Caracterización de Micropartículas derivadas de sangre en un modelo animal de Encefalitis Autoinmune Experimental

Iñaki Osorio Querejeta
Director: David Otaegui Bichot

Biología Molecular y Biomedicina
UC, 2013

Indice

Abstract 4
Antecedentes 5
¿Que es la Esclerosis Múltiple? 5
¿Qué son las MP? 8
¿En que consiste la EAE? 10
Objetivos 12
Metodología 13
Encefalitis Autoinmune Experimental 13
Monitorización de los animales, score. 14
Sacrificio y necropsia 15
Titulación de Ac anti-CD45 16
Extracción de MP y procesamiento para su análisis. 17
Estrategia de ventana 18
Análisis estadístico 19
Estudio de la anatomía patológica, procesamiento de las muestras 20
Resultados 21
Discusión 25
Conclusiones 28
Anexo 29
Bibliografía 30

Abstract

Microparticles (MP) are membrane fragments shed by activated cells after a variety of stimuli such as stress or inflammatory processes. Apparently they play a role in extracellular communication with no direct contact. They also have been shown to contain genetic material, mainly RNA and miRNA, that produces genotypic modifications in the target cell. Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS) characterized by myelin loss, axonal injury and progressive neurological dysfunction. There are studies that shown an increase of MP in MS patients in relapse compare to remission. MP has been postulated to be an interesting biomarker for monitoring, diagnosis and prognosis of autoimmune diseases such as MS. Experimental Autoimmune Encephalitis (EAE) is the murine model of the disease that reproduces the pathology of MS.

The aim of the study was to analyse the leukocyte-derived MP (CD45+ MP) in peripheral blood from EAE and healthy mice.

We performed three mice groups: EAE (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein [MOG] model), immunized (only adjuvant without MOG) and control group. The animals were monitored daily with weight and score. The sacrifice was carried out under inhaled anaesthesia and through hearth exsanguination in the 30th day post immunization. We used flow cytometry to analyse MP levels.

EAE and immunized groups revealed similar CD45+ MP percentages (35.6% and 35.9% respectively). However a lower percentage (15.0%) was found in the control group.

We propose EAE model as a plausible animal experimental model to investigate MP. Our hypothesis is that the similar MP levels in EAE and immunized groups may be due to migration of leucocytes through the blood brain barrier (BBB) into the CNS in EAE group, and finally a lower count of leucocyte-derived (CD45+) MP in peripheral blood. Leucocytes from the immunized group are not reduced in number as they do not migrate through an intact BBB. Cerebral spinal fluid studies are mandatory to confirm a probable higher MP level in EAE group than immunized group.

Antecedentes

¿Que es la Esclerosis Múltiple?

La esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante de origen autoinmune que afecta al Sistema Nervioso Central (SNC) en la cual se dan fenómenos de deterioro gradual y progresivo por el daño axonal asociado que llevan a una discapacidad progresiva del paciente.

Se calcula que cerca de 2 millones de personas en el mundo están afectadas por la enfermedad [1], aproximadamente 46.000 individuos en España [2] y se estima que alrededor de 2000 a nivel de Euskadi. En términos generales su prevalencia se cifra en 1 por 1000 habitantes y su incidencia en 3/100.000/año [3]. Durante el último siglo las mujeres han aumentado su riesgo de sufrir EM hasta el doble con respecto a los hombres. Se postula que este aumento puede deberse a efectos hormonales o ambientales. La EM es una enfermedad crónica con un alto coste sanitario y social ya que es la primera causa de discapacidad no traumática en España, afectando principalmente a personas de entre 20 y 50 años.

Las causas de esta enfermedad compleja son todavía una incógnita, aunque se establece que están involucrados factores genéticos, epigenéticos y ambientales (Fig. 1). Los casos de agregados familiares y los estudios epidemiológicos en gemelos y en pacientes próximos demuestran claramente un componente hereditario en esta enfermedad, sin un patrón de herencia claro. Estudios de GWAS (Genome-Wide Association Study) en pacientes de EM y en controles, han permitido encontrar SNPs que parecen indicar la presencia de más de 20 genes relacionados con la enfermedad [4].

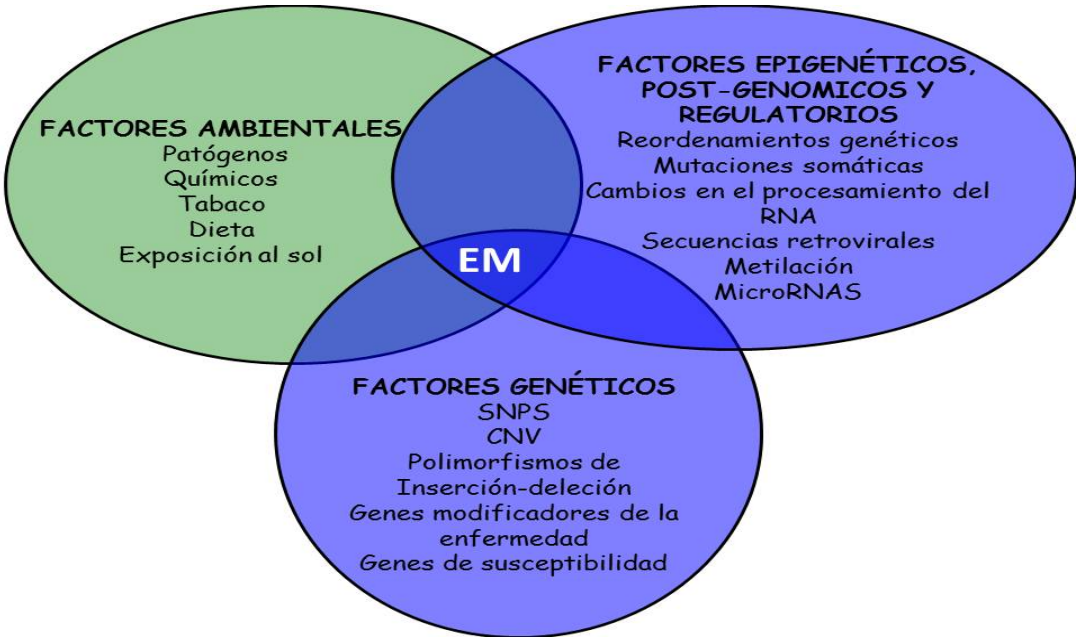


Figura 1: Muestra los distintos factores que parecen estar involucrados en la enfermedad

El curso clínico de la enfermedad es muy variable, lo que dificulta establecer un pronóstico para cada caso individual. Según el tipo de evolución, la enfermedad puede ser (Fig. 2):

- Remitente-recurrente (EMRR) que se caracteriza por la aparición, relativamente aguda, de una disfunción neurológica de cualquier estructura del SNC, definida como brote. Este brote dura unos días tras lo cual se da una recuperación espontanea de los síntomas, denominada fase de remisión. Esta remisión puede ser parcial (80-85%) o completa (EM benigna) en función del grado y cantidad de daño causado a la mielina y al axón y de la capacidad de respuesta de cada individuo. Después del proceso de brote se produce un proceso de remielinización de la zona atacada como respuesta del propio organismo. Este proceso ocurre en las fases tempranas de la enfermedad pero va disminuyendo con la evolución de la enfermedad, hasta desembocar en un estadio crónico de la enfermedad (EMSP).
- Secundariamente progresiva (EMSP) la cual da lugar a una incapacidad progresiva que se superpone con brotes. El 80-90% de los pacientes desarrollan esta forma de la enfermedad tras dos décadas de evolución de la RR.
- Primariamente progresiva (EMPP) en la que la discapacidad aumenta paulatinamente desde el inicio. Entre un 10 y un 15% de los pacientes padecen este desarrollo clínico.

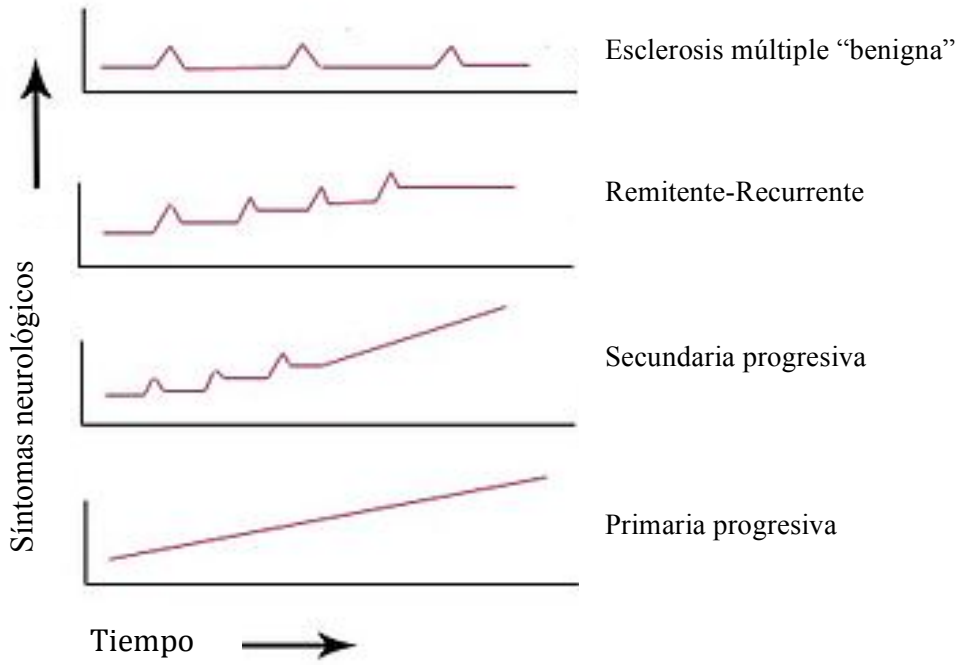


Figura 2: Muestra las diferentes evoluciones clínicas de la enfermedad.

La etiopatología de la EM es compleja. Actualmente se acepta que el inicio de la enfermedad se debe a un proceso inflamatorio mediado por células T autorreactivas. Esto linfocitos T activados atraviesan la barrera hemato-encefálica (BHE) y se dirigen contra antígenos de mielina, provocando, mediante diversos mecanismos inmunológicos, la desmielinización del axón. Como se muestra en la Figura 3, el desarrollo de la enfermedad comienza con un proceso inflamatorio, el cual va provocando un daño axonal con la consiguiente neurodegeneración, que es la causa de la aparición de los síntomas clínicos. Cuando la enfermedad se encuentra en estadios avanzados, la inflamación pierde protagonismo, siendo la neurodegeneración la principal característica de los pacientes.

La terapias actuales se centran en controlar la respuesta inmune que ocurren en los primeros estadios de la enfermedad, mediante el uso de anti-inflamatorios, inmunomoduladores e inmunosupresores. Estos tratamientos alargan el tiempo que transcurren entre un brote y el siguiente, haciendo que la cronificación de la enfermedad sea mas tardía. Sin embargo, no existen tratamientos frente a las fases crónicas de la enfermedad. Un mayor conocimiento de la etiología de la enfermedad debería permitir refinar este tipo de terapias y aumentar las posibilidades de desarrollar nuevas dianas terapéuticas.

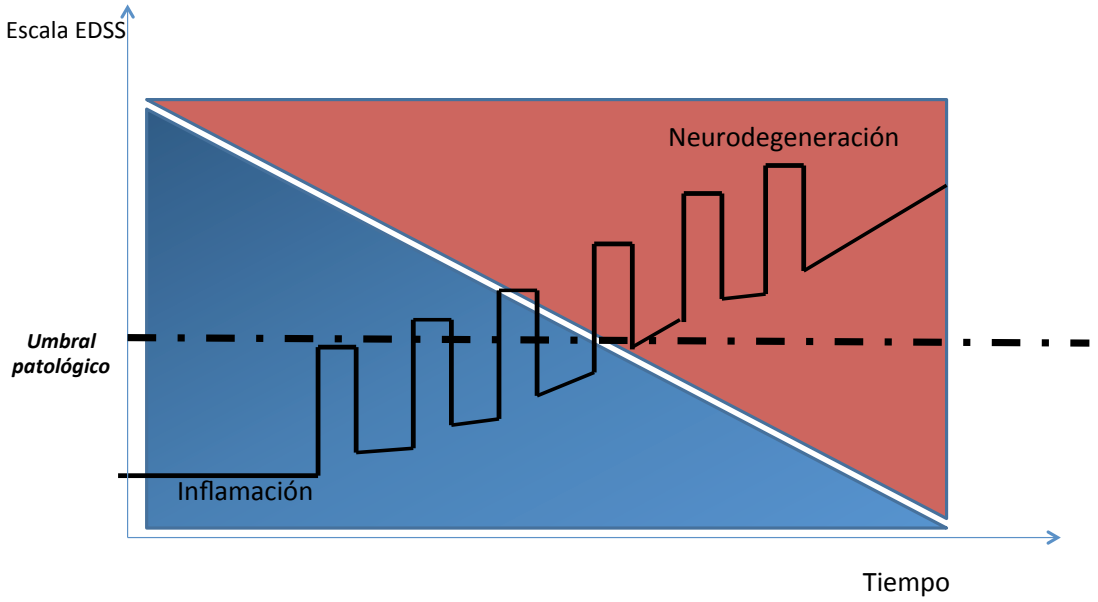


Figura 3: Se muestra la relación entre los procesos inflamatorios y la neurodegeneración en la evolución de la enfermedad. La inflamación es la responsable del inicio de la enfermedad, y la neurodegeneración la responsable de la aparición de los síntomas.

El daño axonal ocurre en estadios tempranos de la enfermedad y gracias a los mecanismos compensatorios del SNC los síntomas comienzan más tarde. Resulta interesante poder diagnosticar tempranamente la enfermedad y poder monitorizarla sin necesidad de la aparición de los síntomas. La sangre ha demostrado ser un buen tejido en el que estudiar las características moleculares de la EM, permitiendo el descubrimiento de potenciales biomarcadores [5, 6]. Esto facilitaría el seguimiento de la enfermedad pudiendo ser una herramienta predictiva de su evolución, permitiendo desarrollar mejores estrategias de tratamiento y mejor seguimientos de estas.

En los últimos años se ha propuesto un nuevo mecanismo de comunicación celular, las micropartículas (MP). Estas partículas están aumentadas en múltiples enfermedades y están relacionadas con la respuesta inmune [7] encontrándose diferencias en su concentración en sangre de pacientes y controles.

Entender el origen de estas micropartículas y comprender la finalidad de las moléculas de RNA que trasportan (mensajero y micros) en la célula receptora, puede ayudar a entender el funcionamiento de la EM y abrir nuevas puertas a modelos de monitorización de los tratamientos y a nuevas dianas terapéuticas.

¿Qué son las MP?

Existen varias formas de denominar las vesículas extracelulares. Una primera división en la nomenclatura se debe a la forma de producción. Aquellas derivadas de cuerpos multivesiculares que tras la fusión de su membrana con la membrana celular se vuelcan al espacio extracelular, se denominan exosomas. Su principal característica es tener menor tamaño y más homogéneo comprendido entre 100 y 300 nanómetros. Por otro lado aquellas denominadas micropartículas, microvesículas o ectosomas provienen de la modificación de la membrana celular tras un estímulo externo o interno que lleva a un reemblandecimiento de la estructura adyacente a la misma permitiendo su evaginación y formación de la vesícula hasta su desprendimiento por completo. Sin embargo la tendencia actual es denominar al conjunto de vesículas (tanto exosomas como MP) como vesículas extracelulares, nombre que actualmente utiliza la reciente formada sociedad internacional de estudio de vesículas extracelulares (Fig. 4).

Las MP son pequeñas vesículas con un tamaño menor a 1µm, que se forman mediante evaginación de las membranas celulares. Son liberadas durante el estrés, la estimulación o la activación celular. Estas MP juegan un papel importante en la comunicación celular [8]. Se han estudiado MP liberadas por diferentes tipos celulares, las cuales contienen en su membrana

marcadores de su origen celular. Estas portan en su interior proteínas y material genético como mRNA o miRNA o DNA, que producen modificaciones en la célula diana[8].

Entre otras funciones, están implicadas en la presentación antigénica a las células T, la activación, inhibición y diferenciación celular, la inducción de la apoptosis, la diferenciación de monocitos y la estimulación de la actividad reguladora de células $CD4^+$ [9].

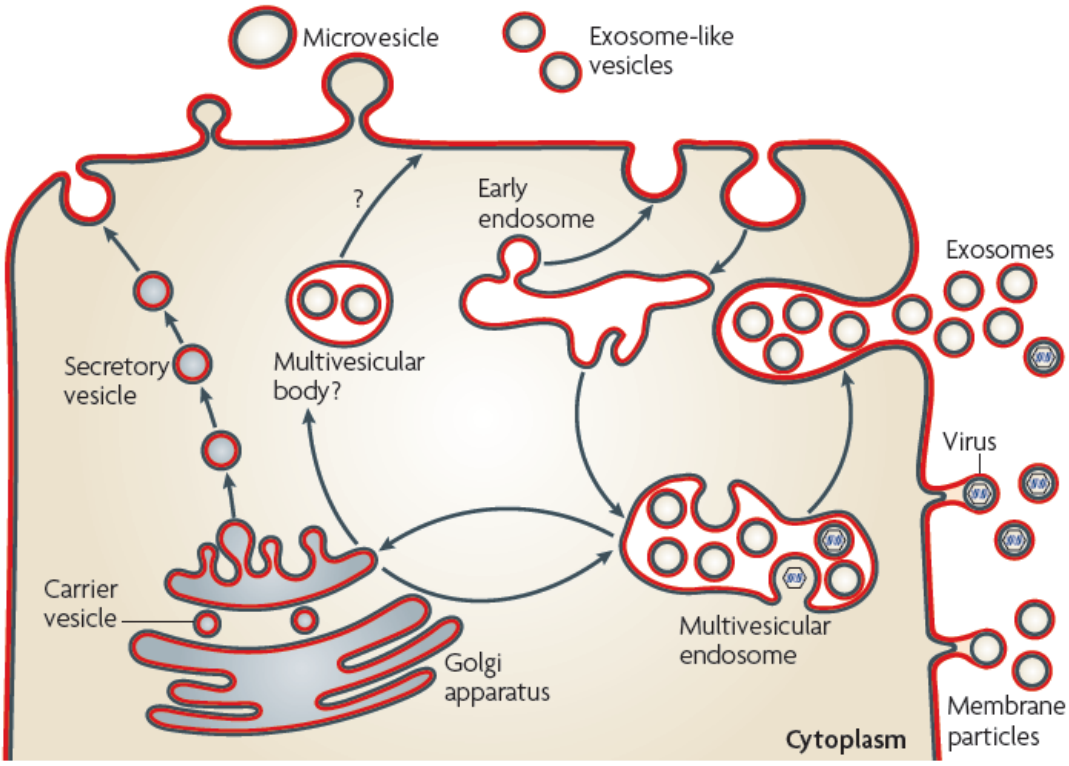


Figura 4: Se muestran los distintos tipos de microvesículas y las diferentes formas de liberación de las mismas.

Existen niveles elevados de estas MP en el embarazo [10] o en enfermedades con un componente inmune como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso, el síndrome de Sjögren o la EM [11, 12] además de otras como el cáncer [13] o enfermedades cardiacas [14]. Se han propuesto las MP como buenos indicadores del estado de inflamación[7] y se piensa que podrían ser buenos marcadores del estado de la enfermedad. Se están investigando en busca de MP especificas de cada enfermedad, de tal forma que permitan la monitorización de la misma.

Más concretamente, durante el desarrollo de la EM, se ha observado un aumento del número de MP de diferentes orígenes celulares, como de la microglía [15], endoteliales [16] o de origen plaquetario[17], durante los periodos de brote frente al estado de remisión. La detección de las MP en fluidos biológicos como el líquido cefalorraquídeo (LCR) o la sangre y su análisis, podrían mejorar la comprensión de la enfermedad y ser una herramienta muy útil en la predicción, diagnostico, pronostico y seguimiento de la enfermedad.

¿En que consiste la EAE?

La EAE es una enfermedad inflamatoria del SNC, mediada por células T $CD4^+$, ampliamente utilizada en investigación para el estudio de la EM. De hecho es el modelo animal más empleado en el estudio de la inflamación cerebral.

En la EAE se induce una respuesta autoinmune mediada por linfocitos T, mediante la inmunización de animales genéticamente susceptibles con antígenos del sistema nervioso (en general antígenos de la mielina). Para reforzar la respuesta inmune se inyecta junto con el antígeno, Adyuvante Completo de Freund, *Mycobacterium tuberculosis* y toxina *pertussis*. Según la cepa de ratón empleado, el antígeno y protocolo de inmunización se obtienen diferentes cursos clínicos, lesiones histológicas y mecanismos participantes (Tabla 1)

Animal	**Cepa**	**Antígeno**	**Modelo de EAE**
Ratón	SJL/J	$PLP_{139-151}$	EAE remitente recurrente severa
		MBP_{84-104}	EAE remitente recurrente moderada
	C57BL/6	MBP_{84-104}	EAE monofásica crónica
		MOG_{35-55}	EAE crónica moderada
	B10.PL	MBP_{Ac-11}	EAE monofásica moderada
	B10.S	MBP_{87-106}	EAE monofásica moderada

Tabla 1: Posibles modelos de EAE en ratón en función de la cepa y antígeno utilizados

Esta inmunización desencadena una respuesta inmunitaria que dará lugar a la aparición de células T autorreactivas activadas que proliferan en los órganos linfoides secundarios. La fase efectora se caracteriza por la extravasación de linfocitos T a través de la barrera hematoencefálica (BHE) hacia el SNC, como de monocitos/macrófagos periféricos atraídos por quimiocinas y citocinas liberadas por células T especificas de mielina. La activación de la capacidad fagocítica no solo de los monocitos/macrófagos infiltrados, sino también de la microglía residente en el SNC esta implicada en la desmielinización de los tractos axonales.

Tanto la EAE como la EM presenta una histopatología similar, además de implicar a los linfocitos T como los mediadores inmunes clave, lo que hace que la EAE sea uno de los

modelos mas utilizados para el estudio de la EM. Sin embargo, las diferencias moleculares y patológicas que subyacen en las variantes de EAE no son bien conocidas [18].

Objetivos

Las MP están relacionadas con procesos inflamatorios [19]. A su vez la EM, tiene un componente inmunológico muy importante. La EAE reproduce muchos de los procesos que ocurren en la enfermedad siendo los leucocitos (CD45+) los responsables del daño axonal en el animal. En este sentido esperaríamos ver una relación entre la EAE y la elevación de las MP totales y derivadas de leucocitos (CD45+) en sangre de los animales, debido a la respuesta inmune especifica frente a la mielina que se genera. Esta relación no debería de existir en animales en los que el SI se activa de forma inespecífica.

La caracterización de la relación existente entre el modelo EAE y las MP derivadas de leucocitos, puede aportar información sobre el papel que desempeñan estas en el proceso inflamatorio y autoinmune y por tanto abrir nuevas vías de estudio en la esclerosis múltiple para poder comprender de una manera mas clara los mecanismos involucrados en la enfermedad.

Por ello se quiere:

- Caracterizar la concentración de MP totales en sangre en el modelo EAE.
- Caracterizar la concentración MP de origen leucocitario (CD45+) en el modelo EAE.

Metodología

Encefalitis Autoinmune Experimental

Se desarrolla un modelo animal de EM denominado EAE. Es un modelo crónico moderado en el que la enfermedad comienza a desarrollarse entre los 7 y 14 días post inmunización (dpi). Este modelo nos permitirá que todos los animales estén enfermos al termino final del estudio. Se utilizan 12 ratones hembra de 8 semanas de edad de la cepa C57BL/6. Antes de comenzar con los procedimientos, los animales pasan 7 días en cuarentena en las instalaciones del animalario del Instituto Biodonostia. Una vez pasado este periodo, los animales son acostumbrados a su manejo por parte del investigador.

Los animales permanecen alojados durante todo el estudio en grupos de 4, en jaulas de polipropileno transparente con acceso libre a comida y agua, en ambiente controlado de luz/oscuridad (ciclos de 12h), aire acondicionado y 18-20º C de temperatura, cumpliendo la normativa legal al respecto (Real Decreto 53/2013).

Tras este periodo se procede a la inmunización de los animales. Se prepara por animal una emulsión que contiene con 1mg de *Mycobacterium tuberculosis* diluida en100µl de adjuvante completo de Freud y 150µg de MOG_{35-55} diluido en 100µl de PBS. La mezcla de estas dos diluciones se realiza con la ayuda de dos jeringuillas unidas entre si por una llave de dos vías. Se presionan ambos embolos de las jeringuillas de forma alterna hasta formar un emulsionado espeso de color blanco. El emulsionado se prepara el mismo día de la inmunización y se guarda en hielo hasta el momento de la inmunización, para evitar que solidifique y bloquee la jeringuilla.

Para realizar la inmunización, se duerme al animal mediante anestesia inhalatoria con isofluorano al 4%. Se procede, bajo anestesia, a depilar los flancos traseros del animal y se le pincha la emulsión subdermicamente en ambas patas formando una bolita con una aguja de 25G (100µl por pata). Cuando el animal despierta se le inyecta intraperitonealmente 100µl de toxina pertussis. Tras 48 horas se vuelve a pinchar, sin anestesia, intraperitonealmente 100µl de toxina pertussis.

El protocolo para la obtención de animales en los que se da una respuesta inmune inespecífica se realiza el mismo protocolo que en el grupo EAE, a excepción de añadir MOG_{35-55} en el emulsionado. En el grupo control no se realiza ningún tipo de intervención.

La n para cada grupo es de 4 contando con un total de 12 animales.

Monitorización de los animales, score.

Los animales son chipados el día de la inmunización para poder ser monitorizados diariamente analizando el peso y el score del animal. El score se evalúa en una escala del 0 al 6 siendo 0 la ausencia de signos neurológicos y 6 un estado moribundo o muerto (Tabla 2).

La monitorización se realiza por dos operadores "a ciego". Es importante realizar las mediciones a horas similares para evitar variaciones debido a su ciclo diario. El peso es un factor importante a tener en cuenta ya que es un buen indicador de la evolución de la enfermedad [20].

El animal comenzara con los primeros síntomas de la enfermedad entre el día 7 y 14 post-inmunización. Una vez comienza con los síntomas, el animal empeorara progresivamente, mostrando un patrón crónico de enfermedad. Si algún animal supera un score de 5 antes del termino del estudio, será sacrificado para evitar su sufrimiento.

Puntuación	Signos	Descripción
0	Comportamiento normal	No presenta signos neurológicos.
1	Flacidez distal en la cola	La parte distal de la cola está flácida y caída.
1.5	Flacidez total de la cola	Toda la cola está flácida y caída.
2	Reflejo de enderezamiento	Es capaz de engancharse a la reja con las patas posteriores pero no muestra fluidez en los movimientos y empieza a mostrar signos de debilidad.
2.5	Sin reflejo de enderezamiento	Ya no es capaz de quedarse enganchado con las patas posteriores a la reja. Al andar muestra movimientos no fluidos y ladeados.
3	Ataxia media	Empieza a arrastrar las patas posteriores manteniendo la capacidad de desplazarse.
3.5	Ataxia severa	Arrastra las 2 patas y tiene dificultades para desplazarse pero sus patas posteriores muestran un movimiento remanente.
4	Parálisis parcial	El ratón tiene paralizada toda la región posterior. Es incapaz de poder impulsarse con las patas traseras ya que las arrastra.
5	Paralasis completa	El ratón no puede mover ninguna de las patas, The mouse can't move its legs at all, se ve más delgado y demacrado.
6	Moribundo/ Muerto	

Tabla 2: muestra los signos y la descripción de los score con los que se evalúa a los animales.

Sacrificio y necropsia

Transcurridos 30 días tras la inmunización se procederá a el sacrificio de los animales. El sacrificio se realiza el día 30 ya que los animales se encontraran en un plato de la enfermedad. En el caso de que un animal superase durante el periodo de estudio un score de 5 se sacrificara al animal siguiendo el mismo protocolo que explicamos a continuación, en el momento de superar este nivel de discapacidad.

El sacrificio tendrá lugar en una campana de extracción bajo anestesia general inhalatoria. Los animales son anestesiados con isofluorano (4%) en cámara tras lo cual son colocados en decúbito dorsal y fijados con cinta autoadhesiva de manera que queden inmovilizados. Se les mantiene la anestesia a través de una boquilla durante todo el procedimiento (Fig. 5, A) El sacrificio se realiza mediante exanguinación cardíaca. Se palpa la cavidad torácica en busca de la posición del corazón. Con la ayuda de una aguja de 25G y una jeringuilla de 5ml se realiza la exanguinación cardiaca del animal. (Fig. 5, B) Es muy importante embeber tanto la jeringuilla como la aguja en citrato, para evitar que la sangre se coagule durante la extracción. Una vez se extrae la sangre, se retira la aguja para evitar la lisis celular, se pasa a un tubo de citrato para su posterior procesamiento y análisis de MP. Tras la exanguinación se realiza un pool de la sangre de los animales de cada grupo, debido a que el volumen de sangre que extraemos es insuficiente para realizar el análisis de MP en cada animal (700-800µl/animal).

Tras el sacrificio se procede a realizar la perfusión del animal para su posterior estudio histopatológico. Se le realiza una laparotomía ventral medial. Posteriormente se ejecuta una incisión en la aurícula derecha.(Fig. 5, C) Con la ayuda de una palomilla se inyecta PBS a través del ventrículo izquierdo, para lavar el sistema circulatorio del animal (Fig. 5, D) Se aprecia una decoloración del hígado cuando el lavado se ha realizado correctamente. Posteriormente se procede a su perfusión vascular con paraformaldehído al 4% para la fijación completa de todos los órganos. Se observa que el animal realiza movimientos con sus extremidades y las vísceras se desplazan, indicando que la perfusión se esta realizando correctamente. Se extraen cerebro y médula espinal, que se mantienen durante 24 horas sumergidos en paraformaldehído al 4%, antes de su inclusión en parafina (el protocolo de preparación de paraformaldehído se muestra en el Anexo). Debido a la toxicidad del paraformaldehído todo este procedimiento se realiza en campana.

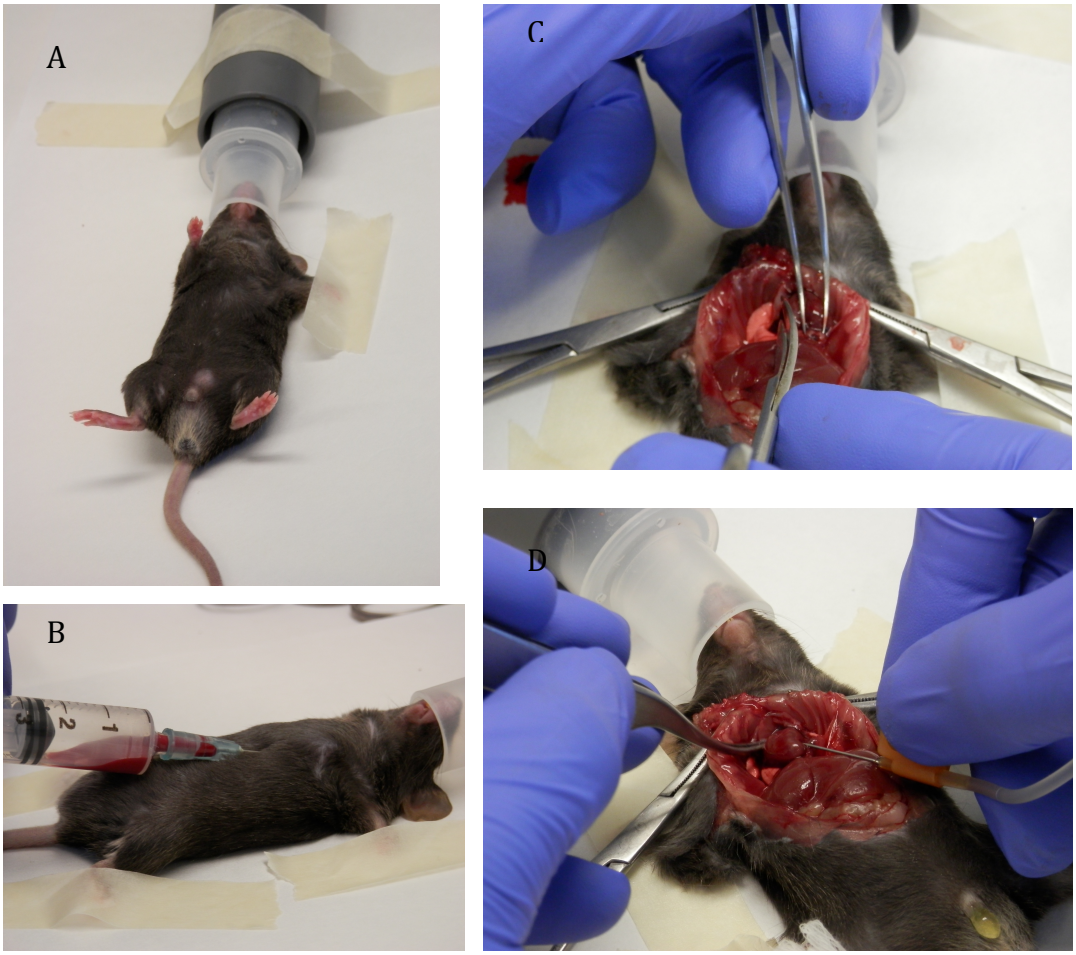


Figura 5: Se muestran 4 pasos del sacrificio. (A) Se coloca a los animales en decúbito dorsal, bajo anestesia inhalatoria con isofluorano al 4% y se le fijan las patas con cinta autoadhesiva. (B) Sacrificio mediante exanguinación cardíaca. (C) Se realiza una incisión en la aurícula derecha para posteriormente proceder con la perfusión. (D) Se pincha el ventrículo izquierdo con una palomilla por la cual introduciremos en el sistema circulatorio del animal el PBS y posteriormente el paraformaldehído.

Titulación de Ac anti-CD45

Es importante antes de realizar el análisis de MP, saber que cantidad de anticuerpo anti-CD45 se requiere para que el marcaje de las MP sea correcto. Para ello se extrae sangre de ratón mediante exanguinación cardíaca. Colocamos en 4 tubos 100µl de esta sangre por tubo a los que se añaden diferentes volúmenes de Ac (2, 4, 8 y 16µl). Se incuba durante 20 minutos en oscuridad, tras lo cual se procede a lisar los eritrocitos. Para ello se añade un lisante específico y se incuba durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugan los 4 tubos a 300g, 5´y temperatura ambiente. Se decanta el sobrenadante y se agregan 2ml de PBS para realizar un lavado. Se aplica un vortex suave y se realiza un segundo lavado. Por ultimo se resuspende en 0,3ml de PBS y se procede a la lectura de las muestra en el citómetro de flujo.

Una vez analizadas las diferentes concentraciones, escogemos la mínima concentración que permite de discernir entre los eventos positivos y negativos.

Extracción de MP y procesamiento para su análisis.

La sangre se encuentra en tubos de citrato. Para la extracción de las MP primeramente se realiza una centrifugación a 2500g 15´ a temperatura ambiente. Se pipetea el sobrenadante, al que se denomina plasma pobre en plaquetas (PPP) dejando aproximadamente 1cm sobre la segunda fase (Fig. 6). Este sobrenadante se pasa a un tubo de polipropileno y se centrifuga a 13000g 2´ a temperatura ambiente. Se vuelve a recoger el sobrenadante (plasma libre de plaquetas o PFP del ingles *platelet free plasma*) y se alícuota en tubos con un volumen en cada uno de 500µl. Una vez en este paso se congela la muestra a -80ºC para un posterior procesamiento y análisis en el citómetro de flujo.

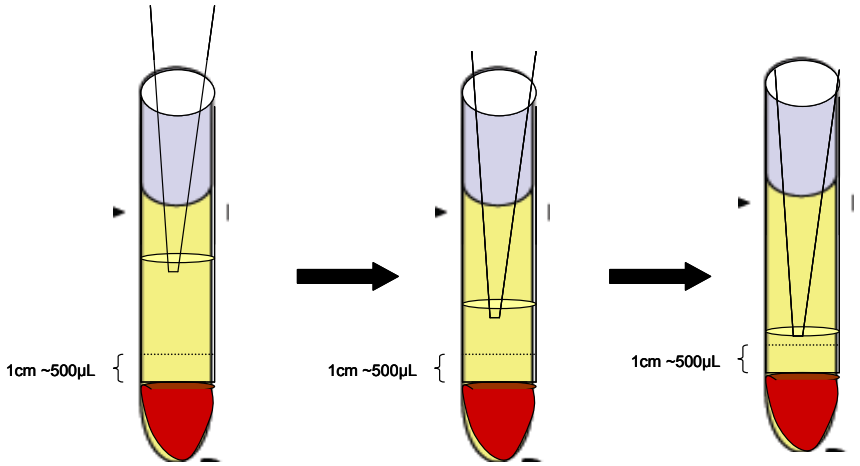


Figura 6: protocolo de obtención del plasma pobre en plaquetas (PPP)

El día que se proceda al análisis por citometría de flujo se deben primeramente descongelar las muestras en hielo (aproximadamente 1 hora). De los 2-3 viales que se han descongelado, se unifican en uno de los tubos de manera que el volumen final sea de 1ml. El sobrenadante se vuelve a congelar. Se centrifuga la muestra a temperatura ambiente, durante 20 minutos a 20.000g. Tras la centrifugación se retira el sobrenadante y nos quedamos con el pellet donde se encuentras las MP. Es posible que en algunas muestras aparezca una capa blanquecina, una capa de lípidos, que hay que tratar de

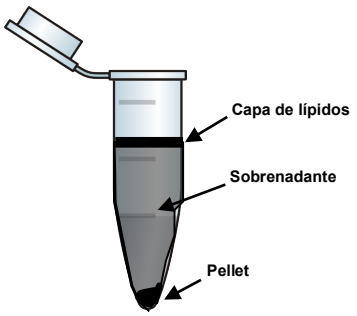


Figura 7: se muestran las fases de la centrifugación, donde se encuentra el pellet de MP.

eliminar a la hora de retirar el sobrenadante (Fig. 7). Retiramos 880 µl del sobrenadante con cuidado de no tocar el pellet. Posteriormente se resuspende el pellet en 100 µl de PBS comercial que previamente a sido filtrado 2 veces con la ayuda de una jeringuilla y un filtro. Este PBS será el que se utilice durante todo el protocolo. Se le aplica un vortex a la muestra y se pasan 40µl de la muestra a un tubo, donde añadiremos 4µl de anticuerpo monoclonal anti-CD45+ marcado con ficoeritrina (PE). Estos se unirán a las MP que posean en su membrana moléculas CD45 permitiéndonos discernir las MP de origen leucocitario de las que no lo son. Esto es así ya que CD45 es un marcador pan-leucocitario y no se encuentra en ningún otro tipo celular.
Tras añadir 4µl del anticuerpo se le aplica un vortex a la muestra y se incuba 20minutos en oscuridad y temperatura ambiente.

Tras realizar el marcaje se procede a lavar las muestras. Para ello se añade 300µl de PBS filtrado a cada tubo y se aplica un vortex. Se centrifuga 20minutos a 20.000g y temperatura ambiente. Se aspiran los 300µl con mucho cuidado de no tocar el pellet. Se resuspende el pellet en 300µl de PBS filtrado mediante vortex.

Añadimos la muestra a tubos Trucount™ que nos permitirán estandarizar la adquisición de todas las muestras y procedemos a analizar las muestras en el citómetro de flujo.

Estrategia de ventana

El análisis de las muestras se realiza mediante citometría de flujo. Es importante definir correctamente la ventana en la cual consideraremos los eventos como MP para conseguir un análisis correcto de los datos.
El limite superior se define adquiriendo con el citómetro bolas de látex y poliestireno de 1µm de tamaño, que es el tamaño máximo de las MP. El limite inferior lo delimita el ruido de fondo que crea el PBS filtrado cuando es adquirimos. Este PBS ha sido filtrado dos veces con un filtro de 0,22µm (Fig. 8). Además creamos un limite superior con el ruido que crea el anticuerpo marcado cuando se adquiere disuelto en PBS. Todos los eventos que se encuentren dentro de este limite son considerados MP. Las MP que se encuentren dentro de esta ventana las denominamos MP totales.

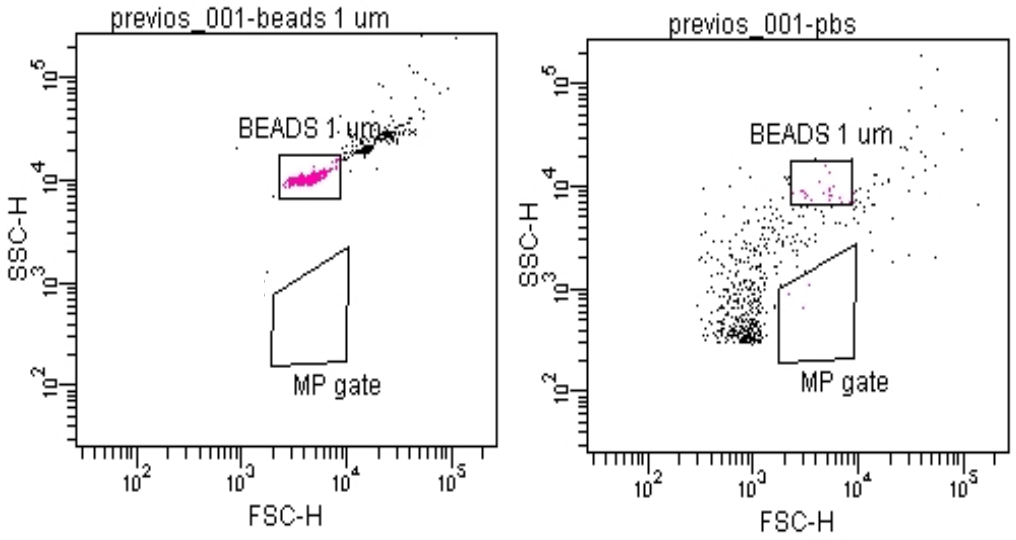


Figura 8: Se muestra como se delimita la ventana de las MP. En la imagen de la izquierda se ve la ventana de las Beads (bolas) de 1 µm. Se aprecia un efecto espejo, característico de la citometría de flujo. En la imagen de la derecha podemos observar el ruido de fondo que crea el PBS y delimita la parte inferior.

Sabemos que no estamos analizando exosomas puesto que estos tienen un tamaño similar al que crea el ruido de fondo del citómetro. Además durante las centrifugaciones realizadas para la obtención de las MP, eliminamos los exosomas, ya que estos se encuentran en el sobrenadante de la ultima centrifugación, mientras que nosotros nos quedamos con el pellet.

Una vez definida la ventana de las MP, tenemos que seleccionar las MP CD45+. Para ello realizamos una nueva ventana en la cual solo aparecerán los eventos que hemos definido como MP. En el eje X colocamos PE (fico-eritrina) ya que los anticuerpos anti-CD45 que hemos usado para marcar son PE positivos. Todos los eventos que se sitúen a la derecha serán CD45+ y los que quedan a la izquierda serán CD45-.

Como estandarización para la adquisición se utilizan tubos Trucount™. Para ello colocamos la muestra en los tubos Trucount™. En estos tubos están presentes una cantidad conocida de bolitas. Cuando se adquieren 3000 eventos en la ventana de Trucount™, se detiene la adquisición. Posteriormente hay que reajustar los datos obtenidos aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{eventos\ en\ la\ ventada\ de\ MP}{eventos\ en\ la\ ventana\ Trucount} \times \frac{numero\ de\ bolas\ por\ tubo}{volumen\ analizado} = contaje\ de\ MP\ absoluto \Big/ \mu l\ de\ plasma\ \square ibre\ de\ plaquetas$$

Análisis estadístico

Debido a la cantidad de sangre que extraemos de cada animal, necesitamos realizar un pool de la sangre por cada grupo. Por ello solo analizamos una muestra por cada grupo en el citómetro y esto no nos permite realizar un análisis estadístico.

Estudio de la anatomía patológica, procesamiento de las muestras

Tras la perfusión del animal, se mantiene la muestra sumergida en paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Posteriormente se lleva la muestra al servicio de anatomía patológica donde se incluye la muestra en parafina. Estas muestras son almacenadas hasta su análisis histológico. Este estudio nos permitirá analizar la existencia o no de lesiones desmielinizantes y la presencia o ausencia de infiltrados leucocitarios en el SNC de los animales.

Resultados

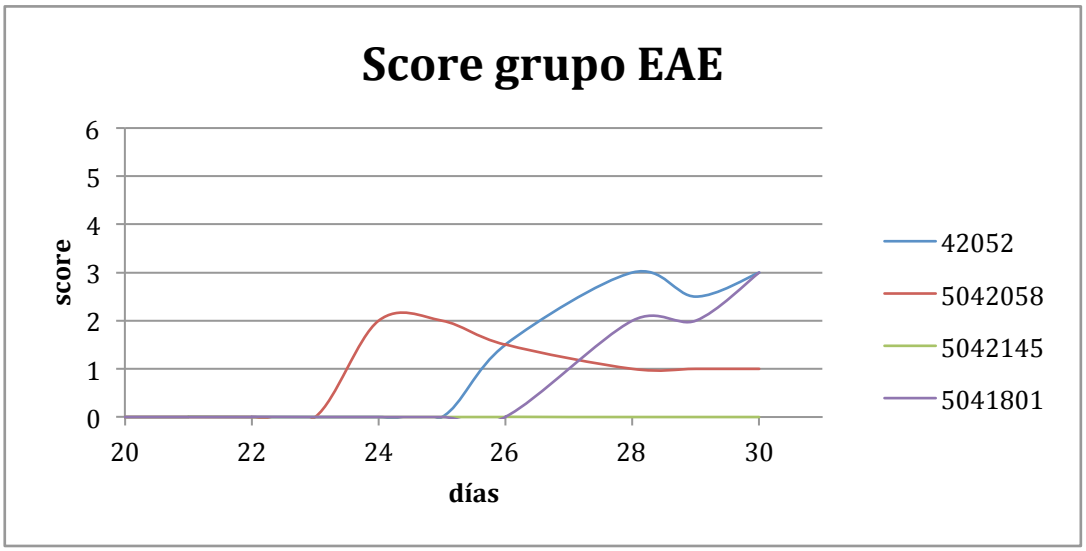
A cada animal se le extrae, mediante exanguinación cardíaca aproximadamente 0,8ml de sangre. Este volumen es insuficiente para realizar un análisis de MP.

No podemos realizar un test estadístico debido a que tras realizar el pool de la sangre, la n por grupo es de uno.

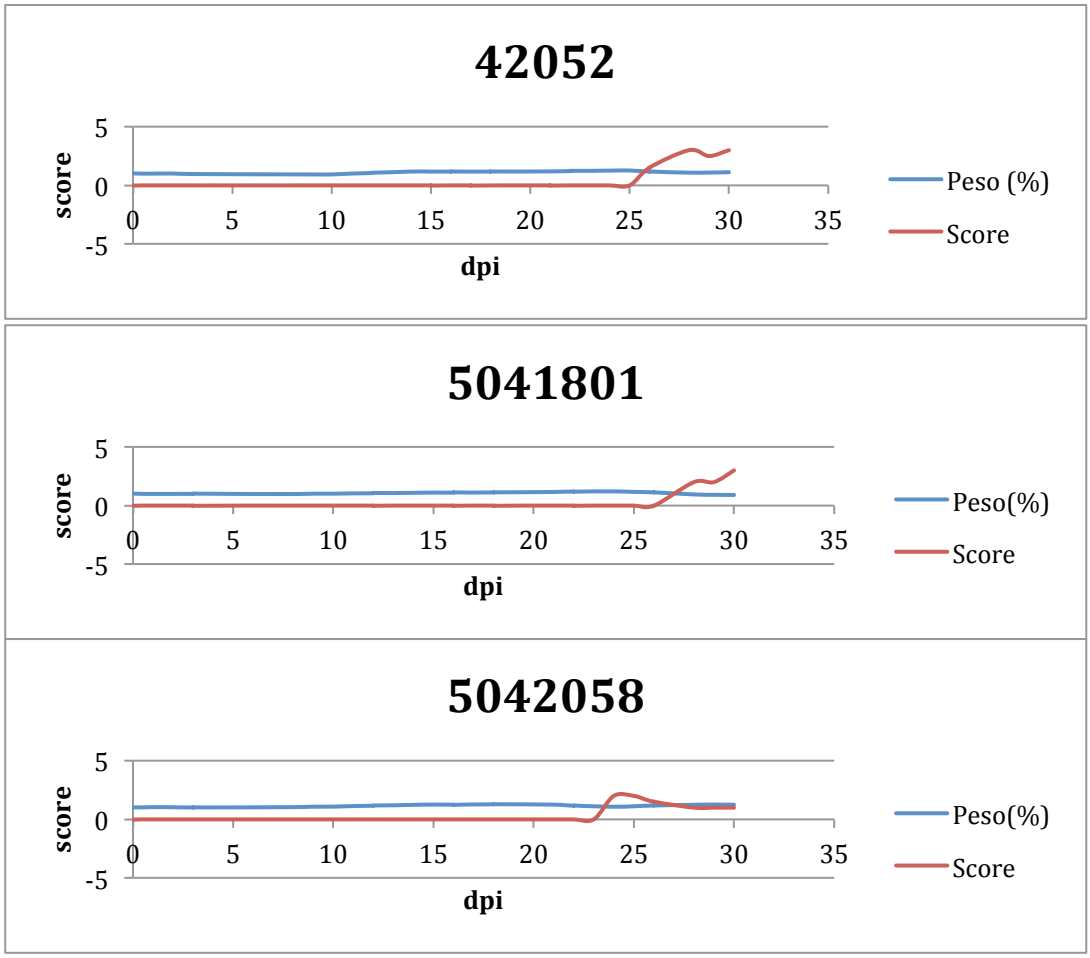
Respecto del modelo animal, ni el grupo control ni el grupo inmunizados muestran síntomas clínicos ni variaciones en el peso. En el grupo EAE, tres de los 4 animales (75%) desarrollan la enfermedad. El animal que no desarrolla la enfermedad queda excluido del estudio. Según la bibliografía los síntomas comienzan a los 7-14 dpi, pero nuestros animales lo hacen entre los 24 y 26dpi. (Grafica 1)

En estos tres animales enfermos, se ha observado una correlación negativa entre el peso y el valor de score. (Grafica 2)

La_figura 9 muestra los Dot blot obtenidos de la lectura de eventos de los tres grupos. Tras analizar estas graficas observamos que las MP derivadas de leucocitos (CD45+), presenta un mayor número de enventos en los grupos EAE e inmunizados frente a los controles (grafica 3, A). Las MP totales no muestran el mismo patrón y estan más elevadas en los grupos inmunizados y controles con respecto del grupo EAE (grafica 3, B).



Grafica 1: se muestran los scores de los animales del grupo EAE. Tres de los 4 animales de este grupo desarrollan la enfermedad entre los días 23 y 26 post inmunización.



Grafica 2: Se muestra la relación existente entre el score y el peso de los tres animales, por separado, que han enfermado del grupo EAE.

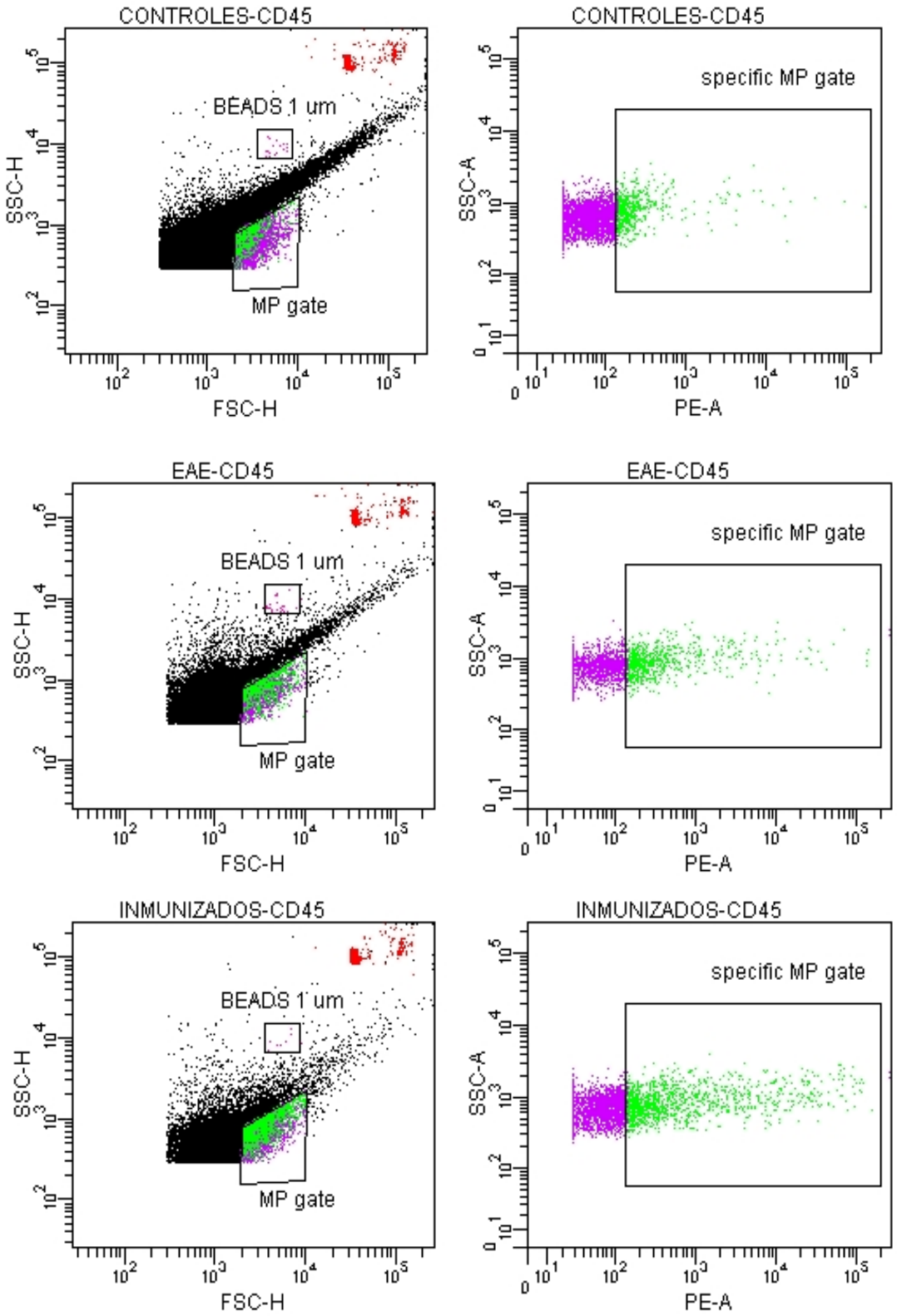
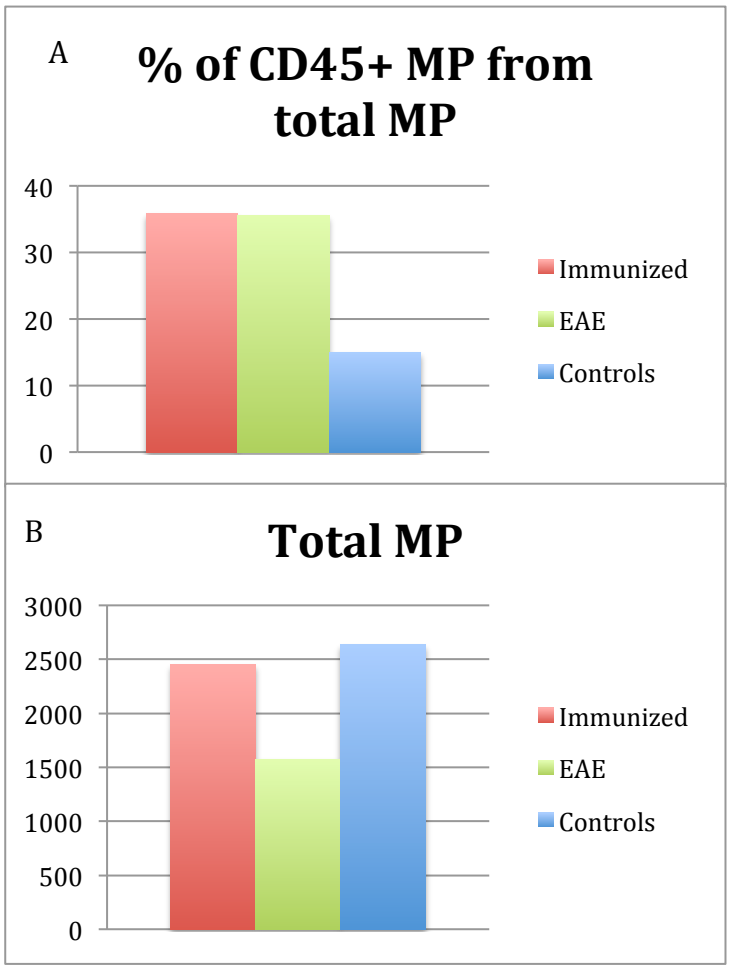


Figura 9: Dot plot de los tres grupos tras la adquisición de la muestran por el citómetro de flujo. Las imágenes de la izquierda muestran todos los eventos y la ventana la cual consideramos que son MP (MP gate). Las imágenes de la derecha muestran del total de MP cuales son CD45+ (eventos verdes, specific MP gate) y cuales no lo son (eventos rosas).



Grafica 3: Se muestran los resultados del análisis de MP mediante citometría de flujo. (A) El porcentaje de MP CD45+ en e grupo inmunizados y EAE es similar, mientras que el de controles es menor. (B) Se muestran el numero total de eventos de las MP totales estandarizado mediante la adquisición con tubos Trucount™. Se observa que los controles y los Inmunizados tienen valores totales de MP similares, mientras que el grupo EAE tiene valores menores.

Discusión

La EAE puede mostrar diferentes patrones patológicos en función del péptido y cepa de animal utilizados. En este caso hemos optado por un modelo crónico moderado. Queríamos estudiar la concentración de MP derivadas de leucocitos durante un proceso inflamatorio especifico frente a la mielina, como se da en este modelo, y compararlo con un proceso inflamatorio inespecífico (grupo inmunizados) y controles. En el modelo crónico todos los animales se encontrarían en procesos inflamatorios similares a la hora del sacrificio. Un modelo agudo, presentaría variabilidad en los síntomas pudiendo encontrarse animales en estadio de brote frente a otros en remisión produciendo variaciones a la hora de estudiar las MP por lo que no resultaría bueno para este estudio.

Uno de los animales del grupo EAE no ha desarrollado la enfermedad. Los que lo hacen comienzan con los síntomas en un rango de 4 días. Ambos sucesos están descritos en la bibliografía y se explican como variabilidad. De hecho se conoce que los factores ambientales influyen en el desarrollo del modelo, como puede ser la estación del año en la que se realiza el modelos, afectando a la susceptibilidad de la enfermedad [20].

Esta descrita la aparición de los síntomas en este modelo entre 7 y 14 dpi [21]. Sin embargo los animales que desarrollan la enfermedad lo hacen entre los días 23 y 26 post inmunización. El animalario del Instituto Biodonostia cuenta con una amplia y moderna tecnología para que los animales se encuentran en estado de asepsia (sistemas de filtración de aire individualizado para cada caja de animales, administración de comida y agua estériles o manipulación de los animales bajo campana). Esto provoca que los animales no estén expuestos a antígenos, haciendo que su SI se encuentre en estado naïve y que no posean células B memoria. En su ausencia, esta descrito que la respuesta frente al antígeno es mas tardía [22]. Esto podría explicar porque nuestros animales comienzan con la clínica 9 días más tarde de lo esperado.

Como ya se ha explicado en la introducción, las MP son liberadas por diferentes tipos celulares durante el estrés, la estimulación o la activación celular. La inflamación es otro proceso que provoca la liberación de MP. En la EAE, se da una inflamación como consecuencia de la respuesta inmune que se genera frente a la vaina de mielina. Los leucocitos, células del sistema inmune, son un factor importante en el desarrollo de este modelo. De ahí el interés de estudiar las MP derivadas de leucocitos en la EAE. Las MP derivadas de leucocitos poseen en su membrana un marcador derivado de estas células (CD45), que permiten caracterizar los procesos inflamatorios que tienen lugar en los animales.

En los controles se observa un menor número de MP CD45+ respecto de los grupos EAE e inmunizados los cuales muestran valores similares. Sin embargo esperaríamos ver valores más elevados en el grupo EAE, como consecuencia de la activación inmune especifica que ocurre en estos animales. En el grupo Inmunizados se produce una activación inmune inespecífica, y cabría pensar que los leucocitos no están tan activos con respecto del grupo EAE. En este modelo se produce un ataque a la mielina que es el causante de la clínica que desarrollan los animales. Para que se produzca este deterioro de la mielina se requiere que los leucocitos migren al SNC atravesando la BHE. Una vez se encuentran en el SNC, donde reconocen a la mielina, se produce un aumento en la liberación de MP, como mecanismo de propagación del estado inflamatorio [15]. Nuestro análisis se ha centrado en las MP presentes en sangre, y no en LCR, por lo que no somos capaces de detectar las MP que han sido liberadas en LCR. Cabría esperar que los niveles de MP CD45+ en sangre en el grupo EAE fuesen similares a los encontrados en el Inmunizados, ya que las células que liberan este tipo de MP, los leucocitos, lo hacen en el SNC, estado presentes en el LCR. Sin embargo en el grupo Inmunizados no se da ninguna migración de los leucocitos hacia el SNC, por lo que todas las MP son liberadas al torrente sanguíneo. Para corroborar esta hipótesis se va a realizar un estudio histopatológico del cerebro y médula en busca de infiltrados leucocitarios.

Las MP totales muestras niveles similares en los grupos inmunizados y controles y menores en el grupo EAE. En un principio esperaríamos ver niveles de MP mayores en el grupo EAE seguido del grupo Inmunizados y por último en los controles, debido a la activación inmune especifica que se da en el grupo EAE. Como hemos explicado antes, las MP son liberadas por muchos tipos celulares como plaquetas, microglía o endotelio entre otros[9]. Se ha descrito que en el análisis de MP puede existir mucha variabilidad en función de parámetros como el estrés o la actividad física del individuo a la hora de realizar la extracción del fluido a analizar. Pensamos que los resultados son diferentes a lo esperado debido a esta variabilidad, que si bien también ocurre a nivel de MP de origen leucocitario (CD45+), pensamos que tiene más influencia en las MP totales ya que existen más tipos celulares que liberan MP y que pueden estar influenciadas por estas variaciones intraindividuales, que únicamente las derivadas de leucocitos. Sin embargo es algo que se escapa del objeto de estudio por lo que no somos capaces de saber porque se dan estos valores.

Una variable a tener en cuenta es la reducida cantidad de sangre que somos capaces de extraer de cada animal, al realizar un pool de las sangres de cada grupo, hemos reducido la n de cada grupo a 1. Esto puede aportar cierta variabilidad a la hora de analizar los datos y puede ser en parte responsable de los resultados no esperados obtenidos.

Debido a que los leucocitos migran hacia el SNC atravesando la BHE, estudiar las MP de LCR nos podría aportar información muy útil sobre los procesos que ocurren en este modelo animal y probablemente el análisis de MP CD45+ correlacionaría mejor con el estado de inflamación que ocurre en el modelo. Por lo tanto la idea de nuestro grupo es dirigir las futuras investigaciones al estudio de MP tanto en sangre como en LCR.

Por otro lado es necesario aumentar el número de animales a estudio para evitar posibles variaciones técnicas y obtener unos datos mas robustos. Además esto nos permitiría realizar un análisis estadístico de los resultados, y ver de esta forma si existen, o no, diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio.

Por último, este estudio se ha centrado en determinar posibles diferencias entre los tres grupos a nivel de las MP derivadas de leucocitos. Evidentemente dentro de los leucocitos existen diversos tipos celulares como lo son las células B, células T o las Natural Killer. Cada uno de estos tipos celulares poseen en su membrana marcadores específicos, además del común de todos, el CD45, lo que nos permitiría analizar el origen de las MP dentro de los subtipos de leucocitos existentes. Esto nos aportaría mayor información sobre el origen de las MP y nos permitiría entender mejor los mecanismos implicados en los procesos patológicos involucrados en el animal, para posteriormente trasladarlos al estudio en pacientes.

Conclusiones

- La metodología utilizada para la obtención de MP es la apropiada en este modelo animal. Sin embargo los resultados muestran que la exanguinación cardiaca de un único animal es insuficiente para llevar a cabo el análisis de las MP y se requiere realizar un pool de sangre.
- La asepsia en la estabulación de los animales parece ser un factor involucrado en el retraso en la aparición de los síntomas clínicos del modelo animal EAE.
- El análisis de MP derivadas de leucocitos (CD45+) en sangre es un marcador de la activación inmune, pero no es capaz de discernir entre el grupo EAE e Inmunizado. Por lo tanto las MP CD45+ en sangre no reflejan el estatus de los animales EAE.
- Las MP totales no muestran el mismo patrón observado en las MP CD45+.
- En futuros experimentos se pretende aumentar la n a estudio, analizar tanto sangre como LCR, y aumentar el número de marcadores a estudiar para así tener una mejor información de los procesos involucrados en la enfermedad.

Anexo

Preparación del formaldehido al 4% en PB 0.1M (con mascara y en campana)

- Se realiza en campana ya que el formaldehido es toxico.
- Paraformaldehido 16gr
- Agua destilada 200ml
- PB 0.2M pH 7.3-7.4 200ml
- Se calientan 100ml de agua a 60ºC y disolvemos 16 gr de paraformaldehído manteniendo la temperatura en un agitador calefactado. Añadir si es necesario 1-2 gotas de hidróxido sódico (NaOH) al 2,5% para su total disolución tras 15 minutos.
- Se filtra con papel de filtro y se completa hasta 200ml con agua destilada y se deja enfriar
- Añadir 200ml de PB 0.2M pH7,3-7,4 **cuando se vaya a usar.**

Preparación de tampón fosfato (PB) 0.2M pH 7,3-7,4

- Fosfato sódico monobásico monohidrato (NaH_2PO_4-H_2O) (65) 6.9g
- Fosfato sódico bibásico dihidrato (Na_2HPO_4-$2H_2O$) 26.7g
- Agua destilada 1l
- Diluir las sales en 800ml y enrasar a 1000ml. Ajustar el pH a 7,3 con NaOH (unas gotas)

Bibliografía

1. Arruti, M., et al., *[Autoimmune hepatitis in a patient with multiple sclerosis under treatment with glatiramer acetate]*. Rev Neurol, 2012. **55**(3): p. 190-2.
2. Múltiple, S.E.d.E. *Esclerosis Múltiple España*. Available from: http://www.esclerosismultiple.com.
3. Confavreux, C. and S. Vukusic, *Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept.* Brain, 2006. **129**(Pt 3): p. 606-16.
4. Ramagopalan, S.V. and D.A. Dyment, *What is Next for the Genetics of Multiple Sclerosis?* Autoimmune Dis, 2011. **2011**: p. 519450.
5. Teunissen, C.E., C. Dijkstra, and C. Polman, *Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis.* Lancet Neurol, 2005. **4**(1): p. 32-41.
6. Dujmovic, I., *Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of neuroaxonal damage in multiple sclerosis.* Mult Scler Int, 2011. **2011**: p. 767083.
7. Thery, C., M. Ostrowski, and E. Segura, *Membrane vesicles as conveyors of immune responses.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(8): p. 581-93.
8. Waldenstrom, A., et al., *Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells.* PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34653.
9. Saenz-Cuesta M, I.H., Muñoz-Culla M, Osorio-Querejeta I, Prada A, Castillo-Triviño T, Sepulveda L, López-Mato P, López de Munain A, Comabella M, Villar LM, Olascoaga J, Otaegui D, *Increaded Microparticles in Multiple SClerosis in a sex-dependent manner*, 2013.
10. Vukusic, S. and C. Confavreux, *Pregnancy and multiple sclerosis: the children of PRIMS.* Clin Neurol Neurosurg, 2006. **108**(3): p. 266-70.
11. Pisetsky, D.S., et al., *Microparticles as mediators and biomarkers of rheumatic disease.* Rheumatology (Oxford), 2012. **51**(10): p. 1737-46.
12. Sellam, J., et al., *Increased levels of circulating microparticles in primary Sjogren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity.* Arthritis Res Ther, 2009. **11**(5): p. R156.
13. Rak, J., *Microparticles in cancer.* Semin Thromb Hemost, 2010. **36**(8): p. 888-906.
14. VanWijk, M.J., et al., *Microparticles in cardiovascular diseases.* Cardiovasc Res, 2003. **59**(2): p. 277-87.
15. Verderio, C., et al., *Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation.* Ann Neurol, 2012. **72**(4): p. 610-24.
16. Minagar, A., et al., *Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis.* Neurology, 2001. **56**(10): p. 1319-24.
17. Sheremata, W.A., et al., *Evidence of platelet activation in multiple sclerosis.* J Neuroinflammation, 2008. **5**: p. 27.
18. Villoslada, P., *Esclerosis Múltiple*. 1 ed2010.
19. Ardoin, S.P., J.C. Shanahan, and D.S. Pisetsky, *The role of microparticles in inflammation and thrombosis.* Scand J Immunol, 2007. **66**(2-3): p. 159-65.
20. Moreno, B., et al., *[Guidelines on the appropriate use of animal models for developing therapies in multiple sclerosis]*. Rev Neurol, 2012. **54**(2): p. 114-24.
21. Racke, M.K., *Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).* Curr Protoc Neurosci, 2001. **Chapter 9**: p. Unit9 7.
22. J, K., *The Immune System in Health and Disease*. 5 ed2007.