



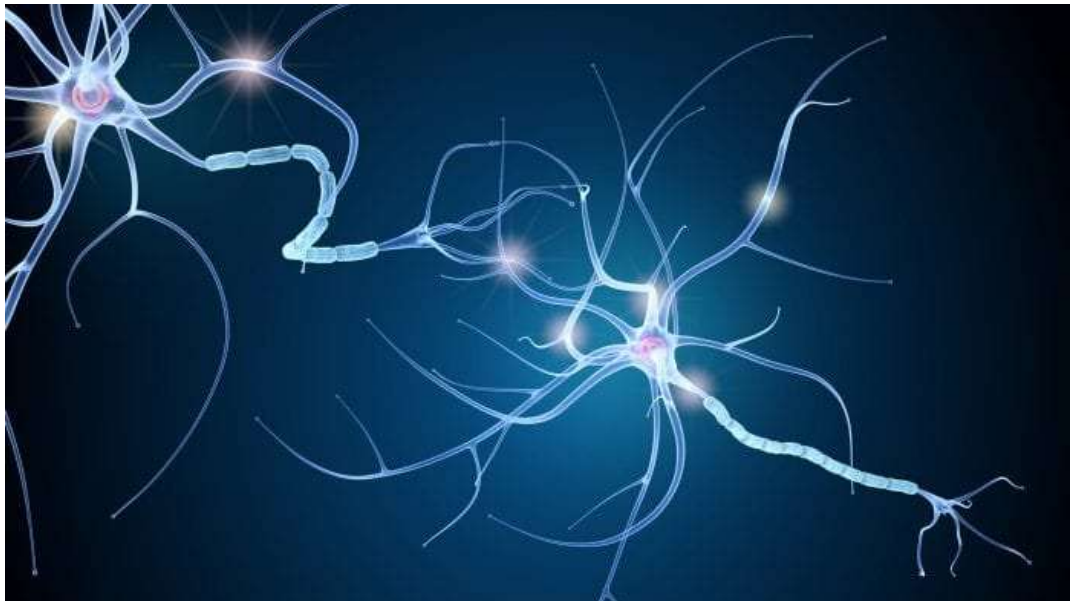
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



Reactividad linfocitaria T frente a péptidos de la mielina y antígenos patógenos en sangre periférica de pacientes con esclerosis múltiple tratados con interferón beta

Albert Guinart Cuadra

TRABAJO FINAL DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA



Tutor académico: Dr. Javier Capilla Luque, Departamento de ciencias médicas básicas, javier.capilla@urv.cat

En cooperación con: Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol

Supervisora: Dra. Eva Martínez Cáceres, jefa del servicio de inmunología del Hospital Germans Trias i Pujol, emmartinez.germanstrias@gencat.cat

Junio, 2021

Yo, Albert Guinart Cuadra, con DNI 48006276D, soy concededor de la guía de prevención de plagio de la URV *Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes* (aprobada en julio de 2017) (<https://www.urv.cat/es/vida-campus/servicios/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagio/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 07 de julio de 2021

Firma

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Albert Guinart Cuadra', is written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat cursive.

Agradecimientos

Como me inculcaron mis padres es de bien nacidos ser agradecidos así que me gustaría empezar este trabajo agradeciendo a todas las personas que me han acompañado en este camino.

En primer lugar, dar las gracias a todo el grupo de neuropatología del Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol, por acogerme y hacerme sentir uno más, especialmente a la Dra. Eva Martínez Cáceres, muchas gracias por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, a pesar de la situación sanitaria, y por las correcciones y consejos a la hora de realizar este trabajo. Gracias también a ti Ares Selles, por permitirme seguirte como si fuera tú sombra por todo el laboratorio de inmunología. También agradecerte que me hayas dejado participar en todo lo que era posible y ayudarme con este trabajo tanto corrigiéndolo como aportando nuevas ideas. Y como no darte las gracias por incluirme en el equipo y todas las conversaciones interesantes sobre la vida.

En el ámbito académico agradecer al Dr. Javier Capilla Luque sus correcciones y consejos que han ayudado a que este trabajo llegue a buen puerto.

También, me gustaría daros las gracias a vosotros, mis compañeros y amigos, a los de la universidad y a los de siempre. Estos años no hubiesen sido lo mismo sin vosotros. Gracias por todas las experiencias compartidas, por motivarme y apoyarme a sacar lo mejor de mí y crecer como persona

Por último, como olvidarme de lo más importante de mi vida, muchas gracias a mi familia por su apoyo y amor incondicional. En especial a vosotros Papá, Mamá y Tete por ser mis pilares en esta vida.

Índice

1. Datos del centro.....	5
2. Resumen.....	5
3. Introducción.....	6
3.1. Epidemiología.....	7
3.2. Factores de riesgo.....	8
3.2.1. Factores genéticos.....	8
3.2.2. Factores ambientales.....	9
3.3. Tipos de esclerosis múltiple.....	11
3.3.1. Esclerosis múltiple remitente recurrente.....	11
3.3.2. Esclerosis múltiple secundaria progresiva.....	12
3.3.3. Esclerosis múltiple primaria progresiva.....	13
3.4. Fisiopatología y mecanismos de la enfermedad.....	13
3.4.1. Rol de los linfocitos T en la esclerosis múltiple.....	15
3.4.2. Rol de los linfocitos B en la esclerosis múltiple.....	16
3.5. Tratamientos contra la esclerosis múltiple.....	18
3.5.1. Interferón beta.....	18
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivos.....	20
6. Materiales y métodos.....	20
6.1. Obtención de las muestras.....	20
6.2. Ensayos de proliferación.....	21
6.2.1. Timidina – H ³	23
6.2.2. Tinción con VPD-450.....	24
6.2.3. ELISpot.....	27
7. Resultados.....	31
7.1. Análisis de la Timidina – H ³	31
7.2. Análisis del VPD-450.....	33
7.3. Análisis del ELISpot.....	36
8. Discusiones.....	38
9. Conclusiones.....	40
10. Bibliografía.....	41
11. Autoevaluación.....	46
12. Anexo I Ficha de seguimiento del tutor del TFG.....	47

1. Datos del centro

El Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol (IGTP) es un centro de investigación público situado en Badalona y que tiene como objetivo principal incrementar el conocimiento científico para, a continuación, transformarlo en una mejora en salud y en atención médica de los pacientes y de la comunidad.

El instituto está asociado al Hospital Germans Trias i Pujol (HUGTP), y también forma parte del campus biomédico de Can Ruti. El IGTP es un centro CERCA (Centres de Recerca de Catalunya), miembro del *Biocluster*, apoyado y supervisado por el Gobierno de Cataluña. Además, está acreditado como centro de excelencia por el instituto de Salud Carlos III y, como tal, es el encargado de coordinar la investigación científica en el campus, colaborando en estrecha relación con los demás centros ubicados en el campus.

El IGTP divide su investigación en 9 grandes áreas.

- Ciencias de la conducta y abuso de sustancias
- Inmunología e inflamación
- Enfermedades cardiovasculares y respiratorias
- Enfermedades infecciosas
- Enfermedades endocrinas y del metabolismo, de los huesos y de los riñones
- Enfermedades del hígado y del aparato digestivo
- Cáncer
- Neurociencias
- Salud comunitaria

Este trabajo de fin de grado (TFG) se lleva a cabo en colaboración con el grupo de inmunopatología dirigido por la Doctora Eva M^a Martínez Cáceres, dentro del área de inmunología e inflamación.

2. Resumen

Actualmente la elección del tratamiento para los pacientes de esclerosis múltiple es muy compleja. Uno de los factores principales es el aumento en el número de fármacos disponibles. Conocer cómo afectan los fármacos disponibles al sistema inmune de los pacientes es imprescindible para poder tomar la mejor decisión de tratamiento. En este trabajo se han realizado ensayos de proliferación celular con células obtenidas de pacientes tratados con interferón beta, uno de los fármacos de primera línea en el tratamiento de la enfermedad,

y de un paciente que aún no ha iniciado el tratamiento, para ver como este fármaco afecta a la proliferación de linfocitos T autorreactivos frente a una selección de los péptidos de la mielina. Se ha observado que el tratamiento con interferón beta consigue disminuir la proliferación celular de estos linfocitos T frente a la selección de péptidos de la mielina. Además, se ha conseguido establecer una relación entre el estado clínico de la enfermedad, activo o inactivo, y la autorreactividad a los péptidos de la mielina. Esta relación podría ser utilizada en un futuro como un biomarcador para prevenir cuando un paciente va a tener un rebrote o va a entrar en una fase más aguda de la enfermedad, permitiendo así la adaptación del tratamiento para paliar la sintomatología adversa de la enfermedad y dar una mayor calidad de vida a los pacientes.

Palabras clave: Esclerosis Múltiple (EM), Interferón beta (IFN- β), linfocitos T, proliferación celular, reactividad

3. Introducción

La esclerosis múltiple (EM) es una de las enfermedades neurológicas más comunes del mundo, además de ser la principal causa no traumática de discapacidad en adultos jóvenes (1)(2). Se trata de una enfermedad heterogénea, multifactorial, inmunomediada, crónica, proinflamatoria, desmielinizante y neurodegenerativa, causada por una interacción compleja entre los factores ambientales y factores genéticos que afecta al sistema nervioso central (3). La EM supone un alto coste económico para la sociedad, con un gasto estimado de 14,6 mil millones de euros en 2010 en Europa (4) y 4,3 mil millones de dólares en los Estados Unidos de América en 2013 (5).

A pesar de los esfuerzos de diferentes grupos de investigación en todo el mundo, las causas que originan el debut de la EM, así como los factores implicados en su gravedad y evolución no han sido dilucidados. En la actualidad las líneas de investigación que han obtenido resultados prometedores son las que han centrado su atención en los niveles de proliferación celular y de citocinas. Se han reportado valores superiores a los considerados normales de citocinas proinflamatorias como el interferón gamma y la interleucina 2, estas favorecen la extravasación de las células leucocitarias a tejido nervioso. Entre estas células se encuentran los linfocitos T y B que desempeñan un papel fundamental en la EM (3)(6). Estas células una vez entran en el sistema nervioso central desencadenan una respuesta autoinmune frente a los péptidos de la mielina produciendo una cascada de inflamación que acabará llevando a la desmielinización y al daño axonal de las neuronas.

3.1. Epidemiología

La enfermedad suele tener su primer debut en adultos jóvenes de edades comprendidas entre los 20 y los 40 años (3) aunque en algunos pacientes se han observado los eventos desmielinizantes característicos de la enfermedad durante la infancia o la adolescencia (7). Existen diferentes formas de EM que se explicarán en profundidad más adelante en este trabajo.

Según los últimos datos aproximadamente 2,8 millones de personas en el mundo sufren esta patología. Otro hecho preocupante es el aumento de casos cada vez que se realiza una revisión de los datos (8), aunque en realidad esto podría ser debido a la introducción de técnicas diagnósticas más sensibles, así como al aumento del acceso a servicios médicos por parte de la población mundial.

Si bien la EM es una enfermedad de distribución global, los países con mayor incidencia son aquellos que se encuentran en latitudes alejada del ecuador (9), notándose incidencias más altas en las regiones más al norte de Europa y de Estados Unidos (Imagen 1).

A nivel poblacional la EM tiene una incidencia mayor en mujeres que en hombres, exceptuando algunas regiones del mundo como Italia y USA. Según los últimos datos el 69% de pacientes de esclerosis múltiple son mujeres mientras que el 31% restante son hombres (8), aunque, esta predominancia parece disminuir en poblaciones situadas más alejadas del ecuador (3). La mayor incidencia de la enfermedad en las mujeres puede sugerir que haya algún factor ambiental o genético que afecte mayoritariamente a este género (10), aunque actualmente no se ha demostrado. Recientemente estudios epigenéticos han demostrado que los genes del cromosoma X, dependiendo si se han visto sometidos a una impronta materna o paterna, pueden afectar a la autoinmunidad del individuo. Otros estudios sugieren que la expresión diferencial de genes que codifican para receptores *toll-like* (TLR) en neuronas, como el TLR-7, pueden contribuir a diferencias en la neurodegeneración dependiendo del sexo (11).

La principal causa de muerte en pacientes de EM se atribuye a fallos motores que cursan con ataxia, paresia o espasticidad entre otros. Además, se ha observado una mayor incidencia de enfermedades infecciosas en estos pacientes respecto a la población general, además los suicidios entre estos pacientes también es más común que entre la población general (3). Todo esto conlleva a que la esperanza de vida media de los pacientes con EM se vea reducida de 7 a 14 años, pese a que esta reducción en la esperanza de vida se hace menos evidente en los estudios más recientes (12). En lo referente a la mortalidad por sexo hay muchos datos contradictorios entre ellos, mientras unos estudios indican una mayor supervivencia de las

mujeres otros no reportan diferencia o encuentran una mayor supervivencia en los hombres (13).

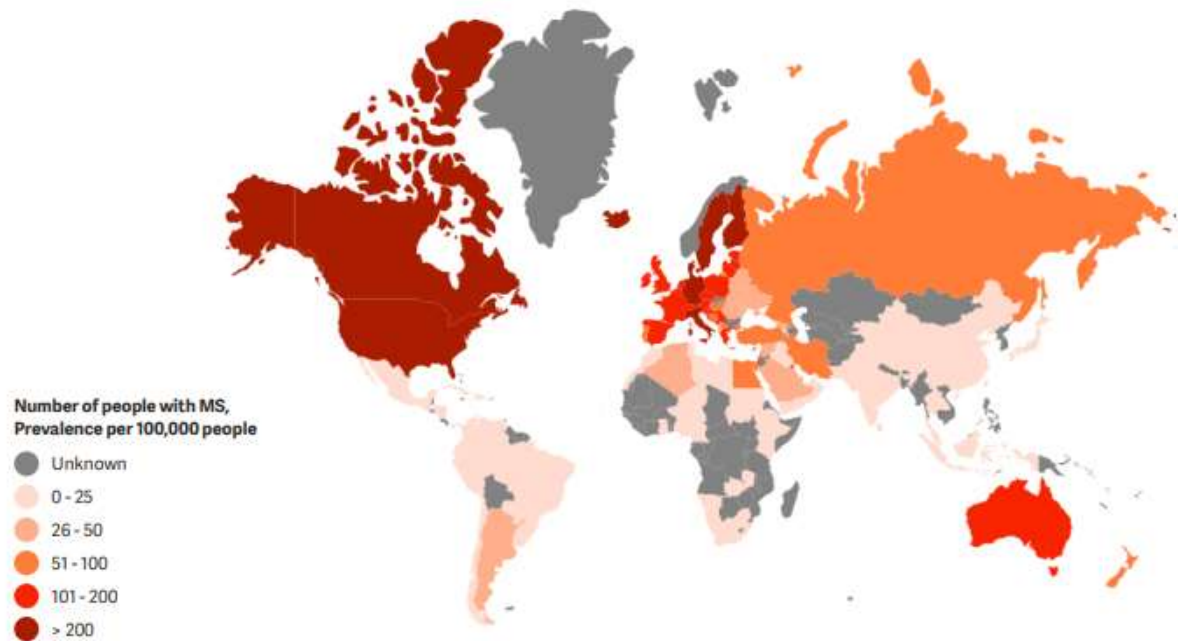


Imagen 1| Incidencia de la esclerosis múltiple en el mundo

3.2. Factores de riesgo

La causa que origina la EM sigue siendo desconocida, pero se sabe que la enfermedad es resultado de una interacción compleja entre la susceptibilidad genética y factores ambientales (3). Por ello a continuación, se exponen los principales factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad divididos en aquellos que son genéticos y los ambientales, recordando siempre que será la combinación de ambos lo que dará lugar a la patología.

3.2.1. Factores genéticos

Como se ha explicado no se ha descubierto una única mutación en el genoma humano que provoque directamente el desarrollo de la enfermedad, pero si se han encontrado una serie de alteraciones que favorecen la aparición de la enfermedad, por lo que ésta podría tener un componente multifactorial.

Se ha observado que los casos de EM dentro de una misma familia tienen una prevalencia del 13%, para todos los tipos de EM (14). El riesgo aumenta a mayor similitud del genoma de los individuos, por ejemplo el riesgo es más elevado de padres a hijos que de abuelos a nietos (15). La heredabilidad de la enfermedad es poligénica, y parece incluir más de 200 genes y diferentes polimorfismos, cada uno de ellos aportando un pequeño aumento en la posibilidad de padecer la enfermedad o en la gravedad de ésta (16).

De todas las alteraciones detectadas las que tienen una afectación más directa sobre los genes que codifican para los antígenos leucocitarios humanos (HLA) tanto de clase I (HLA-I) como de clase II (HLA-II) son las que más aumentan el riesgo de padecer la enfermedad (17). Entre ellas cabe destacar la variante HLA-DRB1*15:01 que triplica el riesgo de padecer la enfermedad, mientras que las otras variantes solo multiplican 1,2 veces el riesgo de padecer la enfermedad (16).

Otras variaciones que afecten a moléculas que regulan el sistema inmunitario como los genes que codifican para la interleucina-2 y los receptores de interleucina-7 pueden afectar al control del sistema inmunitario aumentando el riesgo de padecer EM (18).

3.2.2. Factores ambientales

Hay muchos factores ambientales que pueden aumentar el riesgo de padecer EM, se ha observado que en la vida de un individuo hay un periodo de susceptibilidad a los factores de riesgo ambientales durante la adolescencia (17). La tabla 1 muestra algunos de éstos factores, habiéndose demostrado en algún caso su interacción con factores genéticos (3).

Debido a que la esclerosis múltiple es una enfermedad inmunomediada se ha estudiado la posibilidad de que las enfermedades infecciosas puedan actuar como desencadenantes de la enfermedad (3). Siguiendo esta línea de investigación se han hecho estudios con diferentes agentes infecciosos, entre ellos destacan por su relevancia el virus de Epstein-Barr (EBV), causante de la mononucleosis infecciosa entre otras enfermedades (17). Se ha observado que los pacientes que desarrollan una mononucleosis causada por la infección de este agente biológico en adolescentes o jóvenes adultos tienen el doble de posibilidades de desarrollar EM (19), además se ha observado que los pacientes de EM tienen una cantidad de anticuerpos contra el EBV superiores a los de la población general (20), existiendo estudios epidemiológicos que señalan un 100% de seroprevalencia frente al EBV en pacientes con EM (21). Se hace difícil establecer una relación directa entre la infección por EBV y el desarrollo de la EM, pero desde hace años se sugiere como posible mecanismo el mimetismo molecular, según esta teoría los anticuerpos generados contra la proteína EBNA-1 del EBV podrían mostrar reactividad cruzada contra la proteína básica de la mielina, induciendo así la autoinmunidad que caracteriza a la enfermedad (20) (22).

Otro de los riesgos ambientales cuya relación con el desarrollo de la enfermedad se ha demostrado más concluyente es el tabaquismo. El riesgo de desarrollar EM es dependiente de la dosis de tabaco que consume el individuo, a mayores cantidades de tabaco consumido y durante un periodo de tiempo más extenso mayor riesgo. El ambiente proinflamatorio que favorece el tabaquismo está relacionado con la EM y puede estarlo también con otras enfermedades inflamatorias (17). El tabaquismo no únicamente está involucrado con el riesgo

de padecer la enfermedad, sino que además está relacionado con una peor progresión de ésta (23).

Otro de los factores ambientales a destacar es la exposición al sol y, su vinculación con los niveles de vitamina D. Posiblemente los niveles de vitamina D en los individuos sea la explicación del efecto de la latitud en la incidencia de la EM, ya que las poblaciones más alejadas del ecuador tienen menos insolación, lo cual causaría déficit de vitamina D y un riesgo aumentado de desarrollar EM (3). Niveles séricos elevados de vitamina D han demostrado jugar un papel en la reducción del daño axonal (24) sugiriendo un papel protector en la aparición y evolución de la EM (25).

Los factores ambientales explicados anteriormente no son los únicos que hay en la tabla 1 se pueden ver el resto de los factores cuya relación con el desarrollo de la EM han sido estudiados.

Tabla 1 Factores de riesgo ambientales y estilos de vida con una relación establecida o posible en el riesgo de padecer EM (17)

Factor	OR	HLA gene interaction	Combined OR (nongenetic factor + HLA allele)	Effect during adolescence	Immune system implied	Level of evidence
Smoking	-1.6	Yes	14	No	Yes	+++
EBV infection (seropositivity)	-3.6	Yes	-15	Yes	Yes	+++
Vitamin D level <50nM	-1.4	No	NA	Probably	Yes	+++
Adolescent obesity (BMI >27 at age 20 years)	-2	Yes	-15	Yes	Yes	+++
CMV infection (seropositivity)	0.7	No	NA	Unknown	Yes	++
Night work	-1.7	No	NA	Yes	Yes	++
Low sun exposure	-2	No	NA	Probably	Yes	++
Infectious mononucleosis	-2	Yes	7	Yes	Yes	++
Passive smoking	-1.3	Yes	6	No	Yes	+
Organic solvent exposure	-1.5	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	+
Oral tobacco/nicotine	0.5	No	NA	Unknown	Yes	+
Alcohol	-0.6	No	NA	Unknown	Yes	+
Coffee	-0.7	No	NA	Unknown	Yes	+

CMV: citomegalovirus, EBV: Epstein-Barr virus, HLA: antígeno leucocitario humano, MS: esclerosis múltiple, NA: no aplicable, OR: *odds ratio*: Elevado nivel de evidencia en grandes estudios prospectivos o en estudios Mendelianos aleatorios. Observaciones replicadas y/o verificadas por métodos independientes:++. Observaciones no replicadas:+.

3.3. Tipos de esclerosis múltiple

La EM es una enfermedad compleja de la cual se pueden distinguir diferentes fenotipos. En 1996 se realizó por un conjunto de expertos en la materia la primera clasificación de los diferentes tipos de la enfermedad, en esta clasificación se distinguían estos 4 tipos principales de la enfermedad, para realizar esta clasificación se usaron los resultados de una encuesta internacional que se difundió a diversos especialistas en EM (26):

- EM remitente recurrente (EMRR)
- EM secundaria progresiva (EMSP)
- EM primaria progresiva (EMPP)
- EM progresiva recurrente (EMPR), este fenotipo de EM no está demasiado consolidado ya que muchos expertos sugieren no usar este término puesto que no da información muy relevante y puede causar confusión con el resto de los tipos de la EM.

A lo largo de los años y con la adquisición de nuevos conocimientos sobre la enfermedad, se han ido realizando diferentes revisiones de la clasificación original, incluyendo nuevos aspectos a medida que se ampliaba el conocimiento científico sobre la enfermedad, pero manteniendo los mismos tipos. Por ejemplo se ha añadido el criterio de enfermedad activa basándose en la aparición de lesiones detectadas por resonancia magnética nuclear (RMN) o no activa cuando no se detectan nuevas lesiones, también se ha incorporado el criterio de enfermedad en progresión cuando aparecen nuevos síntomas o enfermedad sin progresión cuando se no se detecta la aparición de nueva sintomatología (27).

3.3.1. Esclerosis múltiple remitente recurrente

La EM remitente recurrente (EMRR) es el tipo de EM más frecuente representando entre el 85-90% de los casos totales (28). La EMRR se caracteriza por una alternancia entre periodos de disfunción neurológica, (recaída) y periodos de estabilidad clínica (remisión). Las recaídas cursan con la aparición de nuevos síntomas o empeoramiento de los ya existentes, en ausencia de infecciones y con una duración mínima de 24 horas, mientras que en los periodos de remisión hay estabilidad clínica sin aparición de nueva sintomatología asociada a la enfermedad (Imagen 2). Además se puede clasificar a los pacientes según si la enfermedad está activa, lo que implica que haya recaídas o se detecte actividad a través de resonancia magnética nuclear (RMN), que suele preceder a las recaídas (27). Las recaídas pueden resultar en un empeoramiento de los síntomas de la enfermedad y deterioro neurológico en la mitad de las ocasiones (29). Son precisamente las recaídas con deterioro las que representan un mayor impacto en la calidad de vida de los pacientes.

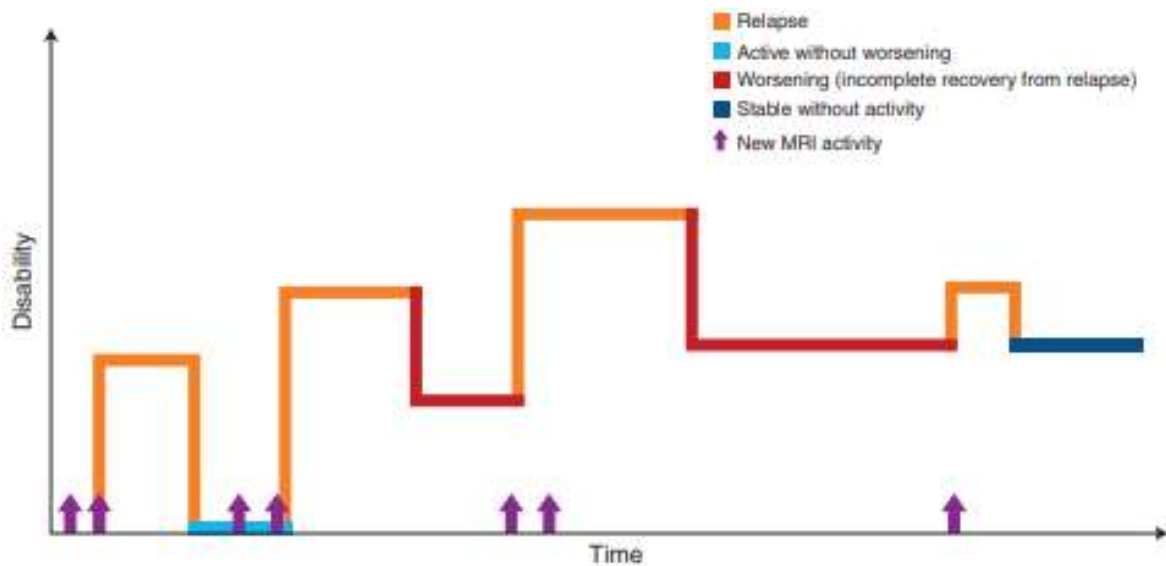


Imagen 2| Esquema del curso clínico de la EMRR (30)

3.3.2. Esclerosis múltiple secundaria progresiva

La mayoría de los pacientes de EMRR no tratados progresan en algún momento hacia una EM secundaria progresiva (EMSP), el tiempo de esta progresión es de aproximadamente 19 años tras el primer brote de la EMRR (31). Cuando la enfermedad alcanza este estado se caracteriza por una acumulación de deterioro neurológico independientemente de las recaídas (Imagen 3). Igual que la EMRR también puede clasificarse como activa o no activa y en deterioro o no según los mismos criterios explicados en la EMRR

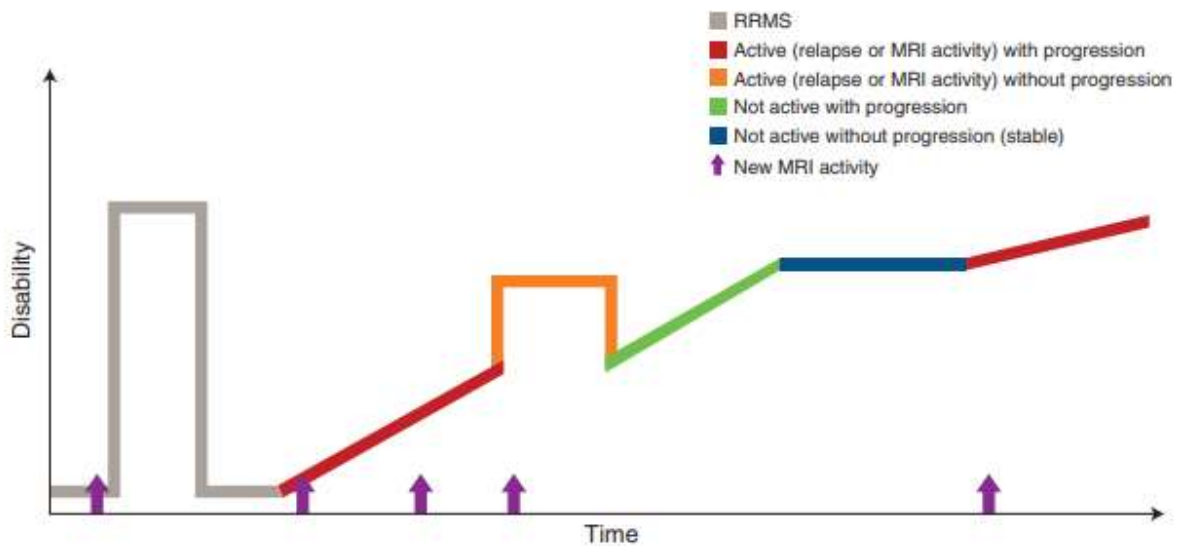


Imagen 3| Curso clínico de la EMSP (30)

3.3.3. Esclerosis múltiple primaria progresiva

Alrededor de entre el 10 y el 15 por ciento de los pacientes desarrollarán este fenotipo de la enfermedad, caracterizada por la ausencia de una fase con recaídas y reemisiones que caracteriza a la EMRR. La evolución de este tipo de EM no es uniforme en todos los pacientes y puede tener tanto periodos con mucho deterioro neuronal como periodos largos de estabilidad (Imagen 4) (27).

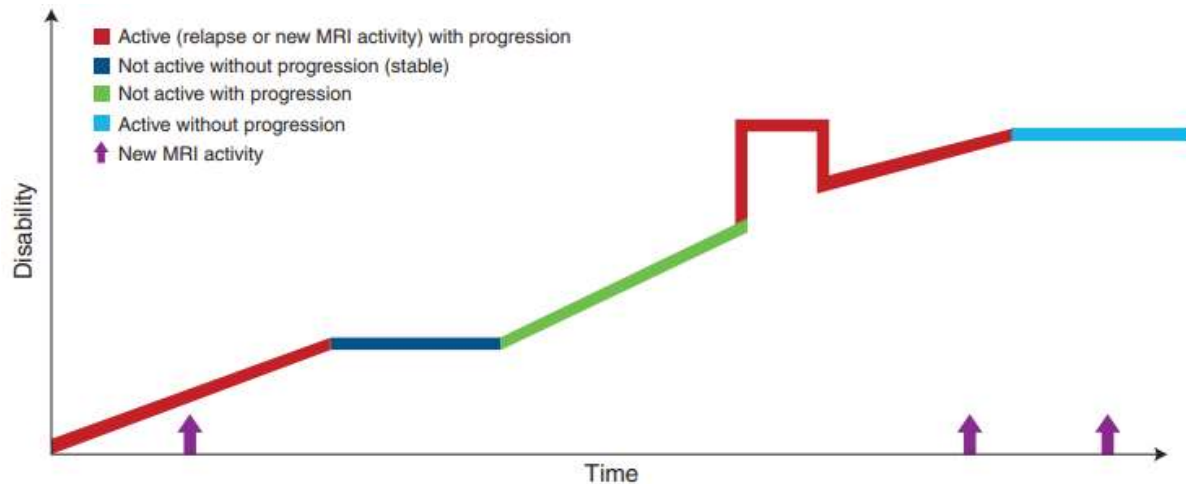


Imagen 4| Curso clínico de la EMPP (30)

3.4. Fisiopatología y mecanismos de la enfermedad

A pesar de la multitud de síntomas y efectos asociados con la EM, el hecho más característico de la patología es la aparición de placas focales, también llamadas lesiones. Estas lesiones son áreas del tejido nervioso que han perdido la mielina, se suelen localizar alrededor de pequeños capilares sanguíneos y se caracterizan por una rotura en la barrera hematoencefálica (BHE) que separa este tejido de la sangre (3). Después de producirse esta rotura hay una migración de diferentes poblaciones celulares, entre ellas destaca por su importancia la población de linfocitos T que causa la destrucción de la mielina y el daño axonal (32).

La BHE es un término para describir la microvascularización del sistema nervioso central (SNC). Los capilares del SNC son continuos y formados por células endoteliales estrechamente unidas de manera que evitan el transporte paracelular, pero que permite el movimiento de moléculas, iones y las células entre el SNC y la sangre. Esta barrera es muy restrictiva y permite la homeostasis del SNC, lo cual es crítico para que tenga cabo una buena funcionalidad neural y a su vez protege al SNC de toxinas, patógenos y daños inflamatorios. La pérdida de parte o la mayoría de las propiedades de esta barrera es uno de los hechos clave de la mayoría de las enfermedades neurológicas, como la EM entre otras (33)

El cómo se produce esta disrupción en la BHE aún es motivo de estudio ya que no se sabe el mecanismo causante. Algunos estudios señalan una relación con los efectos de ciertas citocinas proinflamatorias tales como el TNF, la IL-6 y la IL-1 β y quimiocinas, un grupo de citocinas capaces de provocar quimiotropismo y favorecer la migración celular.

Las citocinas son un grupo de proteínas y glucoproteínas producidas por diversos tipos celulares que actúan fundamentalmente como reguladores de las respuestas inmunitarias e inflamatorias. Además, estas proteínas actúan como factores de crecimiento de distintas células entre las cuales destacan las células hematopoyéticas. Las citocinas actúan de forma compleja interaccionando consigo mismas o con el resto de las citocinas, para de ese modo inducir o suprimir la síntesis de las diferentes citocinas o sus receptores y así regular las respuestas inmunitarias. A su vez la interacción entre las distintas citocinas puede ser sinérgica o bien actuar de forma antagonista entre ellas (34).

Como se ha comentado las citocinas desempeñan un papel clave en el proceso inflamatorio, este se encuentra definido por el balance que se establece entre las citocinas proinflamatorias y las antiinflamatorias y su interacción con receptores de membrana (35).

Existen muchos tipos diferentes de interleucinas, la mayoría de ellas tienen funciones pleiotrópicas. A continuación, se explican las principales citocinas utilizadas en este trabajo, debido a su uso en la fase experimental o a su uso farmacológico:

- La interleucina-2 (IL-2) promueve la proliferación de las células T y es sintetizada por los linfocitos T activados, dirigiendo la respuesta inmunitaria hacia una respuesta tipo Th1. Esta citocina realiza su actividad a través de un receptor de membrana, pero tras la activación linfocitaria se libera al suero en forma soluble (35). En individuos sanos se pueden detectar ciertos niveles del receptor soluble de la IL-2 (36), pero niveles superiores a los normales han sido observados en numerosas enfermedades donde la inflamación tiene un rol importante, ya que niveles elevados de IL-2 se manifiestan con una elevada activación linfocitaria dirigida hacia una respuesta Th1. Se ha demostrado que los niveles de receptor soluble de la interleucina 2 se ven aumentados en los pacientes con esclerosis múltiple (37).
- La interleucina-7 (IL-7) tiene como función estimular el desarrollo de las células precursoras de los linfocitos T y B (35). Además, se ha demostrado que esta citocina promueve una respuesta inmunológica de tipo Th1, también se ha observado que los niveles de IL-7 pueden ser usados como biomarcador para predecir la sensibilidad al tratamiento con interferón beta (38).
- El interferón gamma (IFN- γ) es el único interferón de tipo II, debido a que no está relacionado estructuralmente a los interferones de tipo I. Es secretado principalmente

por linfocitos T pero también por muchas otras poblaciones celulares en proliferación. Esta citocina promueve una respuesta inmunológica de tipo Th1 (39).

- El interferón beta (IFN- β) es un interferón de tipo I e igual que el interferón alfa (IFN- α), tienen una potente actividad antiviral y son producidos principalmente por monocitos y fibroblastos en reacción a una infección. Otra función de los interferones tipo I es su capacidad de detener la proliferación celular. Esta última función es la que hace posible el uso del IFN- β para el tratamiento de la EM o el uso del IFN- α para tratar la hepatitis crónica B o C (40).

Además de estas citocinas, en el origen y el transcurso de la enfermedad son muchas las diferentes citocinas que intervienen en el desarrollo de ésta.

La desregulación de la BHE incrementa la migración transendotelial de leucocitos activados, tales como, macrófagos, células T y B en el sistema nervioso central. Este hecho conlleva a una mayor inflamación y desmielinización, seguida de una pérdida de oligodendrocitos y por último la degradación neuro-axonal (3), como se explicara más adelante en profundidad. Las placas focales se pueden producir tanto en la materia blanca como en la materia gris, incluyendo el cerebro, el nervio óptico y la medula espinal (41)(42). La materia blanca es la región del cerebro subyacente a la materia gris del córtex. Está compuesta por fibras neuronales recubiertas con mielina y apenas cuerpos neuronales, la materia blanca representa más de la mitad del cerebro humano y su función es actuar como transmisor de estímulos. Por su parte la materia gris esta principalmente compuesta por cuerpos neuronales y pocos axones mielinizados, su función es generar los impulsos que serán transmitidos a través de la materia blanca (43). A través de estos hechos se puede observar como la gravedad y ubicación de las lesiones que se produzcan marcarán la evolución de la enfermedad y las afectaciones que sufran los pacientes.

Una vez se ha producido la migración transendotelial, tal y como hemos mencionado, una serie de poblaciones celulares entrarán en contacto con el sistema nervioso central. La visión más tradicional de la EM únicamente daba importancia a los linfocitos T. Hoy en día pese a que sabemos que el grupo celular más importante siguen siendo los linfocitos T, se ha visto la gran importancia de la inmunidad adaptativa, por tanto, se estudian no solo los linfocitos T sino también los B. Además de estos dos tipos de linfocitos, se estudian otras poblaciones con capacidades fagocíticas como los macrófagos (3).

3.4.1. Rol de los linfocitos T en la esclerosis múltiple

Como se ha mencionado anteriormente, la visión clásica de esta enfermedad se basaba únicamente en el papel que tenían los linfocitos T autorreactivos, y pese a que se ha observado que hay otros grupos celulares con relevancia para la enfermedad, las células T

continúan siendo la población celular a la que se le da mayor importancia a la hora de estudiar la EM.

Se ha visto que los episodios de recaída o deterioro neurológico, estén precedidos de una activación descontrolada de los linfocitos T y una regulación ineficiente de los mismos, esto provoca una reacción inmunológica de carácter proinflamatorio que incluye a las dos poblaciones de linfocitos T, los CD4+ conocidos como *T helper* y los T CD8+ también conocidos como citotóxicos que migran hacia el sistema nervioso central y provocan la desmielinización y el posterior daño neurológico (Imagen 5) (3). Una de las causas que puede estar tras la activación descontrolada de los linfocitos T autorreactivos puede ser la falta de regulación de estos por parte de los linfocitos T reguladores, de hecho se han observado algunas anomalías en los linfocitos T reguladores en sangre periférica de pacientes con EM, en concreto una disminución en la expresión de FOXP3, una proteína implicada en la función de las células reguladoras (44).

Hay que destacar que la activación de los linfocitos T autorreactivos requiere de una previa presentación de los antígenos, en el caso de la EM los péptidos de la mielina, por parte de las células presentadoras de antígenos (6), como lo son las células B, en la periferia y en el sistema nervioso central.

3.4.2. Rol de los linfocitos B en la esclerosis múltiple

Los estudios realizados en los últimos años han demostrado que los linfocitos B intervienen en el desarrollo de la EM. Ésta relación de los linfocitos B se ha encontrado gracias a nuevos ensayos clínicos donde un fármaco que deterioraba la población de linfocitos B demostró su eficacia a la hora de prevenir el daño neural en los pacientes de EM (45). Estos fármacos son específicos de los linfocitos B ya que tienen como diana terapéutica el *cluster* de diferenciación 20 (CD20), propio de esta población celular.

Los pacientes de EM tienen una cantidad anormalmente alta de anticuerpos en el sistema nervioso central en comparación con la población sana, pero sorprendentemente no se observa una disminución de estos niveles tras la terapia con anticuerpos monoclonales anti-CD20, sugiriendo un efecto de los linfocitos B independiente de los anticuerpos generados. Además, se ha detectado que los linfocitos B en pacientes de EM tienen una producción elevada de citocinas proinflamatorias lo cual ayuda a crear el ambiente proinflamatorio que favorece el avance de la enfermedad.

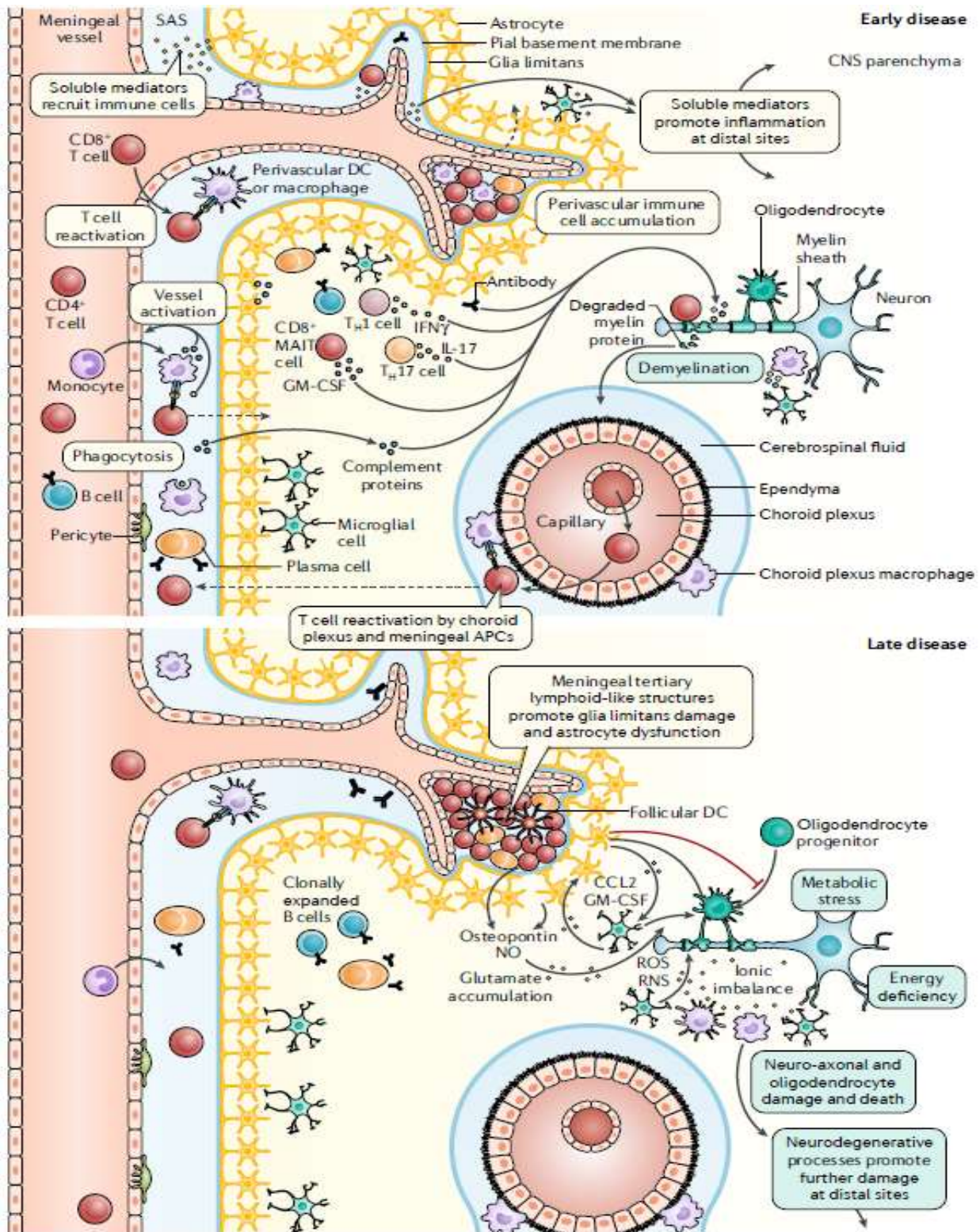


Imagen 5] Complejidad y mecanismos de la EM (3): se observa como las células del sistema inmune son capaces de entrar en el sistema nervioso central a través de una disrupción de la barrera hematoencefálica. En los episodios de recaída más comunes en estadios iniciales de la enfermedad se puede observar la infiltración de linfocitos T y B, estas células en combinación con la microglía y los astrocitos contribuirán al daño neural. En fases más avanzadas de la enfermedad la infiltración celular disminuye, pero el daño neurológico continúa avanzando mediante los linfocitos T y B, además de la aparición de nuevos mecanismos como la alteración de la homeostasis del glutamato entre otros.

3.5. Tratamientos contra la esclerosis múltiple

Existen diferentes estrategias farmacológicas a la hora de iniciar un tratamiento de EM, la mayoría de ellas se basan en tratamientos modificadores de la enfermedad (TME) (46). Algunos de estos actúan modulando la respuesta inmunitaria hacia un perfil más antiinflamatorio, un ejemplo de este fármaco sería el interferón beta o el acetato de glatirameró mientras que otros que actúan de forma más específica sobre una población celular concreta se conocen como inmunosupresores específicos y un ejemplo sería el fármaco Rituximab que es un anticuerpo monoclonal que bloquea la actividad de los linfocitos B (47).

La estrategia principal para el tratamiento de la EM se basa en iniciar el tratamiento con un inmunomodulador seguro con efectividad media como puede ser el interferón beta y en función de la eficacia que reporte el paciente o de las posibles reacciones adversas cambiar hacia un fármaco de segunda línea que suele ser otro inmunomodulador (3).

Cabe destacar que en los últimos años se están desarrollando terapias celulares, con células tolerogénicas o antígeno-específicas, de hecho el equipo de investigación en el que se lleva a cabo este trabajo de fin de grado está desarrollando una terapia celular basada en células tolerogénicas (48).

3.5.1. Interferón beta

Como se ha mencionado existen multitud de TME aprobados para su uso contra la EM pero el interferón beta cobra especial importancia en este trabajo, ya que se evaluarán proliferaciones celulares en pacientes tratados con este fármaco, cuyo nombre comercial es Avonex®.

El interferón- β (IFN- β) bajo el que los pacientes están en tratamiento es el interferón beta 1a (IFN- β 1a), existiendo también otro interferón recombinante llamado IFN- β 1b. Éste es un preparado producido mediante tecnología de DNA recombinante, es una glicoproteína de 166 aminoácidos. El IFN- β 1a inhibe la activación de células T *in vitro* en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EM (49).

El IFN- β , como se ha explicado anteriormente, es una citocina con efecto pleiotrópico, este consigue reducir la respuesta inmunitaria debido a su efecto en varios tipos celulares que incluyen los linfocitos T y B entre otros. Es capaz de regular la migración celular de las células del sistema inmune e impedir la secreción de factores que estimulen a las células inmunitarias (50), así se consigue dirigir la respuesta inmunitaria hacia un perfil más antiinflamatorio.

El mecanismo molecular mediante el cual el IFN- β tiene efectos terapéuticos aún no se comprende totalmente, pero como se ha explicado es capaz de regular diferentes tipos celulares implicados en la respuesta inmunitaria. En lo que respecta a los efectos del IFN- β

sobre las células T se ha observado que reduce la activación de este grupo celular, ya que reduce la expresión de HLA-II, necesario para la activación celular, además también previene la interacción de B7/CD28 y CD40/CD40L, estos dos hechos ayudan a disminuir la activación de los linfocitos T reactivos disminuyendo el progreso de la enfermedad (51).

Otra población celular sobre la que actúa el IFN- β y ha cobrado mayor importancia en los últimos años son los linfocitos B. Los últimos estudios demuestran que el IFN- β disminuye la capacidad estimuladora de los linfocitos B mediante la inhibición de la expresión de CD40 y CD80, además estimula la secreción de interleucina-10, dirigiendo la respuesta inmune hacia un perfil más antiinflamatorio (50).

Además de los efectos mencionados, hay que destacar que el IFN- β tiene muchos más mecanismos de acción, pero lo más relevante es que provoca un ambiente antiinflamatorio donde la actividad de los linfocitos T autorreactivos de la mielina se ve disminuida, ralentizando el avance de la enfermedad y mejorando la calidad de vida de los pacientes.

4. Hipótesis

La EM al ser una enfermedad compleja, de etiopatogenia desconocida y con carácter multifactorial provoca que la personalización del tratamiento sea muy compleja actualmente. Uno de los problemas a los que se enfrentan los especialistas es la gran cantidad de fármacos que actúan como inmunomoduladores de la enfermedad y la carencia de biomarcadores que indiquen cuál de ellos tendrá un resultado mejor en cada paciente (46).

La reactividad frente a los péptidos de la mielina ha cobrado especial relevancia en el campo de la neuroinmunología ya que se especula que podría ser utilizada como un biomarcador de respuesta a fármacos y de progresión de la EM.

En la actualidad el estudio de la reactividad celular T antígeno-específica no se utiliza para evaluar la respuesta de ningún tratamiento modulador de la enfermedad. Pero en otras patologías se ha comenzado a utilizar para monitorizar la eficacia de los tratamientos, como puede ser el uso de la proliferación celular de los linfocitos T CD4+ para evaluar la respuesta a la insulina en niños con riesgo alto de diabetes *mellitus* tipo 2 (52).

El estudio de la proliferación celular también se utiliza para terapias alternativas como las terapias celulares. El grupo de investigación donde se desarrolla este trabajo de fin de grado está llevando a cabo un ensayo clínico con células dendríticas tolerogénicas y para monitorizar la respuesta a la terapia se mide la proliferación de los linfocitos frente a un *pool* de péptidos de la mielina. Estos péptidos de mielina son los antígenos que serán reconocidos

por parte del sistema inmune de los pacientes y darán lugar a la respuesta inmunitaria antígeno-específica contra la mielina.

Saber cómo estos tratamientos modificadores de la enfermedad afectan a la respuesta inmunitaria de pacientes con EM se presenta como una oportunidad para ayudar a los especialistas a tomar la mejor decisión de tratamiento para cada uno de los pacientes de forma personalizada.

Este trabajo forma parte del proyecto Reactive-MS que se llevara a cabo en el grupo de investigación de inmunopatología del IGTP. Este proyecto será muy amplio y testara varios de los tratamientos moduladores de la enfermedad que se utilizan habitualmente. Para la realización de este trabajo de fin de grado, y debido al tiempo disponible para su realización, tomamos la decisión de enfocarnos en un solo tratamiento inmunomodulador de la enfermedad que es el INF- β .

Por consiguiente, las hipótesis que plantea este trabajo es la siguiente:

- El tratamiento con IFN- β disminuirá la reactividad de los linfocitos T frente a una selección de 7 péptidos de mielina.

5. Objetivos

Este Trabajo de fin de grado tiene como objetivo principal:

- Estudiar la influencia del tratamiento con interferón β en la reactividad de los linfocitos T de pacientes con EM frente a una combinación de 7 péptidos de mielina.

Además del objetivo principal también planteamos el siguiente objetivo secundario:

- Evaluar la posible relación entre la actividad clínica de la enfermedad con la presencia de reactividad a los péptidos de la mielina.

6. Materiales y métodos

6.1. Obtención de las muestras

Este proyecto se ha llevado a cabo en el instituto de Investigación Germans Trias i Pujol (IGTP). Todas las muestras se han obtenido de la unidad de EM del Hospital Germans Trias i Pujol, centro hospitalario asociado al IGTP, donde se hacen seguimiento aproximadamente 500 pacientes.

Para la realización de este trabajo se hace necesario el uso de células obtenidas del propio paciente con las que establecer el cultivo celular, ya que no se puede hacer con líneas celulares comercializadas.

Además, se tendrá en cuenta que los pacientes en el momento de su inclusión o bien no hayan sido tratados con ningún medicamento modificador de la enfermedad o bien lleven ya seis meses siendo tratados con interferón β .

Para obtener las muestras se siguió un protocolo que se inicia cuando un paciente de EM acude a hacerse una visita con el neurólogo del hospital. En esa visita el especialista si el paciente cumple con los criterios de inclusión, se le propone la posibilidad de incorporarse al estudio . Tras esto y siempre que el paciente haya dado su consentimiento se le realizará una extracción de sangre por parte del equipo del hospital, aproximadamente el volumen de sangre extraída para el estudio es de 50 mL.

En este estudio se han incluido a todos los pacientes con EM sin tener en cuenta qué tipo de EM padece. En total siguiendo este método se han obtenido un total de cinco muestras, cuatro de las cuales provienen de pacientes tratados con IFN- β durante mínimo 6 meses y una muestra proveniente de un paciente con EM antes de iniciar el tratamiento con IFN- β (Tabla 2).

Tabla 2: Muestras del trabajo

Características de cada una de las muestras incluyendo el tratamiento y el tipo de EM de cada paciente

<u>Muestra</u>	<u>Sexo</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Estado clínico de la EM</u>	<u>Tipo de EM</u>
TT01	Hombre	Interferón β	Sin actividad	EMRR
TT02	Hombre	Interferón β	Sin actividad	EMRR
TT03	Mujer	Interferón β	Sin actividad	EMSP
TT04	Hombre	Interferón β	Activa	EMRR
ST01	Mujer	Sin tratamiento	Activa	EMRR

TT: tratamiento, ST: sin tratamiento, EMRR: EM remitente-recurrente, EMSP: EM secundaria progresiva

6.2. Ensayos de proliferación

La proliferación celular es el resultado del ciclo celular y es definida como el incremento del número de células debido al crecimiento y la división celular (53). Los ensayos de proliferación celular son técnicas que nos permiten observar este incremento en el número de células.

Son técnicas esenciales en la experimentación inmunológica. Estos permiten estudiar la proliferación celular contra agentes inmunogénicos, en el caso de este trabajo los componentes inmunogénicos, estímulos, frente a los que se ha estudiado la proliferación son:

- Una combinación de los péptidos de la mielina, a pesar de que no existe un consenso de que péptidos de la mielina son lo que de forma natural presentan las células presentadoras de antígenos, se han realizado diversos estudios donde se demuestra la proliferación de los linfocitos frente alguno de los péptidos que forman la mielina y combinaciones de estos (54). En concreto para este trabajo la mix de péptidos de mielina está formada por los siguientes péptidos:
 1. *Myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG1-20)
 2. *Myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG35-55)
 3. *Myelin proteolipid protein* (PLP139-154)
 4. *Myelin basic protein* (MBP13-32)
 5. *Myelin basic protein* (MBP83-99)
 6. *Myelin basic protein* (MBP111-129)
 7. *Myelin basic protein* (MBP146-170)
- Citomegalovirus (CMV) y toxoide tetánico (TT) que actuarán como controles positivos de la respuesta antígeno-específica.
- Polihidroxicanoatos (PHA), este actuará como control positivo puesto que provoca la proliferación de todas las células.

Actualmente hay muchos tipos de ensayos de proliferación celular, a grandes rasgos se pueden dividir en cuatro grupos dependiendo de sus fundamentos: ensayos de incorporación de nucleósidos análogos, ensayos basados en proteínas asociadas al ciclo celular, ensayos basados en tinciones y por último un grupo genérico donde hay técnicas que permiten la medición indirecta de la proliferación celular (55).

Como se ha explicado a lo largo del trabajo, el objetivo principal del mismo es ver si los pacientes tratados con IFN- β ven afectada la reactividad linfocitaria frente a los péptidos de la mielina.

Para estudiar si realmente la reactividad se ve afectada a causa del tratamiento con interferón β , se realizaron 3 técnicas diferentes para medir la proliferación celular:

- Incorporación de Timidina - H³
- Tinción con *Violet Proliferation Dye 450* (VPD450)
- IFN- γ ELISpot

Se han utilizado diversas técnicas ya que como se ha explicado con anterioridad existen muchos tipos de ensayos de proliferación y no todos están basados en los mismos principios. Se han utilizado múltiples ensayos con el objetivo de medir diferentes variables y así obtener resultados con menor incertidumbre y poder concluir de forma más exacta si los cultivos celulares han proliferado. En los siguientes apartados de este trabajo se explican la utilidad y los fundamentos de cada una de las técnicas utilizadas para medir la proliferación celular

El paso inicial en todos los tipos de ensayos es la obtención de PBMCs de la sangre periférica de los pacientes. Para obtener-las se ha utilizado una técnica de separación por gradiente de densidad usando Ficoll.

6.2.1. Timidina – H³

La marcación con timidina tritiatda, es uno de los métodos clásicos para ver la proliferación celular. Esta técnica se basa en la incorporación de nucleósidos análogos, en concreto la introducción de análogos de la timidina marcados radioactivamente (55). Estos análogos serán introducidos durante la fase S del ciclo celular, ya que es en esta fase cuando se produce la síntesis del nuevo material genético (56).

Para la aplicación de esta técnica el primer paso es obtener las PBMCs de los pacientes. A continuación, mediante citometría de flujo y/o cámara Neubauer se obtiene el recuento y la viabilidad celular. Basándonos en el número de células final, se llevan a una concentración final de 150000 células/ 100 µL con medio RPMI suplementado con un 10% de suero, 2% L-glutamina y 1% penicilina /estreptomicina.

Seguidamente se procede a añadir 100 µL de la suspensión celular en cada uno de los pocillos de una placa de 96-U, así en cada uno de los pocillos habrá 150000 células. Además, se le añaden 100µL de los siguientes estímulos distribuidos como en la imagen 6 exceptuando los pocillos que servirán de control negativo en los cuales no se pondrá ningún estímulo, pero se añade PBS para que todos los pocillos tengan el mismo volumen. La placa se pone en el incubador a 37°C y un 5% de CO₂.

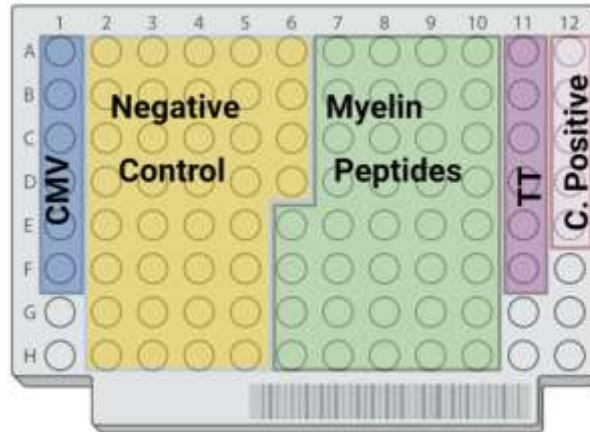


Imagen 6| Distribución de los pocillos en el ensayo de proliferación con timidina-H3

El sexto día de incubación añadimos a cada uno de los pocillos 1 μL de Timidina tritiada y 49 μL de medio RPMI suplementado con un 10% de suero, un 2% de L-glutamina y un 1 % de penicilina y estreptomocina y se deja incubar la placa 18h.

Por último, el séptimo día se transporta la placa en una caja especial, para que en caso de vertidos la radiactividad quede contenida, a la sala de radiactividad donde se adquiere utilizando un equipo especial llamado *harvester* para posteriormente llevar a cabo el análisis de proliferación celular.

6.2.2. Tinción con VPD-450

Esta técnica utiliza otro enfoque para analizar la proliferación celular, mediante el uso de fluorescencia. Estos marcadores son capaces de difundir fácilmente en el citoplasma de las células y unirse de manera covalente a los grupos amino de las proteínas intracitoplasmáticas (55).

Durante las divisiones que se producen en la fase M del ciclo celular el marcador se reparte de manera homogénea en las dos células resultantes, por tanto la intensidad de la fluorescencia se verá reducida a la mitad en cada una de las divisiones celulares (57), indicando así la proliferación celular.

En concreto nuestro grupo, para realizar el ensayo de proliferación celular utiliza el marcador VPD-450 que ha demostrado su eficacia (57) mediante un estudio donde se comparaba con la técnica clásica de proliferación celular que es el ensayo de timidina tritiada.

El mecanismo de acción de este marcador es el siguiente, según facilita la empresa que lo comercializa. El marcador este compuesto por tres partes, una esterasa (ECM), un motivo fluorescente (MFM) y un motivo que reacciona frente grupos amino (ARM). Una vez el VPD-450 difunde al interior celular, la esterasa se escinde y modifica el MFM para dar lugar a un

producto fluorescente, a continuación, ARM reacciona con los componentes celulares que contengan residuos amino (IACB) para quedar retenido en la célula (Imagen 7).

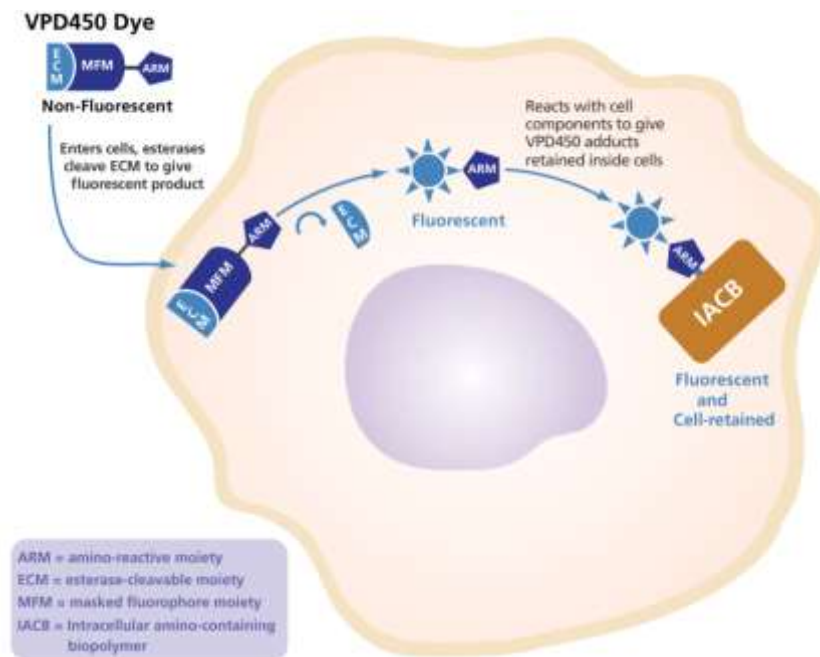


Imagen 7 Mecanismo del VPD-450| Proceso mediante el cual el VPD-450 interacciona con los componentes celulares para dar una señal fluorescente

Para realizar la lectura de proliferación celular de esta técnica se utiliza un citómetro de flujo, BD FACSLyric. Gracias a la utilización de este equipo para esta técnica también realizamos como se explicará a continuación un marcaje con diferentes anticuerpos conjugados, para obtener información adicional como la supervivencia celular y distinguir los linfocitos T CD4+ de los CD8+.

El primer paso que se realiza en este protocolo de siete días de duración es el lavado de las células. Este paso se realiza para eliminar los posibles componentes que pudiesen unirse a nuestros anticuerpos conjugados y dar señales que interfieran en el posterior análisis. En nuestro caso concreto las células no han tenido que ser lavadas ya que están en PBS y durante el proceso de aislamiento de PBMCs se eliminan los compuestos que pueden interferir con la unión de los anticuerpos.

A continuación, se resuspende el pellet en 1250 μ L y añadimos 1,25 μ L del marcador citoplasmático VPD-450 (para añadir este marcador lo hacemos con la luz de la campana de flujo laminar apagada ya que este compuesto es fotosensible y al ser expuesto a la luz pierde intensidad de fluorescencia) se homogeniza la muestra y se deja incubar en el incubador a 37°C durante 12 minutos. Después de esta incubación lavamos las células con PBS para

eliminar el excedente de VPD-450 que no ha quedado retenido por las células y suspendemos las células en un volumen final de 1mL de medio RPMI suplementado con un 10% de suero, un 2% de L-glutamina y un 1 % de penicilina y estreptomicina.

Una vez tenemos las células lavadas se realiza un conteo de las células que tenemos y se comprueba que la tinción ha tenido éxito. Para ello preparamos en un tubo de citometría 20µL de suspensión celular, 20µL de *beads* (es un preparado comercial que incluye dos tipos de esferas diferentes y que se necesita para realizar un conteo utilizando el citómetro) y 150 µL de PBS 1X. Con los datos obtenidos por el citómetro se verifica la tinción de las células con el V450 y utilizamos esta fórmula para saber el número final de células de las que disponemos, en total necesitaremos 6 millones de células que suspendemos en 4mL para tener una concentración celular final igual que en el ensayo con timidina tritiada.

$$N^{\circ} PBMC = \frac{N^{\circ} \text{ eventos viables} \cdot N^{\circ} \text{ de } \frac{\text{beads}}{\mu\text{L}} \cdot \text{Volumen muestral } (\mu\text{L})}{N^{\circ} \text{ beads adquiridas}}$$

El último paso del primer día de protocolo es sembrar las células en placas de 96 pocillos, pero solo utilizaremos 38 de los pocillos (Imagen 8). Primeramente, ponemos 100 µL de la suspensión celular en los 38 pocillos y a continuación ponemos 100 µL de cada estímulo, en los pocillos correspondientes exceptuando los pocillos que serán el control negativo donde añadimos 100 µL de medio y en los pocillos designados como *No Mix* solamente se cultivan 100 µL de la suspensión celular y 100 µL de medio, pero posteriormente no se incubarán con anticuerpos conjugados, estos pocillos sirven como control negativo de los anticuerpos conjugados. Esta placa se deja incubar a 37° durante 7 días.

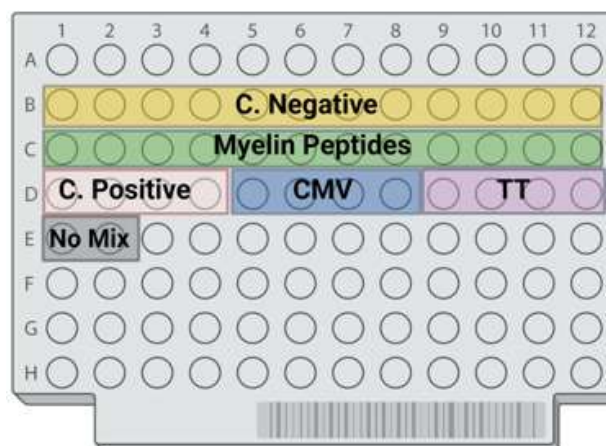


Imagen 8| Distribución de los pocillos en el ensayo de proliferación con VPD-450

El séptimo día de cultivo, se retira la placa del incubador y se observan las células a través de un microscopio para ver si se aprecia una cierta proliferación celular, en caso afirmativo lo que

se observa son pequeños acúmulos celulares esparcidos en el pocillo, en caso de que no haya habido proliferación lo que se observa es un acumulo celular grande en el centro de la placa correspondiente a las células que nosotros habíamos introducido, pero no se ven pequeños acúmulos celulares alrededor. Este paso se utiliza como un primer control visual para después poder ver si los resultados obtenidos en el citómetro de flujo son consistentes.

A continuación, se recogen 55 μ L de sobrenadante de cada uno de los pocillos, estos sobrenadantes serán congelados para tener la posibilidad de hacer futuros estudios.

El siguiente paso es la preparación de la mix de anticuerpos con las que las células serán marcadas. A continuación, se detallan los anticuerpos utilizados y la función que llevan a cabo:

- CD3-APC: este anticuerpo se une al complejo de diferenciación 3 (CD3) propio de los linfocitos T humanos. Al marcar únicamente los linfocitos T nos permite separar esta población celular de las otras que puedan estar presentes.
- CD4 FITC: este anticuerpo se une al complejo de diferenciación 4 (CD4). Permite diferenciar los linfocitos T CD4+ de los linfocitos T CD8+.
- CD8 PE: este anticuerpo se une al complejo de diferenciación 8 (CD8). Permite distinguir los linfocitos T CD8+ de los linfocitos T CD4+.
- Además de los anticuerpos mencionados también se añade 7AAD, que es un marcador de supervivencia en citometría de flujo. Este compuesto se intercala entre las bases de citosina y guanina del ADN de las células muertas ya que al entrar en apoptosis o morir pierden la impermeabilidad hacia este compuesto.

También se añade PBS para trabajar con un mayor volumen que garantiza el correcto pipeteo de la mix de anticuerpos

Una vez se ha realizado la mix se añaden 7,3 μ L por pocillo y es homogeneizado por pipeteo y se incuba 20 minutos a temperatura ambiente, evitando que la luz incida en la placa.

Por último, se obtiene la placa mediante el uso del citómetro de flujo BD FACSLyric que permite adquirir los pocillos de forma automática introduciendo previamente las posiciones que ocupan las diferentes variables. Los datos crudos se exportan para su posterior análisis.

6.2.3. ELISpot

Esta técnica se basa en la utilización de un Kit comercial que nos permite analizar la proliferación celular de forma indirecta. En concreto este ELISpot permite la medir la secreción de interferón-gamma (IFN- γ). Los linfocitos CD4+ y CD8+ cuando proliferan en reacción a un antígeno producen IFN- γ (58).

Este kit consta de una membrana donde hay anexados anticuerpos monoclonales que capturan el IFN- γ (Imagen 9), posteriormente se revela con un anticuerpo monoclonal

conjugado que detectará la presencia de IFN- γ . De esta manera, el resultado final si las células han proliferado son pequeños puntos de color lila (Imagen 10), correspondientes a linfocitos que han proliferado secretando en consecuencia IFN- γ . Mediante el conteo de estos puntos y aplicando un criterio de selección podemos concluir si ha habido proliferación o no la ha habido.

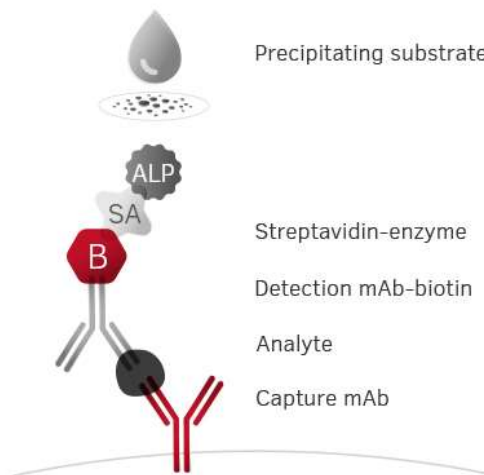


Imagen 9| Esquema del funcionamiento del *kit* comercial de ELISpot

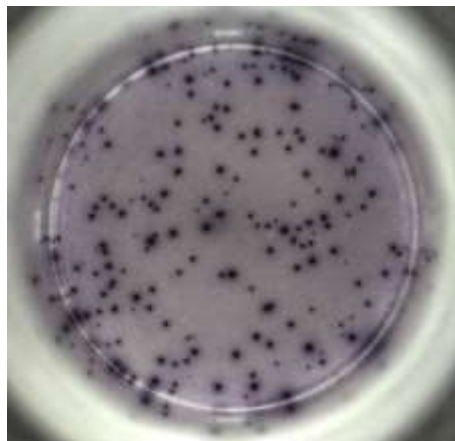


Imagen 10| Ejemplo de un pocillo donde se detecta secreción de IFN- γ

Además, en este experimento se añade una variable más que es el efecto de las interleucinas 2 y 7 para ver cómo éstas afectan a la proliferación celular, para ello se establecerán dos grupos separados, uno tratado con estas interleucinas y otro que no será tratado. Basándonos en la bibliografía se espera que al incorporar estas interleucinas aumente la proliferación celular de los linfocitos (59)(60).

Primeramente, se obtiene un volumen de 8ml de suspensión celular que contenga 10 millones de células del aislado de PBMCs original, al cual se añaden 56uL de la mezcla de péptidos de mielina. En el caso de este experimento será el único estímulo antigénico que se añadirá.

A continuación, se cultivan 2 mL en 4 pocillos de una placa de 24 pocillos durante tres días a 37°C.

El tercer día de cultivo se añaden a dos de los pocillos la mezcla de interleucinas 2 y 7 y se sigue incubando la placa en el incubador a 37°C (Imagen 11).

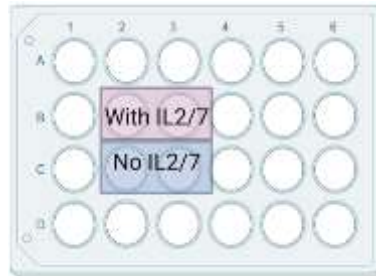


Imagen 11| Distribución de los pocillos suplementados con IL-2 e IL-7

El sexto día se transfieren las células de la placa de cultivo normal a la placa del Kit del ELISpot. Para llevar a cabo este proceso, primeramente, recolectamos las células utilizando un preparado comercial que contiene PBS y EDTA, que ayuda a disgregar las células, a continuación, recolectamos las células en dos tubos Falcon diferentes, para mantener siempre el grupo de células suplementada con interleucinas separado del grupo de células sin interleucinas. Seguidamente se centrifugan los Falcon para obtener el pellet celular y se resuspende en 1 mL exacto de IMDM suplementado con un 10% de suero humano, que ayudara a la supervivencia celular y un 2% de L-Glutamina.

Un paso crítico para saber cuántos pocillos del Kit de ELISpot se podrán cultivar es saber el número de células que tenemos ya que en el caso de las tratadas con interleucina se deben cultivar 100000 células por pocillo y en el caso de las no tratadas se cultivan 200000 células por pocillo, esta diferencia entre los dos grupos se debe a que como se ha mencionado las interleucinas aumentan la proliferación y si se cultivaran las mismas cantidades en ambos grupos, el grupo con interleucinas nos daría demasiada señal al revelar el kit. Para ello realizamos un doble conteo, uno utilizando el citómetro de flujo y otro con la cámara de Neubauer.

A continuación, se preparan los estímulos necesarios para establecer todas las condiciones, los estímulos a diferencia del resto de ensayos de proliferación solo son la PHA que actuará como control positivo y la mezcla de péptidos de mielina que son los mismos que en los anteriores experimentos ya que sino no se estaría comparando la proliferación celular bajo las mismas condiciones (Imagen 12).

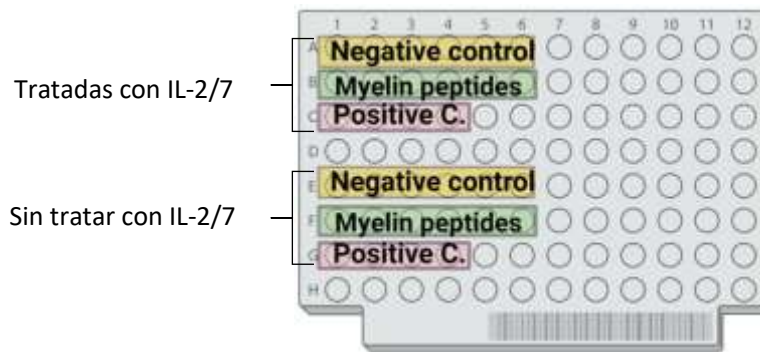


Imagen 12| Distribución de los pocillos en el ensayo de proliferación con ELISpot

Primero transferimos las células a la placa comercial y a continuación se añaden los estímulos, se dejan en el incubador durante 18-24h a 37 °C y un 5% de CO₂.

El séptimo día de protocolo el primer paso es recoger los sobrenadantes y almacenarlos en el congelador de -80°C para poder ser utilizado en otros estudios.

En este último día encontramos diferentes pasos críticos, el primero es que las células se deben remover de la placa, este paso es muy importante ya que lo que queremos detectar en este ensayo es el IFN- γ secretado por las células y no retirarlas puede provocar interferencias. Para eliminar las células se realizan cinco lavados consecutivos con PBS.

A continuación, se realiza el protocolo de rebelado, que dará lugar a la aparición de los puntos lilas característicos de esta técnica:

1. Se añade el anticuerpo de detección, conjugado con biotina, que se unirá al interferón gamma. Y se incuba durante dos horas a temperatura ambiente. Tras la incubación se realizan de nuevo 5 lavados con PBS.
2. Se añade la estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina que se unirá a la biotina conjugada en el anticuerpo de detección y se deja incubar 1 hora a temperatura ambiente. De nuevo tras la incubación se realizan 5 lavados con PBS.
3. Filtramos el sustrato, que dará lugar a la reacción colorimétrica mediada por la estreptavidina y la biotina, a través de un filtro de 0,45 μ m y lo añadimos a los pocillos.

Después de añadir el sustrato tiene lugar una reacción colorimétrica entre el sustrato y la fosfatasa alcalina conjugada con biotina. De esta forma comienzan a aparecer pequeños puntos de color lila que indican lugares de la placa donde ha habido colonias celulares que han proliferado y secretado IFN- γ .

Como se ha explicado una vez añadido el sustrato comienza la reacción colorimétrica. Para parar esta reacción y que no sigan apareciendo más puntos se añade agua en abundancia. Es muy importante vigilar la velocidad de esta reacción ya que si las células de los pocillos han proliferado mucho y se deja reaccionar demasiado tiempo se obtienen demasiados

puntos, lo cual hace imposible su posterior análisis. Por otra parte, si las células de los pocillos han proliferado muy poco hay que aumentar el tiempo de reacción. Este hecho es solventado parando la reacción de los pocillos muy reactivos antes que los otros ya que esta técnica permite detener la reacción añadiendo agua en los pocillos de forma individual.

7. Resultados

Una vez se han llevado a cabo los diferentes ensayos de proliferación celular, se realiza el análisis individual de cada uno de estos ensayos para cada una de las cinco muestras. Posteriormente con el análisis de todos los ensayos se podrá valorar si realmente las células son reactivas o no a los péptidos de la mielina en pacientes en tratamiento con interferón.

7.1. Análisis de la Timidina – H³

El equipo que realiza la obtención de los valores de radioactividad de los pocillos es el *Harvester*, equipo que permite adquirir las células de la placa en unos filtros de papel especial donde quedarán retenidas para la posterior lectura de la radioactividad.

Una vez adquiridos los pocillos por el *harvester*, los filtros se embolsan junto al líquido de centelleo para introducirlos en el contador beta, equipo que detecta y contabiliza la radiación de cada uno de los pocillos y con este se obtienen los datos en forma de archivo de texto, este tipo de archivos no es demasiado manipulable así que el primer paso del análisis es traspasar los datos a un archivo Excel.

Una vez en el programa Excel se suman los valores obtenidos en los dos filtros para las mismas posiciones obteniendo así un valor total que es más preciso.

Para concluir si un pocillo es reactivo frente a un estímulo nos basamos en el siguiente criterio: si un pocillo tiene un valor numérico superior al promedio de los controles negativos más tres veces la desviación estándar de éstos el pocillo es reactivo, (57). También se tiene en cuenta si algún pocillo dentro del grupo de controles negativos ha salido reactivo ya que esto puede indicar que las células de esa muestra son muy proliferativas sin necesidad de añadir ningún estímulo, o que ha podido contaminarse el pocillo con algún estímulo durante el proceso experimental.

En esta técnica solo con que un pocillo de reactividad a los péptidos de la mielina se considera que el paciente es reactivo frente a ellos ya que la reacción es de tipo antígeno-específica, lo cual provoca que no todas las células sean reactivas haciendo difícil su detección.

En el análisis de los cinco pacientes podemos observar distintos comportamientos para cada uno de ellos que quedan recogidos en la siguiente tabla 3:

Tabla 3

Resultados de la reactividad en el ensayo de proliferación mediante Timidina- H³

<u>Muestra</u>	<u>Pocillos reactivos para</u> <u>CMV</u>	<u>Pocillos reactivos para</u> <u>TT</u>	<u>Pocillos reactivos para</u> <u>PHA</u>	<u>Pocillos reactivos para</u> <u>PM</u>	<u>Pocillos reactivos de</u> <u>C-</u>
TT01	6/6	0/6	5/5	0/36	0/36
TT02	6/6	1/6	5/5	1/36	1/36
TT03	5/6	5/6	5/5	1/36	0/36
TT04	6/6	3/6	5/5	1/36	0/36
ST01	4/6	0/6	0/5	1/36	0/36

PM: péptidos de mielina, CMV: citomegalovirus, TT: toxoide tetánico, PHA: polihidroxialcanoato (control positivo), C-: control negativo

Los resultados (Tabla 3) reflejan una serie de hechos relevantes. En primer lugar, podemos ver como todos los pacientes son reactivos frente a citomegalovirus, ya que este actúa como un potente antígeno activando el sistema inmune y la proliferación celular. Por otra parte, solo dos de los pacientes son reactivos al toxoide tetánico ya que el caso de la muestra TT02 no es significativo puesto que solo un pocillo ha dado reactivo, este resultado es esperable ya que, pese a que el toxoide tetánico es un antígeno, tiene menos potencial antigénico que el citomegalovirus. Los pocillos cultivados con PHA de todos los pacientes exceptuando el ST01 han resultado en un 100% de reactividad, este resultado era el esperable puesto que la PHA es un estímulo muy potente. Cabe destacar el caso del ST01 donde no ha habido reactividad frente a PHA. Este hecho se puede deber a la utilización de una alícuota de PHA degradada, esta degradación se ha podido producir ya que las alícuotas se almacenan en el congelador de -20°C y tras más de dos usos puede degradarse y perder su función, otra posibilidad es que haya habido una proliferación excesiva que haya provocado una alta mortalidad celular, hecho que no nos permitiría ver de forma correcta la incorporación de timidina el séptimo día del ensayo.

El resultado más interesante para este trabajo se basa en la reactividad de los linfocitos frente a los péptidos de la mielina, por tanto, los resultados más relevantes son los pocillos que han sido estimulados con la mezcla de péptidos de mielina.

Como se ha explicado debido a la especificidad de los linfocitos contra los péptidos de la mielina con que un solo pocillo salga proliferado, se considera que el paciente es reactivo frente a los péptidos de la mielina. Este criterio varía en función de si en la misma placa ha aparecido algún pocillo del grupo de los controles negativos que haya proliferado, en este caso el criterio para que el paciente sea reactivo es si presenta mínimo dos pocillos proliferados. Siguiendo estos criterios obtenemos que los pacientes TT03, TT04 y ST01 son

reactivos a los péptidos de la mielina, por su parte los pacientes TT01 y TT02 no son reactivos a los péptidos de la mielina según este ensayo.

Como era de esperar la muestra procedente del paciente que aún no ha comenzado el tratamiento con IFN- β ha dado reactividad frente a los péptidos de la mielina.

Estos resultados solo dan una visión parcial de la reactividad, que posteriormente se analizarán en conjunto con el resto de los ensayos de proliferación.

7.2. Análisis del VPD-450

El análisis de este ensayo se lleva a cabo en dos fases diferentes, una primera fase donde tras la adquisición de los pocillos con el citómetro de flujo, utilizando un programa informático (FlowJo®) se seleccionan las poblaciones positivas por los anticuerpos usados en la mix, generando así unos valores de proliferación específicos para cada una de ellas y una segunda fase donde de nuevo se analizan estos datos utilizando Excel.

Primeramente, usando el software FlowJo® lo que se realiza es un refinamiento de los datos para conseguir que las celdas que limitan cada tipo celular sean lo más ajustadas posibles y de este modo se consigue tener de forma exacta el número de células que conforman cada grupo celular. Para esto, se analizan los resultados del citómetro de flujo basándose en una plantilla previamente elaborada donde se muestra la intensidad de fluorescencia de cada uno de los marcadores lo cual se puede correlacionar directamente con el número de células que lo expresan.

Una vez se tienen los grupos celulares bien separados lo que se hace es ajustar la proliferación celular, que se expresa en forma de histograma para cada una de las subpoblaciones de células T, CD4 y CD8. Cuando ha habido proliferación celular lo que se observa son bajadas de la intensidad de fluorescencia en el canal correspondiente al VPD-450, ya que cada vez que las células proliferan la intensidad se divide entre dos. Para tener este valor de forma exacta lo que se hace es ajustar el blanco a un valor del grupo de los controles negativos de forma similar a lo que se hace con el blanco de los experimentos de absorbancia. Por último, se obtienen los *batch report* (Imagen 13 y 14) de todos los análisis realizados.

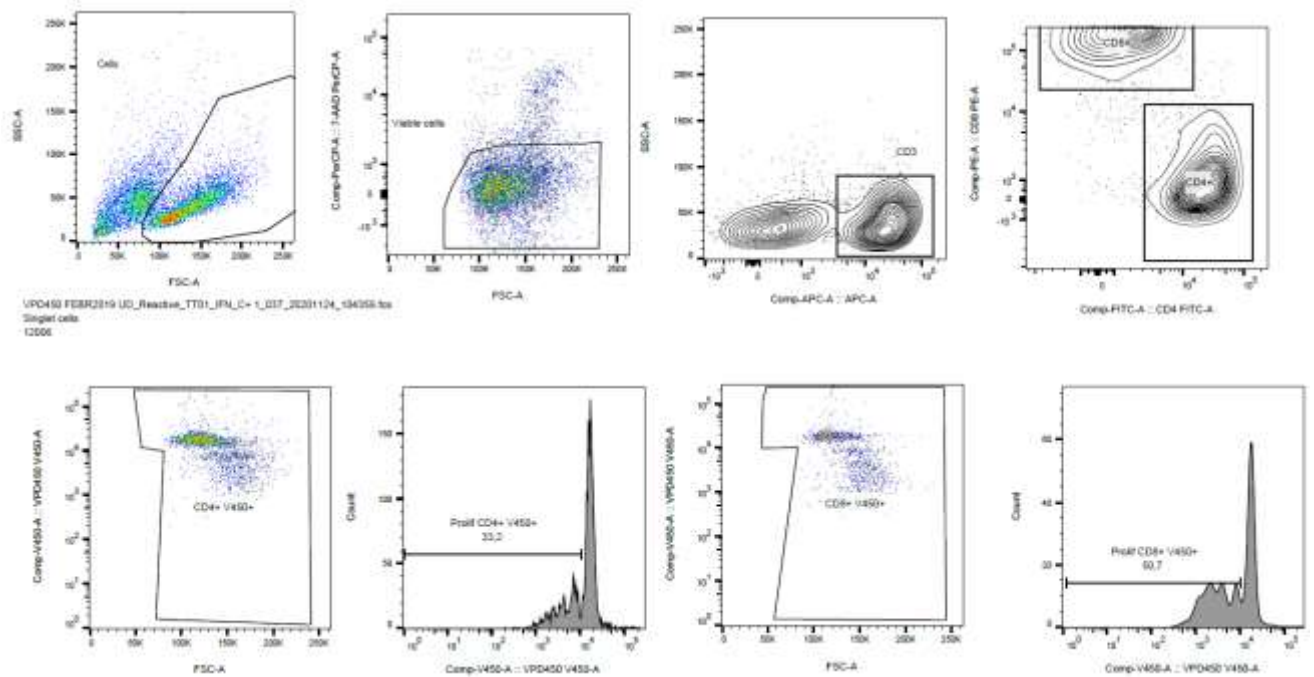


Imagen 13| Ejemplo de un *batch report* de un pocillo donde ha habido proliferación celular (control positivo): se observa todo el proceso de selección de las diferentes poblaciones celulares y los dos histogramas. En los histogramas se aprecian las bajadas en la intensidad de fluorescencia lo cual indica proliferación celular.

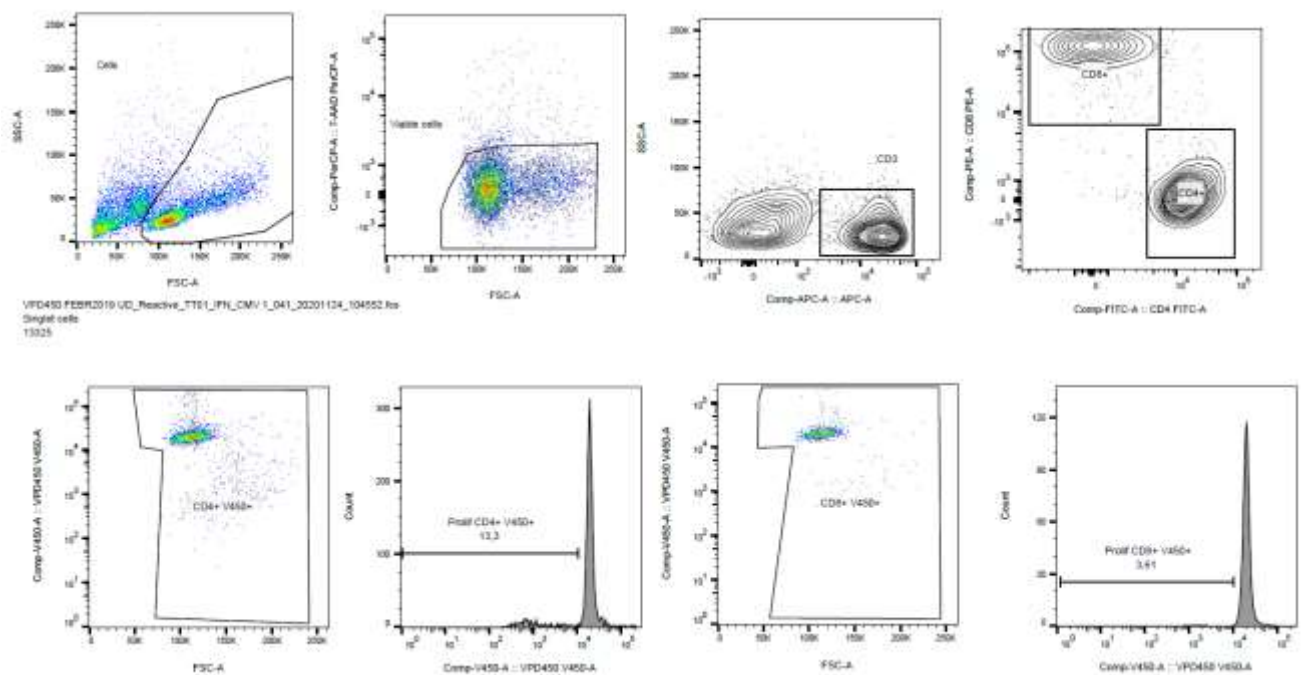


Imagen 14| Ejemplo de un *batch report* de un pocillo donde no ha habido proliferación celular (control negativo): se observa todo el proceso de selección de las diferentes poblaciones celulares y los dos histogramas. En los histogramas no se aprecian las bajadas en la intensidad de fluorescencia lo cual indica proliferación celular, estos controles negativos se utilizarán para establecer el valor 0 de proliferación celular.

Con todos estos datos se realiza el análisis en Excel para poder extraer las conclusiones. En este caso podemos obtener resultados separados por tipos celulares ya que el uso de citómetro de flujo permite diferenciar las diferentes poblaciones celulares, además al utilizar un marcador de viabilidad también podremos ver el porcentaje de viabilidad celular. Pese a que el valor que marcara los resultados son los obtenidos por el citómetro siempre lo contrastamos con una observación previa hecha en el microscopio, que ya puede indicar una cierta proliferación.

El criterio que marca si ha habido proliferación celular o no vuelve a ser el mismo que en el ensayo con timidina, los pocillos reactivos serán aquellos cuyo valor numérico sea mayor al promedio más tres veces la desviación estándar de los pocillos del grupo de controles negativos (57). En el caso de los péptidos de mielina se considerará que el paciente sigue siendo reactivo a partir de un pocillo reactivo de las células T CD4+. Aplicando este criterio se han obtenido los siguientes resultados reflejados en la tabla 4. Únicamente el paciente TT03 cumple los criterios para ser considerado reactivo.

Tabla 4

Resultados de la reactividad linfocitaria en el ensayo de proliferación mediante VPD-450

<u>Muestra</u>	<u>Linfocitos CD4+</u>				
	<u>Pocillos reactivos para</u>	<u>Pocillos reactivos para</u>	<u>Pocillos reactivos para</u>	<u>Pocillos reactivos para</u>	<u>Pocillos reactivos de C-</u>
	<u>CMV</u>	<u>TT</u>	<u>PHA</u>	<u>PM</u>	
TT01	4/4	0/4	4/4	0/12	0/12
TT02	4/4	1/4	4/4	0/12	0/12
TT03	4/4	3/4	4/4	2/12	0/12
TT04	4/4	0/4	4/4	0/12	0/12
ST01	4/4	1/4	4/4	0/12	1/12

<u>Muestra</u>	<u>Linfocitos CD8+</u>				
	<u>Pocillos reactivos para</u>	<u>Pocillos reactivos para</u>	<u>Pocillos reactivos para</u>	<u>Pocillos reactivos para</u>	<u>Pocillos reactivos de C-</u>
	<u>CMV</u>	<u>TT</u>	<u>PHA</u>	<u>PM</u>	
TT01	4/4	0/12	4/4	0/12	0/12
TT02	1/4	0/4	4/4	0/12	0/12
TT03	2/4	1/4	4/4	0/12	0/12
TT04	2/4	0/4	4/4	0/12	0/12
ST01	0/4	0/4	4/4	1/12	0/12

PM: péptidos de mielina, CMV: citomegalovirus, TT: toxoide tetánico, PHA: polihidroxialcanoato (control positivo), C-: control negativo

Como se ha explicado anteriormente la reactividad frente a los péptidos de la mielina es dirigida principalmente por los linfocitos CD4+, pese a ello no se debe quitar importancia a la población de linfocitos CD8+ puesto que también se ha visto que están implicados en el proceso inflamatorio y el avance de la EM.

En lo que respecta al paciente que aún no está bajo tratamiento (ST01) destaca que uno de los pocillos del grupo control negativo da positivo para los criterios de reactividad de la población CD4+, lo cual puede indicar que las células son muy proliferativas sin necesidad de ser estimuladas o también un posible error experimental, que ha contaminado el pocillo. También se detecta reactividad por los péptidos de la mielina en la población CD8+, de este paciente, pero que actualmente no es un criterio para valorar si el paciente es reactivo.

7.3. Análisis del ELISpot

Una vez se ha realizado el protocolo experimental, la placa con los puntos lilas se lleva a un equipo especial que realiza la lectura y nos da el número de puntos que han aparecido. Los equipos más modernos detectan automáticamente de forma correcta los puntos de secreción de las citocinas de interés, en este caso el IFN- γ . En nuestro laboratorio no contamos con equipos tan avanzados, nuestro lector se limita a una bandeja donde se coloca la placa y una cámara hace fotografías desde arriba, hasta aquí no hay una gran diferencia con los equipos más modernos, la diferencia se encuentra en que nuestro equipo realiza el conteo de los puntos de una manera muy poco eficaz. Para solventar esta limitación lo que se realizó fue un conteo manual de cada uno de los puntos que aparecen en la placa del ELISpot.

Cuando se han contabilizado todos los puntos que han aparecido, se plasman en un Excel donde se procede a trabajar con ellos. De nuevo, igual que en el resto de los ensayos, el valor que marcará si un pocillo es reactivo o no, es si el número de puntos lilas que han aparecido en el pocillo, es superior al promedio más tres veces la desviación estándar de los que han aparecido en los pocillos del grupo de los controles negativos.

Pese a que el criterio para establecer la proliferación de los pocillos sea el mismo que en los anteriores ensayos, este ensayo presenta una variación en lo referente al criterio para decidir si un paciente sigue siendo reactivo o no frente a los péptidos de mielina. Mientras en el resto de los ensayos bastaba con que uno de los pocillos estimulado con péptidos de mielina fuera reactivo, en este ensayo se necesita que más del 50% de los pocillos expuestos a péptidos de mielina resulten positivos. Además, en este ensayo también se considera otro criterio para valorar si un paciente es reactivo que es el siguiente: los pacientes cuyos pocillos estimulados con los péptidos de mielina tengan un promedio de puntos de IFN- γ detectados 1,5 veces mayor a los puntos de secreción de IFN- γ detectados en los pocillos del grupo de controles

negativos. Ambos criterios deben ser reactivos para considerar finalmente el paciente como reactivo.

Los resultados obtenidos siguiendo los criterios establecidos anteriormente se expresan a continuación, cabe destacar que en este caso los resultados se muestran en dos grupos, uno donde se ha expuesto a las células a una mezcla de IL-2 e IL-2 y otro donde no se han adicionado estas interleucinas.

Tabla 5

Resultados de la reactividad linfocitaria en el ensayo de proliferación mediante ELISpot de IFN- γ

Pocillos no suplementados IL-2 e IL-7				
<u>Muestra</u>	<u>Pocillos reactivos para PHA</u>	<u>Pocillos reactivos para PM</u>	<u>Pocillos reactivos de C-</u>	<u>\bar{x} PM / \bar{x} C- mayor a 1,5</u>
TT01	2/2	0/3	0/3	1,00
TT02	2/2	0/4	0/4	0,80
TT03	0/2	0/4	0/4	1,11
TT04	2/2	2/4	0/4	1,5
ST01	4/4	6/6	0/6	1,54
Pocillos suplementados con IL-2 e IL-7				
<u>Muestra</u>	<u>Pocillos reactivos para PHA</u>	<u>Pocillos reactivos para PM</u>	<u>Pocillos reactivos de C-</u>	<u>\bar{x} PM / \bar{x} C- mayor a 1,5</u>
TT01	2/2	6/6	0/6	2,80
TT02	4/4	0/6	0/6	1,14
TT03	0/2	5/6	0/4	1,62
TT04	4/4	6/6	0/6	1,63
ST01	4/4	6/6	0/6	2,08

PM: péptidos de mielina, PHA: polihidroxialcanoato (control positivo), C-: control negativo; IL-2: interleucina 2; IL-7: interleucina 7; \bar{x} PM / \bar{x} C-: ratio de media de puntos reactivos en los pocillos estimulados con péptidos de mielina y media de puntos reactivos en los pocillos de controles negativos.

En los resultados reflejados en la tabla 5 se puede observar cómo del grupo de pocillos sin suplementar con interleucinas solo el paciente ST01 es positivo para los criterios de reactividad, también hace falta prestar atención al resultado del paciente TT04 que pese a no haber resultado positivo para los criterios de reactividad da un valor límite, lo que puede indicar que con un poco más de tiempo de incubación podría haber dado positivo. En el grupo de pocillos suplementados con interleucinas siguiendo los dos criterios de reactividad son positivos los pacientes TT01, TT03, TT04 y ST01, detectándose así un elevado número de pacientes reactivos al suplementarse los pocillos con esta combinación de interleucinas.

8. Discusiones

El objetivo principal de este trabajo era estudiar la influencia del tratamiento con IFN- β en la reactividad de los linfocitos T de pacientes con EM. Además, se pretendía observar la posible relación de la actividad clínica de la enfermedad con la autorreactividad hacia los péptidos de la mielina.

Uno de los resultados más sorprendentes es que todos los pacientes de este trabajo a excepción del TT02 son reactivos bajo los criterios de análisis de secreción gamma mediante ELISpot, pero únicamente en la condición suplementada con la combinación de IL-2 e IL-7. Esto resulta particularmente extraño ya que cuando analizamos los resultados de los ELISpot no suplementado con interleucinas, no observamos resultados equivalentes pese a ser células que provienen de un mismo momento en el transcurso de la enfermedad, puesto que la extracción de sangre se realizó en el mismo momento. Un hecho que refuerza la idea de que esta disonancia de resultados es un fenómeno anormal, es que el único ensayo que continúa siendo reactivo sin suplementación es el que corresponde al paciente que no está siendo tratado con interferón (ST01), lo cual era esperable puesto que nuestra hipótesis contempla que el IFN- β reduce la reactividad.

Pese a que es conocido que la suplementación con interleucinas aumenta la proliferación celular. A la hora de diseñar el experimento se tuvo en cuenta este hecho y se cultivaron menos células en los pocillos suplementados. A la luz de estos resultados nos planteamos por qué estábamos obteniendo tanta proliferación celular si se habían cultivado menos células y nos preguntamos si se podía seguir teniendo en cuenta la reactividad linfocitaria bajo estas condiciones. Se realizó una revisión de la bibliografía existente y se encontró una explicación para este fenómeno.

Uno de los mecanismos para la activación de los linfocitos T es la interacción de CD28/CTLA-4, proteínas expresadas en la superficie de los linfocitos T, con CD28/CD86 que son moléculas presentes en las células presentadoras de antígenos, esta interacción causa entre otros efectos una sobreexpresión de IL-2. Uno de los mecanismos mediante el cual el IFN- β ejerce su actividad terapéutica es disminuyendo el porcentaje de producción de IL-2 inducida por células CD80+ (61). Tras este hallazgo se decidió no tener en cuenta los ensayos de proliferación suplementados con interleucinas puesto que estos generan falsos positivos en lo que respecta a la reactividad celular.

Eliminando el ensayo de los pocillos suplementados con interleucinas los datos de este trabajo muestran que de los cuatro pacientes tratados con IFN- β el 50% son reactivos a la combinación de péptidos de la mielina, ya que es suficiente con que haya dado positivo para

uno de los ensayos de proliferación para ser considerado como reactivo. En un ensayo previo sobre proliferación linfocitaria en pacientes de EM llevado a cabo en el mismo centro de investigación se vio que el 74% de los pacientes de EM sin tratamiento eran reactivos en comparación al 30% de los controles sanos (62). Además, en ese ensayo solo se miraba la proliferación de un tipo de EM la remitente recurrente. En nuestro proyecto tan solo el 33% de pacientes con EMRR tratados con IFN- β son reactivos a los péptidos de la mielina, que es un dato equiparable al de los controles sanos de la bibliografía. También hay que destacar que el caso del paciente TT03 se trata de un paciente con EM secundaria progresiva y da positivo para dos de los ensayos de proliferación, esto puede indicar un cierto mecanismo de resistencia a la terapia con IFN- β . Con toda esta información se puede ver la existencia de la eficacia terapéutica del IFN- β a la hora de reducir la reactividad linfocitaria frente a los péptidos de la mielina, que se ve reforzada ya que el paciente que no está en tratamiento tiene unos resultados de proliferación celular mucho mayores a los del grupo de pacientes tratados con IFN- β . Hay que destacar pero que todos estos resultados pueden ser muy variables debido a que el número de réplicas es muy bajo, para obtener resultados más fiables, con mayor valor estadístico, se tendría que aumentar la cohorte de pacientes.

En lo referente al objetivo de intentar encontrar una relación entre la actividad clínica de la enfermedad y la proliferación linfocitaria, los resultados obtenidos no permiten establecer una relación clara, ya que de los pacientes con EM reactivos a la combinación de péptidos de la mielina el paciente TT03 no está en una fase activa de la enfermedad mientras que los pacientes TT04 y ST01 si están en una fase de actividad de la EM. Cabe destacar que el paciente TT03 tiene un tipo diferente de EM, la secundaria progresiva, lo cual podría involucrar diferentes mecanismos de la enfermedad que hacen que pese a no tener actividad clínica si sea reactivo a los péptidos de la mielina.

Si únicamente comparamos los pacientes de EMRR sí que es posible, siempre teniendo en cuenta que el número de pacientes de este ensayo es muy reducido, establecer una cierta relación de la actividad clínica con la reactividad linfocitaria ya que observamos que de los cuatro pacientes (TT01, TT02, TT04 y ST01) únicamente los que están en una fase activa de la enfermedad (TT04 y ST01) son reactivos a los péptidos de la mielina. Este hecho se ve reforzado ya que el paciente que no está en tratamiento con IFN- β (ST01) y tiene EMRR en una fase activa de la enfermedad también es reactivo para los péptidos de la mielina. Así que para futuros estudios sería interesante aumentar la cohorte de pacientes para observar si esta tendencia se mantiene y ver si la evaluación de la proliferación linfocitaria se podría utilizar como biomarcador para predecir episodios de recaída o de mayor actividad de la EM, y así poder dar una opción terapéutica más personalizada a los pacientes.

9. Conclusiones

Tras analizar los resultados de los ensayos de proliferación linfocitaria frente a los péptidos de la mielina se pueden extraer dos conclusiones principales:

- Al evaluar el efecto del IFN- β sobre la proliferación celular se debe evitar suplementar los medios de cultivo con IL-2 ya que ésta puede alterar la proliferación celular dando como resultados falsos positivos.
- El tratamiento con IFN- β en pacientes con EM corrobora la hipótesis que planteaba este trabajo y es capaz de reducir la reactividad linfocitaria frente a una combinación de péptidos de la mielina. Esta acción terapéutica se aprecia especialmente en los pacientes de EMRR.
- Se puede observar una relación, en aquellos pacientes con EMRR, entre la actividad clínica de la enfermedad y la reactividad linfocitaria frente a los péptidos de la mielina, ya que los pacientes en fase activa de la enfermedad son positivos para la reactividad y los que no presentan reactividad linfocitaria no están en una fase activa de la enfermedad.

Todavía quedan muchas cuestiones sin respuesta en el campo de la EM, como por ejemplo la diferencia de reactividad frente a los péptidos de la mielina en los tipos progresivos de la enfermedad. Los resultados y conclusiones de este trabajo únicamente se han obtenido de cuatro pacientes tratados con IFN- β y uno sin tratar, con lo cual pueden ser muy variables. Se detectan resultados interesantes que pueden influir en la mejora de la calidad de vida de los pacientes, abriendo la puerta a la realización de nuevos estudios con cohortes ampliadas.

10. Bibliografía

1. Kobelt G, Thompson A, Berg J, Gannedahl M, Eriksson J. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Mult Scler* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2021 Apr 13];23(8):1123–36. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1352458517694432>
2. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor B V., et al. Atlas of multiple sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity [Internet]. Vol. 83, *Neurology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2014 [cited 2021 Apr 13]. p. 1022–4. Available from: [/pmc/articles/PMC4162299/](http://pmc/articles/PMC4162299/)
3. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, et al. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Prim*. 2018 Dec 1;4(1).
4. Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E, et al. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2021 May 28];21(10):718–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21924589/>
5. Chen AY, Chonghasawat AO, Leadholm KL. Multiple sclerosis: Frequency, cost, and economic burden in the United States. *J Clin Neurosci* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2021 May 28];45:180–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28676312/>
6. Jelcic I, Al Nimer F, Wang J, Lentsch V, Planas R, Jelcic I, et al. Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis. *Cell* [Internet]. 2018 Sep 20 [cited 2021 May 31];175(1):85-100.e23. Available from: [/pmc/articles/PMC6191934/](http://pmc/articles/PMC6191934/)
7. Bigi S, Banwell B. Pediatric multiple sclerosis. *J Child Neurol* [Internet]. 2012 Nov [cited 2021 May 30];27(11):1378–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22914372/>
8. International The Multiple Sclerosis Federation (MSIF). Mapping multiple sclerosis around the world key epidemiology findings Atlas of MS 3 rd edition [Internet]. 2020 [cited 2021 May 28]. Available from: www.atlasofms.org
9. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology [Internet]. Vol. 9, *The Lancet Neurology*. *Lancet Neurol*; 2010 [cited 2021 May 29]. p. 520–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20398859/>
10. Alonso A, Hernán MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: A systematic review. *Neurology* [Internet]. 2008 Jul 8 [cited 2021 May 29];71(2):129–35. Available from: [/pmc/articles/PMC4109189/](http://pmc/articles/PMC4109189/)
11. Voskuhl RR, Sawalha AH, Itoh Y. Sex chromosome contributions to sex differences in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Mult Scler* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 May 29];24(1):22–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29307297/>
12. Lunde HMB, Assmus J, Myhr KM, Bø L, Grytten N. Survival and cause of death in multiple sclerosis: A 60-year longitudinal population study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2021 May 29];88(8):621–5. Available from: [/pmc/articles/PMC5537547/](http://pmc/articles/PMC5537547/)
13. Scalfari A, Knappertz V, Cutter G, Goodin DS, Ashton R, Ebers GC. Mortality in patients with multiple sclerosis [Internet]. Vol. 81, *Neurology*. American Academy of Neurology; 2013 [cited 2021 May 29]. p. 184–92. Available from:

/pmc/articles/PMC3770174/

14. Harirchian MH, Fatehi F, Sarraf P, Honarvar NM, Bitarafan S. Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis [Internet]. Vol. 20, *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. Elsevier B.V.; 2018 [cited 2021 May 30]. p. 43–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29291483/>
15. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. In: *Lancet* [Internet]. Elsevier B.V.; 2002 [cited 2021 May 30]. p. 1221–31. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S014067360208220X/fulltext>
16. Parnell GP, Booth DR. The Multiple Sclerosis (MS) genetic risk factors indicate both acquired and innate immune cell subsets contribute to MS pathogenesis and identify novel therapeutic opportunities [Internet]. Vol. 8, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation; 2017 [cited 2021 May 30]. p. 425. Available from: </pmc/articles/PMC5394466/>
17. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis [Internet]. Vol. 13, *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2021 May 29]. p. 26–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27934854/>
18. Cotsapas C, Mitrovic M. Genome-wide association studies of multiple sclerosis [Internet]. Vol. 7, *Clinical and Translational Immunology*. John Wiley and Sons Inc.; 2018 [cited 2021 May 30]. Available from: </pmc/articles/PMC5983059/>
19. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan S V. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One* [Internet]. 2010 [cited 2021 May 29];5(9):1–5. Available from: </pmc/articles/PMC2931696/>
20. Sundqvist E, Sundström P, Lindén M, Hedström AK, Aloisi F, Hillert J, et al. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: Interaction with HLA. *Genes Immun* [Internet]. 2012 Jan 21 [cited 2021 May 29];13(1):14–20. Available from: www.nature.com/gene
21. Haahr S, Plesner AM, Vestergaard BF, Höllsberg P. A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2004 Apr;109(4):270–5.
22. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular Mimicry in T Cell-Mediated Autoimmunity: Viral Peptides Activate Human T Cell Clones Specific for Myelin Basic Protein. Vol. 80, *Cell*. 1995.
23. Healy BC, Ali EN, Guttmann CRG, Chitnis T, Glanz BI, Buckle G, et al. Smoking and disease progression in multiple sclerosis. *Arch Neurol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2021 May 29];66(7):858–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19597087/>
24. Sandberg L, Biström M, Salzer J, Vågberg M, Svenningsson A, Sundström P. Vitamin D and axonal injury in multiple sclerosis. *Mult Scler* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2021 May 29];22(8):1027–31. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1352458515606986?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed
25. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *J Am Med Assoc* [Internet]. 2006 Dec 20 [cited 2021 May 29];296(23):2832–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17179460/>
26. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey [Internet]. Vol. 46, *Neurology*. Lippincott Williams and Wilkins; 1996 [cited 2021 May 30]. p. 907–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8780061/>

27. Klineova S, Lublin FD. Clinical course of multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2018 [cited 2021 May 30];8(9). Available from: www.perspectivesinmedicine.org
28. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. Vol. 389, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2017. p. 1336–46.
29. Lublin FD, Baier M, Cutter G. Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis. *Neurology* [Internet]. 2003 Dec 9 [cited 2021 May 30];61(11):1528–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14663037/>
30. Types of MS | National Multiple Sclerosis Society [Internet]. [cited 2021 May 30]. Available from: <https://www.nationalmssociety.org/What-is-MS/Types-of-MS>
31. Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M. Secondary progressive multiple sclerosis: Current knowledge and future challenges. Vol. 5, *Lancet Neurology*. 2006. p. 343–54.
32. Grau-López L, Raïch D, Ramo-Tello C, Naranjo-Gómez M, Dávalos A, Pujol-Borrell R, et al. Myelin peptides in multiple sclerosis. Vol. 8, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier; 2009. p. 650–3.
33. Daneman R, Prat A. The blood–brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2021 May 28];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25561720/>
34. O'shea J, Tato CM, Siegel R. Cytokines and cytokine receptors. In: *Clinical Immunology*. Elsevier Ltd; 2008. p. 139–71.
35. Estructura y función de las citocinas | *Medicina Integral* [Internet]. [cited 2021 May 25]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-estructura-funcion-citocinas-13026682>
36. Kleiner G, Marcuzzi A, Zanin V, Monasta L, Zauli G. Cytokine Levels in the Serum of Healthy Subjects. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2013 [cited 2021 May 28];2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/13026682>
37. Gallo P, Piccinno MG, Pagni S, Argentiero V, Giometto B, Bozza F, et al. Immune activation in multiple sclerosis: study of IL-2, sIL-2R, and γ -IFN levels in serum and cerebrospinal fluid. *J Neurol Sci* [Internet]. 1989 Aug 1 [cited 2021 May 28];92(1):9–15. Available from: <http://www.jns-journal.com/article/0022510X89901718/fulltext>
38. Lee LF, Axtell R, Tu GH, Logronio K, Dille J, Yu J, et al. IL-7 promotes TH1 development and serum IL-7 predicts clinical response to interferon- β in multiple sclerosis. *Sci Transl Med* [Internet]. 2011 Jul 27 [cited 2021 May 28];3(93):93ra68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21461200/>
39. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004 Feb;75(2):163–89.
40. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system [Internet]. Vol. 357, *Lancet*. Elsevier B.V.; 2001 [cited 2021 May 28]. p. 1777–89. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673600049047/fulltext>
41. Gilmore CP, Donaldson I, Bö L, Owens T, Lowe J, Evangelou N. Regional variations in the extent and pattern of grey matter demyelination in multiple sclerosis: A comparison between the cerebral cortex, cerebellar cortex, deep grey matter nuclei and the spinal cord. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2009 Feb [cited 2021 May 28];80(2):182–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18829630/>
42. Green AJ, McQuaid S, Hauser SL, Allen I V., Lyness R. Ocular pathology in multiple sclerosis: Retinal atrophy and inflammation irrespective of disease duration. *Brain*. 2010;133(12):3373–82.

- [Internet]. 2010 Jun [cited 2021 May 28];133(6):1591–601. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20410146/>
43. Fields RD. White matter in learning, cognition and psychiatric disorders [Internet]. Vol. 31, Trends in Neurosciences. Elsevier; 2008 [cited 2021 May 28]. p. 361–70. Available from: <http://www.cell.com.sabidi.urv.cat/article/S016622360800132X/fulltext>
 44. González Parias JL, Duque Giraldo VE, Velásquez-Lopera MM. FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales [Internet]. Vol. 29, Inmunología. Ediciones Ergon SA; 2010 [cited 2021 May 31]. p. 74–84. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-inmunologia-322-articulo-foxp3-controlador-maestro-generacion-funcion-S0213962610700135>
 45. Hauser SL, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Panzara M, et al. B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis [Internet]. 2008 [cited 2021 May 31]. Available from: www.nejm.org
 46. Rotstein D, Montalban X. Reaching an evidence-based prognosis for personalized treatment of multiple sclerosis. Vol. 15, Nature Reviews Neurology. Nature Publishing Group; 2019. p. 287–300.
 47. Luna G, Alping P, Burman J, Fink K, Fogdell-Hahn A, Gunnarsson M, et al. Infection Risks among Patients with Multiple Sclerosis Treated with Fingolimod, Natalizumab, Rituximab, and Injectable Therapies. JAMA Neurol [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2021 May 31];77(2):184–91. Available from: [/pmc/articles/PMC6784753/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34111111/)
 48. Willekens B, Presas-Rodríguez S, Mansilla MJ, Derdelinckx J, Lee WP, Nijs G, et al. Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): A harmonised study protocol for two phase i clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration. BMJ Open [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2021 May 31];9(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31501122/>
 49. CARRETERO M. Offarm [Internet]. Vol. 19, Offarm. Doyma; 2000 [cited 2021 May 31]. 140–142 p. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-interferon-beta-1a-15454>
 50. Hojati Z, Kay M, Dehghanian F. Mechanism of action of interferon beta in treatment of multiple sclerosis. In: Multiple Sclerosis: A Mechanistic View. Elsevier Inc.; 2016. p. 365–92.
 51. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon- β mechanisms of action in multiple sclerosis. Neurology [Internet]. 2010 Jan 5 [cited 2021 May 31];74(1 SUPPL.):S17–24. Available from: https://n.neurology.org/content/74/1_Supplement_1/S17
 52. Bonifacio E, Ziegler AG, Klingensmith G, Schober E, Bingley PJ, Rottenkolber M, et al. Effects of high-dose oral insulin on immune responses in children at high risk for type 1 diabetes: The Pre-POINT randomized clinical trial. JAMA - J Am Med Assoc. 2015 Apr 21;313(15):1541–9.
 53. Schafer KA. The Cell Cycle: A Review. Vol. 35, Veterinary Pathology. American College of Veterinary Pathologists Inc.; 1998. p. 461–78.
 54. Grau-López L, Raïch D, Ramo-Tello C, Naranjo-Gómez M, Dávalos A, Pujol-Borrell R, et al. Specific T-cell proliferation to myelin peptides in relapsing-remitting multiple sclerosis. Eur J Neurol [Internet]. 2011 Aug [cited 2021 May 31];18(8):1101–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21749576/>
 55. Romar GA, Kupper TS, Divito SJ. Research techniques made simple: Techniques to assess cell proliferation. Vol. 136, Journal of Investigative Dermatology. Nature Publishing Group; 2016. p. e1–7.
 56. Wiman KG, Zhivotovsky B. Understanding cell cycle and cell death regulation provides

- novel weapons against human diseases [Internet]. Vol. 281, *Journal of Internal Medicine*. Blackwell Publishing Ltd; 2017 [cited 2021 Apr 16]. p. 483–95. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/joim.12609>
57. Di Blasi D, Claessen I, Turksma AW, van Beek J, ten Brinke A. Guidelines for analysis of low-frequency antigen-specific T cell results: Dye-based proliferation assay vs 3H-thymidine incorporation. *J Immunol Methods*. 2020 Dec 1;487:112907.
 58. Seo E, Choi ES, Kim JH, Kim H, Koh KN, Im HJ, et al. Immunologic monitoring of cytomegalovirus (CMV) enzyme-linked immune absorbent spot (ELISPOT) for controlling clinically significant CMV infection in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *PLoS One* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2021 May 18];16(2 February):e0246191. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246191>
 59. Sawa Y, Arima Y, Ogura H, Kitabayashi C, Jiang JJ, Fukushima T, et al. Hepatic Interleukin-7 Expression Regulates T Cell Responses. *Immunity* [Internet]. 2009 Mar 20 [cited 2021 May 19];30(3):447–57. Available from: <http://www.cell.com/article/S1074761309001058/fulltext>
 60. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: New insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. Vol. 23, *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Current Trends; 2011. p. 598–604.
 61. Espejo C, Brieva L, Ruggiero G, Río J, Montalban X, Martínez-Cáceres EM. IFN- β treatment modulates the CD28/CTLA-4-mediated pathway for IL-2 production in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* [Internet]. 2004 Dec 2 [cited 2021 May 20];10(6):630–5. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/10.1191/1352458504ms1094oa?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed
 62. Grau-López L, Raich D, Ramo-Tello C, Naranjo-Gómez M, Dávalos A, Pujol-Borrell R, et al. Specific T-cell proliferation to myelin peptides in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Eur J Neurol* [Internet]. 2011 Aug 1 [cited 2021 Jun 1];18(8):1101–4. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.sabidi.urv.cat/doi/full/10.1111/j.1468-1331.2010.03307.x>

11. Autoevaluación

Durante la realización de este trabajo he podido aunar y poner en práctica los conocimientos adquiridos durante estos cuatro años de universidad. Gracias a ellos he sido capaz de aplicar el método científico y el razonamiento crítico a la hora de analizar mis resultados y extraer conclusiones.

Para mí este trabajo es la demostración de que estos cuatro años de universidad no han pasado en vano, sino que a través de cada una de las asignaturas he sido capaz de extraer algún concepto o enseñanza que he podido aplicar a este trabajo de forma más o menos directa.

También he de destacar que el hecho de realizar el trabajo de fin de grado en un centro de investigación externo a la universidad ha sido una experiencia muy enriquecedora, puesto que me ha permitido demostrarme a mí mismo que tengo las herramientas necesarias para adaptarme al trabajo que se realiza en un centro de investigación y formar parte de un grupo no como un estudiante sino como un miembro más, colaborando y ayudando en todo lo que haga falta. Además, el hecho de realizar el trabajo en una institución externa a la universidad me ha permitido crecer como profesional y mejorar mis habilidades transversales

Como conclusión este trabajo me ha servido para darme cuenta de que tras mi paso por la universidad he podido crecer como persona y dar el paso de estudiante de biotecnología a biotecnólogo y me graduó con todos los conocimientos y habilidades que me capacitan como científico.

12. Anexo I Ficha de seguimiento del tutor del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: Albert Guinart Cuadra

Nom i Cognoms del Tutor/a: Javier Capilla Luque

Data de la entrevista amb l'alumne: 9/03/2021

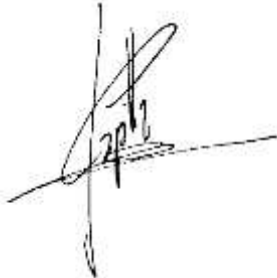
Recomanacions durant el seguiment: Hem fet un primer contacte on l'alumne explica de forma general els aspectes que està desenvolupant al centre de investigació, la hipòtesi de partida i la metodologia a utilitzar. Es recomana realitzar un index provisional de treball per tal d'estructurar el treball i facilitar el seu redactat. S'han fet recomanacions sobre com presentar les dades que s'esperen obtenir i com abordar algunes de les limitacions que d'entrada presenta la planificació del projecte.

Observacions: L'alumne m'envia un esborrany de l'index (17/03/2021) que mitjançant diversos intercanvis de correus electrònics consensuem com a correcte per tal de desenvolupar el redactat. Posteriorment s'envia la part introductòria per a la seva revisió. L'alumne durant la recerca bibliogràfica consulta sobre la idoneïtat de citar alguns articles de més de cinc anys. Es recomana no capficar-se ja que hi ha certs que porten dècades assentats sense modificacions destacables.

Observacions Darrera revisió: 21/05/21

L'alumne comunica dubtes puntuals en quant a la presentació i redacció dels resultats obtinguts així com la discussió dels mateixos. Es recomana com procedir alhora de diferenciar resultats de discussió i quin material és susceptible de ser inclòs com annexes.

Signatura del Tutor/a



Signatura del Alumne/a



Tarragona a 21 de maig de 2021