



Universidad de Granada
Facultad de Medicina
Programa de Doctorado en Inmunología/Biomedicina

**Acción terapéutica de cortistatina en la encefalomiелitis
autoinmune experimental y el efecto paradójico de su
ausencia en inflamación y autoinmunidad**

Luciana de Souza Moreira

Tesis Doctoral
Granada - España
Julio, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Luciana de Souza Moreira
D.L.: GR 521-2013
ISBN: 978-84-9028-371-4



Universidad de Granada
Facultad de Medicina
Programa de Doctorado en Inmunología/Biomedicina



Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra"
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Acción terapéutica de cortistatina en la encefalomiелitis autoinmune
experimental y el efecto paradójico de su ausencia en inflamación y
autoinmunidad

Tesis doctoral presentada por:

Luciana de Souza Moreira

Directora de la Tesis:

Dra. Elena González Rey

Granada - España

Julio, 2012

Dra. Elena Gonzalez Rey, Investigadora del Instituto de Parasitología Y Biomedicina "López-Neyra"
del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Certifica:

Que el trabajo titulado "**Acción terapéutica de cortistatina en la encefalomiелitis autoinmune experimental y el efecto paradójico de su ausencia en inflamación y autoinmunidad**" ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Biología Celular e Inmunología del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en Granada por la Licenciada Luciana de Souza Moreira para optar al GRADO DE DOCTOR por la Universidad de Granada.

Por lo tanto, concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizo la presentación de esta Tesis Doctoral para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

Granada, 11 de Julio de 2012



Fdo.: Elena Gonzalez-Rey

Declaración de los derechos de otros autores

El doctorando **Luciana de Souza Moreira** y la directora **Elena González Rey** de la tesis **Acción terapéutica de cortistatina en la encefalomiелitis autoinmune experimental y el efecto paradójico de su ausencia en inflamación y autoinmunidad**. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de la directora de la tesis y hasta donde mi conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 11 de Julio de 2012

Director/es de la Tesis:



Fdo.: Elena González Rey

Doctorando:



Fdo.: Luciana de Souza Moreira

*A mis padres que esperan
incansablemente mi retorno*

Agradecimientos

Doy gracias a Dios por ser mi mayor guía y tutor. Gracias Dios por haberme permitido salir de mi país y realizar esta tesis en un excelente grupo de trabajo. Por mantener la salud de mis padres mientras yo no los pude cuidar. Por haberme mantenido fuerte, quitado mi ansiedad y dejado mi nivel de estrés "casi" nulo durante este tiempo! Y claro por haberme traído lo que más pedí durante muchos años. Gracias Dios!

En segundo lugar agradezco a mi querida Jefa, a la Dra Elena González Rey que me ha dado la gran oportunidad de realizar esta tesis bajo su tutoría. Gracias por haberme dirigido, que a pesar de haber sido su primera becaria, lo ha hecho de la manera más brillante, extraordinaria y profesional. Pero en este apartado quiero agradecer por todo lo que fuiste además de tutora, pero como no hay espacio, intentaré reducir: Gracias por haberme apoyado en TODO! Gracias por no haber medido esfuerzo en ayudarme! Gracias jefa por haberme tratado muchos más que una estudiante, pero como amiga, hermana e hija! Eres "chiquitita" pero eres GRANDIOSA! Jijiji Jamás sabrás cuanto te quiero! Porque para esto no hay espectrofotómetro, citómetro, o cualquier cosa que se pueda medir. Te quiero!

Agradezco al Dr. Mario Delgado por ser un extraordinario jefe, por su compañerismo y su ayuda experimental. Por su excelente visión crítica, por apoyarme y hacerme creer que tengo potencial. Gracias por las palabras de incentivos. Gracias por además de ser mi jefe, poder decir que eres mi amigo!

Gracias a mis padres, mi familia y a mis amigos que desde de Brasil me han acompañado y no me han dejado sentir sola a pesar de la distancia. Qué desde aquí pude oír sus voces diciéndome para no desistir y que confían en mi victoria. Aquí está un gran regalo para vosotros!

Gracias en especial a Maria Morell, Marta Caro, Marta P. (P. no, Pedreño!) y Virginia que participaran activamente en el desarrollo de esta tesis. Gracias porque con: las musicas y compañerismo de Virginia (mi primera amiga "granaina), con las danzas en medio a una buena discusión científica con Maria, con el especial empeño con "estrés cómico" de Marta Pedreño, y por el cuidado y ayuda técnica de Marta Caro (¡Viva Marta!) hicieron mis días más felices y el trabajo más ligero. Y... a Irene Forte que siempre dices Luci ¿te ayudo? Y lo hizo cuando lo necesité. A Veronika Neubrand que con su dulzura y paz me ha dado tranquilidad y equilibrio cuando estaba a su lado. A todas vosotras, muchas gracias por las horas en la sala de cultivo, por la ayuda en diversos experimentos y con la tesis! Sin vosotras todo esto no sería posible! Las quiero mucho!

Gracias a Per Anderson, por hacerme estudiar con sus preguntas ingeniosas y gracias por haber servido también de mi libro de inmunología ambulante! jijiji Aunque jamás te perdonaré por la danza sueca, te echaré de menos siempre!

Gracias también a todos los compañeros de laboratorio Gema, Andreína, Nieves, Alfredo y Mario Duran que en su manera estuvieran presentes durante el desarrollo de esta tesis.

Gracias a los profesionales y amigos del López-Neyra: Salvador por la ayuda en el citómetro. Clara, Paco y Bea por toda la ayuda y paciencia en el animalario del instituto. Daniel, Agustina, Adriana, Soledad, Diana y Ana por hacer los pequeños momento de laser más agradables.

Gracias a todos los amigos de la IEBG... Juan, Noelia, Raquel, Aninha...es que son tantos que no los puedo seguir nombrando por si acaso falta uno! A todos vosotros, muchas gracias por hacerme sentir especial.

En especial doy Gracias a mis dos amigos y hermanos: Lina y Wes. Vosotros si sois mi familia aquí. ¿Qué más puedo decir? Los quiero mucho!

Gracias a los colaboradores: Dra Carmem Guaza, y su grupo (en especial Miriam Mercha y Leyre Mestre) del Instituto Cajal que me enseñaron los cultivos de células gliales; Dr. Justo P.Castaño y Dr Raul Luque de la Universidad de Córdoba por ceder los ratones CST-KO y a Dr. Francisco O'Valle por la patología.

Y por último, pero no el menos importante, agradezco al Dr. Bruno L. Diaz, por haber me enseñado los primeros y más importantes pasos en la vida científica que ahora completan 10 años! Gracias principalmente por aun estar presente en ella!

De todos modos, a todos los que contribuyeron de alguna manera para la realización de esta tesis.

Muito Obrigada!

RESUMEN.....	i
ABREVIATURAS.....	ii
1 – INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Generalidades del sistema nervioso.....	1
1.2.- La esclerosis múltiple – Aspectos generales y epidemiología.....	3
1.2.1.- Aspectos clínicos.....	4
1.2.2.- Diagnóstico.....	6
1.2.3.- Etiología - Bases Inmunogenéticas y Factores Ambientales.....	7
1.2.4.- Patología.....	10
1.3.- Modelos animales utilizados en el estudio de la EM.....	11
1.3.1.- Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).....	11
1.3.2.- Modelo de infección viral.....	14
1.3.3.- Modelos de desmielinización.....	16
1.4.- Inmunopatología de la EM.....	16
1.4.1.- El sistema inmunitario.....	16
1.4.2.- El componente autoinmune en la esclerosis múltiple.....	25
1.4.3.- El componente inflamatorio en la esclerosis múltiple.....	30
1.4.4.- La tolerancia inmunológica en la esclerosis múltiple.....	32
1.5.- El papel de las células gliales en la EM.....	34
1.5.1 - Astrocitos.....	35
1.5.2 - Microglia.....	36
1.5.3 – Oligodendrocitos.....	38
1.6.- Tratamientos de la EM.....	40
1.7.- Neuroinmunología en la autoinmunidad.....	45
1.7.1.- Comunicación de los sistemas inmunitario y neuro-endocrino.....	45
1.7.2.- Neuropeptidos inmunomoduladores.....	48
1.8.- Cortistatina.....	56
1.8.1 – El papel de CST en la respuesta inmune.....	58

1.8.2 – El papel de CST en el sistema nervioso	60
2 – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	62
3 – MATERIALES Y MÉTODOS	64
3.1 - Productos químicos	64
3.2 - Péptidos.....	64
3.3 - Tampones y soluciones:	64
3.4 - Medios de cultivo.....	65
3.5 - Animales y modelos de experimentación:	66
3.5.1 - Inducción de EAE y tratamiento	67
3.5.2 - Modelo de ligación y punción cecal (CLP, del inglés <i>cecal ligation and puncture</i>)	70
3.5.3 - Modelo de colitis inducida por TNBS	71
3.5.4 - Modelo de artritis inducida por colágeno (CIA)	72
3.5.5 - Modelos de dolor inflamatorio y ensayos de comportamiento relacionados con dolor	73
3.5.6 - Modelos de comportamiento relacionados con ansiedad	76
3.6 - Neuropatología, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....	77
3.6.1 - Tinción con Hematoxilina y Eosina.....	77
3.6.2 - Técnica de Kluver-barrera.....	78
3.6.3 - Inmunohistoquímica para la detección de MBP	78
3.6.4 - Inmunofluorescencias	79
3.7 - Obtención de órganos y aislamiento de células	80
3.7.1 - Procesamiento de órganos linfoides.....	80
3.7.2 - Obtención de macrófagos peritoneales y de la suspensión peritoneal	81
3.7.3 - Obtención de extractos proteicos	81
3.7.4 - Obtención de células gliales.....	81
3.7.5 -Recolección y cultivo de la microglía no adherente:	82
3.7.6 - Aislamiento de diferentes poblaciones de células T	84
3.7.7 - Colección del líquido sinovial.....	85
3.8 - Análisis de la respuesta de células T autorreactivas	85

3.8.1 - Estimulación de los cultivos.....	86
3.8.2 - Ensayo de proliferación linfocitaria	86
3.8.3 - Caracterización de citoquinas intracelulares y marcadores de superficie mediante citometría de flujo	87
3.9 - Determinación de proteínas por ELISA(del inglés, Enzyme-linked Immunosorbent Assay)...	88
3.10 - Obtención de suero.....	91
3.11 - Determinación en suero de la producción de inmunoglobulinas	91
3.12 - Análisis de la expresión génica.....	92
3.12.1 - Aislamiento del ARNm.....	92
3.12.2 - Cuantificación de ARN	93
3.12.3 - Transcripción inversa (RT)	93
3.12.4 - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	94
3.12.5 - Electroforesis en geles de agarosa.....	96
3.13 - Ensayo de MTT.....	96
3.14 - Ensayo colorimétrico para determinación de óxido nítrico (ON).....	96
3.15 - Determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO).....	97
3.16 - Análisis estadístico.....	97
4 – RESULTADOS	99
4.1 - El tratamiento con CST reduce la incidencia y severidad de la EAE	99
4.2 - El tratamiento con CST reduce la infiltración y la desmielinización en el SNC de ratones con EAE	102
4.3 - El tratamiento con CST reduce la respuesta inflamatoria en el SNC de ratones con EAE.....	106
4.4 - El tratamiento con CST reduce la respuesta inflamatoria y autorreactiva en EAE.....	108
4.5 - El tratamiento con CST regula los niveles de autoanticuerpos en un modelo de EAE.....	111
4.6 - CST inhibe de forma directa la respuesta inflamatoria y autorreactiva de células T	112
4.7 – La CST modula la presencia y activación de células inmunes en la periferia en el modelo de EAE.....	114
4.8 – El tratamiento con CST induce la aparición de células T reguladoras (Treg) en ratones con EAE	116

4.9 - El tratamiento con CST induce la producción de factores neurotróficos en el SNC.	118
4.10 - CST inhibe la producción de citoquinas inflamatorias en microglia y astrocitos	120
4.11 - Efecto terapéutico beneficioso del tratamiento con Ghrelina (GHR) en la EAE.....	122
4.12 - Células inmunes deficientes en CST son más reactivas a estímulos inflamatorios	127
4.13 - Los ratones CST-KO son menos susceptibles a la inducción de la EAE.....	130
4.14 - Los ratones CST-KO no disminuyen ex vivo la respuesta autoreactiva de células T en el modelo de EAE	133
4.15 - Estudios de transferencia adoptiva indican que la resistencia de los CST-KO al desarrollo de la EAE parece residir intrínsecamente en los propios CST-KO.	135
4.16 - Ratones CST-KO son menos susceptibles al desarrollo de la artritis reumatoide, la colitis inducida por TNBS y la sepsis inducida por ligación y punición cecal	137
4.16.1 - Artritis reumatoide	137
4.16.2 - Enfermedad inflamatoria intestinal: Enfermedad de Chohn	140
4.16.3 - Sepsis	143
4.17 - Los ratones CST-KO presentan alteraciones en el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA).....	147
4.18 - Los ratones CST-KO presentan un estado de ansiedad elevado	148
4.19 - La inhibición de los receptores de glucocorticoides revierte el fenotipo de los ratones CST-KO.	151
4.20 – Ratones CST-KO son más susceptibles a la inflamación localizada.....	153
4.21.1 - Artritis monoarticular.....	153
4.21.2 - Dolor inflamatorio.....	155
4.22 - La CST reduce la respuesta al dolor en condiciones de inflamación aguda y crónica.....	158
5 – DISCUSIÓN.....	160
6 – COMENTARIOS FINALES.....	188
7 – CONCLUSIONES.....	190
8 – BIBLIOGRAFIA.....	192

RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurodegenerativa autoinmune inflamatoria crónica que causa alteraciones nerviosas graves. Actualmente se desconoce la etiología de la esclerosis múltiple, aunque se ha demostrado que existe un componente inflamatorio y autoinmune responsable de la neurodegeneración mediada por células autoreactivas Th1/Th17 acompañada de un desbalance de células reguladoras (Treg) responsables del mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Al no existir una cura efectiva, la necesidad de desarrollo de nuevas terapias es evidente. En concreto, las estrategias terapéuticas actuales están enfocadas a controlar el componente inflamatorio e incrementar la capacidad de regeneración del SNC. En este trabajo, nos propusimos demostrar que Cortistatina (CST) podría ser una alternativa terapéutica en el tratamiento de EM. CST es un neuropéptido con actividad anti-inflamatoria e inmunoreguladora muy potente a nivel sistémico, que regula un amplio abanico de agentes pro-inflamatorios, siendo capaz de inhibir la respuesta tipo Th1/Th17 y de inducir la generación/activación de células Tregs en varios modelos de autoinmunidad. De hecho, en un modelo de EM (el de la encefalomiелitis autoinmune experimental EAE), demostramos que el tratamiento con CST fue capaz de reducir la incidencia y severidad de la enfermedad, con una disminución significativa del número de placas desmielinizantes, así como de la infiltración y producción de mediadores inflamatorios en el parénquima nervioso. El tratamiento con CST bloqueó selectivamente la reactividad de células T encefalogénicas, perdiendo la capacidad proliferativa y produciendo niveles reducidos de citoquinas frente al antígeno específico. El tratamiento con CST aumentó la proporción de células T reguladoras funcionales en periferia, productoras de IL10. Estos resultados demuestran que, además de controlar la inflamación, CST tiene un papel en la respuesta autorreactiva de células antígeno-específicas y en el control de la tolerancia inmunológica. Corroborando los efectos anti-inflamatorios del tratamiento con CST, macrófagos y linfocitos activados deficientes en CST, presentaron una producción de citoquinas pro-inflamatorias exacerbada. Sorprendentemente, ratones deficientes en CST (CST-KO) fueron menos susceptibles a la inducción de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como la EAE, la artritis, colitis y sepsis. Encontramos que este efecto podía ser debido parcialmente a una desregulación en el eje hipotálamo-pituitaria-hipófisis que se reflejó en niveles elevados de glucocorticoides (GC) en circulación en ausencia de CST. Sin embargo, esta alteración sistémica de GCs no afectó la inflamación localizada. En un modelo de artritis monoarticular, los ratones CST-KO presentaron una mayor infiltración de células polimorfonucleares y producción de TNF- α en el líquido sinovial, y en general alteraciones histopatológicas más severas, es decir, desarrollaron una respuesta inflamatoria localizada exacerbada. La generación de este modelo en CST-KO nos permitió observar alteraciones en la sensibilidad al dolor en ausencia de CST. Así, demostramos que los ratones CST-KO son más sensibles a estímulos dolorosos en condiciones basales o bajo un proceso artrítico, y este efecto parece ser una consecuencia directa de la ausencia de CST endógena, ya que este neuropéptido presenta efectos analgésicos en modelos de inflamación aguda y crónica. Nuestros resultados han demostrado que la administración de CST atenúa las manifestaciones patológicas del dolor de forma independiente de su actividad anti-inflamatoria. En conclusión, en este trabajo demostramos que CST representa una atractiva alternativa terapéutica para el tratamiento de EM, y que, además de ser un excelente modulador de la respuesta inmunitaria, presenta importantes propiedades analgésicas.

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotropica
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNP	<i>Activity-Dependent Neuroprotective Protein</i>
AM	Adrenomedulina
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APC	<i>Antigen-presenting cells</i> (células presentadoras de antígeno)
ApoE	Apolipoproteína E
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina de suero bovina
cAMP	<i>cyclic AMP</i>
CBP	<i>Co-activator CREB-binding Protein</i>
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CIA	Artritis inducida por colágeno
CLP	<i>Cecal ligation and puncture</i>
CREB	<i>cAMP-responsive-element-binding protein</i>
CRG	Carragenina
CRH	Corticotropina
CST	Cortistatina
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4</i>
DC	<i>Dendritic cells</i> (Célula dendrítica)
DMEM	<i>Dulbecco-modified Eagle Medium</i>
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DRG	<i>Dorsal Root Ganglion</i>
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Esclerosis múltiple
FcR	Receptores de Fc
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
Foxp3	<i>Forkhead box Protein-3</i>
GC	Glucocorticoide
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GHR	Grelina
GHSR	<i>Growth hormone secretagogue receptor</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-Induced TNF Receptor</i>

GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i>
GR	Receptores de glucocorticoide
GRE	<i>GC-response elements</i>
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
HPA	Hipotálamo-pituitaria-adrenal
ICAM	<i>Intercellular cell adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
IL-	Interleuquina
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
IPEX	<i>Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enetropathy, X-linked</i>
iTreg	Treg inducibles
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LES	Lupus eritematoso sistémico
LPS	Lipopolisacáridos
MBP	Myelin basic protein (proteína básica de mielina)
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
MHC	Complejo de histocompatibilidad
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MPO	Mieloperoxidasa
MSH	<i>Melanocyte-stimulating hormone</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolico
NF-L	<i>Neurofilament light</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
nGRE	GRE negativo
NK	Células <i>natural killer</i>
NPY	Neuropéptido Y
NT-3	<i>Neurotrophin-3</i>
nTreg	Treg naturales
OCT	<i>Optimal cutting temperature</i>
ON	Óxido nítrico
OPC	<i>Oligodendrocyte Precursor Cells</i>
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDL	Poli-D-Lysine hydrobromide
PGE2	Prostaglandina E2
pGRE	GRE positivo
PKA	Proteína quinasa A

PKC	Proteína quinasa C
PLP	<i>Proteolipid protein</i>
PP	Primaria progresiva
PWL	<i>Paw withdrawal latency</i>
RAMP	<i>Receptor activity-modifying proteins</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted</i>
RM	Resonancia magnética
RP	Remitente progresiva
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute médium-1640</i>
RR	Remitente-recurrente
RT	Transcripción inversa
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SBF	Suero bovino fetal
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>
SEM	Error estándar de la media
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SOM	<i>Somatostatina</i>
SP	Secundaria progresiva
SST	Receptores de somatostatina
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TCR	Receptor de células T
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	T helper (células T efectoras)
TNBS	Ácido picrilsulfónico
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR-1	Receptores de TNF- α
TNFsol	TNF- α soluble
TNFtm	TNF- α transmembrana
Treg	Célula T reguladora
UCN	Urocortina
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>

1 – INTRODUCCIÓN

1.1.- Generalidades del sistema nervioso

El sistema nervioso en mamíferos controla las emociones y todas las funciones orgánicas, al tiempo que es responsable de mantener la homeostasis al percibir, interpretar, y generar las señales adecuadas como respuesta a las variaciones del medio interno y externo. El sistema nervioso está formado por 1) el sistema nervioso central (SNC), que comprende encéfalo y la medula espinal (protegidos por el cráneo y la columna vertebral, respectivamente), responsables de la recepción de estímulos, integración de los mismos y elaboración de las respuestas; y 2) el sistema nervioso periférico (SNP), formado por nervios craneales y espinales, ganglios y terminaciones nerviosas, y que se encarga de conducir los estímulos al SNC y trasladar a los órganos las órdenes emanadas por éste.

En el sistema nervioso existen diferentes tipos celulares que constituyen el nicho adecuado para que se desarrollen las diferentes funciones descritas. Las neuronas son las células funcionales del tejido nervioso y se estima que cada cerebro humano posee en torno a 10^{11} neuronas. Este tipo celular consta de un cuerpo celular y de unas finas prolongaciones divididas en dendritas y axones (Figura 1.1). Es el responsable de recibir el estímulo y transportar la información para y desde el SNC y SNP. Además de las neuronas, el sistema nervioso está compuesto en su mayoría por células gliales (aproximadamente por cada neurona hay entre 10 a 50 células de glia). Se trata de un grupo de células con características muy diferentes, responsables del mantenimiento estructural, defensa, y soporte trófico de la red neuronal. Entre ellas se incluyen: los oligodendrocitos (en el SNC) y las células de Schwann (en el SNP), responsables del revestimiento con mielina de los axones neuronales; los astrocitos, responsables del mantenimiento y la integridad estructural de sistema nervioso; y la microglía y macrófagos perivasculares, responsables de la fagocitosis de restos celulares, desechos metabólicos, etc. Actualmente se considera que todos estos tipos celulares interactúan e intervienen en procesos de neurogénesis, siendo fundamentales en el buen funcionamiento de las sinapsis nerviosas.

La transferencia de información de un punto a otro del sistema nervioso, requiere que se genere un potencial de acción (impulso nervioso) a través de la despolarización/repolarización

de la membrana plasmática neuronal en las dendritas, que es conducido a lo largo de los axones. Estos, a su vez, liberan diferentes mediadores como neurotransmisores y neuropéptidos, que transmiten así la información hacia la neurona siguiente o hacia los tipos celulares localizados en las terminaciones nerviosas. A lo largo del axón, la mielina, lipoproteína que constituye un sistema de bicapas fosfolipídicas, forma una capa gruesa permitiendo la transmisión de los impulsos nerviosos gracias a su efecto aislante. Los potenciales de acción saltan entre las regiones desnudas de los axones (Nódulos de Ranvier) y a lo largo de los segmentos mielinizados. La consecuencia es una conducción saltatoria del

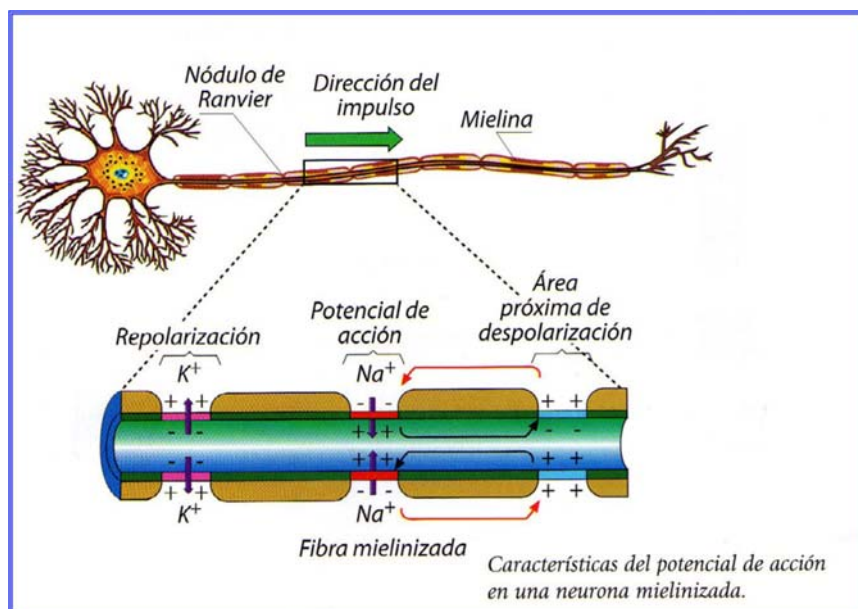


Figura 1.1 – Diagrama de una neurona

potencial de acción lo que contribuye al aumento de la velocidad del impulso nervioso (Girault and Peles 2002). La velocidad de conducción del impulso nervioso es proporcional al diámetro del axón y a la distancia entre los nodos de Ranvier. Cuando se produce la pérdida de la mielina se ocasionan graves trastornos en el sistema nervioso, ya que los impulsos eléctricos no se conducen con suficiente velocidad o se detienen en mitad de los axones, lo que reduce, deforma o impide completamente la transmisión de la información. La

desmielinización es un evento común en los déficits neurológicos resultante de lesiones debidas a un traumatismo, o en enfermedades neurodegenerativas crónicas, como en el caso de la esclerosis múltiple (EM).

1.2.- La esclerosis múltiple – Aspectos generales y epidemiología

La EM es un desorden neurodegenerativo mediado por el sistema inmune que se caracteriza por la presencia de inflamación, desmielinización y daño axonal en el SNC (Lucchinetti, Bruck et al. 2001). El neurólogo francés Jean Martin Charcot describió por primera vez la EM en 1868. A partir del análisis patológico *post-mortem* de sus pacientes, Charcot estableció una relación entre episodios intermitentes de disfunción neurológica y lesiones, en las que se apreciaban células inflamatorias dentro de la sustancia blanca del SNC. A esto lo denominó *sclérosis en plaque disseminé* o esclerosis múltiple.

La EM es la enfermedad neurológica más frecuente en los adultos jóvenes del norte de Europa y América del Norte. Un 70% de los casos se inician entre los 20 y los 40 años de edad y se ha convertido en la principal causa de discapacidad en adultos jóvenes después de los traumatismos. La incidencia de la EM es de dos a tres veces mayor en mujeres que en hombres. Sin embargo, aun no se ha esclarecido totalmente si el factor hormonal es la clave de las diferentes incidencias. Los diversos estudios de epidemiología realizados en España, muestran tasas de prevalencia de alrededor de 50 casos/100.000 habitantes en el año 2000. Estudios posteriores han mostrado un aumento en estas cifras, alrededor de 70-80 casos/100.000 habitantes (Villoslada 2010). En el norte de Europa, en países como Reino Unido y países escandinavos, la prevalencia presenta índices aún más elevados (100 y 200 casos/100.000 habitantes) (Compston 1994).

En general, existe un consenso sobre el aumento significativo de las tasas de prevalencia en diferentes países, que podría estar asociado a una mayor accesibilidad a tecnologías de diagnóstico más avanzadas, una mayor supervivencia debido a mejor asistencia médica, así como un aumento real de la frecuencia de la enfermedad. Este incremento significativo de la incidencia podría estar relacionado también con el aumento de las enfermedades autoinmunes descrito en las tres últimas décadas, debido a lo que se ha denominado la “hipótesis de la higiene”. Esta teoría propone que el descenso de las

infecciones infantiles, gracias a los antibióticos, vacunas y la mejora de la higiene, condicionaría el desarrollo de enfermedades autoinmunes en la edad adulta.

1.2.1.- Aspectos clínicos

La EM se caracteriza por la presencia de brotes clínicos, definidos como déficits neurológicos focales, propiciados por una lesión desmielinizante. Todos los síntomas dentro del plazo de un mes se consideran como un mismo brote, considerándose brotes diferentes los que ocurren con más de un mes de diferencia. Los brotes se clasifican según afecten a uno o varios sistemas, como monofocales o polifocales. Los síntomas clínicos de la enfermedad son muy variables. El paciente puede presentar cualquier síntoma de disfunción del SNC y, en casos excepcionales, también del SNP. Los síntomas más comunes de la EM son: alteraciones de la sensibilidad (parestesia), deficiencias visuales causadas por la neuritis óptica, temblor, fatiga, trastorno de los esfínteres, pérdida de la coordinación y parálisis muscular. Los signos clínicos vienen determinados por el lugar y por la extensión de las placas desmielinizantes, que se presentan de manera preferente en el SNC. La mayoría de los pacientes con EM presentan inicialmente un curso de enfermedad de recaída-remisión, seguido por un curso secundario progresivo, mientras la minoría presenta la forma progresiva primaria. De acuerdo con el modo de inicio y progresión de la enfermedad, se pueden distinguir cuatro fenotipos clínicos diferentes (Lublin and Reingold 1996) (Figura 1.2):

- La forma de remitente-recurrente (RR) se caracteriza por brotes clínicos claramente definidos, autolimitados, con remisión parcial o total de los síntomas que, a medida que se repiten, van ocasionando un déficit residual funcional, pero no hay progresión de los brotes. Es la forma clínica más común de EM, y afecta al 80% de los pacientes.

- La secundaria progresiva (SP) es la forma secundaria a la EM-RR, que evoluciona con un incremento de la discapacidad no relacionado con los brotes.

•La primaria y progresiva (PP) supone una progresión desde el inicio de la enfermedad con eventuales estabilizaciones temporales. Los pacientes presentan un empeoramiento continuo y gradual de los síntomas sin la presencia de brotes clínicos.

•La recurrente progresiva (RP) es aquella en que la progresión continúa desde el inicio con posibles brotes clínicos, con o sin recuperación completa. Durante los períodos entre brotes los pacientes presentan una progresión continua de los signos clínicos de la enfermedad.

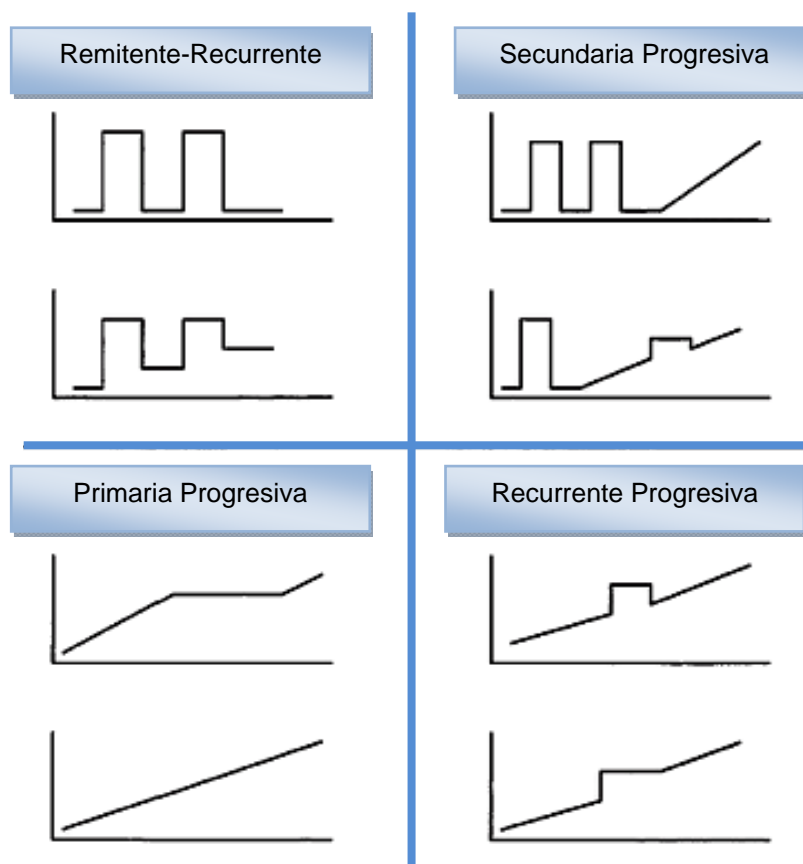


Figura 1.2 - Formas clínicas de la EM. Según la clasificación de Lublin y Reingold (1996) se pueden diferenciar subgrupos clínicos: remitente-recurrente (RR), secundaria progresiva (SP), primaria progresiva (PP) y recurrente progresiva (RP).

1.2.2.- Diagnóstico

Para el diagnóstico de la EM hay que tener en cuenta criterios que incluyen los signos clínicos y la diseminación de las lesiones. En la actualidad estos aspectos se determinan utilizando los siguientes métodos de diagnóstico:

a) Resonancia magnética (RM), que detecta la localización, la morfología y la intensidad de las lesiones; permite distinguir entre lesiones nuevas y antiguas a través la intensidad de la señal debido a la captación del compuesto de contraste gadolinio.

b) Examen del líquido cefalorraquídeo (LCR), que permite caracterizar la naturaleza inflamatoria de los trastornos neurológicos demostrando la síntesis intratecal de inmunoglobulinas. Esta alteración ocurre en un 96% de los pacientes, pero no es específica para EM.

c) Potenciales evocados, que se detectan usando el electro-encefalograma, que mide la actividad eléctrica del cerebro en respuesta a la estimulación. El potencial evocado visual es el más utilizado para el diagnóstico de la EM y consiste en medir la velocidad e intensidad de los impulsos cuando los ojos son estimulados.

En conjunto, estos tres métodos contribuyen a la confirmación del diagnóstico de la EM. Para un diagnóstico definitivo se debe demostrar la diseminación en el tiempo (al menos dos brotes separados y sintomáticos o cambios en la RM) y en el espacio (al menos dos lugares diferentes del SNC). De acuerdo con la frecuencia y potencia de los brotes, existen criterios establecidos para el diagnóstico de la EM, y son de aplicación universal en clínica. Los criterios vigentes dan gran relevancia a la RM, pues es la forma más sensible de diagnosticar la EM, además de visualizar la diseminación de las lesiones de manera espacial y temporal, así como excluir determinadas enfermedades que mimetizarían los signos clínicos de la EM.

1.2.3.- Etiología - Bases Inmunogenéticas y Factores Ambientales

A pesar de que la causa exacta de la EM permanece indeterminada, varios factores epidemiológicos contribuyen a explicar algunas de las hipótesis etiológicas de esta enfermedad. Numerosas evidencias circunstanciales apoyan el hecho de que la patología de la EM tiene atributos indicativos de enfermedad autoinmune, mediada por un ataque dirigido contra las vainas de mielina del SNC. Aunque no se conoce el factor iniciador de tal proceso, parece que la interacción entre factores ambientales y la predisposición genética contribuyen al desarrollo de la EM (Figura 1.3).

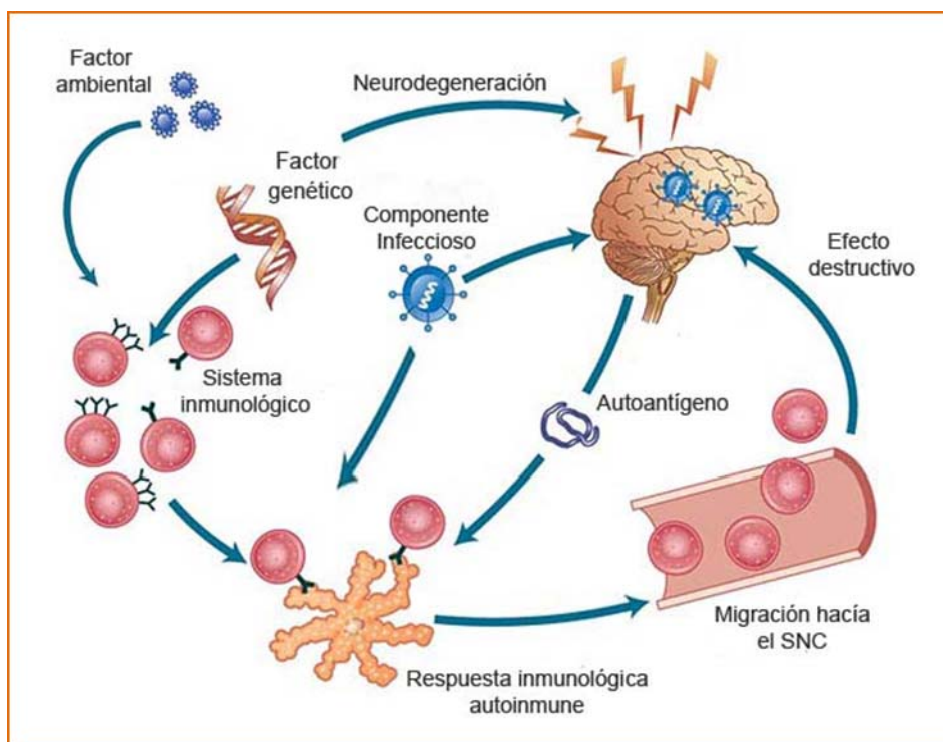


Figura 1.3 – Etiología de la EM. Aunque su etiología está todavía por establecer, numerosas evidencias circunstanciales apoyan el hecho de que la patología de EM tiene atributos indicativos de enfermedad autoinmune, mediada por un ataque dirigido contra las vainas de mielina del SNC, condicionado por una predisposición genética y la acción de diversos factores ambientales e infecciones virales

a) Factores genéticos

Los factores genéticos parecen jugar un papel crucial en la determinación de la susceptibilidad a la EM. De hecho, alrededor del 10% de los pacientes con EM tienen familiares cercanos con la misma enfermedad. Una de las evidencias de la contribución del componente genético proviene de estudios con gemelos; en un análisis comparativo entre gemelos monocigóticos y dicigóticos, la susceptibilidad a la EM era mucho mayor en los monocigóticos que en los dicigóticos, con una tasa de concordancia del 30% entre gemelos monocigóticos. Diferentes estudios demuestran que la susceptibilidad a la enfermedad tiene un carácter poligénico. Entre los genes asociados se encuentran los de *IL-1 β* y su receptor (IL-1R), *TNF* (del inglés, *Tumor necrosis factor*), la proteína ApoE (apolipoproteína E), la cadena pesada de inmunoglobulinas, el receptor de células T (TCR), la proteína básica de mielina (MBP, del inglés, *myelin basic protein*), *IL-2R*, *IL7R* y *LAG3*. (Jadidi-Niaragh and Mirshafiey).

De manera similar a otras enfermedades autoinmunes, los genes del HLA (del inglés, *human leucocyte antigen*) son los que destacan por su mayor asociación con la EM. Las asociaciones más fuertes implican las regiones DR y DQ (Hillert and Olerup 1993). Estas regiones codifican para el complejo de histocompatibilidad (MHC) de clase II, que se expresa sobre todo en las células presentadoras de antígeno, siendo responsables de dicha presentación antigénica a linfocitos T.

Sin embargo, aunque las alteraciones genéticas constituyen un factor de susceptibilidad a la enfermedad, no es el único factor determinante y la combinación de diferentes factores ambientales pueden contribuir al desarrollo de la EM en los individuos predispuestos genéticamente.

b) Factores ambientales

Factores como la localización geográfica o la etnia parecen contribuir indirectamente a la susceptibilidad a la EM. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado la alta prevalencia en países del norte europeo, así como en Estados Unidos y Canadá. En países como Escocia, Suecia y Dinamarca la prevalencia de la EM puede alcanzar índices de hasta

250/100.000 habitantes (muy elevados si los comparamos con la prevalencia de 4-20 casos/100.000 en países tropicales). Datos obtenidos de estudios de migración de diferentes poblaciones, sugieren que el riesgo es conferido por la exposición durante la adolescencia, ya que la migración antes de la pubertad desde una área de prevalencia baja hacia una de prevalencia más alta da lugar a un aumento del riesgo de desarrollar la EM, mientras que no hay diferencias cuando la emigración se da en sentido inverso (Ewing and Bernard 1998). La distribución geográfica desigual de la prevalencia e incidencia de la enfermedad, los estudios de migración o los relatos de casos de epidemias de EM ocurridos en Dinamarca y Estados Unidos, sugieren un posible papel de un agente infeccioso en la etiopatogénesis de la EM. Los virus son los candidatos más estudiados y descritos en la asociación con la EM.

Actualmente ningún virus aislado parece ser específico de la EM o se ha relacionado de manera inequívoca con esta enfermedad. Sin embargo, diversos virus tales como Epstein-Barr, herpes virus humano 6, zóster de la varicela, o el virus de la hepatitis se han relacionado con la EM. La hipótesis de una infección viral como factor desencadenante de la EM deriva de los estudios realizados en pacientes infectados, y también por el hecho de que uno de los modelos animales de la EM, el modelo de infección con el virus Theiler en ratones susceptibles, mimetiza signos clínicos y patológicos similares a la EM en humanos. Las teorías propuestas para explicar cómo las infecciones por un agente viral o bacteriano pueden inducir la EM son principalmente las siguientes:

- a) La teoría del mimetismo molecular, donde antígenos procedentes del microorganismo podrían presentar similitudes con proteínas de mielina, y la reactividad cruzada entre los autoantígenos y los componentes virales inducirían una respuesta inmunológica equivocada contra la vaina de mielina del SNC.
- b) La teoría de expansión de epítomos, que se basa en la activación, debido a eventos inflamatorios provocados por la infección, de células T autorreactivas presentes en la circulación, y capaces de reconocer antígenos presentes en la vaina de mielina reaccionando frente a ellos.
- c) La teoría de los superantígenos, que consiste en la activación de células T de manera no específica por antígenos del agente infeccioso. Los superantígenos son

potentes activadores de células T CD4+ que causan una rápida y masiva proliferación de células y la producción de citoquinas.

Otros factores ambientales, como el estrés, alimentación, etc, podrían intervenir en el inicio de la EM. A pesar de las innumerables evidencias, el papel de la genética y de los factores ambientales en la susceptibilidad de la EM sigue siendo complejo y poco conocido.

1.2.4.- Patología

La EM es una enfermedad caracterizada por un infiltrado inflamatorio en la sustancia blanca, con destrucción de los oligodendrocitos y consecuente desmielinización que provoca daño axonal y muerte neuronal (Steinman 1996). La patología de la EM fue mencionada por primera vez hace más de un siglo, con las primeras observaciones macroscópicas e ilustraciones de dos patólogos: Robert Carswell (1838) y Jean Cruveilhier (1841). Los primeros estudios microscópicos fueron realizados 20-30 años más tarde por el patólogo Rindfleisch (1863), quien describió los principales componentes de las placas de EM (infiltrados de células redondas, desmielinización y tejido cicatricial). Sin embargo, fue el médico francés Charcot quien en 1868 estableció una relación entre las observaciones clínicas y la presencia de placas escleróticas y de desmielinización (Lucchinetti, Bruck et al. 2000).

Las características patológicas de la enfermedad incluyen: inflamación perivascular mononuclear (linfocitos T, macrófagos/microglía), desmielinización con pérdida variable de los oligodendrocitos durante la fase crónica y grados variables de remielinización, daño relativo en los axones y/o cicatrices glióticas con proliferación de astrocitos e intensa producción de fibras gliales (astrogliosis) (Trapp, Peterson et al. 1998). La presentación patológica más común de la EM se da por la presencia de placas desmielinizantes en la sustancia blanca del SNC con preservación axonal relativa.

Las placas pueden ocurrir en cualquier parte de la sustancia blanca, pero son más frecuentes en las regiones de los nervios ópticos, en el tronco cerebral, cerebelo y médula espinal. Las placas se pueden dividir en agudas, crónicas activas, crónicas inactivas y placas en remielinización, también conocidas como placas en sombra.

Las placas agudas son más frecuentes en el estadio inicial de la enfermedad. Se caracterizan por un infiltrado inflamatorio perivascular, principalmente de células mononucleares como los linfocitos y fundamentalmente macrófagos. La esclerosis aún no es profunda, hay poca desmielinización, ligera pérdida axonal y poca alteración en la barrera hematoencefálica (BHE). Las placas crónicas activas presentan un escaso infiltrado inflamatorio, la desmielinización es completa salvo en el borde, donde se observa un proceso de desmielinización en marcha, con presencia de macrófagos fagocitando activamente mielina. Las placas crónicas inactivas suelen ser extensas y con desmielinización completa, con escasa densidad de axones, un número reducido de oligodendrocitos y alta densidad de astrocitos (astrogliosis), por lo que se denominan también placas glióticas. Las placas crónicas pueden ser remielinizadas (lo que se denomina placas en sombra o en remielinización). En estas placas los axones presentan una vaina de mielina más fina de lo normal y no existe astrogliosis.

1.3.- Modelos animales utilizados en el estudio de la EM

A causa de la limitada disponibilidad de muestras de cerebro humano durante la enfermedad activa, especialmente en estadios tempranos, se ha desarrollado una amplia variedad de modelos animales para la investigación de diversos desórdenes en el SNC. Los modelos animales que simulan las características de la EM han permitido aumentar la comprensión de los procesos patológicos que pueden causar o afectar esta enfermedad. Además, son una herramienta fundamental para llevar a acabo el desarrollo de nuevas terapias en esta enfermedad (Chitnis and Khoury 2003).

1.3.1.- Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)

La encefalomiелitis autoinmune experimental es el modelo animal más utilizado en el estudio de la EM (Baxter 2007). El desarrollo del modelo se lleva a cabo en cepas de ratones susceptibles, por inmunización con péptidos sintéticos derivados de proteínas de la vaina de mielina como MBP, MOG (del inglés, *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*) y PLP (del inglés, *proteolipid protein*), en adyuvantes adecuados. Esta inmunización provoca la

activación y expansión de células T específicas de antígeno en la periferia. Estas células entran en el SNC, reaccionan con los antígenos adecuados e inducen la enfermedad. Así, se produce una enfermedad inflamatoria desmielinizante autoinmune del SNC, que comparte aspectos clínicos e inmunopatológicos con la EM. Las diferencias en la susceptibilidad a las proteínas de mielina, en el ataque autoinmune y en la progresión de la enfermedad dependen de la especie y la cepa del animal inoculado. Por otro lado, la EAE también se puede inducir pasivamente por transferencia de células T CD4⁺ activadas *in vitro* con estos antígenos neurales o por transferencia adoptiva de células inmunes de ratones enfermos a ratones sanos (Baxter 2007). En este caso, el curso clínico depende, no solamente de la especie inoculada, sino también de si las células T CD4⁺, CD8⁺ o la mezcla de ambas se transfieren adoptivamente. La transferencia de la enfermedad de forma pasiva es una fuerte evidencia del componente autoinmune en el modelo de EAE.

La utilización de este modelo ha permitido el estudio de la biología de la EM (inflamación, respuesta autoinmune, mecanismos de tolerancia inmunológica) y ha influido directamente en el desarrollo de tres medicamentos actualmente aprobados para su uso en EM: acetato de glatirámico, mitoxantrona y natalizumab.

Al igual que la EM, la EAE puede ser una enfermedad aguda o una enfermedad crónica recurrente, con una evolución clínica caracterizada por una rápida aparición de la sintomatología (como una pérdida de sensibilidad en las patas traseras, que normalmente progresa hacia parálisis) o con una remisión espontánea (como se observa en algunos animales) (Dal Canto, Melvold et al. 1995). El curso clínico de la EAE puede ser variable, como el de la EM. En la inducción activa, las señales clínicas empiezan alrededor del día 12 después de la inyección del antígeno y se observa progresión hasta el día 20. Los ratones de la cepa SJL son más susceptibles a PLP, que induce un proceso similar a la forma de remisión-recaída de la EM en humanos, además de compartir varias similitudes histopatológicas, como inflamación mediada por células T y macrófagos (Aktas, Smorodchenko et al. 2005). Los ratones de la cepa C57BL/6, se utilizan como modelo de enfermedad crónica. Los ratones de esta cepa se inmunizan con MOG, lo que induce un ataque severo, con recuperación parcial, frecuentemente seguido por un estadio secundario progresivo con secuelas permanentes, como en los casos avanzados de la EM (Mendel, Kerlero de Rosbo et al. 1995).

La EAE, al igual que la EM, es una enfermedad mediada por células T CD4 activadas, específicas de la fracción encefalogénica, que entran en el SNC y activan la microglía (capaz de producir TNF- α), lo que lleva a la inducción de VCAM e ICAM. Estas moléculas de adhesión, junto con la inducción de la permeabilidad de la BHE, facilitan la infiltración de células mononucleares en el SNC y la consecuente desmielinización y daño axonal (Juedes, Hjelmstrom et al. 2000).

A pesar de ciertas controversias, estudios realizados con depleción por anticuerpo, con ratones deficientes de células CD8+, así como con transferencia pasiva, sugieren un papel regulador de las células T CD8+ en la EAE. Se demostró que la transferencia adoptiva de células T CD8+ citotóxicas (CTL, del *inglés cytotoxic T lymphocytes*) específicas para MBP mediaba una enfermedad autoinmune en el SNC (Goverman, Perchellet et al. 2005). Sin embargo los signos clínicos, la distribución y tipo de lesiones en este modelo difieren del observado en células CD4+. Las lesiones ocasionadas por la transferencia adoptiva de células T CD8+ están localizadas primariamente en el cerebro, mientras que las de CD4+, que son más semejantes a las lesiones de la EM, atacan principalmente la medula espinal, con infiltrado inflamatorio, masiva muerte celular perivascular y desmielinización (Huseby, Liggitt et al. 2001; Sun, Whitaker et al. 2001).

Considerando el modelo de transferencia pasiva se ha demostrado que las células T secretoras de citoquinas del tipo Th1, como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , y Th17, productoras de IL-17, son las que inducen la enfermedad. Por el contrario, las células que expresan IL-4, IL-5 e IL-10 protegen a los animales de la enfermedad (Hemmer, Archelos et al. 2002). Sin embargo, células Th2 específicas para MBP producen una enfermedad más severa que cuando se transfieren en un hospedero inmunodeficiente (Lafaille, Keere et al. 1997). De la misma manera, las citoquinas Th1 parecen tener un doble papel en la EAE. Ratones deficientes en IFN- γ desarrollan una enfermedad aun más severa (Willenborg, Fordham et al. 1996), mientras que la inyección intratecal de IFN- γ protege a los animales de la fase progresiva crónica de la EAE, al inducir muerte de células inflamatorias en el SNC (Furlan, Brambilla et al. 2001). Lo mismo se observa con TNF- α . Ratones deficientes en TNF- α también desarrollan la enfermedad y, en algunos casos, de forma más severa que los controles. Dos estudios han demostrado que la inhibición de TNF- α con un anticuerpo neutralizante o con el uso del receptor soluble de TNF, exacerba la EM (Genain, Abel et al. 1996; van Oosten,

Barkhof et al. 1996) Es importante destacar que existen algunas diferencias entre el modelo de EAE y la EM:

1 EAE se induce en cepas genéticamente susceptibles usando antígenos específicos y un fuerte adyuvante, mientras que la EM es un proceso cuya etiología está aún por determinar.

2 En la EAE se utilizan cepas endogámicas mientras que la EM ocurre en una población genéticamente heterogénea

3 En la EM existe una diversidad en el fenotipo clínico de las lesiones que abarca aquellas en las que existe una extensa inflamación a las que destacan por su inflamación mínima pero oligodendrogliopatía evidente. Estas variaciones son difícilmente observables en el modelo de EAE.

Aún considerando estas diferencias, el modelo de EAE es el más utilizado por los investigadores para la caracterización y conocimiento de los factores implicados en procesos de neuroinflamación y autoinmunidad del SNC.

1.3.2.- Modelo de infección viral

A pesar de que hasta el momento no se ha descrito de forma precisa la implicación de un tipo de virus exclusivo como causante de la EM, varios agentes virales, incluyendo retrovirus endógenos humanos, virus de Epstein-Barr, y algunos herpesvirus, han sido relacionados con la patogénesis de la EM. El modelo de virus ha sido utilizado para demostrar los mecanismos por los cuales la autoinmunidad se puede desarrollar después de una infección viral, lo que es consistente con la hipótesis de la epidemiología de la EM mediada por infección viral. Se ha propuesto la teoría de la inducción por virus de la enfermedad al ocurrir a continuación de una infección neurotrófica del SNC, en particular de los oligodendrocitos, o de una infección citopática de los oligodendrocitos que, en caso de ser atacados por las células T y por la respuesta humoral, originan una enfermedad desmielinizante.

El virus de la encefalomyelitis murina de Theiler (TMEV, del inglés *Theiler's murine encephalomyelitis Virus*), es el más utilizado como modelo de enfermedad autoinmune inflamatoria desmielinizante del SNC inducida por virus. En este modelo, la enfermedad se

induce por la inoculación intracraneal del virus, que da lugar a una enfermedad bifásica. La infección de ratones susceptibles al virus TMEV (cepa SJL), consiste en una fase aguda, que ocurre entre los 3 a 12 días post-infección, seguida de la enfermedad crónica desmielinizante, que aparece entre los 30 y 40 días post-infección. De forma eventual se produce la muerte del ratón. En contraste, la cepa C57Bl/6 es parcialmente resistente y desarrolla solamente la fase aguda, con la eliminación completa del virus en, aproximadamente, tres semanas después de la infección. (Oleszak, Chang et al. 2004).

La fase aguda de la enfermedad presenta semejanzas con la enfermedad de polioencefaliomielitis y está asociada con la replicación del virus en la materia gris del SNC. Durante esta fase se observan en el SNC un extenso infiltrado de células mononucleares, (células T CD4, CD8, macrófagos y pocos linfocitos B) y una destrucción neuronal de grado variable con poco o ningún signo clínico (Oleszak, Chang et al. 2004). Durante la fase crónica, los ratones desarrollan lesiones desmielinizantes en la sustancia blanca, con infiltrado de células mononucleares, (principalmente de células T CD4+ y CD8+) y presentan a una atrofia progresiva de la medula espinal y una extensa pérdida axonal con la consecuente deterioración neurológica, que llevan a la aparición de signos clínicos muy semejantes a los vistos en EM. Un importante hallazgo observado al usar el modelo inducido por virus, fue que el daño axonal precede a la desmielinización en la infección por TMEV (Tsunoda, Kuang et al. 2003). El mecanismo preciso del daño axonal en el estadio temprano de la infección por TMEV aun no está claro. Lo más probable es que el daño axonal en la materia blanca y en la médula espinal podría ser el resultado de la degeneración Walleriana (degeneración axonal después de una lesión en el nervio), inducida por la muerte neuronal en la materia gris del SNC (Tsunoda, Kuang et al. 2003). Durante la fase aguda, la apoptosis neuronal inducida por la infección por TMEV genera una señal que tras provocar la migración de células inflamatorias a los sitios de degeneración walleriana, induce desmielinización (Tsunoda and Fujinami 2010).

En general el modelo de TMEV permite estudiar las características del proceso de desmielinización y daño axonal mediado por el sistema inmune en un modelo que asemeja la enfermedad en su fase crónica.

1.3.3.- Modelos de desmielinización

Debido a la variabilidad de fenotipos clínicos encontrados en los pacientes con EM, principalmente en lo que respecta a las placas y lesiones, se han desarrollado otros modelos que estudian los fenómenos de desmielinización/remielinización independientemente del efecto debido a la respuesta inmune. Estos modelos utilizan diferentes toxinas como lisolecitina, cuprizona, o bromuro de etidio, que van a producir en mayor o menor grado y en diferentes regiones (cerebro, médula) una desmielinización parcial o total, afectando a diferentes poblaciones celulares. Permiten además la caracterización del efecto de agentes terapéuticos dirigidos a reprimir la desmielinización y acelerar los eventos de remielinización en la EM.

1.4.- Inmunopatología de la EM

Aunque su etiología está todavía por establecer, en base al estudio en diferentes modelos animales (que se comentarán en apartados siguientes), la EM se describe como una patología neurodegenerativa del SNC caracterizada por un proceso autoinmune derivado de una pérdida de la tolerancia por parte del sistema inmune contra varios componentes de la vaina de mielina y que conlleva una inflamación crónica (Lutton, Winston et al. 2004). De este modo, la inmunopatología de la EM comprende dos componentes claves: el autoinmune y el inflamatorio.

Antes de desarrollar este apartado y facilitar su comprensión, se explicarán brevemente las características principales de la respuesta inmune.

1.4.1.- El sistema inmunitario

En mamíferos, el sistema inmunitario consta del sistema inmunitario innato, evolutivamente más antiguo, y el altamente específico sistema inmunitario adaptativo. El sistema inmunitario innato actúa como una primera línea de defensa reconociendo estructuras moleculares específicas de patógenos a través de un limitado grupo de receptores específicos. Además, puede detectar la presencia de daño tisular, mediante el reconocimiento de

moléculas liberadas tras la lesión. El sistema inmunitario adaptativo reconoce un amplio espectro de antígenos a partir de un conjunto diverso de receptores reordenados somáticamente (receptores de células T y células B). La combinación entre la inmunidad innata y adaptativa permite reconocer y eliminar patógenos con máxima eficacia y reparar el daño causado por los mismos, aumentando la supervivencia de los organismos.

Básicamente, ante una infección o daño tisular, se produce la activación de células del sistema inmunológico residentes en el tejido afectado como macrófagos, mastocitos y neutrófilos, que, tras reconocer al patógeno o el daño causado, liberarán diferentes mediadores como citoquinas, quimioquinas, especies reactivas de oxígeno, aminas vasoactivas, productos proteicos, dirigidos a aislar el daño y reclutar nuevas células inmunes desde el torrente sanguíneo hacia el sitio inflamado. Una vez el patógeno ha sido eliminado y se ha reparado el daño tisular, se produce una fase de resolución caracterizada por el control y desactivación de los componentes celulares y mediadores moleculares del sistema inmunitario innato. Por tanto, si bien el proceso inflamatorio es crucial para la supervivencia, también lo es controlar la magnitud de la respuesta inflamatoria (Figura 1.4).

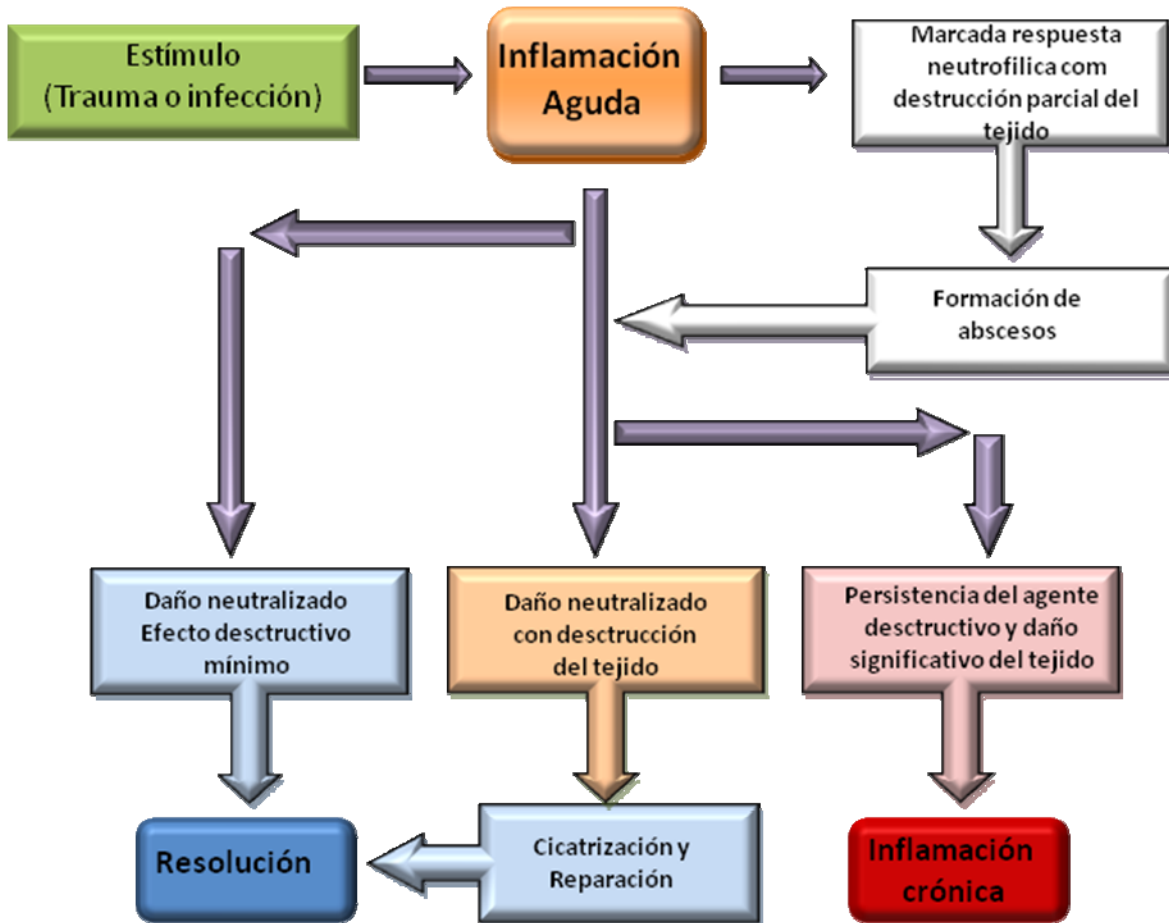


Figura 1.4. – Diagrama del proceso inflamatorio

Respecto a la respuesta inmunitaria adaptativa, los linfocitos T y B juegan un papel fundamental. Los linfocitos pueden clasificarse en diferentes poblaciones según sus marcadores de superficie y función. Los linfocitos T citotóxicos, que incluyen los linajes CD4 y CD8, matan las células diana. Los linfocitos Th (CD4+ helper) modulan las respuestas de células B y T CD8+. Las células Th se clasifican dependiendo de su perfil de citoquinas, que están relacionadas con el desarrollo de diferentes funciones inmunes (Figura 1.5). Así, distinguimos células Th1 (que producen principalmente IL-2, IFN- γ y TNF- α), células Th2 (que producen IL-4, IL5, IL-9, IL-10, entre otras), células Th17 (que producen IL-17, IL-22), y células T reguladoras (que se comentarán más adelante). Existe una importante interconexión en la producción y generación de estos tipos celulares durante el desarrollo de las respuestas inmunológicas, que, en algunos casos, puede ser antagonística (por ejemplo, las citoquinas producidas por las células Th1 reprimen la respuesta Th2, y al revés). En general, una respuesta Th1/Th17 es protectora frente a infecciones causadas por la mayoría de patógenos, sobre todo intracelulares. Las citoquinas Th1 y Th17 activan la inmunidad innata y promueven la producción de anticuerpos capaces de opsonizar y fijar el complemento. Una respuesta Th2 tiene carácter anti-inflamatorio, y es efectiva en la erradicación de patógenos extracelulares. En cualquier caso, la activación errónea o exagerada de estas poblaciones puede conducir a condiciones patológicas de distinto tipo.

Respuestas insuficientes pueden causar inmunodeficiencias y cáncer; pero, respuestas excesivas pueden producir un estado de inflamación crónica, que, junto con otros factores, como la susceptibilidad genética o factores ambientales y la presencia de células autoreactivas en la periferia, puede desencadenar autoinmunidad. Una respuesta autoinmune es similar a una respuesta inmune fisiológica pero dirigida frente a antígenos propios, que, en condiciones de inflamación crónica, se encuentran expuestos, se producen en exceso, y activan los clones de células T autoreactivos presentes en periferia. Estas células reclutarán y activarán a otras células del sistema inmune generando un proceso destructivo que se amplifica en el tiempo.

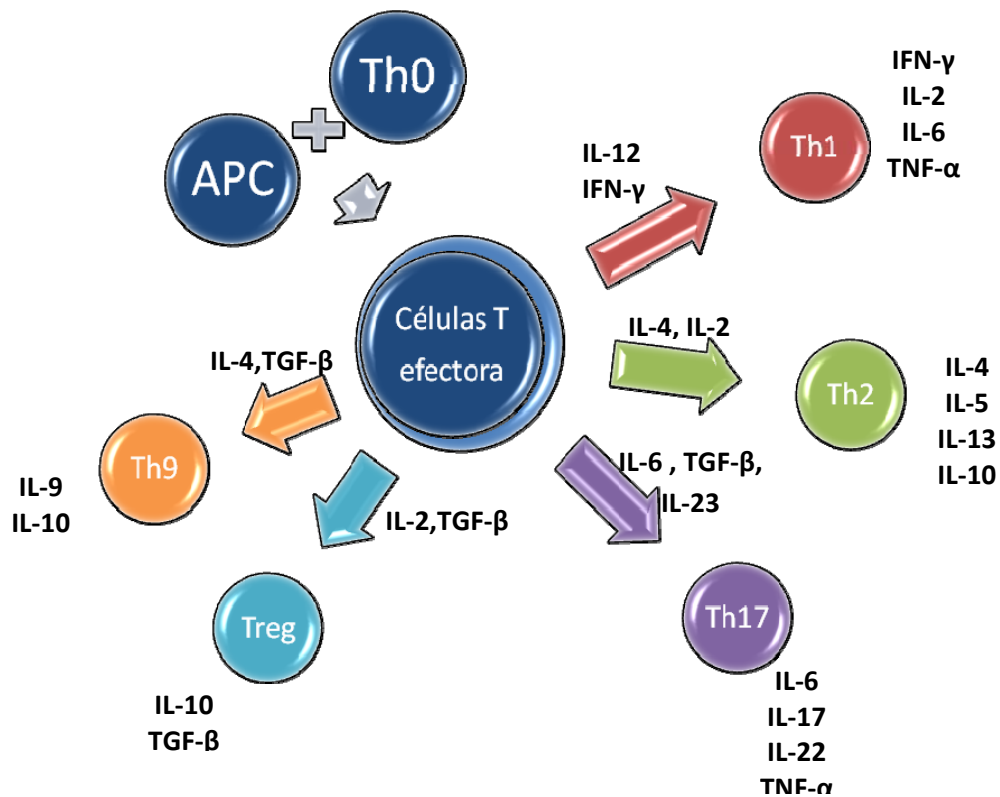


Figura 1.5 - Polarización de células T. Células Th0 se diferencian en respuesta a la activación inducida por la presentación antigénica mediada por células presentadoras de antígenos profesionales en los órganos linfoides. La diferenciación es dependiente del perfil de citoquinas presentes en el momento de la activación

Por tanto, la regulación de la respuesta inmunitaria es, de hecho, el factor clave en la supervivencia de los organismos. Con el fin de reconocer y reaccionar frente a cualquier estructura química de cualquier organismo, los linfocitos poseen un amplio repertorio de receptores (por ejemplo, existen más de 10^{14} clones diferentes de células T). Hoy se sabe que aproximadamente el 50% de estos clones son capaces de reconocer componentes del propio organismo. En este sentido, los organismos han desarrollado diferentes mecanismos de tolerancia en el sistema inmune, como son la tolerancia central, anergia, regulación con citoquinas, y la presencia de células dendríticas tolerogénicas y/o células T reguladoras.

La tolerancia central a los autoantígenos se establece incluso durante la ontogenia de los linfocitos, en el momento en que el TCR específico de antígeno está presente a niveles suficientes como para generar la tolerancia. Durante el desarrollo, los linfocitos sufren un proceso que se denomina selección clonal, que consiste en permitir que estas células completen su maduración y diferenciación. Durante este proceso, en el timo, las células que reconocen antígenos propios con alta afinidad son eliminados, mientras que los que tienen baja o ninguna afinidad por los antígenos propios son seleccionados, lo que permite la migración hacia los órganos linfoides periféricos. Se considera que el proceso de selección clonal está mediado por la afinidad del TCR al complejo de MHC-antígeno propio. La presentación de antígeno propio en el timo se hace posible mediante las células epiteliales tímicas especializadas, con capacidad de expresar de manera promiscua una interminable variedad de antígenos tejido-específicos (Derbinski, Schulte et al. 2001). Sin embargo, durante este proceso muchas células autorreactivas se escapan y deben ser controladas en la periferia. De esta forma, linfocitos T autorreactivos están normalmente presentes en todos los individuos, aunque sólo entre un 3-8% de la población desarrolla enfermedades autoinmunes, lo que indica la eficacia de los mecanismos de tolerancia periférica. Estos mecanismos incluyen cambios intrínsecos (génicos, bioquímicos) que afectan la capacidad de los linfocitos autorreactivos de responder tras la activación de su receptor (anergia clonal). Esto puede deberse a la ausencia de señales co-estimuladoras (B7-1 y B7.2) o simplemente porque el antígeno no está asociado a moléculas de MHC esenciales para la activación linfocitaria y expansión clonal. Además, se ha demostrado recientemente que las células estromales de los ganglios linfáticos son capaces de presentar autoantígenos a los linfocitos T, lo que induce una delección clonal similar a la del timo (Katakai, Suto et al. 2008). Otros controles implican la limitación de la presencia de factores de crecimiento esenciales y de mediadores proinflamatorios claves para el desarrollo eficiente de la respuesta inmunitaria. Por último, un mecanismo fundamental de supresión inmunológica, ampliamente estudiado en la última década, es la supresión mediada por cierto tipo de células T (denominadas células T reguladoras, Treg) que limitan la activación y expansión de linfocitos T autorreactivos.

Las Treg tienen un papel crítico en la inducción y mantenimiento de tolerancia periférica tanto frente a antígenos propios como no propios, controlando la respuesta inmunitaria, de tal forma que, la ausencia o mal funcionamiento de las Treg está asociado a

procesos autoinmunes, incluida la EM. Se pueden distinguir dos grupos de Treg atendiendo a su origen (Figura 1.6):

- a) Treg naturales, que se originan en el timo. Son células CD4⁺ que expresan constitutivamente el factor de transcripción Foxp3 (del inglés *Forkhead box Protein-3*) y la cadena α del receptor de la IL-2 (CD25).
- b) Treg inducibles, que comprende a las Tr1, Th3, y las inducibles CD4⁺Foxp3⁺.

La tolerancia hacia lo propio a través de la expresión promiscua de antígenos en el timo puede operar, no solamente vía selección negativa de células T, sino también vía selección de células T CD4 reguladoras (Seddon and Mason 2000). Las células Treg originadas en el timo se conocen como Treg naturales (nTreg) y son esenciales en el mantenimiento de la tolerancia periférica a antígenos propios. Sakaguchi et al demostraron que la depleción de células Treg CD4⁺CD25⁺ en ratones normales inducía múltiples enfermedades autoinmunes, mientras que la reconstitución de las mismas suprimía el desarrollo de estas enfermedades (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). La expresión de Foxp3 es esencial para el desarrollo de estas células Treg naturales, ya que su transducción en células T vírgenes induce la expresión de CD25 y otras moléculas de superficie, como CTLA-4 (del inglés, *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*), y reprime la producción de IL-2 e IFN- γ y la proliferación de células T (Hori, Nomura et al. 2003). Además, mutaciones en este gen causan un desorden autoinmune fatal en humanos (Síndrome IPEX, del inglés, *Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enetropathy, X-linked*) y en ratones Scurfy. Los individuos con mutaciones para Foxp3 presentan una hiperproliferación linfocitaria y desarrollan alergias y enfermedades autoinmunes, como la diabetes y la enfermedad inflamatoria del intestino (Brunkow, Jeffery et al. 2001). En general, las Treg naturales actúan principalmente inhibiendo la producción de IL-2 y la entrada en ciclo celular de las células autorreactivas. De esta forma, inhiben la proliferación de células T *naive* y su diferenciación en células T efectoras in vivo, suprimen las funciones efectoras de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, de células T asesinas naturales (NK, del inglés, *natural Killer*),

linfocitos B, macrófagos, y células dendríticas. El mecanismo exacto por el que estas células Treg ejercen su función supresora no está claro, aunque se ha demostrado que depende principalmente de contacto celular en base a CTLA-4, que interacciona con CD80/CD86 en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC, del inglés, *antigen-presenting cells*), señalizando de manera negativa la activación de células T (Fehervari and Sakaguchi 2004)

Las células Treg no parecen ser un tipo celular con un fenotipo específico pero sí un grupo de células T con diferentes fenotipos, que comparten la función supresora. De este modo, además de CD25, Foxp3 y CTLA4, se están utilizando otras diferentes moléculas como marcadores de células con capacidades reguladoras. Entre ellas, TGF- β , IL-10 o HLA-G y una baja expresión de CD45RB, CD62L, CD39 y GITR (del inglés *Glucocorticoid-Induced TNF Receptor*) (Feger, Tolosa et al. 2007). Utilizando estos marcadores se han identificado en la periferia otros tipos de células Treg. Estas células se pueden generar en la periferia en presencia de determinados factores solubles o en presencia de células dendríticas (células centinelas del sistema inmune con la función principal de APCs) con un fenotipo de maduración intermedio (denominadas reguladoras o tolerogénicas). En este sentido, se ha destacado sobre todo la participación de dendríticas tolerogénicas en la generación de células Tr1 y de células Treg Foxp3⁺. Respecto a las células Tr1, regulan respuestas inmunes tanto de linfocitos *naïve* como células efectoras Th1, Th2, y de memoria. Para ejercer sus funciones supresoras, precisan ser activadas por su TCR, lo cual provoca la secreción local de citoquinas inmunomoduladoras (IL-10 y parece que también TGF- β). De esta forma, una vez activadas de manera antígeno-específica, pueden suprimir las respuestas frente a otros antígenos. Las células Th3 se caracterizan por la producción de TGF- β . También se generan en presencia de células dendríticas tolerogénicas pero, al contrario que las Tr1, estas células presentan marcadores compartidos con las Treg naturales, como Foxp3 y CD25. (Lan, Ansari et al. 2005). A diferencia de las células Treg naturales, las células Treg inducibles actúan principalmente mediante la producción de mediadores solubles (citoquinas IL-10 y TGF- β).

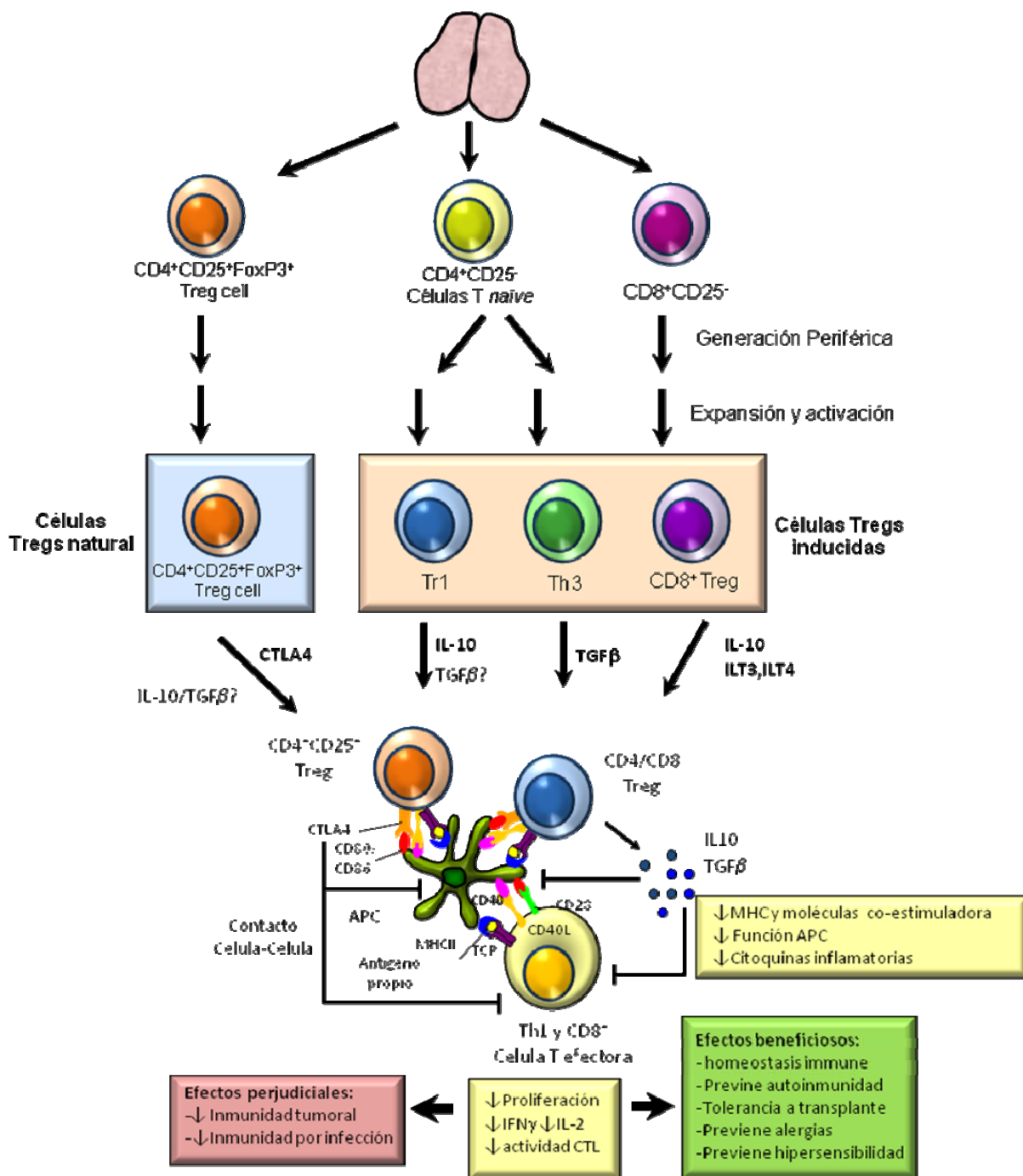


Figura 1.6 – Diferentes subtipos de células Tregs implicados en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Células T regs naturales (nTreg) Foxp3 + se diferencian en el timo y migran hacia los tejidos periféricos, y son capaces de presentar efectos inmunosupresores mediante liberación de citoquinas o mediante contacto celular, mientras las células Treg inducibles (iTreg) se diferencian en los órganos linfoides, presentan fenotipos y modos de acción diferenciados de las células nTreg. En general, las células Tregs actúan en la inmunosupresión de las células T efectoras presentado diversos efectos beneficiosos

1.4.2.- El componente autoinmune en la esclerosis múltiple

Diversas teorías sobre la etiología de la EM conducen a un punto en común: células autorreactivas presentes en periferia y específicas frente antígenos de la vaina de mielina, infiltran el SNC y empiezan un ataque contra la mielina, que ocasiona desmielinización y daño axonal. Tradicionalmente, la EM se ha considerado una enfermedad mediada por células Th1 CD4+, específicas de la proteína mielina, como responsables del inicio y coordinación de la respuesta autoinmune en el SNC. Así, se han observado células Th1 CD4+ activadas específicas de mielina tanto en sangre como en fluidos de pacientes, mientras que en individuos sanos se han encontrado células no activadas (J neuro immunol _88_1_1998_Cowden). De hecho, ambos tipos de células T (CD4+ y CD8+) se han observado dentro de lesiones y en el fluido cerebroespinal, predominando las células Th1 CD4+ en las lesiones agudas y las CD8+ en las lesiones crónicas (Fenyk-Melody, Garrison et al. 1998). Sin embargo, resultados recientes demuestran un papel crucial de las células Th17 en la evolución de la enfermedad desmielinizante. El descubrimiento de la implicación de las células Th17 en la patogénesis de la EM se inició a partir de observaciones en ratones tratados con anticuerpos neutralizantes para IFN- γ y en ratones deficientes en IFN- γ , TNF- α o en su receptor específico, donde el desarrollo de la enfermedad es incluso más severo. Además, ratones deficientes en la subunidad p35 de IL-12, un factor clave en la polarización a la respuesta Th1, desarrollaban la enfermedad mientras los deficientes para la subunidad p40 eran resistentes (Ferber, Brocke et al. 1996; Heremans, Dillen et al. 1996; Gran, Zhang et al. 2002). La discrepancia entre estos resultados fue resuelta con el descubrimiento de la citoquina IL-23, compuesta por una subunidad p19 y por la subunidad p40 de IL-12. La IL-23 no está implicada en la diferenciación de células Th17 pero es clave para su supervivencia y mantenimiento una vez generadas. La diferenciación de las células Th17 depende de la combinación de citoquinas adecuada (IL-6, TGF- β , IL-21) y afecta de manera negativa a la diferenciación de células Th1/Th2 y Treg. Estas células secretan altos niveles de IL-17A y son altamente encefalitogénicas, al inducir la enfermedad cuando se transfieren a ratones sanos (Langrish, Chen et al. 2005). Así, ratones deficientes en la citoquina IL17, mostraron una disminución en los síntomas de la enfermedad, que, aunque no fue una reversión completa, sugiere un papel predominante en la EM para las células Th17. De hecho, en el

modelo animal de EAE se observa un gran número de células Th17 específicas de autoantígenos del SNC en los órganos inmunes de la periferia y no en el SNC antes del inicio de los síntomas de la enfermedad. Durante la fase aguda en dicho, el mayor porcentaje de células Th17 específicas de autoantígenos del SNC se encuentran en el tejido diana inflamado, aunque la mayoría de las células Th17 en términos generales aún se encuentran en periferia (bazo y ganglios linfáticos). En estos órganos, las células Th17 forman un reservorio desde el que son reclutadas hacia el tejido diana para participar en la agresión al mismo. Durante la fase de recuperación en EAE, un alto número de células IL-17 específicas de autoantígenos aparecen en periferia pero no en el SNC. Además, la frecuencia de células Th17 es mayor en el LCR de pacientes con EM-RR durante la fase de recaída que durante la remisión, o en comparación con pacientes con otras enfermedades neurológicas no inflamatorias. En este sentido, se han detectado altos niveles de IL-17 en leucocitos circulantes, en placas y LCR de pacientes con EM, existiendo una correlación entre los niveles de IL-17 (a los que contribuyen también las células gliales residentes activadas durante la enfermedad) y la presencia de placas activas de desmielinización. Por tanto, los niveles de IL-17 se consideran un marcador de severidad de la EM e indica la presencia de la enfermedad de forma activa. Es importante considerar que, ya que las células Th17 y las Treg tienen programas de desarrollo y funciones efectoras recíprocas, el número de células Th17 respecto al de Treg podría indicar la cronicidad de la inflamación en el SNC e indicar la progresión de la enfermedad.

Por tanto, actualmente se considera que la EM se inicia a partir de la activación en la periferia de células Th17 autoreactivas para antígenos del SNC, que expresan altos niveles de IL-17 (Figura 1.7). Entre las diferentes funciones de esta citoquina (que potencia la secreción de IL-6, TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, MCP-1, activación de la microglia residente, etc) destaca la ruptura de la barrera hematoencefálica. La BHE es fundamental en la creación de un área altamente restringida en el cerebro. Está formada por las células endoteliales conectadas por uniones muy estrechas, asociadas a una membrana basal, pericitos y una capa casi continua de astrocitos. Esta estructura tiene una importancia en el mantenimiento de la homeostasis de las neuronas y células gliales y en el bloqueo del acceso de células inflamatorias y sustancias posiblemente tóxicas. Aunque no esté muy claro si es un evento primario o secundario al proceso inmunológico inflamatorio, se sabe que la rotura de la BHE es un evento importante

en la patogenia de la EM. (Larochelle, Alvarez et al. 2011). La IL-17 parece alterar la BHE mediante la generación de especies reactivas de oxígeno por las células endoteliales, lo que afecta al citoesqueleto y a la estabilidad de las uniones celulares de la BHE.

La producción de IL-17 también tiene un papel en la atracción de neutrófilos, la activación de metaloproteinasas, y la trans migración de células a través de la BHE. Esto permite la entrada de estas células al SNC, y el reclutamiento de otras células del sistema inmune hacia el órgano diana (células Th1, de macrófagos, células B). La activación de estas células y de las células residentes genera una cascada de mediadores inflamatorios que conduce a la destrucción de la mielina y daño axonal.

Por otro lado, se ha demostrado que la fase de recuperación/remisión está relacionada con la generación de una respuesta Th2/Treg, en base al aumento de la producción de las citoquinas anti-inflamatorias/reguladoras IL-10 y TGF- β . De hecho, la administración de estas citoquinas reduce de manera significativa los signos de la enfermedad. Estos datos sugieren que existe un cambio de respuesta tipo Th1/Th17 hacia la respuesta tipo Th2/Treg durante la fase de remisión de la enfermedad. La importancia de la respuesta Th2/Treg se ve enfatizada por los efectos de dos drogas de primera línea utilizadas ampliamente en el tratamiento de EM: acetato de glatirámico e IFN- β (Imitola, Chitnis et al. 2005), que parecen contribuir al desarrollo de esta respuesta.

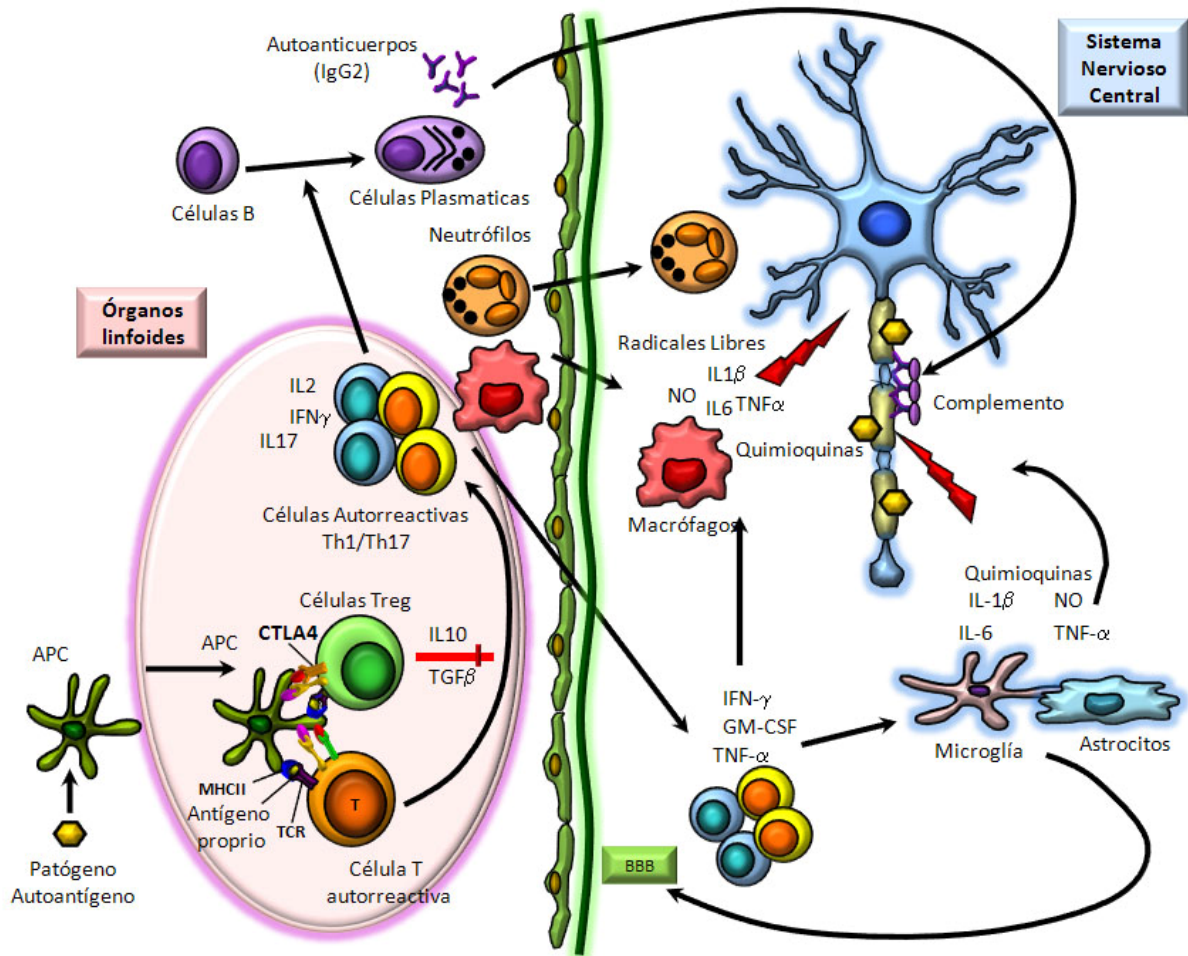


Figura 1.7 - Respuesta Inmune e inflamatoria en Esclerosis múltiple: Células dendríticas (DC) presentan autoantígenos y activan células CD4+, que migran al SNC produciendo citoquinas y quimioquinas. Estos factores inducen la activación de microglía e infiltración de células mononucleares lo que potencia la destrucción de la vaina de mielina. Las células CD4+ también contribuyen en la producción de autoanticuerpos por células B generando daño tisular a través del complemento. Sin embargo, la presencia de células T regs es capaz de modular de manera negativa la activación de células CD4+ autorreactiva, contribuyendo en el control de la enfermedad. Adaptado de (Anderson and Delgado 2008).

Junto con la participación de la respuesta inmunológica celular en la fisiopatología de la EM, la presencia de inmunoglobulinas y autoanticuerpos en lesiones y en el LCR de los pacientes, sugiere un papel decisivo de la inmunidad humoral en el desarrollo de la enfermedad. Diversos estudios sobre la patogénesis de la EM han indicado que las células B, que generan estos anticuerpos en el SNC, son participantes activos en la formación y mantenimiento durante todo el proceso de la enfermedad desmielinizante. (Nikbin, Bonab et al. 2007). Los autoanticuerpos son responsables en parte de la degeneración de la mielina (Figura 1.7). Se han sugerido muchas moléculas candidatas para la implicación autoantigénica en EM, entre ellas la MBP, PLP, MOG, glicoproteína asociada a mielina, transaldolasa, S100b, aB-cristalina, y 2',3' ciclic nucleotido 3' fosfodiesterasa (Hemmer, Archelos et al. 2002). De todas estas moléculas, sólo MBP, PLP y MOG comparten dos criterios clásicos importantes para catalogarlas como probables autoantígenos: 1) que haya evidencias de autorreactividad celular o humoral en muestras clínicas de pacientes con EM, y 2) que la molécula sea capaz de inducir el modelo de EAE. PLP es una proteína altamente hidrofóbica, con peso molecular de 30KDa hallada sólo en el SNC. Es una proteína transmembrana que atraviesa la bicapa lipídica de la mielina en cuatro ocasiones y, como tal, puede actuar a modo de canal de protones. La MBP es una fosfoproteína importante del SNC, con una conformación de bobina muy estable y un peso molecular de 18.5KDa. La función que se ha propuesto para esta proteína es la de agregación de la membrana. MOG es un componente menor de la vaina de mielina. Comprende sólo un 0.05-0,1% de la proteína total de mielina y tiene un peso molecular de 25KDa. Su función sigue siendo desconocida. (Sedzik 2008). Los autoanticuerpos generados frente a estas moléculas se unen a su antígeno-específico a través de la región denominada Fab, mientras que los dominios Fc son los mediadores de los mecanismos degenerativos. Estos mecanismos pueden activarse a través de dos vías:

- 1) A través de la activación del complemento: la unión de la proteína C1q a la región Fc inicia una cascada de la actividad del complemento y el anclaje del complejo de ataque a la membrana. Este causa la formación de poros y consecuente ruptura de la misma (Storch and Lassmann 1997).

2) A través de un proceso denominado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo: la unión de Fc a receptores de Fc (FcR) presentes en los macrófagos, neutrófilos y células T, conduce a la liberación de componentes inflamatorios, con la consecuente citotoxicidad y lisis de la célula diana. (Zhou, Srivastava et al. 2006).

El análisis de 83 biopsias de lesiones activas, ha demostrado que la desmielinización está acompañada por la deposición de complejo IgG-complemento (Lucchinetti, Bruck et al. 2000). Además de secretar anticuerpos, los clones activos de células B en el SNC secretan citoquinas inflamatorias (como TNF- α y IL-6) y son capaces de presentar autoantígenos para las células T, lo que contribuye a la respuesta autorreactiva en el SNC. Otra evidencia que apoya el papel de las células B en la patología de la EM, proviene de ensayos clínicos que tienen como objetivo la depleción de células B CD20+, a través del uso de anticuerpos anti-CD20 (Rituximab). Esta terapia fue desarrollada inicialmente para tratar linfomas de células B y ha mostrado resultados prometedores en el tratamiento de la EM. (Hauser, Waubant et al. 2008). Los efectos benéficos observados con la eliminación de células B parecen ser debidos a la modulación de la producción de citoquinas y/o a la supresión de la activación de células T, ya que las células B plasmáticas productoras de anticuerpos no expresan CD20. De hecho, la reducción en los niveles de autoanticuerpos frente a mielina aparece más tarde en comparación con otros efectos inmediatos del tratamiento con anti-CD20 (Bar-Or, Fawaz et al. 2010; Weber, Hemmer et al. 2011).

1.4.3.- El componente inflamatorio en la esclerosis múltiple

La inflamación juega un papel clave en la patogénesis de la EM (Figura 1.7). De hecho, citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, como IL-17, TNF- α , IL-6 o IFN γ , derivadas de linfocitos y macrófagos, presentan un patrón alterado en lesiones cerebrales, en LCR y en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EM (Ensoli, Fiorelli et al. 2002). A pesar de que la mayoría de las citoquinas detectadas en las placas de EM son producidas por macrófagos y linfocitos, se sabe que las células gliales contribuyen de manera significativa al proceso patológico, ya que la microglía y los astrocitos pueden producir una amplia variedad de mediadores inflamatorios cuando se activan. (Alvarez, Cayrol et al. 2011).

Las citoquinas presentan un papel central en la iniciación, propagación y regulación del daño en el SNC. La producción de citoquinas está implicada en la rotura temporal de BHE y en la modulación de la expresión de moléculas de adhesión, posibilitando la infiltración de células inflamatorias (Larochelle, Alvarez et al. 2011). Se ha demostrado que la estimulación de células endoteliales de la BHE con TNF- α e IFN- γ induce la expresión de moléculas de adhesión tales como ICAM-1 (del inglés, *intercellular cell adhesion molecule*), VCAM (del inglés, *vascular cell adhesion molecule*), selectinas tipo E y P y de varios receptores de citoquinas en la microvasculatura cerebral (Wosik, Biernacki et al. 2007). La interacción de moléculas de superficie, presente en los linfocitos, con ICAM-1 y VCAM-1, está implicada en la adhesión, polarización y extravasamiento de células T a través de la BHE (Engelhardt 2006).

Posteriormente, las células inflamatorias migran y traspasan la BHE en respuesta a un gradiente de quimioquinas que son producidas en abundancia en la mayoría de los procesos inflamatorios. El papel de las quimioquinas se demostró en el modelo de EAE, donde se observó un aumento repentino y drástico de IP-10 (del inglés, *Interferon gamma-induced protein 10*), RANTES (del inglés, *regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted*) MCP-1 (del inglés, *monocyte chemotactic protein-1*), y MIP-1 α , (del inglés, *macrophage inflammatory protein*) tanto en cerebro como en médula espinal, en el inicio de la recaída, lo que indicaba una expresión temporal en el desarrollo de la EAE (Glabinski, Tani et al. 1997). Además, se ha demostrado que TNF- α e IFN- γ influyen en la expresión y secreción de diversas quimioquinas por células endoteliales de la BHE. (Chui and Dorovini-Zis 2010).

Estudios en pacientes han demostrado que los niveles de citoquinas pro-inflamatorias están elevados coincidiendo con la aparición de los brotes clínicos característicos de la EM, mientras que los niveles de citoquinas anti-inflamatorias están elevados en la fase de remisión de la enfermedad. La importancia del papel de estos mediadores se ve reforzada con el uso de anticuerpos específicos contra estas citoquinas, que mejoran la progresión de la enfermedad. La respuesta inflamatoria que se desencadena en el SNC durante la progresión de la EM es causa directa de muerte celular neuronal, lo que provoca una amplia neurodegeneración en el lugar de la inflamación. Además, hay evidencias de que las células progenitoras son susceptibles de muerte celular inducida por citoquinas (Molina-Holgado, Vela et al. 2001). La

muerte por apoptosis inducida por Fas/FasL es otro factor importante en la regulación de la enfermedad. Su posible participación en la EM ha sido demostrada en el modelo de EAE con ratones B6.lpr y B6.gld, mutantes para la expresión de Fas y FasL, respectivamente, que presentan resistencia al desarrollo de la EAE (Dittel 2000). Estos resultados sugieren que la expresión de FasL en células activadas en el SNC, interaccionan con el Fas expresado en los oligodendrocitos estimulados, por ejemplo, con IFN- γ , lo que induce la muerte celular y el consecuente reclutamiento de linfocitos T y establecimiento de la lesión inflamatoria/inmune (Dittel 2000)

La inflamación activa puede determinar el curso de la enfermedad inicial, pero hay evidencias de que la progresión de la enfermedad se puede llevar a cabo independientemente de la inflamación aguda. Aunque el daño axonal es más prominente en lesiones inflamatorias activas, la pérdida axonal y neuronal, fue observada desde el principio en la EM, no sólo dentro de las lesiones focales activas, sino también en las placas crónicas silenciosa y en la materia blanca de apariencia normal (NAWM, del inglés, *normal-appearance white matter*) (Trapp, Peterson et al. 1998; Kuhlmann, Lingfeld et al. 2002). Recientes estudios en biopsia *post-mortem* de pacientes con EM jóvenes y en modelos de EAE han demostrado la presencia de transección axonal, atrofia cerebral y muerte neuronal en la fase temprana la enfermedad independientemente de la inflamación. Estos resultados apoyan el papel de un componente neurodegenerativo en la EM, principalmente en los casos progresivos sin remisión. (Herz, Zipp et al. 2010). Esto podría explicar en parte por qué determinadas terapias con mecanismos anti-inflamatorios dirigidas al sistema inmunológico adaptativo muestran poco efecto en la enfermedad progresiva. (Weiner 2008). Estos resultados también demuestran la complejidad de esta enfermedad y la diversidad de fenotipos que pueden presentar los pacientes, y las dificultades en encontrar un tratamiento eficiente.

1.4.4.- La tolerancia inmunológica en la esclerosis múltiple

Como se comentó anteriormente, la tolerancia inmunológica frente a un antígeno propio es esencial para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica. Entender la inducción, el mantenimiento y la rotura de la tolerancia inmunológica es de suprema importancia, desde el

momento en que la ausencia o pérdida de la misma dan lugar a diversas enfermedades autoinmunes, como es el caso de la EM.

La participación de las células Treg en la prevención de una respuesta autoinmune contra el SNC en la EM, se ha basado principalmente en los estudios en el modelo de EAE en roedores. Así, se ha demostrado que la presencia de Treg está relacionada con la respuesta Th2 protectora y con la inhibición en la migración y la activación de células Th1/Th17 encefalogénicas. Por otro lado, la depleción de células CD25⁺ en ratones con EAE genera grados más severos de la enfermedad, en los que las células T reactivas para MOG presentan una mayor producción de IFN- γ (McGeachy, Stephens et al. 2005). Además, la transferencia adoptiva de células T CD4⁺CD25⁻ de un ratón enfermo a un ratón sano, induce los signos clínicos de la EAE, mientras que los ratones que reciben células CD4⁺ totales o una baja concentración de células CD4⁺CD25⁺ sufren de forma menos severa la enfermedad (McGeachy, Stephens et al. 2005).

Las células Treg específicas de mielina son capaces de migrar y acumularse en el SNC de ratones con EAE. La acumulación y la frecuencia de las células Treg en el SNC se ha relacionado con la recuperación de la EAE (Korn, Reddy et al. 2007), aunque durante el pico de la enfermedad las células encontradas en el SNC de ratones con EAE, no son suficientes para controlar la función efectora de las células T encefalogénicas. Aunque existe cierta controversia en relación a la frecuencia de Treg en humanos, se ha demostrado un elevado número de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en LCR de pacientes con EM en comparación con los niveles de estas células en sangre periférica de estos pacientes (Feger, Luther et al. 2007). Usando ciertos marcadores como CD39⁺ con Foxp3 se pudo detectar una sorprendente reducción de células Treg en pacientes (Zozulya and Wiendl 2008). Además, en estudios con células provenientes de sangre periférica de pacientes se observó una menor expresión de Foxp3, así como una disfunción en la capacidad supresora *in vitro*. También se describieron células Tr1 que presentaban una disfunción en pacientes de EM. Estas células pierden la capacidad de expresar IL-10 y presentan una capacidad supresora reducida (Martinez-Forero, Garcia-Munoz et al. 2008).

Las células Treg en la EAE y en la EM se convierten en algo esencial para el restablecimiento y mantenimiento de la tolerancia inmunológica en el SNC. Por lo tanto, la reconstitución o el aumento de la función de las células Treg en la EM representan una

posible diana terapéutica para restaurar la tolerancia inmunológica en la EM. De hecho, algunas de las terapias aprobadas para el tratamiento de la EM presentan efectos en la modulación de las células Treg.

1.5.- El papel de las células gliales en la EM

Existe cierta controversia a la hora de considerar el papel beneficioso o perjudicial de los diferentes tipos celulares residentes en el SNC en condiciones de neuroinflamación y desórdenes como la EM. Para algunos autores, la activación de las células gliales es una respuesta en un momento dado a un daño concreto y la producción de mediadores o actividades de estas células va dirigido a contrarrestar el daño producido. Sin embargo, para otros investigadores, la activación de estas células ocurre como un efecto secundario del daño que se está produciendo, y, por tanto, estas células formarían parte del proceso patológico al que acompañan. Tradicionalmente se ha considerado que el sistema nervioso central (SNC) era un órgano inmunoprivilegiado. Sin embargo, hoy sabemos que ante una situación de daño cerebral, trauma o infección, puede desarrollar una respuesta inmune, en parte controlada por la barrera hematoencefálica (que dificulta la entrada de células inmunes, patógenos y macromoléculas), y por activación de astrocitos y de la microglía (Figura 1.8).

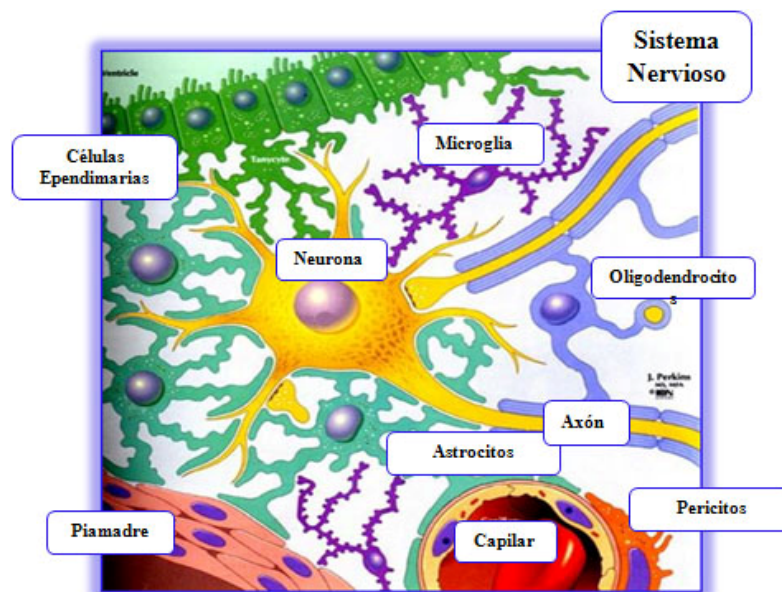


Figura 1.8 – Células gliales involucradas en la homeostasis del SNC

1.5.1 - Astrocitos

Clásicamente se ha considerado que el papel fundamental de los astrocitos es el mantenimiento de la integridad estructural del SNC, ya que son las células más abundantes en el cerebro en el SNC de los mamíferos y constituyen aproximadamente el 90% del cerebro humano. Los astrocitos poseen funciones importantes en el mantenimiento de la homeostasis (a través del equilibrio de iones, pH y almacenamiento de glucógeno) y están involucrados en la función sináptica y en la estructuración física del sistema nervioso central. Sin embargo, los astrocitos parecen ejercer un papel activo en el SNC tanto en condiciones basales como en caso de daño, donde están implicados en la amplificación de la respuesta inflamatoria mediante la producción de citoquinas/quimioquinas, moléculas de adhesión y modulación de la permeabilidad de la BHE. El papel de los astrocitos en la BHE parece ser principalmente regulador. En condiciones basales, los astrocitos protegen la BHE a través de la producción de TGF- β , (Abbott, Ronnback et al. 2006). Durante la inflamación, los astrocitos secretan IL-6, TNF- α e IL-1 β , lo que aumenta la permeabilidad de la BHE al actuar directamente en las uniones estrechas de las células endoteliales del capilar cerebral. La capacidad de los astrocitos de modular la permeabilidad de la BHE tiene implicaciones significativas durante la inflamación, porque permitiría la entrada de iones, moléculas tóxicas para el SNC y, principalmente, células del sistema inmunológico.

Un reciente estudio, en el que se utiliza un modelo de desmielinización inducido por la activación de la microglía por inyección de LPS intratecal, sugiere que la activación de astrocitos podría ser uno de los pasos importante en la cascada de formación de la lesión en la EM (Sharma, Fischer et al. 2010). Los astrocitos tienen el potencial para secretar citoquinas inflamatorias tales como IL-1, IL-6, y TNF- α , e innumerables quimioquinas como IP-10, RANTES, MCP-1 y SDF-1 (del inglés, *stromal cell-derived factor-1*) (Nair, Frederick et al. 2008). La exposición de los astrocitos frente a TNF- α , IL-1 β , o IFN γ conduce a la regulación positiva tanto de ICAM-1 como de VCAM-1, dos moléculas de adhesión que desempeñan papeles cruciales en la extravasación de las células T a través del parénquima nervioso. *In vivo*, la expresión de ICAM-1 se observó en astrocitos en los bordes de las lesiones desmielinizadas de

muestras de EM y EAE, pero sólo se encontró VCAM-1 en muestras de EAE. (Nair, Frederick et al. 2008). Un reciente estudio demostró la producción de IL-17 en astrocitos de muestras *post-mortem* de EM (Tzartos, Friese et al. 2008). En lesiones inflamatorias desmielinizantes de EM y EAE, los astrocitos presentan un fenotipo hipertrófico que lleva a la formación de cicatrices astrogliales. Dependiendo del grado y características de estas cicatrices se ha demostrado que dichas cicatrices glióticas parecen tener un papel en el aislamiento de la inflamación y daño en el SNC. Sin embargo, una astrogliosis excesiva conduce a una zona de difícil recuperación en el SNC. En general, se ha demostrado que la neutralización de los astrocitos en EAE origina la propagación de la inflamación, aumento de la degeneración axonal y empeoramiento de los signos clínicos de la enfermedad y de los daños en el tejido (Voskuhl, Peterson et al. 2009).

Los astrocitos podrían participar en la fase de recuperación de la EM y EAE, debido a la producción de diversos factores neurotróficos. La producción de BDNF (del inglés, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), NT-3 (del inglés, *Neurotrophin-3*) y NGF (del inglés, *Nerve Growth Factor*) por los astrocitos se ha detectado en el modelo de EAE durante la fase de recuperación, lo que sugiere un papel importante de los astrocitos en el mantenimiento de la supervivencia de las neuronas y de otras células gliales, así como en la reparación, remielinización y neurogénesis.

1.5.2 - Microglia

La microglía es el representante ontogenético en el SNC del macrófago en periferia, ya que deriva de precursores hematopoyéticos y comparte con los macrófagos diversos marcadores, como CD11b+ y F40/80. Además de los marcadores, la microglía y los macrófagos presentan diversas funciones comunes como producción de citoquinas, fagocitosis y presentación antigénica, que permiten a la microglía realizar diferentes funciones interviniendo en la modulación de la inmunidad innata y adaptativa en el SNC. Durante mucho tiempo se consideró que la microglía, en condiciones de fisiología normal del SNC, estaría en estado de reposo. Estudios *in vivo* han demostrado que la microglía está continuamente en un estado de alerta, vigilando la zona cerebral, reparando el tejido, y

fagocitando restos neuronales para mantener la homeostasis del microambiente. (Nimmerjahn, Kirchhoff et al. 2005). El fenotipo de la microglía está muy regulado según las condiciones en el SNC, sufriendo cambios importantes en respuesta a las alteraciones en la homeostasis e insultos patológicos en el sistema nervioso. El fenotipo activado depende de una forma crítica de la secuencia y duración de la exposición a diferentes estímulos. Así, la ruptura de la BHE provoca una activación inmediata y focalizada en la microglía que transforma su comportamiento y pasa de una función de mantenimiento a otra de protección de la zona lesionada. (Nimmerjahn, Kirchhoff et al. 2005). Recientemente se ha descrito como infecciones sistémicas sufridas a lo largo de la vida del organismo pueden modificar el fenotipo microglial influyendo posteriormente en los síntomas y la progresión de las enfermedades crónicas neurodegenerativas (Perry, Nicoll et al. 2010). En condiciones patológicas tales como infección o daño mecánico o neurodegenerativo, la microglía se activa, migrando hacia el sitio de la lesión. Estas células liberan una amplia serie de mediadores solubles, que incluyen citoquinas (TNF- α , IL-6, IL-12) o neutrofinas, y son responsables de la eliminación de restos celulares a través de la fagocitosis. (Neumann, Kotter et al. 2009). En la EM, la microglia activada contribuye al desarrollo de la neuroinflamación y daño axonal. Sin embargo, al mismo tiempo, en presencia de lesiones activas desmielinizantes, la microglia activada lleva a cabo la fagocitosis de detritos neuronales, que es un proceso esencial para permitir la reparación y la regeneración de la zona dañada. Un reciente trabajo ha demostrado la captación y la degradación de NF-L (del inglés, *Neurofilament light*) y MBP por la microglía humana, lo que confirma la fagocitosis de antígenos neuronales y de mielina por estas células. Por otro lado, a pesar de que la fagocitosis y la degradación de detritos neuronales son un evento esencial para la homeostasis en el SNC, este proceso conduce a la presentación antigénica y consecuente activación autoinmune. De hecho, la activación de la microglía conlleva un aumento en la expresión de la molécula de MHC clase II (Perry 1998), y estas células pueden presentar antígenos en el parénquima nervioso a células inmunes infiltradas debido a la ruptura de la BHE, contribuyendo activamente a la respuesta autoinmune. Estos resultados demuestran el efecto dual de la microglía en enfermedades neurodegenerativas pudiendo tener carácter neuroprotector o neurotóxico (Prinz and Mildner 2011). La permeabilidad de la BHE también tiene un efecto dual ya que, por un lado, se produce la entrada de mediadores celulares y

moleculares inflamatorios y tóxicos, pero, por otro lado, los macrófagos infiltrantes contribuyen a la retirada de la mielina facilitando la regeneración axonal (Vargas and Barres 2007).

1.5.3 – Oligodendrocitos

Los signos clínicos de la EM se producen principalmente por el déficit en la transmisión del impulso nervioso, debido a la desmielinización resultante del ataque autoinmune contra la mielina. Aunque la inflamación por si sola puede causar el bloqueo temporal de la conducción del impulso, son la pérdida de mielina y un fallo en la remielinización las causas de los síntomas persistentes de la EM, ya que los axones desmielinizados son susceptibles de daños irreversibles. Los oligodendrocitos, que llevan a cabo la síntesis de mielina, tienen extrema importancia en el desarrollo y recuperación de la EM, lo que justifica la búsqueda intensiva de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas hacia este tipo celular que combinen un efecto inmunorregulador y a la vez, neuroprotector.

En general, las lesiones agudas desmielinizantes difieren significativamente en términos de inflamación y de la patología de los oligodendrocitos (Lucchinetti, Bruck et al. 2000). En este sentido, se han descrito dos grupos principales de placas: uno, presente en más del 75% de los casos, caracterizado por depósitos significativos de anticuerpos, infiltrados inflamatorios y remielinización; y el otro, caracterizado por la pérdida de oligodendrocitos, sin remielinización. Junto con la alta variabilidad del fenotipo clínico y patológico y con la progresión de la enfermedad, es tentador especular que la EM podría ser un grupo de enfermedades con diferentes etiologías pero que convergerían en un aspecto común: la desmielinización, el punto clave de la EM.

La respuesta autoinmune contra la mielina es considerada el iniciador de la EM, produciéndose la muerte primaria de oligodendrocitos y la degradación de la mielina. El mecanismo exacto no está todavía muy claro. Al igual que con respecto a los aspectos clínicos y patológicos, existen diferentes hipótesis sobre el proceso de desmielinización y, probablemente, superposición de los mismos. El proceso de desmielinización parece estar relacionado de forma indirecta con la presencia de células T, si bien hay importantes

evidencias de una relación con células del sistema inmune innato. Se sabe que hay una elevada correspondencia entre la desmielinización activa y la presencia de macrófagos, mientras que se pueden encontrar áreas de desmielinización crónica sin presencia de linfocitos T o B (Lucchinetti, Bruck et al. 2000).

Se han postulado diferentes hipótesis para el proceso de desmielinización:

a) Citotoxicidad mediada por células T CD8⁺ (CTL): estas células se han encontrado en lesiones de EM y podrían inducir la lisis directa de los oligodendrocitos.

b) Citotoxicidad mediada por anticuerpo: se ha detectado la presencia de anticuerpos dirigidos contra MBP, PLP y MOG en lesiones de EM, pudiendo inducir la citotoxicidad mediada por activación de complemento. Esta hipótesis está avalada por estudios con cultivos de microglía y oligodendrocitos, donde se ha observado que la adición de complemento estimula la fagocitosis por la microglía activada

c).- Muerte inducida por factores solubles encontrados en concentraciones elevadas en la placa, como las perforinas, TNF- α y óxido nítrico liberados por astrocitos, microglía o células T infiltradas. Se demostró que muchos de ellos inducían apoptosis de oligodendrocitos en cultivo (Selmaj, Raine et al. 1991).

Los procesos de remielinización son claves en la recuperación de la EM. Los principales moduladores de la remielinización son las células precursoras de los oligodendrocitos (OPCs del inglés, *Oligodendrocyte Precursor Cells*). Las OPCs migran hacia estas lesiones desmielinizantes, proliferan y se diferencian a oligodendrocitos maduros para remielinizar los axones, pero con una eficacia limitada (Patani, Balaratnam et al. 2007). La presencia de las placas de sombra demuestra que son posibles la reparación y la remielinización de las placas de EM. Un reciente estudio ha demostrado que el fallo en la remielinización depende de factores diferentes que afectan al reclutamiento de OPCs, migración a las lesiones, y/o maduración a células productoras de mielina. Sobre todo, tiene gran importancia el equilibrio en un momento dado en la producción y presencia de los factores que regulan la migración y la diferenciación, ya que se ha demostrado que el fallo en remielinización no se produce por la ausencia de OPCs en las placas, ya que estas células se localizaron en los diferentes grados de lesión de EAE.

1.6.- Tratamientos de la EM

El brote o recaída en la enfermedad está directamente relacionado con la inflamación en zonas focales del SNC. Debido a la naturaleza inflamatoria de la enfermedad, los tratamientos actuales se centran principalmente en terapias anti-inflamatorias, como el uso de corticosteroides. Sin embargo, aunque estos tratamientos muestran éxito en los episodios agudos, no inhiben la progresión a largo plazo de la enfermedad. Así, actualmente no existe ningún tratamiento efectivo para la EM, lo que radica en el hecho de que esta enfermedad se caracteriza por una presentación clínica variable con multitud de mecanismos celulares y moleculares implicados.

Por el momento hay 5 agentes aprobados por la agencia americana reguladora de medicamentos (FDA, del inglés, *Food and Drugs Administration*) para el tratamiento de la EM. Estas drogas se consideran terapias modificadoras de la enfermedad, y todas están aprobadas para la forma recidivante de la EM. Aún no hay ningún agente efectivo aprobado para la forma progresiva primaria. La heterogeneidad de la EM no sólo dificulta las estrategias terapéuticas sino también la capacidad de predecir la evolución de la enfermedad en los pacientes. Dentro de los medicamentos aprobados por la FDA se incluyen cuatro preparaciones de IFN- β (*Avonex*, *Rebif*, *Bseron* y *Extavia*), acetato de glatirámero (*Copaxone*), Mitoxantrona (*Novantrone*), Natalizumab (*Tysabri*) y Fingolimod (*Gilenya*).

1) IFN- β 1: Existen cuatro formulaciones de IFN- β : *Bseron* y *Extavia* se producen en *E. coli* y difieren del IFN- β humano por la sustitución de un aminoácido y por que no están glicosilados, mientras que *Avonex* y *Rebif* son idénticos al IFN- β humano endógeno y se producen en células de ovario de hámsters chinos. A pesar de las diferencias, todos se unen al mismo receptor. El IFN- β es una de las terapias actuales de primera línea contra la EM: reduce dramáticamente el número de lesiones inflamatorias del SNC aunque falla en proporcionar un control satisfactorio de la evolución de la enfermedad. Los mecanismos de los efectos terapéuticos de IFN- β en la EM aun no están completamente esclarecidos. Entre los mecanismos propuestos hasta ahora están la inhibición de la activación de células T, la reducción de la actividad metaloproteinasas de la matriz extracelular, la reducción de la producción de

citoquinas inflamatorias, y la producción de citoquinas anti-inflamatorias para aumentar la actividad supresora de las células T (Vollmer, Stewart et al. 2010). La eficacia clínica del IFN- β es mayor en la EM-RR que en la EM-SP y presenta algunos efectos adversos. Al menos un 30% de pacientes que son respondedores subóptimos al tratamiento con IFN- β debido al inicio tardío del tratamiento, factores genéticos de resistencia, la producción de anticuerpos neutralizantes, lo que disminuye la eficacia del tratamiento con este fármaco. ((Plosker 2011).

2) Acetato de glatirámero: Es una mezcla de péptidos sintéticos, y se desarrolló para imitar el componente de la vaina de mielina que inducía la EAE. Sin embargo, de manera inesperada, el compuesto inhibió el desarrollo de la EAE en roedores y monos (Lalive, Neuhaus et al. 2011). Actualmente es la droga terapéutica de primera elección en el tratamiento de la EM-RR. El acetato de glatirámero parece afectar a diversos mecanismos de la enfermedad, incluyendo la polarización de células T hacia un fenotipo Th2, un aumento en la frecuencia y función de las células T reguladoras CD25⁺Foxp3⁺, la modulación de los linfocitos T CD8⁺ y el desarrollo de células presentadoras de antígenos reguladoras o tolerogénicas. Además de ejercer un efecto inmunomodulador sobre las células B, algunas evidencias sugieren que este compuesto es también neuroprotector, ya que induce la remielinización. Se piensa que este efecto es debido a la capacidad de modular factores neurotróficos. Sin embargo, la capacidad neuroprotectora está todavía por detallar (Lalive, Neuhaus et al. 2011).

3) Mitoxantrona: Es el único agente citotóxico aprobado para el tratamiento de la EM. Este compuesto es una antraquinona sintética que se intercala con el ADN, impidiendo la unión de la topoisomerasa II, lo que interfiere con la reparación del ADN. La mitoxantrona es un inmunosupresor general, pero también es capaz de inhibir la migración de linfocitos y monocitos, inducir apoptosis en células dendríticas y disminuir la secreción de citoquinas inflamatorias. Sin embargo, al tener una capacidad inmunosupresora generalizada, presenta efectos adversos como disfunción cardíaca y supresión de la médula ósea, lo que puede incrementar el riesgo de leucemia. (Vollmer, Stewart et al. 2010).

4) Natalizumab: Es un anticuerpo humanizado que está dirigido contra la subunidad $\alpha 4$ de la integrina VLA4 del complejo de adhesión. A pesar de que el mecanismo específico mediado por Natalizumab sigue sin estar claro, se piensa que la migración de células T, B y monocitos al SNC es resultado del bloqueo de VLA4, que impide la unión a la molécula de adhesión ICAM-1, expresada en las células endoteliales de la microvasculatura cerebral. Las muestras de pacientes con EM presentaron tres veces más expresión de VLA4 en el LCR y en los linfocitos circulantes que las de individuos normales, lo que llevó a los ensayos clínicos con el anticuerpo Natalizumab. Este tratamiento presentó efectos beneficiosos en pacientes con EM, sin embargo el uso de este anticuerpo puede, en algunos casos, favorecer una leucoencefalopatía multifocal progresiva. Por lo tanto, a pesar de estar aprobada para el uso en EM, este anticuerpo sólo se recomienda en casos de enfermedad recurrente y en pacientes que no responden o no toleren las terapias de primera línea.

5) Fingolimod: Es el primer medicamento administrado por vía oral, aprobado recientemente para el tratamiento de la forma EM-RR. Es un modulador sintético del receptor la esfingosina-1-fosfato (S1P). El receptor de S1P se expresa predominantemente en los linfocitos y regula su migración desde los órganos linfoides. El fingolimod, a pesar de inducir la fosforilación del receptor, actúa también como un antagonista, ya que, después de inducir la fosforilación del receptor, induce la regulación negativa del mismo, bloqueando la señal de migración de los linfocitos T y B. El fingolimod es una nueva droga potencial para la EM. No parece afectar la función de células T en respuesta a infección viral, y sí aumentar la función supresora de las células T reguladoras. También es capaz de atravesar la BHE, donde se cree que puede actuar directamente en las células neuronales y gliales de SNC, modulando la reparación y la remielinización (Scott 2011). Debido al cómodo régimen de tratamiento, y a su eficacia clínica, comparada con IFN- β 1, fingolimod es una valiosa opción para el tratamiento de pacientes con EM-RR. Sin embargo, aún está por determinar el perfil de seguridad a largo plazo, particularmente con respecto a eventos

adversos, como edema macular y serias infecciones, que ocurrieron frecuentemente durante el ensayo clínico (Singer, Ross et al. 2011).

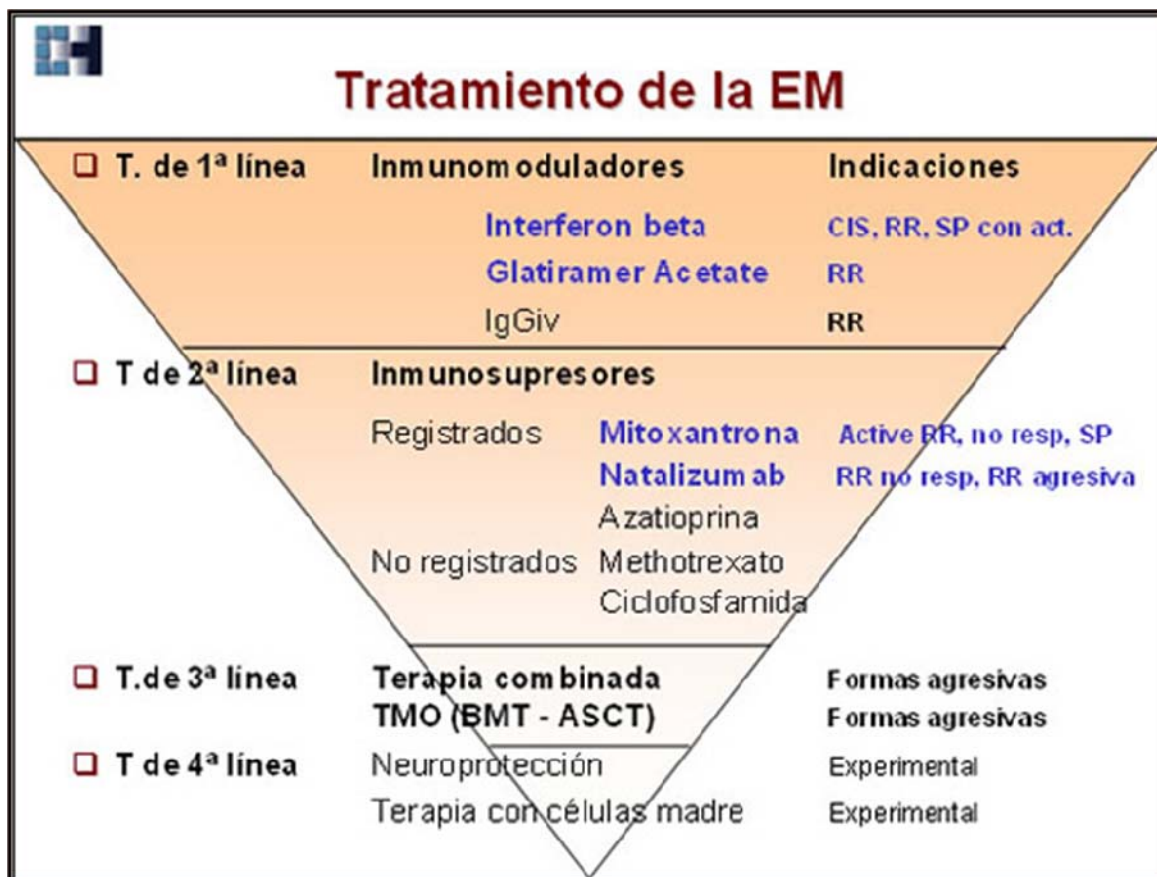


Figura 1.9 - Tratamiento actual de la Esclerosis Múltiple

6) La comprensión cada vez mayor de la inmunopatología de la EM ha llevado al ensayo y al uso de las terapias descritas anteriormente. Sin embargo, las terapias de primera línea, como IFN- β y acetato de glatirámico, muestran un impacto mínimo en los casos de EM agresivos, en los que existe una inflamación de gran actividad, y tienen poco o ningún efecto en los paciente con EM progresiva. La Mitoxantrona y el Natalizumab, debido a los graves efectos secundarios, se reservan como terapias para casos agresivos, refractarios e intolerantes a las terapias de primera línea. Otros tratamientos propuestos e innumerables ensayos clínicos en proceso

incluyen drogas de diversos tipos: la administración de inmunosupresores como la ciclofosfamida y la cladribina, la inyección de anticuerpos monoclonales como Rituximab, y el uso de cannabinoides como Sativex. Ultimamente se considera que el uso futuro de tratamientos combinados podría ser muy útil en el tratamiento de esta enfermedad. Sobre todo, se ha combinado interferón β con azatioprina, con buenos resultados de seguridad; el interferón β también se ha asociado a ciclofosfamida, metotrexato, mofetilo y mitoxantrona. Se trata de estudios de fase II con pocos pacientes y, por tanto, sus conclusiones en cuanto a eficacia son escasas, por lo que son necesarios estudios con más pacientes para comprobar sus posibles beneficios clínicos. Desde el punto de vista científico y dados los conocimientos sobre la patogenia de la enfermedad, se ha propuesto la combinación de fármacos anti-inflamatorios y neuroprotectores. Existen diferentes ensayos clínicos en marcha en los que se han combinado tratamientos convencionales con tratamientos neuroprotectores. Finalmente, un tratamiento que parece muy prometedor en un futuro relativamente próximo es el tratamiento con células madre.

A pesar de que las drogas aprobadas por el FDA presentan diversos efectos beneficiosos, muchos de los pacientes no muestran una mejoría en la calidad de vida. Síntomas como movilidad reducida, fatiga, depresión, dolor, disfunción sexual, problemas de visión y audición, dificultad en la respiración son las principales quejas acerca de la reducción en la calidad de vida de los pacientes, lo que demuestra la necesidad de combinación de los agentes inmunomoduladores con otros tipos de tratamientos, como las “terapias sintomáticas”.

Las terapias sintomáticas son drogas que se dirigen a un aspecto particular de la enfermedad, como la fatiga, el dolor o la depresión, pero que no cambian o limitan el curso de la misma. Por ejemplo, la Fampridine (Ampyra), es un bloqueante de los canales de potasio dependientes de voltaje en la superficie de las fibras nerviosas desmielinizantes y el tratamiento con este agente mejoró la conducción del impulso nervioso, con significativas mejoras en la movilidad de los pacientes, que aumenta la calidad de vida del paciente afectado por EM (Goodman, Brown et al. 2010).

Todos estos datos indican que en la elaboración de estrategias terapéuticas para EM se deben adoptar nuevos abordajes que cubran los aspectos más relevantes de la enfermedad,

como la inflamación, la autoinmunidad, desmielinización, neurodegeneración, pérdida neuronal, proteger los axones o promover la remielinización, y conseguir así la mejora en la calidad de vida del paciente. El objetivo del tratamiento de la esclerosis múltiple debe ser el prevenir la aparición de nuevas lesiones, evitar la progresión de la enfermedad, y recuperar los axones dañados. Para ello es importante considerar los diferentes tipos celulares implicados y la relación entre los mismos a nivel periférico y tisular.

1.7.- Neuroinmunología en la autoinmunidad

Como se ha comentado anteriormente, una terapia efectiva en enfermedades autoinmunes, como la EM, sería aquella capaz de combinar efectos inmunomoduladores regulando procesos autoreactivos, modulando la respuesta inflamatoria y restaurando la tolerancia inmunológica. En los últimos años, se ha observado un creciente número de neuropéptidos con capacidad de regular la respuesta inmune y con potentes efectos terapéuticos en diversos modelos de enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

1.7.1.- Comunicación de los sistemas inmunitario y neuro-endocrino

En las últimas décadas, se ha hecho evidente que la homeostasis corporal es posible gracias al balance controlado entre los sistemas fisiológicos que modulan el ambiente interno del organismo. Así, existe una conexión bidireccional entre los sistemas neuro-endocrino e inmunitario, mediado por una compleja red de células y mediadores que permiten la coordinación de respuestas frente a diferentes estímulos. Frente a señales de peligro externo o interno, el sistema inmunitario informa al sistema neuro-endocrino de que se está produciendo una infección, daño o inflamación. El SNC responde a esta información con cambios que incluyen fiebre, efectos en el comportamiento y el metabolismo, letargia y somnolencia. De manera inversa, el sistema inmunológico está controlado por el SNC, principalmente en respuesta a estrés físico o ambiental. (Sternberg 2006). La regulación del sistema inmunitario por el SNC ocurre de forma local o sistémica. El SNP provee la primera línea de defensa local en sitios de inflamación a través de la liberación de determinados neuropéptidos (como la Substancia P, bradiquinina y la hormona liberadora de la corticotropina). Estos deben

amplificar o facilitar la inflamación induciendo vasodilatación, aumento del flujo sanguíneo, adhesión y migración de leucocitos a la zona inflamada, fagocitosis y producción de factores citotóxicos como prostaglandinas y óxido nítrico.(Sternberg 2006) .

El efecto de los factores neuroendocrinos en la respuesta inflamatoria puede variar a lo largo del proceso, contribuyendo al aumento o la disminución de la respuesta inflamatoria. De esta forma, a lo largo del proceso y dependiendo del tipo de estímulo, se pueden activar grupos neuronales en el hipotálamo que disparan vías de señalización dirigidas a desarrollar una respuesta anti-inflamatoria e inmunosupresora para limitar la respuesta inmune que se esté produciendo. El sistema nervioso simpático (o adrenérgico) y el parasimpático (o colinérgico), junto con los ejes hipotálamo-hipófisis-suprarrenal/gonadal/tiroide son la principal ruta de inhibición de la inflamación a nivel regional y sistémica a través de la inervación de los órganos inmunes y de la producción de hormonas. Los glucocorticoides son el ejemplo clásico de agente inmunorregulador endógeno producido por estas rutas en respuesta a estrés y/o inflamación sistémica. Además de los corticoides, los estrógenos y catecolaminas también se inducen y liberan bajo estas condiciones. Otro ejemplo anti-inflamatorio y anti-nociceptivo son los opiodes liberados durante procesos de inflamación neurogénica. Por otro lado, se ha demostrado que varios neuropéptidos se liberan en las terminaciones nerviosas periféricas del sistema nervioso (sensoriales y eferentes), en las proximidades de las células inmunes (Shibata, Hisajima et al. 2008).

Esta interacción entre los sistemas inmunitario y neuro-endocrino es posible porque existe un lenguaje bioquímico común (Figura 1.10). Así, citoquinas producidas por las células inmunes actúan sobre células del sistema neuro-endocrino, y células del sistema inmunitario reconocen neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas producidos por el sistema nervioso y endocrino. La comunicación bidireccional entre el sistema inmunitario y el neuro-endocrino se refuerza con los hallazgos de que células de ambos sistemas pueden producir mediadores que anteriormente se pensaba que eran exclusivos de uno de ellos. (Blalock 2005). Así, células del sistema inmunológico pueden producir neuropéptidos en respuesta a señales inflamatorias, y estos neuropéptidos pueden actuar de forma paracrina y/o autocrina sobre receptores específicos presentes en las células del sistema inmunitario.

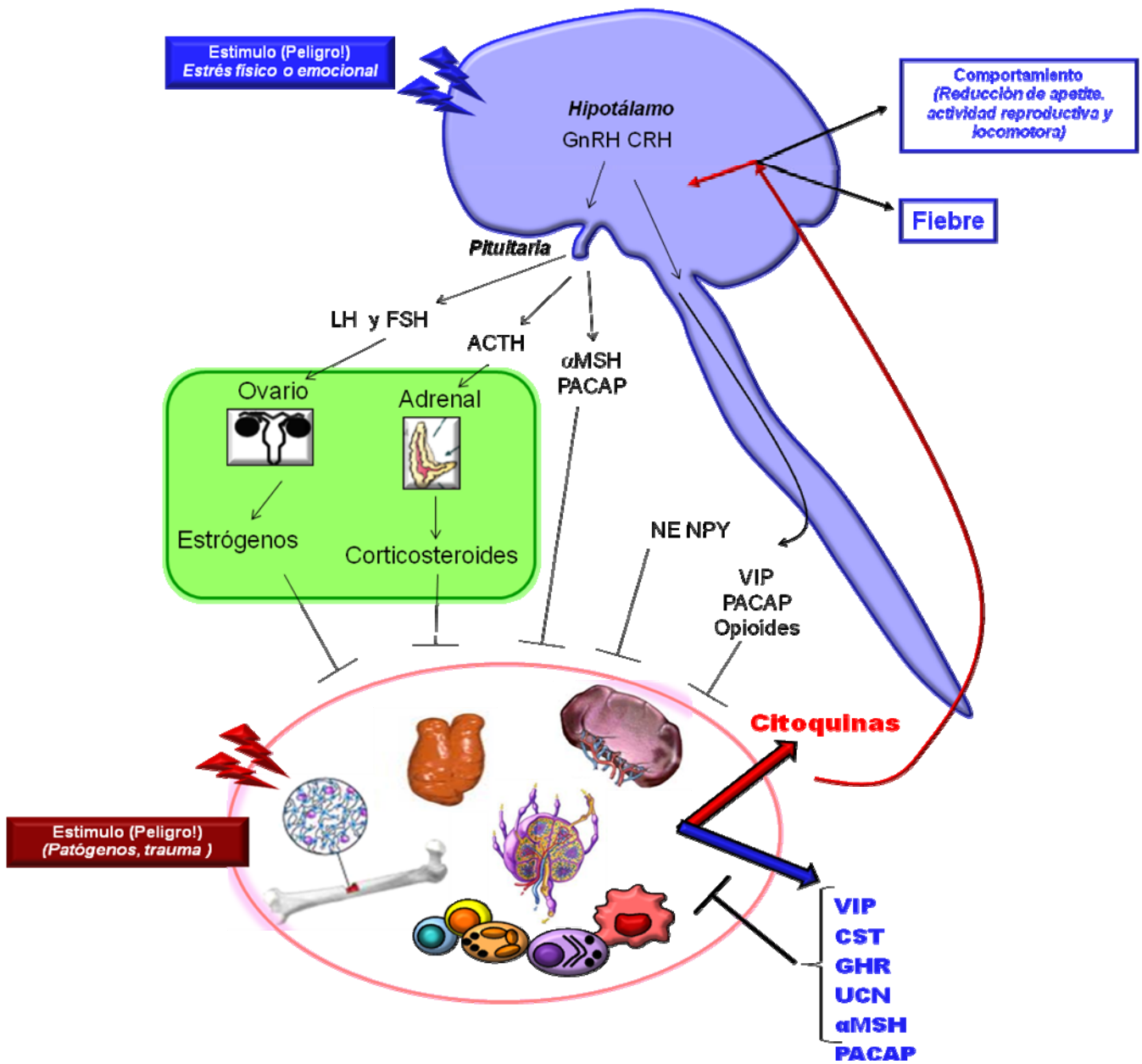


Figura 1.10 – Interacción entre los sistemas inmunológico y neuro-endocrino

1.7.2.- Neuropéptidos inmunomoduladores

En los últimos años se ha caracterizado el efecto de diversos neuropéptidos con capacidad de regular la respuesta inflamatoria y con potentes efectos terapéuticos en diversos modelos de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Actualmente se reconocen unos 40 neuropéptidos con efectos inmunomoduladores. La mayoría muestra un perfil anti-inflamatorio actuando sobre la respuesta inmune innata, pero solo un número limitado es capaz de modular la respuesta inmune adquirida. Entre ellos destacan VIP (del inglés *vasoactive intestinal peptide*), PACAP (del inglés, *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*), MSH (del inglés, *melanocyte-stimulating hormone*), Neuropéptido Y (NPY), Urocortina (UCN), Adrenomedulina (AM), y Grelina (GHR) (Gonzalez-Rey, Delgado-Maroto et al. 2010). De acuerdo a su secuencia y estructura, estos péptidos no están relacionados entre sí, y su origen y acciones fisiológicas en el organismo son muy diferentes (Tabla 1.1(Gonzalez-Rey, Chorny et al. 2006)). Sin embargo, desde el punto de vista inmunológico, presentan algunas características comunes que los convierten en reguladores potenciales de la respuesta inmune: son producidos por células inmunes, generalmente en respuesta a inflamación, daños en el tejido, o estimulación antigénica; algunos de sus receptores son expresados en células inmunocompetentes; tienen efectos anti-inflamatorios y muestran diversos efectos reguladores sobre respuestas mediadas por células T.

Estudios recientes han demostrado la relevancia de estos neuropéptidos para la salud al caracterizar su efecto terapéutico en diversos modelos de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. El tratamiento con estos péptidos disminuye la severidad y progresión de la enfermedad en modelos animales de sepsis, artritis reumatoide, uveoretinitis, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, etc. En concreto, la administración de estos péptidos previenen la muerte por choque endotóxico en un modelo animal de sepsis, aumentan la supervivencia y reducen la pérdida de peso en colitis en un modelo experimental de enfermedad de Crohn, y previenen la progresión de artritis inducida por colágeno. En situaciones de neuroinflamación, se ha descrito que el tratamiento con VIP suprime la neuropatología de la EAE al reducir la inflamación del SNC regulando un amplio espectro de mediadores pro-inflamatorios y, al mismo tiempo, bloqueando selectivamente la

autorreactividad encefalitogénica dependiente de la respuesta Th1 (Gonzalez-Rey, Fernandez-Martin et al. 2006).

El efecto terapéutico de estos péptidos está asociado con una regulación de los componentes principales presentes en estas enfermedades: suprimen los eventos tempranos asociados con el inicio y establecimiento de la respuesta autoinmune frente a componentes del tejido diana, así como las fases tardías asociadas con la destructiva respuesta inflamatoria. En concreto, estos neuropéptidos alteran el desarrollo de células T autoreactivas y modulan el balance de células Th1/Th17 y Th2, su entrada en el órgano diana, y disminuyen la producción y liberación de mediadores inflamatorios, implicados en el daño local y sistémico. Al mismo tiempo, estimulan la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10. El efecto sobre la respuesta Th1 resulta indirectamente en una disminución en los niveles de autoanticuerpos (especialmente el isotipo IgG2a, implicado en la activación del complemento y de neutrófilos), lo que contribuye a reducir el daño en el tejido. Finalmente, estos neuropéptidos inducen la expansión periférica de células T reguladoras CD25⁺FoxP3⁺ a partir de la población de CD4⁺CD25⁻. En el caso de α MSH, VIP y PACAP, la generación de Treg puede ocurrir también a partir de células dendríticas tolerogénicas (generadas por estos neuropéptidos a partir de precursores de médula ósea o monocitos). Un aspecto interesante de las funciones de estos péptidos ha sido descrito recientemente en relación a sus características estructurales. Así, en base a su secuencia de aminoácidos, VIP, α MSH, GHR, y AM tienen una carga neta positiva con una distribución anfipática que recuerda a la presente en algunos péptidos antimicrobiales. En este sentido, se ha descrito recientemente su capacidad antimicrobial frente a diversos tipos de bacterias Gram⁺ y Gram⁻, y frente a parásitos protozoarios de los géneros de *Trypanosoma* (*T. brucei*) y *Leishmania*, los cuales presentan en superficie una importante carga negativa (Gonzalez-Rey, Chorny et al. 2006).

Estos resultados indican que los neuropéptidos son capaces de regular la respuesta inmune en diferentes niveles (Figura 1.11). Pero ¿cómo es posible que estos neuropéptidos puedan modular esta gran cantidad de mediadores y procesos?

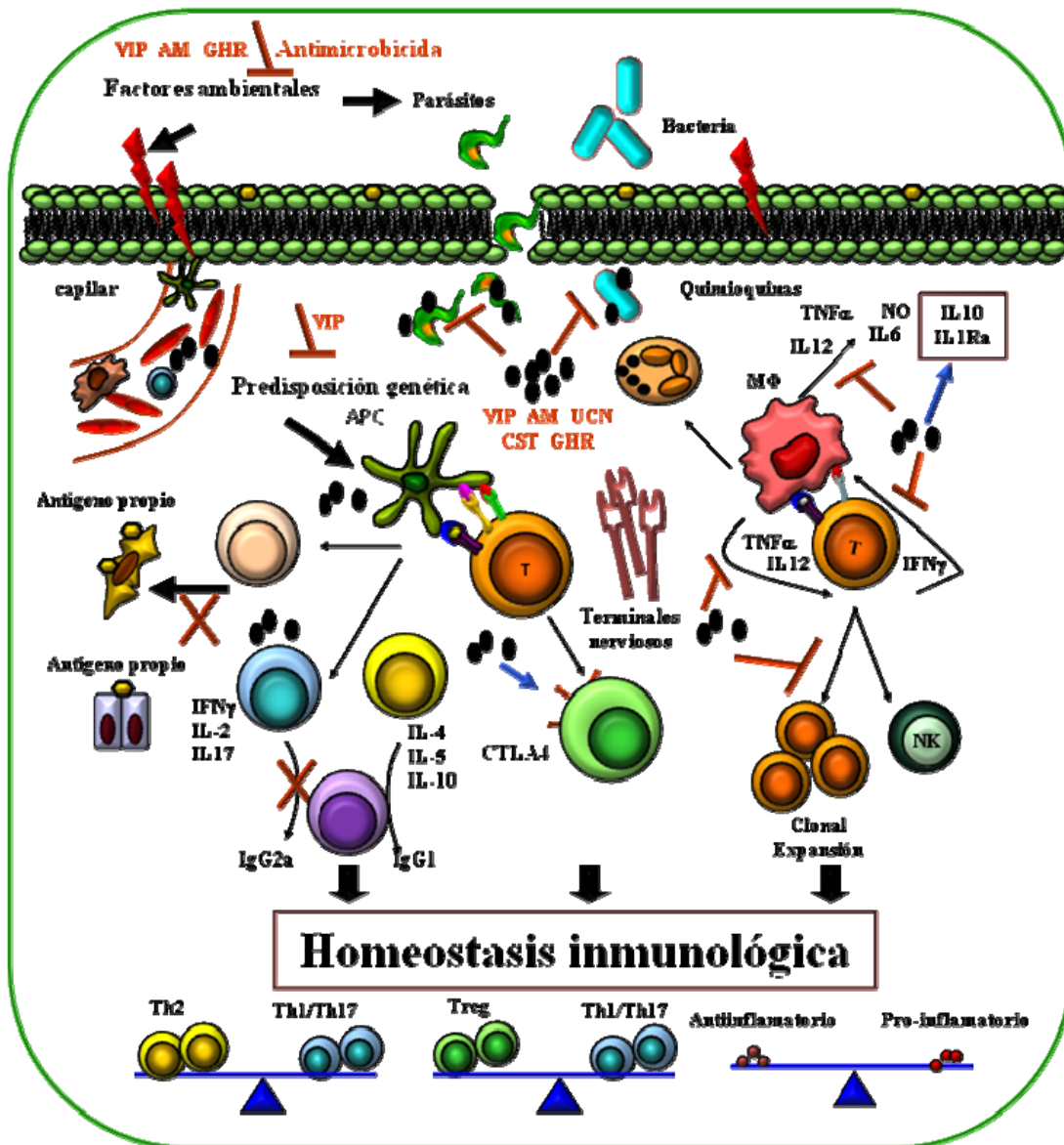


Figura 1.11 – Amplio espectro de acción de los neuropéptidos inmunomoduladores

La clave del potente espectro de acción de estos neuropéptidos reside en su alta afinidad por receptores transmembrana acoplados a proteínas G (GPCR, del inglés *G-protein-coupled receptor*) que señalizan a través de la vía AMPc-PKA. Mediante la unión al receptor, los neuropéptidos inducen un aumento de cAMP (del inglés, *cyclic AMP*) y la activación de la PKA (proteína quinasa A), que tiene cuatro efectos principales (Gonzalez-Rey, Chorny et al. 2007) (Figura 1.12):

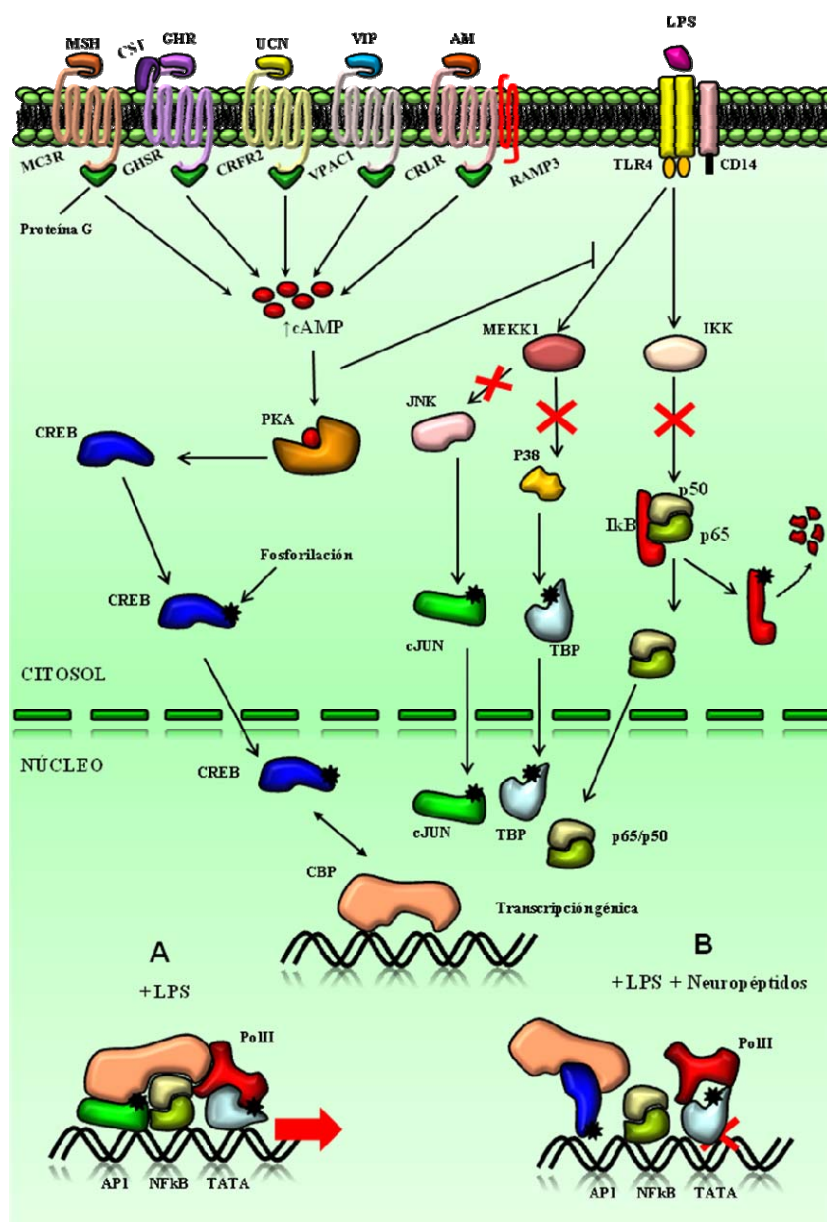


Figura 1.12 – Mecanismo de acción de los neuropéptidos inmunomoduladores

1) La activación de PKA induce la fosforilación de CREB (del inglés, *cAMP-responsive-element-binding protein*) que, debido a su alta afinidad por CBP (del inglés, *co-activator CREB-binding Protein*) evita la asociación de CBP con p65 (componente clave de la vía de NF- κ B).

2) PKA activada inhibe la activación de IKK (del inglés, *I κ B kinase*), lo que impide la fosforilación de I κ B y consecuentemente mantiene la estabilidad del complejo NF- κ B (del inglés, *nuclear factor- κ B*) en el citosol.

3) La activación de PKA inhibe la activación y fosforilación de MEKK1 (del inglés, *MAPK/ERK kinase kinase 1*) comprometiendo la fosforilación de p38, lo que impide la fosforilación de TBP (del inglés, *TATA-binding protein*) bloqueando la translocación nuclear de TBP. La unión de TBP fosforilada a la región TATA del DNA, es esencial para la actividad de la DNA polimerasa II.

4) La inhibición de MEKK1 por PKA posteriormente, desactiva JNK y la fosforilación de cJun. Se produce un cambio en la composición del complejo AP-1 (del inglés, *activator protein 1*), que requiere para su funcionalidad la presencia de cJun fosforilado.

La consecuencia final de la activación de la vía AMPc-PKA, tras la unión de los neuropéptidos a sus respectivos receptores, es la inhibición del complejo transcripcional y consecuentemente la unión del mismo a los promotores de diversos genes involucrados en inflamación.

Ante la diversidad de acciones mediadas por algunos neuropéptidos, una cuestión importante es el papel fisiológico desempeñado por los neuropéptidos endógenos en el mantenimiento de la homeostasis inmune. De hecho, animales deficientes en uno de estos neuropéptidos o de sus receptores, han mostrado la relevancia de las alteraciones de sus niveles y la asociación con la aparición de desórdenes inflamatorios y autoinmunes. Por ejemplo, la ausencia de VIP, AM o UCN o los receptores de VIP/PACAP resulta en una mayor susceptibilidad a la inflamación de las vías respiratorias y a la endotoxemia (Martinez, Abad et al. 2002). Los bajos niveles de GHR en edotoxemia y artritis están asociados con un mayor daño inflamatorio causado por estas enfermedades. No solo la respuesta inflamatoria innata parece estar afectada. Ratones deficientes para el receptor de VIP, VPAC2, muestran una respuesta Th1 exacerbada *in vivo* (Goetzl, Voice et al. 2001). Un trabajo reciente con

ratones deficientes en PACAP apoyan los hallazgos del efecto terapéutico de los neuropéptidos en un entorno autoinmune. Se ha demostrado que estos ratones presentan una mayor incidencia y severidad en el modelo de EAE, un aumento de la respuesta Th1 encefalogénica y una disminución de células Treg antígeno-específica (Tan, Abad et al. 2009). Otro estudio utilizando ratones deficientes en GHR ha demostrado que este neuropéptido desempeña un papel importante en la función y la evolución del timo (Youm, Yang et al. 2009). En humanos se ha comprobado que pacientes con artritis, endotoxemia, gastritis y colitis ulcerosa muestran niveles elevados de UCN y AM. En muestras de pacientes con desórdenes degenerativos como Alzheimer o Parkinson tienen bajos niveles de VIP, lo que también ocurre en pacientes con lupus y tiroiditis autoinmune (pacientes en los que se han encontrado niveles significativos de autoanticuerpos frente a VIP). De forma importante, estudios recientes han mostrado que monocitos, sinoviocitos y células T de pacientes con artritis reumatoide, osteoartritis y esclerosis múltiple, respectivamente, expresan bajos niveles de los receptores de VIP, con lo que la respuesta a este neuropéptido es mucho menor. Este hecho se relaciona con una respuesta Th1 autoreactiva aberrante en estos pacientes, y, en el caso de la artritis y espondilitis, está genéticamente asociada con un polimorfismo funcional de la región 3' del receptor de VIP, VPAC1.

En conjunto, estos resultados sugieren que los neuropéptidos y sus receptores son reguladores intrínsecos de la tolerancia inmunológica, y que un defecto en su sistema de señalización afecta al mantenimiento de la homeostasis inmune. Podría ser que los neuropéptidos no actúen en circunstancias normales, pero tengan un papel relevante cuando el sistema inmunológico está tratando de adaptarse a distintos tipos de problemas (ej. condiciones autoinmunes), y, junto con otras citoquinas, podría considerarse como parte del lenguaje del estrés en el sistema inmunitario.

Los efectos inmunomoduladores y pleiotrópicos de los neuropéptidos sugieren numerosas posibilidades terapéuticas. Los avances en este campo en los últimos años invitan a ser optimista en la aplicación futura de neuropéptidos con fines terapéuticos en humanos. Uno de los estudios más relevantes con los neuropéptidos en fase clínica, es en el que se ha realizado mediante la administración exógena de VIP en pacientes con sarcoidosis activa, una enfermedad mediada por macrófagos y células Th1. En este ensayo clínico, se demostró que la inhalación de VIP redujo significativamente la secreción de TNF- α y expresión de

moléculas co-estimuladoras en células broncoalveolares e indujo un aumento del número de células Treg en el líquido broncoalveolar (Prasse, Zissel et al. 2010). En cuanto a su toxicidad, los neuropéptidos se han administrado en humanos sin aparentes complicaciones o efectos secundarios. Los neuropéptidos son compuestos fisiológicos intrínsecamente no tóxicos. Son moléculas pequeñas e hidrofílicas que llegan rápidamente al sitio de inflamación y son rápidamente eliminadas de la circulación a través de los mecanismos naturales de detoxificación hepática. Por ejemplo, la infusión sistémica de la GHR en los pacientes con caquexia e infecciones pulmonares crónicas provoca una disminución significativa en la inflamación de las vías respiratorias sin efectos secundarios asociados (Kodama, Ashitani et al. 2008).

A pesar de la eficacia descrita tras la administración de los neuropéptidos como tratamiento en determinadas enfermedades, existen ciertos obstáculos que tienen que ser resueltos para conseguir su aplicación terapéutica. Debido a su naturaleza peptídica, estas moléculas son muy inestables y sensibles a degradación proteolítica. En este sentido, se han propuesto distintos abordajes con el fin de aumentar la estabilidad de los neuropéptidos, como modificaciones en la secuencia de aminoácidos o la co-administración con inhibidores de peptidasas. Por otro lado, se intenta mejorar la llegada de estos péptidos al sitio diana mediante su incorporación en micelas, nanopartículas, liposomas, y el uso de vectores lentivirales. La combinación de estos neuropéptidos con inhibidores de fosfodiesterasas (enzimas implicadas en la degradación del AMPc) es otra de las estrategias terapéuticas que se están desarrollando en el tratamiento combinado con los péptidos frente a diferentes desórdenes inmunológicos.

Péptido	Familia ^a	Receptor ^b	Fuente principal ^c	Función fisiológica ^d	Fuente Inmunol. ^e	Receptor/Células Inmunológicas ^f	Función inmunológicas ^g	Terapia ^h
VIP PACAP	PACAP Secretina Glucagon GHRH	VPAC1 VPAC2 PAC1	GI SNC corazón pulmón tiroides riñón genitales	<ul style="list-style-type: none"> ▲ vasodilatación ▲ motilidad gástrica ▲ secreción gastrointestinal ▲ débito cardíaco ▲ broncodilatación ▲ Hiperglicemia ▲ relajación del músculo liso ▲ crecimiento ▲ regulación hormonal ▲ analgesia ▲ metabolismo óseo 	CD4 Th2 CD8 TC2 mastocitos PMNC	VPAC1/T.M ϕ .Mo.DC.PMNC VPAC2/T.M ϕ (inducible) PAC1/M ϕ .Mo	<ul style="list-style-type: none"> ▼ citoquinas y quimiocinas inflamatorias ▼ co-estimulación de Mo y DCs ▼ expresión de iNOS ▲ IL-10, TGFβ ▼ proliferación de células T ▼ respuesta Th1: producción de IL-2 and IFNγ ▼ reclutamiento y diferenciación de Th1 ▼ apoptosis Th2 ▲ respuesta y reclutamiento de Th2 ▲ células Tregs ▲ generación de DC tolerogénicas 	RA EAE EAU IBD T1DM SD Sepsis Pancreatitis Transplante
aMSH	POMC ACTH	MC1R MC3R MC4R MC5R	SNC Pituitaria piel	<ul style="list-style-type: none"> ▲ efectos oscurecedor de la piel ▲ aprendizaje, atención y memoria ▼ efectos motores ▼ ingestión de alimentos 	T monocitos DC	MC1R/T.M ϕ .Mo.DC.PMNC.B MC3R/M ϕ .Mo MC5R/T.B	<ul style="list-style-type: none"> ▼ presentación de antígeno y co-estimulación de DCs ▲ producción de IL-10 ▼ proliferación de células T ▲ expansión de células Tregs ▲ generación de DC tolerogénicas 	sepsis EAE RA EAE Transplante IBD
NPY	Peptido YY polipeptido polipeptido	Y1-5	SNC nervio simpático	<ul style="list-style-type: none"> ▼ ingesta de alimentos ▼ metabolismo energético ▼ ansiedad 	T macrofagos DC	Y1/T.M ϕ .DC.B	<ul style="list-style-type: none"> ▼ presentación de antígeno y co-estimulación de DCs ▼ proliferación de células T ▼ respuesta Th1: activación y diferenciación 	EAE
UCN	CRH Urotensina	CRFR1 CRFR2	SNC pituitaria GI riñón testículos corazón, piel	<ul style="list-style-type: none"> ▲ vasodilatación ▲ broncodilatación ▲ débito cardíaco ▲ relajación del músculo liso ▼ ingestión de alimentos ▲ secreción de ACTH 	T B monocitos macrofagos DC mastocitos	CRFR2/T.M ϕ .Mo.DC.PMNC	<ul style="list-style-type: none"> ▼ citoquinas y quimiocinas inflamatorias ▲ producción de IL-10/TGF-β ▼ proliferación de células T ▼ respuesta Th1: producción de IL-2 and IFNγ ▲ células Tregs 	Sepsis EAE IBD RA
AM	calcitonina CGRP amilina	CRLR -RAMP1 CRLR -RAMP2 CRLR -RAMP3	adrenal SNC todos los tejidos periféricos (excepto en la tiroides)	<ul style="list-style-type: none"> ▲ vasodilatación ▲ broncodilatación ▲ relajación del músculo liso ▲ secreción de ACTH ▼ ingestión de alimentos 	monocitos macrofagos	CRLR-RAMP2/3/T.M ϕ .Mo.DC	<ul style="list-style-type: none"> ▼ citoquinas y quimiocinas inflamatorias ▲ producción de IL-10/TGF-β ▼ proliferación de células T ▼ respuesta Th1: producción de IL-2 and IFNγ ▲ células Tregs 	Sepsis IBD RA pancreatitis
Chrelin	motilina	GHSR	SNC GI estómago páncreas	<ul style="list-style-type: none"> ▲ débito cardíaco ▲ apetite y adiposidad ▲ hormona del crecimiento ▲ vasodilatación ▲ motilidad gástrica ▲ secreción gastrointestinal 	monocitos macrofagos	GHSR/T.M ϕ .Mo.DC	<ul style="list-style-type: none"> ▼ citoquinas y quimiocinas inflamatorias ▲ producción de IL-10/TGF-β ▼ proliferación de células T ▼ secreción de HMGB1 ▼ respuesta Th1: producción de IL-2 and IFNγ ▲ células Tregs 	Sepsis EAE IBD RA pancreatitis

Tabla 1.1 - Generalidades de los neuropéptidos immunomoduladores. a) Familias de péptidos que presentan alguna homología con la secuencia y estructura con el neuropéptido referenciado; b) Receptores a través de los cuales los neuropéptidos ejercen sus funciones ; c) Tejido o órganos con significante niveles del neuropéptido ;d) Principales efectos fisiológicos de los neuropéptidos en diferentes órganos y tejidos; e) Células del sistema inmunológico capaces de expresar neuropéptido; f) Células del sistema inmunológico expresando los diferentes subtipos de receptores de cada neuropéptido; g) Principales efectos de los neuropéptidos en la respuesta inflamatoria y autoinmune; h) Efectos benéficos de los neuropéptidos en diferentes modelos de enfermedades autoinmune.

1.8.- Cortistatina

La cortistatina (CST) es un neuropéptido de la familia de la somatostatina (SOM)/urotensina II (UII). (De lecea_nature_381_242_1996). Fue descubierta en 1996 en el cerebro de la rata. El nombre de este péptido se debe a su expresión predominantemente cortical y a su capacidad de disminuir la actividad de dicha zona del sistema nervioso. La CST deriva de una preproteína (preproCST) de 114 aminoácidos en ratón y 105 aminoácidos en humanos. La preproCST genera la proCST tras un procesamiento proteolítico del precursor que puede ocurrir en dos sitios diferentes de la secuencia aminoacídica, Lys-Lys o Lys-Arg, generando la CST-14 o la CST -29, respectivamente. Cuando este procesamiento ocurre en ambos sitios de escisión, se produce una isoforma de 13 aminoácidos (CST-13) (Puebla, Mouchantaf et al. 1999). El procesamiento de la preproCST humana ocurre en dos sitios Arg-Arg dando lugar a la hCST-29 o a la hCST-17. Mientras que la CST de ratón y rata son idénticas, la proteína humana tiene una única sustitución de 1 aminoácido y 3 aminoácidos adicionales en la región C terminal (en la forma hCST-17). PreproCST ha sido clonada a partir de diferentes tejidos periféricos en humanos, incluyendo corazón fetal, pulmones, próstata, riñón y algunos tumores (Dalm, Van Hagen et al. 2004). Es importante destacar que la presencia del RNAm para preproCST pero no para la SOM, ha sido detectada en células del sistema inmunológico.

CST comparte 11 de los 14 aminoácidos con SOM, incluyendo el núcleo de aminoácidos hidrofóbicos (FWKT) y las dos cisteínas que mediante un puente disulfuro permiten la formación de la estructura cíclica en ambos péptidos. Con base a la similitud estructural entre ambos neuropéptidos, CST se une con alta afinidad a los receptores de SOM (SST1-5) (Figura 1.13) (Fukusumi, Kitada et al. 1997), con la que comparte varias propiedades biológicas, como la disminución de los niveles de cAMP en células de la hipófisis, la inhibición de la proliferación celular y la disminución de la actividad neuronal en el hipocampo (de Lecea et al., 1996). Además, ambos péptidos parecen reducir la actividad neuronal en el hipocampo e inducen el desarrollo de convulsiones (Spier and de Lecea 2000).

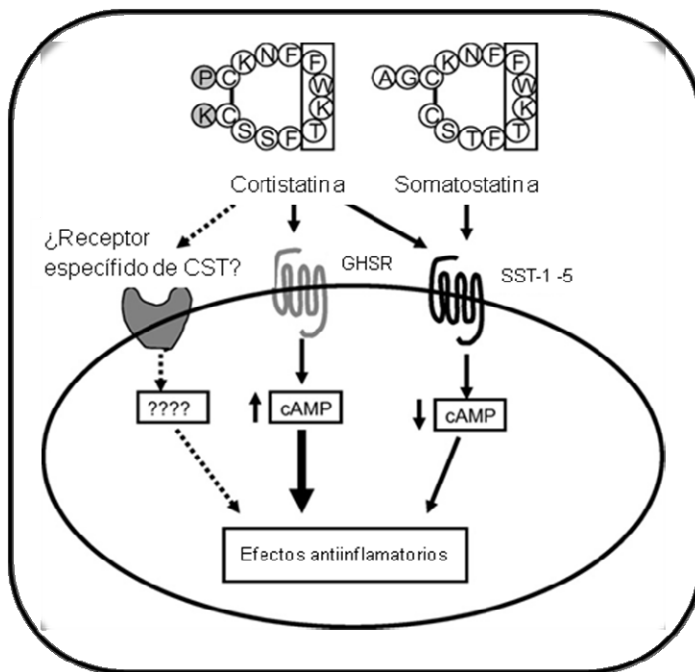


Figura 1.13 - El efecto diferencial de la somatostatina y cortistatina en el sistema inmunológico es una cuestión de especificidad del receptor. La somatostatina se une sólo a los SST1-5 y la acción es principalmente debido a la disminución de los niveles de cAMP. Cortistatina, además de su unión a SST1-5, se une al receptor de la grelina (GHSR) y activa la vía cAMP/PKA. Un receptor específico de CST aún no identificado (análogo al MrgX2 en humano) podría modular su acción anti-inflamatoria

A pesar de la gran similitud estructural y funcional con SOM, la CST presenta importantes diferencias funcionales respecto a la SOM. Por ejemplo, presentan una acción diferencial en la inducción del sueño: la inyección intracerebral de CST provoca un aumento del sueño mientras que la somatostatina disminuye esta acción. Durante la vigilia y el sueño hay una variación en los niveles de acetilcolina. Se ha demostrado que la CST antagoniza los efectos de la acetilcolina, mientras que la SOM mejora los efectos de la misma. (de Lecea, Criado et al. 1996). De acuerdo con la hipótesis de que la CST es un factor inductor de sueño, la privación del sueño aumenta la concentración del RNAm de preproCST y sus niveles oscilan a lo largo del ciclo luz / oscuridad (Cirelli, Faraguna et al. 2006). Por otro lado, la CST afecta a la reducción de la actividad locomotora en contraste con el efecto de la SOM. Recientemente se ha descrito el papel de la SOM y la CST en la modulación del dolor. En ensayos *in vitro* cultivos primarios de ganglios de la raíz dorsal (DRG, del inglés, *Dorsal Root Ganglia*) estimulados con capsaicina, se ha comprobado que ambos péptidos son capaces de reducir la liberación del principal neuropéptido modulador del dolor CGRP (del inglés *Calcitonin Gene-Related Peptide*). Sin embargo, sólo la CST, y no la SOM, ha sido capaz de

inhibir la liberación de CGRP en cultivos organotípicos de cerebro estimulado con capsaicina (Capuano, Curro et al. 2011).

Las diferencias funcionales descritas entre SOM y CST junto con el hecho de que en ratones deficientes en SOM no exista un aumento en la expresión de CST, sugiere que la CST no tiene un papel compensatorio, y que la CST podría estar uniéndose a otros receptores distintos de los de SOM. De hecho se ha descrito que este neuropéptido es capaz de unirse y señalizar a través del receptor de grelina, el GHSR (del inglés, *Growth hormone secretagogue receptor*), con la consecuente activación de la vía de AMPc/PKA dando lugar a un efecto anti-inflamatorio. Además de unirse a GHSR, se ha descrito que la CST se une con mayor afinidad al receptor huérfano recién descubierto en humanos MrgX2, mientras que SOM se puede unir a este receptor pero con baja afinidad. (Robas, Mead et al. 2003). La unión con GHSR y MrgX2 es una explicación plausible para las distintas acciones de ambos péptidos (Figura 1.13). Sin embargo, MrgX2 no se expresa en roedores y su receptor homólogo está aún por identificar. Además, los heterodímeros de los receptores de SOM y moléculas modificadores de la actividad de los receptores, RAMPs (del inglés, *Receptor activity-modifying proteins*) también podrían explicar las diferencias funcionales entre CST y SOM. Así, dependiendo del tipo celular, del contexto y del tipo de estimulación, las rutas de señalización desencadenadas por la unión del péptido al receptor son diferentes incluyendo activación de PKC (proteína quinasa C), inducción de AMPc, o aumento de Ca intracelular.

1.8.1 – El papel de CST en la respuesta inmune

Varias células del sistema inmunitario humano, incluyendo linfocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas, producen CST pero no SOM, y sus niveles de producción se correlacionan con la diferenciación y activación de estas células. Tanto la maduración de los monocitos a macrófagos y/o células dendríticas maduras, como la estimulación con LPS, inducen un aumento de la expresión de CST (Dalm, van Hagen et al. 2003). Estos resultados sugieren un papel regulador endógeno de la CST en el sistema inmunológico, principalmente en procesos inflamatorios.

La CST ejerce su efecto a través de los receptores mencionados anteriormente los cuales también se expresan en diferentes tipos celulares del sistema inmunitario como macrófagos,

monocitos, células dendríticas, células T, y neutrófilos. Diferentes experimentos *in vitro* han demostrado que en condiciones de inflamación, CST inhibe la producción de varias citocinas y mediadores pro-inflamatorios como TNF- α , IL-6, IL-12, óxido nítrico y de quimioquinas (RANTES, MCP-1, MIP-1, MIP-2, KC), y estimula la producción de agentes anti-inflamatorios como IL-10 e IL-1Ra (Gonzalez-Rey and Delgado 2006). Todo esto se traduce en un potente efecto terapéutico por parte de la CST en modelos de choque endotóxico, colitis y artritis inducida por colágeno (Gonzalez-Rey and Delgado 2006), donde el tratamiento con CST disminuyó el componente inflamatorio y, por tanto, la progresión y signos clínicos de dichas enfermedades (Tabla 1.2) Los efectos terapéuticos de la CST en inflamación intestinal y artritis reumatoide se han asociado también con una inhibición de la respuesta tipo Th1 específica de antígeno. Hay que señalar que, aunque la SOM también posee alguno de estos efectos inmunomoduladores (Krantic, 2000; Pinter, 2006), comparativamente el efecto de la CST tanto *in vitro* como *in vivo* fue siempre más eficiente. Además, se ha visto que la administración de CST induce la generación de Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en los ganglios mesentéricos de ratones con colitis y en las articulaciones de ratones con artritis reumatoide (Gonzalez-Rey, Varela et al. 2006; Gonzalez-Rey, Chorny et al. 2007), lo que sugiere que la CST podría restaurar la tolerancia inmunológica que se ha perdido en estos desórdenes y contribuir así a su efecto terapéutico.

Familia ^a	Receptor ^b	Fuente principal ^c	Función fisiológica ^d
Somatostatina	SST1-5 MRGX2 GHSR	SNC riñon estomago	▼ actividad locomotora ▲ somnolencia ▼ hormonio del crecimiento ▼ proliferación celular

Receptor/Células Inmunológicas ^f	Fuente Inmunológica ^e	Función inmunológica ^g	Terapia ^h
SST1-5/T,M ϕ ,Mo,DC GHSR/T,M ϕ ,Mo	T monocitos macrofagos	▼ citoquinas y quimioquinas inflamatorias ▲ producción de IL-10/TGF-b ▼ proliferación de células T ▼ respuesta/diferenciación Th1 ▲ células Tregs	Sepsis RA IBD

Tabla 1.2 - Generalidades del neuropéptido CORTISTATINA. a) Familia de péptido que presenta alguna homología con la secuencia y estructura con la CST; b) Receptores a través de los cuales la CST ejerce sus funciones ; c) Tejido o órganos con significante niveles del neuropéptido ;d) Principales efectos fisiológicos de la CST en diferentes órganos y tejidos; e) Células del sistema inmunológico capaces de expresar CST; f) Células del sistema inmunológicas expresando los diferentes subtipos de receptores en que CST puede se unir; g) Principales efectos de este neuropéptido en la respuesta inflamatoria y autoinmune; h) Efectos benéficos de CST en diferentes modelos de enfermedades autoinmune.

Estos resultados obtenidos en modelos *in vivo* e *in vitro* refuerzan la idea de CST como un agente inmunomodulador con potenciales aplicaciones terapéuticas. Como se ha comentado anteriormente, la CST ejerce su efecto mediante la unión a diversos tipos de receptores que incluyen los receptores de la SOM y el GHSR, (Deghenghi, Papotti et al. 2001). La amplia distribución de GHSR en las células del sistema inmunológico y el papel funcional de la GHR como un modulador de linfocitos, macrófagos y células dendríticas sugieren un posible papel de CST señalizando a través del mismo receptor. De hecho se demostró que, en un modelo de artritis inducida por colágeno, la CST ejerce sus efectos terapéuticos parcialmente a través del receptor de GHR, ya que su efecto se podía revertir parcialmente con un antagonista del GHSR (Gonzalez-Rey, Chorny et al. 2007). La unión al receptor de GHR explica los efectos anti-inflamatorios de CST, dado que el GHSR es un receptor acoplado a la vía de AMPc-PKA, que está íntimamente relacionada con la inhibición de diversas citoquinas inflamatorias. (Figura 1.12). Así, la capacidad de la CST de unirse a diferentes receptores y activar diferentes vías de transducción podría explicar en parte el efecto de la CST en los modelos inflamatorios y autoinmunes y su mayor eficiencia respecto al uso de la SOM y otros agonistas.

1.8.2 – El papel de CST en el sistema nervioso

El análisis de la distribución de la preproCST determinada por hibridación *in situ* en secciones de cerebro de rata indica que se expresa en neuronas del cortex cerebral e hipocampo, y, en bajos niveles, en bulbo olfatorio y el estriado, principalmente en neuronas GABAérgicas. Sin embargo, no se ha detectado expresión en el tálamo, mesencéfalo, tallo cerebral, o cerebelo.

Entre los principales efectos de la CST en el sistema nervioso destaca la disminución de la actividad motora (Criado, Li et al. 1999), la inducción de convulsiones (cuando se inyecta intracerebroventriculamente en dosis muy altas, > 10µg), y la inducción de sueño. También la inyección intracerebroventricular parece afectar al aprendizaje y la memoria a largo plazo, lo que se relaciona con la inhibición por parte de la CST de la neurotransmisión glutamatérgica. En el SNC se ha demostrado que la CST podría modular el establecimiento de conexiones sinápticas en el neocortex e hipocampo durante el desarrollo, debido a la relación que tiene

con el factor neurotrófico BDNF. Por otra parte, la CST ejerce efectos neuroprotectores en condiciones de isquemia o trauma cerebral disminuyendo la liberación de neurotransmisores excitotóxicos (Rauca, Schafer et al. 1999). Otro ejemplo de la importancia de CST como neuroprotector es que se ha visto que existe una menor expresión de CST en retinas de individuos diabéticos, lo que se corresponde con una mayor neurodegeneración medida por activación de microglía y muerte celular neuronal

Un dato interesante es que, aunque la expresión de CST es bastante abundante en el SNC (principalmente en córtex e hipocampo), no se detecta en el mesencéfalo, región del cerebro afectada en desórdenes como la enfermedad de Parkinson, donde además existe una mayor abundancia de microglía y donde es mayor la sensibilidad a la neurotoxicidad desencadenada por su activación. Por otro lado, en individuos enfermos con Alzheimer o Parkinson existe una disminución drástica en los niveles de CST. De hecho, se ha visto que en ratones transgénicos que sobreexpresan el precursor de la proteína β amiloide humana se produce un déficit en la expresión de CST, en comparación con lo que ocurre en ratones normales en los que la expresión de CST en el hipocampo aumenta con la edad (Winsky-Sommerer, Spier et al. 2004). Esta deficiencia en CST podría estar relacionada con algunos de los problemas derivados de esta enfermedad como el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo sugiriendo una posible implicación de este péptido en desórdenes del sistema nervioso. Sin embargo, la caracterización del papel de CST en el control de la respuesta inflamatoria en el compartimento del SNC es muy escasa. Uno de los pocos estudios realizados en este campo, mostró que la CST pero no la SOM, es capaz de disminuir la producción de prostanoïdes de cultivos primarios de astrocitos corticales de rata y de cultivos primarios de microglía cortical estimulados con IL-1 β , disminuyendo la expresión de COX-2 (Dello Russo, Lisi et al. 2009). También se ha comprobado recientemente que la CST fue capaz reducir el ambiente inflamatorio generado en un modelo de meningoencefalitis bacteriana ejerciendo al mismo tiempo un efecto neuroprotector (Chiu, Wen et al. 2011). Estos resultados sugieren un importante papel de la CST en el SNC tanto en condiciones basales como en enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer y/o la enfermedad de Parkinson, donde existe una combinación de diferentes componentes como la autoinmunidad, inflamación, y neurodegeneración.

2 – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Aunque la etiología tanto de la esclerosis múltiple, como de su modelo experimental EAE, no se conoce aún, lo que sí parece bastante establecido es que ambas alteraciones neurodegenerativas tienen dos componentes patológicos responsables de la desmielinización del SNC: un componente inflamatorio destructivo y un componente autoinmune caracterizado por una respuesta tipo Th1/Th17 encefalogénica. Puesto que las actuales estrategias terapéuticas para tratar la esclerosis múltiple están encaminadas a tratar algún aspecto de estos dos componentes, cortistatina, como agente anti-inflamatorio y a la vez capaz de desactivar la respuesta inmune tipo Th1, puede presentar una ventaja muy atractiva frente a otros agentes que controlen un aspecto particular de esta neuropatología. Además, la posibilidad de que cortistatina esté favoreciendo la generación/activación de células T reguladoras, y el consiguiente restablecimiento de la tolerancia inmunológica perdida, garantizaría que un tratamiento corto con este péptido fuera suficiente para evitar recurrencia de la enfermedad a largo plazo. Por otra parte, la CST parece ser esencial en la homeostasis del SNC actuando como factor neuroprotector en distintas circunstancias de daño y estrés cerebral. Por tanto, en el presente trabajo nos propusimos estudiar la posible aplicación terapéutica de CST en la esclerosis múltiple, utilizando el modelo de EAE, que guarda un gran número de similitudes tanto a nivel clínico como histopatológico con la enfermedad, así como conocer los mecanismos celulares y moleculares implicados en este posible efecto terapéutico. En base a las características inmunomoduladoras y neuroprotectoras de la CST esperamos que el tratamiento con este neuropéptido prevenga el desarrollo y/o cure total o parcialmente la esclerosis múltiple. Por un lado a través de un efecto anti-inflamatorio en el parénquima nervioso, inhibiendo la síntesis de mediadores proinflamatorios y citotóxicos, y evitando la invasión del SNC por diferentes células inmune, y por otro lado, favoreciendo la regeneración neuronal generando factores neurotróficos y aumentando la supervivencia de las células residentes. Los objetivos concretos planteados en este trabajo han sido:

Estudiar el efecto del tratamiento con cortistatina in vivo en el modelo de enfermedad autoinmune inflamatoria degenerativa EAE, estudiando los parámetros clínicos e histopatológicos característicos de la enfermedad.

Analizar el efecto de CST en los niveles de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y anti-inflamatorias en el SNC de animales con EAE.

Estudiar el efecto de CST sobre la respuesta autorreactiva Th1/Th17 en el modelo de EAE, analizando la proliferación de células CD4 autorreactivas, y el perfil de citoquinas de linfocitos de ganglios linfáticos cervicales de los animales con los diferentes tratamientos.

Estudiar la generación de células T reguladoras en ratones con EAE tras el tratamiento con CST. Determinar la participación de estas células T reguladoras en el potencial efecto terapéutico en EAE.

Investigar la participación en el efecto terapéutico de CST, de la regulación con este neuropéptido de la activación de las células gliales in vitro

Estudiar el papel endógeno del neuropéptido CST, caracterizando el perfil inmunológico de ratones deficientes en CST (CST-KO) en el modelo de EAE.

3 – MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 - Productos químicos

En general, los compuestos químicos y materiales básicos que se han utilizado en la realización de esta tesis fueran suministrados por las siguientes compañías: MERCK, Sigma, PAA, Fluka, Promega, New England Biolabs, Pharmacia, Molecular Probes, Difco, Nunc, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, BD Bioscience y BioRad.

3.2 - Péptidos

El péptido PLP 139-151 (HCLGKWLGHDPKF) se adquirió de la casa comercial Peptides International. El péptido MOG 35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) se sintetizó y se obtuvo de la compañía GeneScript. Tanto PLP como MOG se disolvieron en PBS libre de Ca^{++} y Mg^{++} , y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Los neuropéptidos Grelina y Cortistatina fueron adquiridos en American Peptides y Phoenix Pharmaceuticals. Estos péptidos se disolvieron en tampón fosfato 20 mM pH 7.0, y se guardaron a -80°C hasta su uso.

3.3 - Tampones y soluciones:

Tampón de carga de ácidos nucleicos 10x: glicerol 70% (v/v), sarcosil 5% (p/v), azul de bromofenol 2% (p/v), xilano cianol 2% (p/v), EDTA 0.1 mM pH 8.

Tampón de lisis de eritrocitos (ACK): NH_4Cl 0.15 M, KHCO_3 1 mM, EDTA 0.1 mM

Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 130 mM, Na_2HPO_4 70 mM, NaHPO_4 3 mM, pH 7.2

Tampón TAE 50x: Tris HCl 2 M pH 7.2, EDTA 50 mM pH 8

Tampón de lisis de órganos: Tris-HCL 50 mM pH 7.4, DTT 0.5 mM

Tampón de lavado para citometria de flujo: SFB 10%, azida sodica 1% en PBS.

Tampón de lavado para ELISA: Tween 0.1% en PBS

Tampón de bloqueo para ELISA: SBF 10% en PBS

Tampón monofosfato para ELISA (solución A): NaH_2PO_4 0.2M

Tampón bisfosfato para ELISA (solución B): Na_2HPO_4 0.2M

Tampón de unión pH 9 0.1M: 10 ml solución B + 9 ml H_2O MilliQ

Tampón de unión pH 6 0.1M: 8.77ml solución A + 1.23 ml solución B y 10 ml H₂O MilliQ

3.4 - Medios de cultivo

DMEM completo: Medio DMEM (*Dulbecco-modified Eagle Medium*, PAA) suplementado con suero bovino fetal (SBF) 10% (Gibco), penicilina (100.00U, Sigma), estreptomicina (100mg/l, Sigma), L-glutamina (2mM, Sigma). El DMEM completo se ha utilizado para el cultivo de macrófagos peritoneales, y durante la estimulación de astrocitos y microglía primaria.

DMEM 10:10:1: Medio DMEM suplementado con SBF 10%, suero de caballo 10% (Gibco) penicilina (100.00U), estreptomicina (100mg/l), L-glutamina (2mM), HEPES (10mM), β-mercaptoetanol (50 μM). El DMEM 10:10:1 se ha utilizado en los cultivos de cerebros de neonatos de ratones para el aislamiento de astrocitos, precursores de oligodendrocitos y microglia.

DMEM/F12+FC: Medio DMEM/F12 (*DMEM/Nutrient Mixture F-12*, Gibco) libre de suero suplementado con los siguientes factores de crecimiento (FC): Apo-Transferrin 25 μg/ml (Sigma), Biotina 10 nM (Sigma), Selenito de sodio 30 nM (Sigma), Putrescina 1 μg/ml (Sigma), Insulina 5 μg/ml (Sigma), Hidrocortisona 20 nM (Sigma), Progesterona 20 nM (Sigma), penicilina (100.00U), estreptomicina (100mg/l), BFGF (del inglés, *Basic fibroblast growth factor*) 5 ng/ml (Peprotech), PDGF-AA (del inglés, *platelet-derived growth factor*) 5 ng/ml (Peprotech), BSA 0.1% (albúmina de suero bovina, Fraction V, Gibco). El DMEM/F12+FC se utilizó en los cultivos de mantenimiento de precursores de oligodendrocitos y durante su diferenciación (en que este medio se suplementa con 30 nM de la hormona tiroidea T3 (Sigma).

El suero bovino fetal utilizado en todos los medios de cultivo se inactiva por calor a 56°C durante 30 minutos antes de ser añadido a los medios.

3.5 - Animales y modelos de experimentación:

Todos los estudios con animales se realizaron bajo la normativa de la Unión Europea sobre el manejo y uso de animales de laboratorio. Los modelos utilizados en esta tesis fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal del Instituto de Parasitología y Biomedicina “Lopez Neyra”. Los animales se mantuvieron en un ambiente controlado con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas a una temperatura constante de 23°C. La atención diaria de los animales, además de la alimentación y limpieza, se ha realizado por los veterinarios y técnicos acreditados del animalario. Todos los ratones se mantuvieron provistos de una dieta estándar y agua ad libitum.

Se han utilizado ratones SJL/J (modelo de EAE RR) y ratones C57BL/6 en el resto de modelos (que incluyen: modelo crónico de EAE, modelo de ligación y punción cecal-CLP, modelo de artritis reumatoide, modelo de artritis monoarticular, modelo de enfermedad inflamatoria intestinal-IBD, y modelo de dolor inflamatorio). Aunque el modelo de EAE se desarrolla específicamente en ratones C57BL/6, no es el fondo genético más adecuado para el desarrollo del modelo de artritis inducida por colágeno ni para el de IBD, como queda indicado en los apartados correspondientes. El uso de estos ratones se debe a que los ratones deficientes en cortistatina (con los que se realiza el estudio) se han desarrollado en este fondo genético. Los animales no transgénicos se obtuvieron del centro de producción Charles River.

Los ratones deficientes en CST (CST-KO) se establecieron como colonia en el animalario del IPBLN. Estos animales fueron generados en el laboratorio del grupo del Dr. L. de Lecea utilizando la técnica Cre-LoxP (comunicación personal) (Universidad de Stanford), posteriormente cedidos al laboratorio del grupo del Dr J. Castaño (Universidad de Cordoba), que, a su vez, nos facilitó los animales suficientes para iniciar la colonia.

Los ratones deficientes en somatostatina (SOM-KO) también se encuentran en el fondo genético de C57BL/6. Se utilizaron en el modelo de EAE. Fueron cedidos por el grupo del Dr. J. Castaño (Universidad de Cordoba).

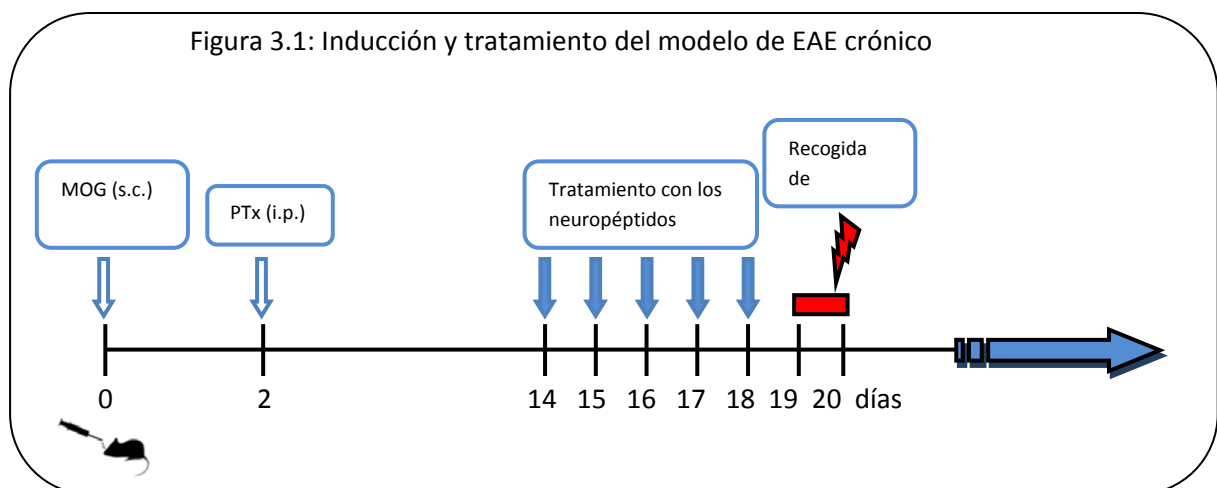
A no ser que se especifique lo contrario, los animales fueron anestesiados a la hora de inducir los modelos con una mezcla de ketamina (Imalgene 1000, Merial) y acepromacina (CalmoNeosan, Pfizer), vía intramuscular a la concentración de 0.8 mg/Kg de ketamina y 2

mg/Kg de acepromacina. El sacrificio en los momentos indicados se llevó a cabo mediante inhalación con CO₂.

3.5.1 - Inducción de EAE y tratamiento

a) Modelo crónico de EAE

Ratones C57BL/6 (hembras, 6-8 semanas de edad) previamente anestesiados con una mezcla de ketamina/acepromacina vía intramuscular, se inmunizaron subcutáneamente (i.sc) con 150 µl por animal de una emulsión de 200 µg del péptido MOG₃₅₋₅₅ en adyuvante completo de Freund (CFA, del inglés *Complete Freund's Adjuvant*) suplementada con 400 µg de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco). La administración del MOG se repartió entre la zona cervical y flancos laterales a ambos lado de la cola. Los ratones también recibieron por vía intraperitoneal (i.p) 200 ng de toxina pertussis (Sigma) en 200 µl de PBS en el momento de la inducción (día 0) y una segunda dosis tras 48 horas de la inmunización (día 2). Los primeros signos clínicos de la enfermedad empezaron alrededor del día 14 post-inmunización. En los ratones deficientes en CST y en SST se indujo la EAE de la misma forma.



b) Modelo de remisión-recaída de EAE

En este modelo se utilizaron ratones susceptibles SJL/J (hembras, 6-8 semanas de edad), anestesiados como en el caso anterior que se inmunizaron por i.sc. con 150 µg de PLP₁₃₉₋₁₅₁

emulsionado en CFA con 400 µg de *M. tuberculosis* H37RA. La administración del PLP se realizó como en el caso anterior. Los ratones recibieron por vía i.p 200 ng de toxina pertussis en 200 µl de PBS el día 0 y el día 2. Los primeros síntomas de la inducción de la EAE se observaron alrededor de los días 11-14 post-inmunización, con un primer brote alrededor del día 20-21 post-inmunización, seguido de una recuperación parcialmente sin signos clínicos de enfermedad. Un segundo brote de parálisis (recaída) comenzó y alcanzó un pico alrededor de 40-42 días después de la inmunización.

En ambos modelos se siguió diariamente la evolución de la enfermedad en todos los grupos experimentales, analizando de forma objetiva los signos clínicos, que fueron calificados de acuerdo con la siguiente escala:

0. sin signos clínicos;
- 0.5 pérdida parcial de tonicidad en la cola;
1. pérdida completa de tonicidad en la cola;
2. cola flácida y flojedad en las extremidades traseras moderada o ligera ataxia;
3. flojedad en extremidades traseras severa o ataxia moderada; parálisis al menos en 1 pata trasera;
4. paraplejia con flojedad moderada en patas delanteras;
5. tetraplejia;
6. muerte.

c) Tratamiento con los neuropéptidos

El tratamiento con los neuropéptidos se ha realizado en diferentes condiciones:

- Pre tratamiento: los animales se inyectaron una vez al día durante 5 días consecutivos antes de la inducción con MOG, y 4 días inmediatamente después. Solo se utilizó CST.
- Antes del inicio de la enfermedad en animales inmunizados con MOG: los neuropéptidos se inyectaron una vez al día comenzando el día 12 post-inmunización con MOG durante 5 días consecutivos. Sólo se utilizó CST

- Una vez iniciados los signos clínicos de la enfermedad: se inyectaron animales con diferentes grados clínicos (0.5: día 14 post-inmunización; 1.5-2: día 16-18 post-inmunización), una vez al día durante 5 días consecutivos. Se utilizaron CST y GHR.
- Reversión con CST en animales deficientes en este neuropéptido: se siguió la misma secuencia que en el caso de pretratamiento.

El tratamiento se realizó i.p con 1 nmol de los neuropéptidos (0.5 µg/ratón/día) disueltos en PBS en un volumen final de 200 µl. En los ratones control se administró solo PBS. La dosis utilizada se eligió en base al efecto terapéutico de estos neuropéptidos en otros modelos de enfermedades autoinmunes. En los casos indicados, los ratones se sacrificaron 24-48 horas después de la última administración de los neuropéptidos.

En un grupo de experimentos se utilizó el compuesto sintético esteroideo Mifepristona (RU486, Sigma), que es un antagonista del receptor de glucocorticoides (con una afinidad 10 veces mayor que el cortisol) y del de la progesterona (con más del doble de afinidad). No se une al receptor de estrógenos. Este compuesto se disolvió en etanol a una concentración final de 50 mg/ml. Se inyectaron los ratones deficientes en CST de forma i.sc 1 mg/ratón 3 veces/semana disuelto 1:1 en Macrogol PEG400 durante 20-24 días comenzando en el día de la inmunización con MOG. Los ratones control de estos experimentos se inyectaron con etanol:PEG400 (1:1) de la misma forma.

d) Transferencia de células a ratones con EAE

En este experimento, el día 22 post-inmunización se obtuvieron y purificaron células de los ganglios linfáticos drenantes y de bazo procedentes de ratones con EAE o de ratones con EAE tratados con los neuropéptidos, y se inyectaron i.p a ratones en los que previamente se ha inducido la enfermedad y mostraban un grado clínico de 0.5-1. Para ello, 24 horas tras la última dosis de tratamiento con los neuropéptidos o con el vehículo, se aislaron los órganos linfáticos drenantes y el bazo y se homogeneizaron de acuerdo al protocolo de procesamiento de órganos linfoides. Tras 2 horas de adherencia en plástico, recuperación de las células flotantes, y centrifugación a 300 rpm durante 5 minutos, las células obtenidas se separaron en diferentes poblaciones mediante selección inmunomagnética, según el protocolo descrito más

adelante (Miltenyi Biotech). Las poblaciones obtenidas de los distintos grupos experimentales fueron las siguientes:

- Células CD4 totales: se inyectaron 10×10^6 células/ratón en 200 μ l de PBS
- Células CD4+CD25-: se inyectaron 15×10^6 células/ratón en 200 μ l de PBS

Tanto cuando se realizó el tratamiento con los neuropéptidos como cuando se utilizó la transferencia de los diferentes tipos celulares, como en el caso de los ratones deficientes en CST se hizo un seguimiento de los signos clínicos de la enfermedad entre 30-50 días post-inmunización. Para estudiar el mecanismo de acción de los tratamientos utilizados o del efecto endógeno de la CST se obtuvo suero por punción cardíaca (donde se determinaron niveles de autoanticuerpos por ELISA específico), se obtuvieron células de órganos linfoides (donde se determinó la respuesta autorreactiva analizando la producción de citoquinas y quimioquinas por ELISA específico, la respuesta proliferativa mediante ensayos radiactivos, la producción de citoquinas intracelulares mediante citometría de flujo), se obtuvieron extractos médula espinal y cerebro (parénquima nervioso) donde se determinaron los niveles locales de mediadores inflamatorios tanto a nivel de expresión génica (usando técnicas de biología molecular) como a nivel proteico (por ELISA específico), y se obtuvieron secciones de médula espinal donde se determinó la presencia de desmielinización e infiltración mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Las técnicas utilizadas en cada caso se especifican en los apartados correspondientes.

3.5.2 - Modelo de ligación y punción cecal (CLP, del inglés *cecal ligation and puncture*)

Este modelo se llevó a cabo en ratones salvajes y en ratones deficientes en CST. Tras anestesiarse los ratones C57BL/6 (machos/hembras según se especifique, 6-8 semanas) con una mezcla de ketamina/acepromazina vía intramuscular, se sometieron los ratones a laparotomía con una incisión longitudinal de aproximadamente 1 cm y posterior exposición del ciego. En seguida se hizo una ligación con hilo de seda estéril en la región cerca de la válvula ileocecal (a 5 mm del extremo cecal), realizando además una punción con una aguja de 22G y presionando ligeramente sobre el contenido cecal hacia el peritoneo. El ciego fue recolocado

en la cavidad peritoneal que se suturó con hilo de seda, junto con músculos y la piel. La consecuencia es un proceso que asemeja a una peritonitis y a un proceso séptico y aproximadamente el 80% de los animales mueren entre el 4^o-6^o día post-CLP. En los experimentos de reversión con CST, el tratamiento que realizamos con el péptido se inició a -2, 0, 5, 18, y 24h post CLP mediante inyección intraperitoneal de 1 nmol (0.5 µg/ratón/día). Se registró la supervivencia durante 10 días y los signos clínicos (fiebre, pelo erizado, etc) diariamente. A las 24h de haber inducido CLP se obtuvo el suero por punción cardiaca y la suspensión peritoneal tras lavado con PBS. Tras separar las células y el fluido peritoneal (como se describe en el apartado correspondiente), se almacenó el fluido a -20°C para posterior determinación de los niveles de citoquinas/quimioquinas inflamatorias, y se recogieron en diversos tiempos (6, 24, y 48 horas) los sobrenadantes de los cultivos de células provenientes del peritoneo se almacenaron a -20°C hasta realizar la determinación de la liberación espontánea de citoquinas.

En un grupo de experimentos se inyectaron los ratones deficientes en CST a los que se indujo CLP con 0.6 mg/ratón de RU486 disuelto en PEG400 (1:1) vía subcutánea inmediatamente después de CLP y 24 horas post-CLP. Los ratones control de estos experimentos se inyectaron con etanol:PEG400 (1:1) de la misma forma.

3.5.3 - Modelo de colitis inducida por TNBS

Este modelo de colitis aguda se desarrolla mediante la administración del ácido picrilsulfónico (TNBS al 5% w/v, Sigma) en ratones genéticamente susceptibles como SJL/J y Balb/c, mientras que la cepa C57BL/6 es bastante resistente. En nuestro caso, desarrollamos el modelo en ratones C57BL/6 (hembras/machos de 8-10 semanas de edad) por lo que realizamos algunas modificaciones respecto al protocolo normal. En general, el modelo de colitis se indujo por la administración de 3 mg de TNBS mediante la utilización de un enema utilizando un cateter (de 2 mm de diámetro exterior) que se insertó aproximadamente 4 cm a través del orificio del ano. Los ratones fueron previamente anestesiados de forma ligera mediante inhalación con 3% isofluorano (Inibsa), tras lo cual se administró TNBS (disuelto en 50% de etanol) siendo el volumen final del enema de 150 µl. El etanol se utiliza para romper la integridad del epitelio intestinal, facilitando el acceso del TNBS a la lámina propia

intestinal, donde actúa como un hapteno para proteínas autólogas colónicas y/o de la microbiota intestinal, volviéndolas inmunogénicas y desencadenando una respuesta inmune mediada por células Th1/Th17. Una vez instilado el volumen final de TNBS, cada ratón permaneció suspendido 30 segundos cabeza abajo antes de devolverlo a la jaula correspondiente. Se realizaron dos administraciones más de TNBS (que en el caso de los ratones susceptibles supone la muerte del 100% de los animales): una el día 11 y otra el día 19 de desarrollo del modelo, para conseguir una mayor susceptibilidad. Los ratones se identificaron numéricamente y se realizó un seguimiento diario de la supervivencia y la pérdida de peso de cada animal por separado. Además, en determinados momentos se evaluó la consistencia y aspecto de las heces según el siguiente criterio:

0. normal;
1. Amorfa
2. Blanda y pegajosa
3. diarrea con presencia de sangre

3.5.4 - Modelo de artritis inducida por colágeno (CIA)

Este modelo se desarrolla normalmente utilizando el colágeno de tipo II en la cepa altamente susceptible DBA/1 mice (H-2q). Sin embargo, recientemente se ha descrito que el modelo se puede desarrollar en otras cepas, sobre todo en el fondo genético de C57BL/6 (H-2b), que es donde se generan la mayoría de las cepas de ratón genéticamente modificadas (Inglis, Simelyte et al. 2008). Cuando se utilizan ratones C57BL/6, el desarrollo de CIA no suele alcanzar más de un 50-80% de incidencia, siendo ésta además bastante variable, frente al 100% que desarrollaría la enfermedad en la cepa DBA/1. En nuestro caso, llevamos a cabo este modelo en ratones salvajes y en ratones deficientes en CST, ambos C57BL/6 (machos, 12-14 semanas de edad). Después de ser anestesiados con ketamina/acepromacina, los ratones se inmunizaron con i.sc en la base de la cola con 200 µg de colágeno tipo II de pollo (Sigma) emulsionado en CFA suplementado con 200 µg de *M. tuberculosis* H37RA. El colágeno se prepara mediante disolución en 0.05 M de ácido acético a 4°C durante 12-16 horas. A los 21 días después de la primera inmunización, se inyectaron de nuevo los ratones con 200 µg de CII en CFA. En el día 26 después de la primera inmunización, se inyectaron los ratones de

forma i.p con 50 µg del lipopolisacárido bacteriano (LPS), ya que se ha descrito que permite la sincronización del modelo y exacerba el desarrollo del mismo en este fondo genético (Asquith, Miller et al. 2010). El desarrollo de la enfermedad se evaluó 3 veces por semana a partir de la segunda inmunización según el siguiente criterio en cuanto a grados clínicos:

0. sin signos clínicos;
1. Edema leve
2. Edema moderado afectando a 1-2 dedos
3. Edema en toda la articulación
4. Distorsión, rigidez, y disfunción de la articulación.

Cada pata se evalúa independientemente sumando los diferentes grados, de forma que un animal puede obtener un grado máximo de 16. También se determinó el grado de inflamación utilizando un calibre automático, y se registró la incidencia de la enfermedad.

3.5.5 - Modelos de dolor inflamatorio y ensayos de comportamiento relacionados con dolor

En los siguientes modelos se utilizaron ratones C57BL/6 salvajes y deficientes en CST (machos/hembras, 12-14 semanas de edad). Los animales se habituaron a la habitación donde se realizó la experimentación previamente durante al menos 1 hora. No se observaron diferencias significativas entre ratones machos y hembras en estos modelos. De acuerdo a los principios éticos recogidos en las guías correspondientes al uso de animales de laboratorio para estudios experimentales relacionados con el dolor, se redujo al mínimo necesario tanto el número de animales utilizados como los experimentos realizados. Asimismo, la intensidad del estímulo dañino fue también reducido al valor necesario para demostrar de forma consistente los efectos del tratamiento realizado.

a) Artritis monoarticular (inflamación inducida por CFA)

Para inducir el dolor asociado a la artritis monoarticular (dolor crónico inflamatorio) se anestesiaron los ratones con 3% de isoflurano y se inyectaron de forma intra-articular (i.a) con 10 µg de CFA preparado en solución salina (0.9% de ClNa): 10 µl en la articulación de la rodilla izquierda y solución salina (10 µl) en la articulación contralateral derecha. La

inflamación en la articulación de la rodilla se determinó con la medida del calibre durante 10 días. La acumulación de neutrófilos sinoviales (determinado según la actividad mieloperoxidasa-MPO), y los niveles de TNF- α (por ELISA) se determinaron en el fluido sinovial de la rodilla extraído 24h después de la inyección con CFA (como se describirá a continuación). Las respuestas nociceptivas se determinaron por la hiperalgesia inducida por calor radiante y por alodinia táctil utilizando la técnica de Hargreaves y los filamentos de Von Frey, respectivamente (descritos a continuación), en la pata ipsilateral a la rodilla inflamada. Las respuestas nociceptivas se evaluaron 1, 3, 7 y 10 días después de la inducción de la inflamación por CFA. En los grupos en que se utilizó CST, ésta se administró vía i.a utilizando 200 ng /10 μ l en solución salina en ratones anestesiados con isofluorano.

b) Inflamación inducida por Carragenina (CRG)

Este modelo de inflamación aguda, se indujo por la inyección intraplantar (i.pl.) de 200 μ g/20 μ l de CRG (Sigma) en la pata trasera izquierda de los ratones. La inflamación se determinó mediante la medida con el calibre; los niveles de citoquinas se determinaron por ELISA 2 horas después de la inyección de CRG; y la infiltración de neutrófilos se determinó midiendo la actividad MPO 4 horas después de la inyección de CRG. Las respuestas nociceptivas se determinaron en diferentes momentos (2, 4, y 24 horas post-CRG) usando las técnicas de hiperalgesia inducida por calor radiante y la hipersensibilidad a la presión mecánica determinadas por la técnica de Hargreaves y de Randall-Selitto respectivamente (descritas a continuación). En los grupos en que se utilizó CST, ésta se administró periféricamente por inyección local vía intraplantar (i.pl) en la superficie de la almohadilla plantar de la pata trasera a 100 ng /20 μ l en solución salina en ratones anestesiados con isofluorano.

c) Caracterización de la respuesta nociceptiva térmica

Las respuestas nociceptivas térmicas se midieron utilizando el aparato de calor radiante de Hargreaves (IITC Life Sciences) adaptado para ratones (Hargreaves, Dubner et al. 1988). Los animales se mantuvieron en cajas sobre una plataforma de vidrio para aclimatarse durante 30 minutos antes de realizar los experimentos. Una fuente de calor automática (50 W, 10 V, con contador de tiempo relacionado con un sensor de luz) se dirige sobre la superficie plantar

de la pata. El tiempo de la latencia de retirada de la pata (PWL, del inglés *Paw withdrawal latency*) se midió por triplicado y el valor medio corresponde al umbral de hiperalgesia térmica (PWL, en segundos). Se ajustó la latencia de retirada de la pata a 9-12 segundos y se estableció un punto de corte de 20 segundos (definido como la analgesia completa) para evitar daños en los tejidos de la pata trasera de los ratones.

d) Caracterización de la hipersensibilidad por presión mecánica

La nocicepción mecánica se evaluó utilizando ensayos de presión en las patas traseras de acuerdo al método de Randall (Randall and Selitto 1957) con algunas modificaciones, utilizando un analgesímetro de presión (IITC Life Sciences). Los ratones se involucraron previamente con un trapo pequeño que dejó libres las patas traseras. Éstas se sometieron a presión de forma gradual y la latencia en la retirada de la pata al sentir la presión se registró de forma automática. La presión de corte se estableció en 250 mmHg.

e) Caracterización de la hipersensibilidad táctil (alodinia)

La respuesta táctil se evaluó cuantificando el umbral de latencia en la retirada de la pata en respuesta a la estimulación con los filamentos flexibles de von Frey (rango 0.08-3.0 g; IITC Life Science). Antes de realizar los experimentos, los animales se colocaron durante 30 minutos en cajas individuales de Plexiglass con una superficie de malla de acero. Una serie de filamentos de von Frey calibrados se aplicaron perpendicularmente a la superficie plantar de la pata trasera con fuerza suficiente para doblar el filamento durante 4-5 segundos. El intento de retirada de la pata y/o quejido del animal se consideró una respuesta positiva. Se determinó el 50% del umbral de retirada de la pata por el método arriba-debajo de Dixon (Dixon 1980). En ausencia de una respuesta, se utilizó el filamento con el siguiente nivel de fuerza. En el caso de una respuesta positiva, se utilizó un filamento con un nivel de fuerza menor. El ensayo se repitió durante 4-5 veces/ratón en intervalos de 5 minutos. La respuesta umbral se definió como la fuerza necesaria para originar una frecuencia en la respuesta hasta en el 50% de las aplicaciones.

3.5.6 - Modelos de comportamiento relacionados con ansiedad

Para la caracterización del comportamiento asociado a la ansiedad hemos utilizado ensayos no condicionados, que se basan en el conflicto que existe entre el comportamiento exploratorio normal del animal y la tendencia natural a evitar espacios abiertos y luminosos (como respuesta adaptativa para reducir el riesgo de los depredadores). La ansiedad es mayor cuanto mayor es el comportamiento que intenta evitar esos espacios. En general, no se observaron diferencias significativas entre machos y hembras en estas pruebas de comportamiento. Los experimentos fueron ejecutados en condiciones de igual luminosidad y ruido. En cada caso, el aparato utilizado se limpió con una solución de 70% de etanol y se dejó secar entre individuos. Todos los experimentos se realizaron en la fase de luz en un ciclo normal de luz/oscuridad (06.00-18.00 h). Previamente a la realización de los ensayos, los animales pasan un periodo de habituación a la habitación, que consiste en situar al animal 30 minutos en dicha habitación el día anterior y el día del ensayo, justo antes de realizar el mismo.

a) Ensayo de laberinto elevado

Este ensayo se realiza en un laberinto que consta de 2 brazos abiertos ($30 \times 5 \text{ cm}^2$) y 2 brazos cerrados ($30 \times 5 \times 15 \text{ cm}^3$), que se extienden desde una plataforma central ($5 \times 5 \text{ cm}^2$). El laberinto está elevado 38 cm del nivel del suelo. Cada ratón se situó en la zona central hacia uno de los brazos abiertos, y se le dejó que explorara libremente durante 10 minutos. Se consideró que un animal estaba dentro de uno de los brazos cuando superaba la mitad del mismo. Se registraron el número de entradas en los brazos abiertos y el tiempo pasado en los mismos. Para ello todo el proceso se grabó con una cámara digital y se analizó según el software específico (SMART 2.5)

b) Ensayo de campo abierto

Se utiliza una caja de Plexiglass rellena de arena ($40 \times 40 \times 35 \text{ cm}^3$). Los ratones se situaron en el centro de la caja y se dejó que exploraran durante 5 minutos. En el análisis informático la caja es dividida en cuadrantes que ocupan la periferia y los que ocupan el

centro. Se registró el número de cuadrantes cruzados por los ratones en la periferia y en el centro de la caja.

3. 6 - Neuropatología, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

El análisis histopatológico de ratones con EAE se realizó en la médula espinal de los diferentes grupos experimentales, una vez sacrificados los ratones con CO₂. Por una parte, diferentes regiones de la médula espinal (cervical, torácica y lumbar) se aislaron cuidadosamente y se fijaron en paraformaldehído (Sigma) al 4% durante 4-8 horas a 4°C. Más tarde el tejido fue equilibrado en sacarosa al 30% y tras extensivos lavados en PBS finalmente fue incluido en una resina (O.C.T.: *optimal cutting temperature* de Tissue Tek), sumergido rápidamente en nieve carbónica y almacenado a -80°C hasta su procesamiento. Tras el equilibrado a -20°C se realizaron los criocortes en secciones de 10µm en un criostato Leica CM 1850 UV. Los cortes se almacenaron a -80°C hasta su utilización. La detección de diferentes antígenos con técnicas de inmunofluorescencia se realizó en estos cortes. Por otra parte, las regiones cervicales y lumbares de la médula espinal fueron fijadas en formalina tamponada 10% (Formaldehído 3.7% disuelto en PBS), deshidratadas e incluidas finalmente en parafina. Tras el corte con microtomo se realizaron tinciones de las distintas secciones con hematoxilina y eosina o Luxol fast blue (Kluver Barrera) para analizar infiltración y desmielinización, respectivamente. También se caracterizó mediante inmunohistoquímica en estas muestras la proteína básica de mielina (MBP). Las alteraciones neuropatológicas se cuantificaron en función del número de placas desmielinizantes en al menos 23 secciones de diferentes animales de la región proximal (cervical) y distal (sacra) de la médula espinal. Se determinó el número de ratones con placas y el número de placas/ratón.

3.6.1 - Tinción con Hematoxilina y Eosina

Esta tinción se realizó en las secciones de parafina. La hematoxilina tiñe el núcleo celular y la eosina el citoplasma. De manera resumida, se desparafinaron las muestras, con posterior hidratación de los cortes mediante baños sucesivos en alcoholes de concentración decreciente (alcohol absoluto, alcohol de 96° y alcohol de 80°). Se realizaron dos lavados en agua destilada durante 10 minutos y se incubaron las muestras en hematoxilina de Harris por

5 minutos a temperatura ambiente, seguido por dos lavados con agua. A continuación, se incubaron las muestras con eosina alcohólica durante 5 minutos y se procedió a la realización dos lavados con agua. Después del último lavado con agua, se deshidrataron por pasos sucesivos en alcohol de graduación creciente, y se procedió al montaje con medio de montaje permanente (EUKITT® - Sigma).

3.6.2 - Técnica de Kluver-barrera

Con esta técnica se define la presencia de mielina (sustancia blanca) con el azul luxol, y los núcleos celulares de neuronas y células gliales con el violeta de cresilo (Kluver and Barrera 1953). Para la realización de la tinción, se desparafinaron e hidrataron los cortes de parafina con alcohol 95%. Posteriormente, se incubaron las muestras en solución rápida de azul de luxol a 56°C durante toda la noche. Seguidamente, se eliminó el exceso del colorante mediante un lavado rápido en alcohol 95% seguido de un lavado con agua destilada. Para que se produzca la diferenciación, se incubó con solución de carbonato de litio 0.05% durante 30 segundos. Se continuó la diferenciación en el alcohol 70%, hasta que la materia gris y la materia blanca estuviesen bien definidas. Se enjuagó en agua destilada y se incubó durante 6 minutos en solución de acetato de violeta de cresilo 0.1% y 5 minutos en hematoxilina. El exceso de colorante se eliminó mediante un lavado rápido en agua corriente. Se enjuagó con alcohol al 95% y se prosiguió con la deshidratación mediante dos cambios de alcohol etílico absoluto y xileno durante 2 minutos. Después del lavado con agua, se deshidrató mediante pasos sucesivos en alcohol de graduación creciente, y se procedió al montaje con medio de montaje permanente (EUKITT).

3.6.3 - Inmunohistoquímica para la detección de MBP

El proceso de detección de MBP se realizó de forma automatizada con un inmunoteñidor (Lab Vision autostainer 360, Termo Scientific). Se hicieron cortes del tejido embebido en parafina de 3 µm de espesor que fueron colocados sobre el porta-objetos. Se dejaron secar en la estufa a 60°C, al menos durante 3-4 horas. Posteriormente se realizó el desparafinado y la recuperación antigénica simultáneamente mediante el sistema Termo Scientific introduciendo los portas en el módulo PT (Lab Visin) en Buffer EDTA a pH 8.0 durante 20 minutos a 95°C. La inmunotinción se realizó utilizando anticuerpos primarios

prediluidos (Master Diagnostica) anti-MBP con un tiempo de incubación de 10 minutos, que, posteriormente, se incubaron con el amplificador de anticuerpo primario (Ultravision Quanto) durante 10 minutos, y se aclaró con tampón salino. En seguida se aplicó el micropolímero conjugado a la peroxidasa, y se incubó durante 10 minutos. A continuación, se procedió al revelado de la tinción mediante la incubación con una solución de sustrato/cromógeno (diaminobencidina) durante 5 minutos. Las preparaciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Harris durante 2 minutos y lavadas con agua destilada. Después del lavado con agua, se deshidrató mediante pasos sucesivos en alcohol de graduación creciente, y se procedió el montaje con medio de montaje permanente (EUKITT). Las imágenes en campo visible fueron registradas utilizando un microscopio Zeiss AXI0 y una cámara AxioCam ICc1.

3.6.4 - Inmunofluorescencias

La inmunodetección de anticuerpos específicos se llevó a cabo en cortes seriados del tejido previamente fijado e incluido en OCT, tras ser obtenidos con el criostato y dispuestos en portaobjetos especiales preparados para fijar criomuestras. Estas muestras se descongelaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se fijaron de nuevo con paraformaldeído al 2% (Sigma) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, se lavaron las muestras dos veces con PBS (cada lavado implica una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente con PBS, retirando el exceso de solución por inversión). A continuación, las muestras se permeabilizaron con Triton 0.2% disuelto en una solución de PBS con SBF al 1%, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras eliminar la solución de permeabilización, las muestras se lavaron una vez y se bloquearon las uniones inespecíficas incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente con Triton 0.1% disuelto en una solución de PBS con SBF al 10%. A continuación, tras eliminar el exceso de la solución de bloqueo, se añadieron los anticuerpos primarios a sus respectivas concentraciones (ver tabla de Anticuerpos para inmunofluorescencia). Los portaobjetos se cubrieron con plástico (tipo *parafilm*) directamente en contacto con las muestras para evitar que el anticuerpo se secase durante la incubación de 18 horas a 4°C en cámara húmeda. Tras continuos lavados, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos específicos (ver tabla de Anticuerpos para inmunofluorescencia), y se lavaron tres veces. Los núcleos se

tiñeron con una solución de Hoechst (dilución 1:1000 del compuesto disuelto en agua a 1mM; Molecular Probes) y se cubrieron las muestras con el medio de montaje adecuado (ProLong, Molecular Probes) para evitar la pérdida de fluorescencia hasta su observación. Las imágenes se han obtenido utilizando el microscopio Olympus IX81 con la cámara DP72 y el programa AxioVert (Olympus).

La inmunodetección de antígenos utilizando anticuerpos conjugados a fluoróforos se ha utilizado también en muestras derivadas de cultivos celulares, previa fijación de los mismos al 4% en PBS. A partir de la fijación, el protocolo continúa los mismos pasos descritos anteriormente.

Anticuepos conjugados a fluoroforos	Casa comercial	Catalogo	Concentración Stock	Concentración de uso
Anti-CD4-FITC	BD biosciensce	557807	0.5 mg/ml	2.5 µg/ml
Anti-CD45-PE	BD biosciensce	553081	0.2 mg/ml	1 µg/ml
Anti-Iba1	Wako	19-19741	0.5 mg/ml	1 µg/ml
Alexa Fluor 546	Invitrogen	A10040	2mg/ml	2 µg/ml

3.7 - Obtención de órganos y aislamiento de células

3.7.1 - Procesamiento de órganos linfoides

En diferentes momentos después de la inmunización con MOG según el grupo experimental, se aislaron el bazo y los ganglios linfáticos drenantes (cervicales, axilares, inguinales), y se homogeneizaron de forma mecánica en RPMI completo utilizando portaobjetos esmerilados. Las células obtenidas se centrifugaron a 300g durante 5 minutos. Las células procedentes del bazo se resuspendieron en tampón de lisis de eritrocitos ACK, y se incubaron durante 5-7 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se adicionó medio completo para inactivar el efecto del tampón, y se centrifugaron de nuevo las células. Tanto los esplenocitos como los linfocitos de los ganglios se resuspendieron finalmente en RPMI completo, y se contabilizaron las células viables por tinción con el colorante azul de Trypan

(Sigma), empleando una cámara de Neubauer (Brand). Las células se distribuyeron a una concentración de 10^6 células/ml, hasta que fueron estimuladas (ver apartado correspondiente).

3.7.2 - Obtención de macrófagos peritoneales y de la suspensión peritoneal

Tras sacrificar los ratones por inhalación con CO₂, se inyectaron con 2 ml de DMEM completo en la cavidad peritoneal, y se masajearon en la región abdominal durante 2 minutos. A continuación, se realizó una pequeña incisión suficiente para introducir una pipeta de 1 ml y obtener el fluido peritoneal, realizando varios lavados con medio. La suspensión recogida se centrifugó a 400g durante 10 minutos a 4°C, obteniéndose la población de células por un lado y por otro, el sobrenadante (fluido peritoneal) que se almacenó a -20°C para posterior determinación de citoquinas en los casos así indicados. Las células se resuspendieron en medio DMEM, y se distribuyeron a una proporción de 10^6 células/ml. Después de 2h, se realizó un lavado para eliminar las células no adherentes. En los casos indicados se estimularon con LPS (1µg/ml) y se incubaron en ausencia/presencia del neuropéptido a 10^{-7} M, durante 24-48 horas recogiendo los sobrenadantes en el tiempo indicado, que se guardaron a -20°C hasta su análisis.

3.7.3 - Obtención de extractos proteicos

Para la determinación de citoquinas en tejidos (médula, cerebro), se obtuvieron extractos proteicos de estas muestras mediante la homogenización mecánica de las mismas en tampón de lisis de órganos (50 mg de tejido/ml) en presencia de inhibidores de proteasas (1:500, Sigma), incluyendo fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF), pepstatina, y leupeptina. Tras la homogenización, se centrifugaron las muestras a 14.000g durante 20 minutos a 4°C, y se guardaron los sobrenadantes a -80°C hasta su utilización para la determinación de citoquinas por ELISA.

3.7.4 - Obtención de células gliales

Los cultivos de células gliales se realizaron a partir del cultivo de cerebros de neonatos (P1-P3) de ratones C57BL/6 y ratones CD1, obteniendo desde el mismo cultivo las diferentes poblaciones: microglía, astrocitos, y oligodendrocitos (Mecha M , Iñigo PM et al. 2011). Para esto se aislaran los cerebros de los neonatos, eliminando el cerebelo y el bulbo olfatorio, y

retirando las meninges utilizando pinzas y una lupa Stemi DV4 (Zeiss). La disgregación mecánica de los cerebros se llevó a cabo con una aguja de calibre 23 (23G) acoplada a una jeringa de 1 ml previamente lavada con suero de caballo (Gibco), para disminuir la adherencia de las células gliales al plástico/cristal. Normalmente, se homogeneizaron simultáneamente 5 cerebros en un volumen de 400 μ l de DMEM 10:10:1, completando a un volumen final de 10 ml tras obtener una solución homogénea. Las muestras se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se resuspendieron los cerebros en DMEM 10:10:1 a una proporción de 10 ml de medio/cada dos cerebros y se distribuyeron dos cerebros por frasco de cultivo (BD Falcon) de 75 cm^2 con filtro previamente tapizados con 5 $\mu\text{g/ml}$ de Poli-D-Lysine hydrobromide (PDL, Sigma) durante 15 minutos a 37°C, y lavados con agua MilliQ esteril. El cultivo se mantuvo a 37°C con 5% de CO₂, durante 10-14 días, sin cambio del medio.

3.7.5 -Recolección y cultivo de la microglía no adherente:

Tras los 10-14 días de cultivo de extracto de cerebro de neonatos, se agitaron los frascos durante 3 horas a 230 rpm para levantar la microglía. Tras el periodo de agitación, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en DMEM 10:10:1, se contabilizaron y se distribuyeron en pocillos previamente tapizados con 5 $\mu\text{g/ml}$ de PDL a una concentración de 200.000 células/ml. La pureza del cultivo se determinó mediante tinción con anti-Iba1 como anticuerpo primario y el correspondiente secundario conjugado a un fluoróforo. Dicha pureza fue >95%. Tras 24h, los cultivos se estimularon en DMEM/2% SBF con LPS 0.1 $\mu\text{g/ml}$ o LPS/IFN (0.1 $\mu\text{g/ml}$ /500 Ud/ml), en presencia/ausencia de CST 10⁻⁷M durante 24-48 horas. El sobrenadante se recogió y se almacenó a -20°C hasta la detección de citoquinas por ELISA.

a) Recolección y cultivo de progenitores de oligodendrocitos (OPCs):

Para la obtención de los progenitores de oligodendrocitos se utilizaron las células restantes del mismo frasco de cultivo del que se recuperó la microglía. Tras añadir 10 ml de DMEM 10:10:1 fresco, los frascos se volvieron a agitar a 260rpm por aproximadamente 18 horas a 37°C. De esta manera, se separaron los OPCs y la microglia restante de la monocapa de astrocitos. Tras la agitación, se recogió el sobrenadante y se filtró en malla estéril de 0.30 μm distribuyendo las células directamente en una placa de Petri de 10cm. Las placas se

incubaron aproximadamente 1 hora a 37°C y 5% de CO₂, para eliminar la microglía restante por su elevada adhesión al plástico en comparación con los OPCs. A continuación, se recuperó el sobrenadante (donde se encontraban los OPCs) y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se distribuyeron en medio DMEM 10:10:1, en placas previamente tratadas durante 18h con PDL, y se incubaron durante 3 horas a 37°C en 5% de CO₂, tras lo cual el medio se sustituyó por DMEM F12-FC. La composición de estos cultivos al cabo de 3 días fue de aproximadamente 85% de OPCs, 13% astrocitos, 2% microglía. La presencia de OPCs se determinó utilizando el anticuerpo anti-Olig2.

b) Cultivo de oligodendrocitos maduros:

A los 3 días de cultivo de OPCs, se añadió la hormona T3 a la concentración de 30 nM para que tenga lugar la diferenciación de los oligodendrocitos durante 3-5 días. La presencia de oligodendrocitos maduros se determinó utilizando el anticuerpo anti-MBP.

La estimulación tanto en OPCs como en oligodendrocitos maduros, se realizó con los diferentes estímulos/tratamiento con LPS 1 µg/ml, o LPS/IFN (1 µg/ml/100 Ud/ml), o con H₂O₂ 400 µM, en presencia/ausencia de CST 10⁻⁷M. Tras 24-48 horas de incubación se realizó un ensayo de viabilidad (MTT), que se describe a continuación.

c) Recolección y cultivo de los astrocitos:

Tras la recolección de los OPCs, las células que quedan adheridas en los frascos son principalmente astrocitos y células precursoras gliales. Estos cultivos son tratados con Cytosine β-D-arabinofuranoside 12 µM (ARA-C, Sigma) durante tres días para impedir la proliferación celular y mantener el cultivo de astrocitos lo más puro posible. Transcurrido este tiempo, los astrocitos son despegados por incubación con 2 ml de Tryple (Gibco) durante 7 minutos. Las células recuperadas se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en DMEM completo a una concentración de 100.000 células/ml. Tras 48 horas de adhesión y formación de una monocapa (con una pureza de más del 99%, determinada por inmunofluorescencia indirecta utilizando como anticuerpo primario anti-GFAP), los astrocitos se estimularon en DMEM/2% SBF con LPS 0.1 µg/ml o

LPS/IFN (0.1 µg/ml/500 Ud/ml), en presencia/ausencia de CST 10^{-7} M durante 24-48 horas. El sobrenadante se recogió y se almacenó a -20°C hasta la detección de citoquinas por ELISA.

3.7.6 - Aislamiento de diferentes poblaciones de células T

El aislamiento de las poblaciones CD4+, CD4+CD25+, y CD4+CD25-, se ha realizado a partir de las células de los ganglios linfáticos drenantes y de bazo de ratones con EAE tratados con cortistatina y ghrelina, y ratones no tratados. Para ello, se utilizaron las columnas magnéticas de Miltenyi Biotech, siguiendo el protocolo de la casa comercial para el aislamiento de células T reguladoras CD4+CD25+. En resumen, el protocolo consiste en aislar primero las células CD4+ totales eliminando las células que no son CD4+ al ser incubadas con un conjunto de anticuerpos específicos conjugados a biotina y, a continuación con bolas magnéticas conjugadas a anticuerpos que reconocen la biotina. En paralelo, las células se marcan con CD25 conjugado al fluoróforo ficoeritrina (PE). La suspensión celular marcada de esta forma se somete a separación magnética, de forma que las células T no CD4+ son retenidas en la columna y las no marcadas (células T CD4+) son eluidas. Este eluido se incubó a continuación con bolas magnéticas que reconocen la PE, de forma que, al pasar por la columna de separación, quedan retenidas las células CD4+CD25+, y se eluyen las células CD4+CD25-. Las células CD4+CD25+ se someten a un nuevo paso de purificación y se eluyen finalmente para ser utilizadas. En concreto, después del procesamiento de los órganos linfoides, las células se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos a 4°C y se resuspendieron en 40 µl de tampón base (PBS pH 7.2 suplementado con 0.5% de albúmina de suero bovina (BSA) y EDTA 2 mM) por cada 10^7 células. Se añadieron 10 µl de la mezcla de anticuerpos biotinilados CD8a (Ly-2), CD11b (Mac-1), CD45R (B220), CD49b (DX5) y Ter-119, para eliminar las células no CD4+, y se incubó durante 10 minutos en hielo. Se añadieron 30 µl del tampón base, 20 µl de las microesferas acopladas a anticuerpo anti-biotina y 10 µl de anticuerpo anti-CD25-PE, y se incubaron las muestras durante 15 minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de tampón base (cada lavado significa dos centrifugaciones de 300 x g durante 10 minutos), y se resuspendieron las células en 500 µl de tampón base, seguido de la separación en columna magnética LD (capacidad: 10^8 células marcadas magnéticamente de un total de 5×10^8 células). Las columnas LD se acoplaron en un separador magnético (Miltenyi Biotech) y se equilibraron con 2 ml de tampón base. Se aplicó

la suspensión celular en la columna, y, tras dos lavados con tampón base, se recogieron las células eluidas (células T CD4+). Las células CD4+ aisladas se centrifugaron a 300g durante 10 minutos, y se resuspendieron en 90 µl de tampón base, añadiendo e incubando las muestras con 10 µl de microesferas acopladas con anticuerpo anti-PE durante 15 minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de tampón base, y se resuspendieron en 500 µl de tampón base para realizar la separación en columna magnética MS (capacidad: 10⁷ células marcadas magnéticamente de un total de 2 x 10⁸ células). Las columnas MS se acoplaron al separador magnético y se equilibraron con 0.5 ml de tampón base. Se aplicó la suspensión celular en la columna, recogiendo las células eluidas tras sucesivos lavados con 1.5 ml de tampón padrón. Se recogió todo el efluente, que contiene la fracción de células CD4+ CD25- (empobrecidas de células T CD4+CD25+), que se inyectaron en los ratones como se ha descrito en el apartado correspondiente.

3.7.7 - Colección del líquido sinovial.

Tras el sacrificio de los ratones por inhalación de CO₂, se retiró la piel que cubre la rodilla y el tendón de la rótula fue cuidadosamente disecado para exponer la membrana sinovial. Se insertó una aguja de calibre 30 a través de la membrana, y se lavo dos veces la cavidad sinovial mediante la inyección y inmediata aspiración de 25 µl de solución salina heparinizada (5 U/ml) para obtener el lavado sinovial, lo que generó un total de aproximadamente 50 µl de lavado sinovial. El fluido recogido se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -20 ° C hasta su uso.

3.8 - Análisis de la respuesta de células T autorreactivas

En el pico de máxima manifestación clínica de la EAE (entre 12 y 16 días post-inmunización), de forma estéril, se aislaron los ganglios linfáticos axilares e inguinales y/o bazo y se homogenizaron como se describe en el apartado correspondiente. Tras el procesamiento de los órganos linfoides, se distribuyeron a una concentración de 10⁶ células/ml en placas de 24 pocillos (Nunc) en RPMI completo.

3.8.1 - Estimulación de los cultivos

Para analizar la producción de citoquinas, las células fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂ en RPMI completo en presencia o ausencia de 15µM del antígeno específico (MOG₃₅₋₅₅) durante 24-48 horas (para la determinación de citoquinas) o durante 72-96 horas (para la respuesta proliferativa). Como controles de estimulación antigénica inespecífica, usamos cultivos tratados con anti-CD3 (1 µg/ml) /anti-CD28 (2.5 µg/ml) o con Concanavalina A (ConA, 2.5 µg/ml), en un volumen final de 1 ml. Tras la incubación, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C para posterior análisis de citoquinas por ELISA, o se llevó a cabo el ensayo de proliferación (ver apartado correspondiente).

El análisis de la producción de citoquinas a nivel intracelular, se realizó tras estimular las células durante 18 horas a 37°C con 25 ng/ml de Phorbol 12-myristate 13-acetate, (PMA, Sigma), utilizado para inducir proliferación celular, en combinación con 0.5 µg/ml de ionomicina (Sigma), que es un ionóforo de calcio que colabora con el PMA para estimular la producción de citoquinas intracelulares. En las últimas 6 horas de la incubación, se adicionó 3 µM de monensina (inhibidor del transporte vesicular en el complejo de Golgi). Tras la estimulación, las células se recuperaron y se analizaron las citoquinas intracelulares por citometría de flujo (según el protocolo descrito en el apartado correspondiente).

3.8.2 - Ensayo de proliferación linfocitaria

En este ensayo se utiliza un nucleótido marcado radiactivamente, la timidina que se incorpora a las nuevas cadenas de DNA durante la división celular mitótica. Para medir la radiactividad incorporada al DNA de las células recuperadas, se utiliza un contador de centelleo beta, determinando la división celular que ha ocurrido en respuesta a un agente específico. En nuestro caso, tras el cultivo durante 72-96 horas de las células de los órganos linfoides en presencia/ausencia de los estímulos descritos, las últimas 8 horas de incubación se añadieron 2.5 µCi/ml de timidina tritiada ([³H]--metil-Tdr, Amersham) por pocillo. A continuación, se recuperaron las células a través del uso del harvester (Inotech) y se inmovilizaron con etanol 70% sobre una membrana de vidrio (Wallac). Después de secar la membrana durante 2 minutos en horno de microondas en potencia máxima, se sumergió la membrana en líquido de centelleo y la incorporación [³H]-metil-TdR se cuantificó por el

contador de centelleo de placas Microbeta counter 1450 (Wallac). Los resultados se expresan como índice de proliferación de acuerdo con el número de cuentas radiactivas obtenidas por minuto (c.p.m)

3.8.3 - Caracterización de citoquinas intracelulares y marcadores de superficie mediante citometría de flujo

La citometría de flujo se realizó en células aisladas de ganglios y bazo de ratones con EAE en el momento del sacrificio y recogida de las muestras (Figura 3.1), y en células linfoides estimuladas *in vitro* (como se especifica en el apartado correspondiente). Para la realización de la citometría de flujo, utilizamos 0.5×10^6 células/marcaje distribuidas en tubos de poliestireno de 5ml (BD Falcon). Una vez recogidas de las placas correspondientes, las células se lavaron (a 300 g durante 5 minutos a 4°C) dos veces con 1 ml de tampón de citometría de flujo, eliminando el sobrenadante de cada tubo por inversión. Antes del marcaje específico, las células se incubaron (10 minutos a 4°C) con 25 µl de una mezcla del anticuerpo anti-2.4G2 (Mouse BD Fc Block™) y el compuesto 7-AAD (7-Amino-actinomycin D, Calbiochem) ambos disueltos a una proporción 1:100 en tampón de citometría. El anti-2.4G2 bloquea la unión inespecífica de inmunoglobulinas a los receptores FCyII, FCgIII y probablemente FCgI, y el 7-AAD es un agente fluorescente intercalante de DNA usado para exclusión de células muertas, ya que el compuesto no es permeable a la membrana plasmática de células vivas. Tras esta incubación, se añadieron directamente 50 µl/tubo de una mezcla de anticuerpos conjugados a diferente fluoroforos (Ver tabla de anticuerpos utilizados en citometria) a las concentraciones apropiadas en tampón de citometría, para marcaje de proteínas de superficie o sus respectivos isotipos. Se incubaron las células durante 30 minutos a 4°C (en algunas ocasiones el marcaje se prolongó durante 12 horas). A partir de este punto, durante todas las incubaciones se protegieron las células de la exposición a la luz. A continuación, las células se lavaron dos veces y se permeabilizaron tras la incubación con 0.75 ml de la solución FIX/PERM (BD PharMingen), durante 30 minutos a 4°C. Para eliminar el exceso de esta solución, las células se lavaron con 1ml de solución de lavado /PERM WASH, BD PharMingen) y se realizó la incubación (30 minutos a 4°C) con 50 µl de concentraciones apropiadas de anticuerpos conjugados a diferente fluoroforos para proteínas intracelulares o sus respectivos isotipos, disueltos en solución FIX/PERM. Tras

varios lavados en solución PERM WASH, las células se resuspendieron en 0.5 ml de tampón de citometría. Para la determinación de Foxp3 intracelular el protocolo fue similar pero se utilizaron las soluciones de fijación, permeabilización y lavado de eBioscience específicas para la detección de este factor.

La adquisición y análisis de las muestras se realizó en el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson), utilizando del programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

Anticuerpos conjugados a fluoroforos	Casa comercial	Catalogo	Concentración del Stock	Concentración de Uso
Anti-mouse IgG FOXP-3 – PE	ebioscience	12577380	0.2mg/ml	4 µg/ml
Anti-mouse IgG CD4 - PERCP	BD bioscience	553052	0.2mg/ml	4 µg/ml
Anti-mouse IgG CD25 - FITC	BD bioscience	553071	0.5mg/ml	5 µg/ml
Anti-mouse IgG IFN- γ - FITC	BD bioscience	554411	0.5mg/ml	5 µg/ml
Anti-mouse IgG IL-17 - PE	BD bioscience	554467	0.2mg/ml	4 µg/ml
Anti-mouse IgG IL-4 - APC	BD bioscience	554467	0.2mg/ml	4 µg/ml
Anti-mouse IgG IL-10 - PE	BD bioscience	554467	0.2mg/ml	4 µg/ml
(Isotipo) Rat IgG2a- PE	BD bioscience	553930	0.2mg/ml	4 µg/ml
(Isotipo Hamster) IgG1 - FITC	BD bioscience	553953	0.5mg/ml	5 µg/ml

3.9 - Determinación de proteínas por ELISA (del inglés, Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Los niveles de citoquinas/quimioquinas en extractos proteicos de tejidos, sobrenadantes de cultivos, fluido peritoneal, y líquido sinovial se analizaron mediante ELISA utilizando anticuerpos de captura y de detección conjugados a biotina (BD Pharmingen; Peprotech), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante en cada caso. Se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc. Maxisorb) que se recubrieron durante 18-24 horas a 4°C con 50 µl del anticuerpo purificado (anticuerpo primario o de captura) disuelto en su respectivo tampón de unión con pH específicos (Ver tabla de anticuerpos de captura para ELISA). A continuación, se eliminó el exceso de anticuerpo no unido a la placa lavando las placas dos veces (todos los lavados se realizaron con 350 µl de tampón de lavado) y se bloquearon las uniones inespecíficas con 200 µl de tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras el período de bloqueo, se añadieron 100 µl de las muestras o de las diluciones seriadas de las citoquinas/quimioquinas

recombinantes de concentración conocida (curva patrón) y se incubaron entre 18-24 horas a 4°C. La curva patrón se preparó diluyendo las respectivas proteínas recombinantes en solución de bloqueo en las siguientes concentraciones: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.15, 0.07, 0.03 ng/ml. Como blanco se utilizaron 100 µl de la solución de bloqueo. Tras la incubación, se lavaron las placas cuatro veces para eliminar el exceso de muestras, y se añadieron 100 µl del anticuerpo biotinilado específico de cada muestra disuelto en solución de bloqueo (Ver tabla de anticuerpos biotinilados para ELISA). Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora y en seguida se lavaron seis veces para eliminar los anticuerpos no unidos. Se añadieron 100 µl del conjugado avidina-peroxidasa 2 µg/ml (Sigma) disuelta en solución de bloqueo y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras ocho lavados para eliminar los residuos de avidina-peroxidasa, se añadieron 100 µl de una solución de ABTS 0.1 M (Fluka) junto con H₂O₂ 0.03% (Sigma). Este sustrato cromogénico es oxidado por la peroxidada, dando lugar a un producto de reacción de color verde, que absorbe la luz en el espectro visible, siendo la densidad óptica obtenida proporcional a la cantidad del producto medido (en relación a los valores obtenidos en la curva patrón). La absorbancia se midió a 405 nm y se cuantificó en el espectrofotómetro VersaMax y utilizando el programa SoftMax Pro (Molecular Devices).

Proteínas recombinantes		
Proteína	Casa comercial	Catalogo
IL-2	BD biosciensce	550069
IL-4	BD biosciensce	550067
IL-6	BD biosciensce	554582
IL-10	BD biosciensce	550070
IL-12	BD biosciensce	554592
IL-17	ebiosciensce	14-8171
TNFα	Peprotech	315-01A
IFN	BD biosciensce	554587
TGF-B	Peprotech	100-21
MCP-1	Peprotech	250-10
RANTES	Peprotech	250-07
MIP-1	Peprotech	250-09
MIP-2	Peprotech	250-15
MDC	Peprotech	250-23

Anticuerpos de captura	Casa comercial	Catalogo	Concentración del Stock	Concentración de uso	Tampón de unión
Anti-IL-2	BD bioscience	554424	0.5 mg/ml	2 µg/ml	pH9
Anti-IL-4	BD bioscience	554387	0.2 mg/ml	0,8 µg/ml	pH9
Anti- IL-6	BD bioscience	554400	0.5 mg/ml	2 µg/ml	pH9
Anti-IL-10	ebioscience	14-7101	0.5 mg/ml	2 µg/ml	pH 6
Anti-IL-12	BD bioscience	551219	1 mg/ml	4 µg/ml	pH9
Anti- IL-17	BD bioscience	14-7175	0.5 mg/ml	2 µg/ml	pH 6
Anti-TNFa	BD bioscience	551225	0.5 mg/ml	2 µg/ml	pH 6
Anti- IFN	BD bioscience	551309	0.5 mg/ml	2 µg/ml	pH9
Anti-TGF-b	BD bioscience	555052	0.5 mg/ml	2 µg/ml	pH9
Anti-MCP-1	Peprtech	500-P113	0.5 mg/ml	1 µg/ml	pH 6
Anti-RANTES	Peprtech	500-P118	0.5 mg/ml	1 µg/ml	pH9
Anti-MIP-1a	Peprtech	500-P121	0.5 mg/ml	0,5 µg/ml	PBS
Anti-MIP-2	Peprtech	500-P130	0.5 mg/ml	0,5 µg/ml	pH9
Anti-MDC	Peprtech	500-P176	0.5 mg/ml	1 µg/ml	pH9
Anti-IP-10	Peprtech	500-P129	0,5 mg/ml	1 µg/ml	pH9

Anticuerpos biotinilados	Casa comercial	Catalogo	Concentración del Stock	Concentración de uso
Anti-IL-2	BD bioscience	554426	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti-IL-4	BD bioscience	554390	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti- IL-6	BD bioscience	554402	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti-IL-10	ebioscience	13-7102	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti-IL-12	BD bioscience	554476	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti- IL-17	ebioscience	13-7177	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti-TNF- α	BD bioscience	554415	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti- IFN- γ	BD bioscience	551506	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti-TGF- β	BD bioscience	555053	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti-MCP-1	Peprtech	500-P113 Bt	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti-RANTES	Peprtech	500-P118 Bt	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti-MIP-1 α	Peprtech	500-P121 Bt	0.5 mg/ml	0,5 µg/ml
Anti-MIP-2	Peprtech	500-P130 Bt	0.5 mg/ml	0,5 µg/ml
Anti-MDC	Peprtech	500-P176 Bt	0.5 mg/ml	2 µg/ml
Anti-IP-10	Peprtech	500-P129 Bt	0.5 mg/ml	2 µg/ml

3.10 - Obtención de suero

La obtención del suero se realizó de dos formas:

a) a partir de la sangre periférica de los ratones para medir la modulación de los niveles de inmunoglobulinas tras la inducción y tratamiento de la EAE. Para recuperar la sangre, se anestesió de manera terminal a los ratones por inhalación excesiva de CO₂. Tras abrir el esternón, se realizó la punción cardíaca por inserción de 5-10 mm de una aguja de calibre 22 (22G) acoplada a una jeringa de 1ml en el ventrículo izquierdo. Se obtuvieron entre 0.8-1 ml de sangre por ratón. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente por aproximadamente 3 horas. A continuación, se centrifugaron las muestras a 2000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, y se recogió el suero (fase superior amarilla), almacenándose a -20°C hasta su uso.

b) por decapitación del animal sin anestesia previa, para determinar los niveles de corticosteroides en suero afectando lo mínimo posible el estado de estrés del animal. Inmediatamente que es obtenida, la sangre se mezcló con inhibidores de proteasas (Roche), siguiendo a continuación el protocolo anterior. Las muestras de suero se almacenaron en este caso a -80°C hasta la determinación de corticoides mediante ELISA específico (Immunodiagnosics Systems, UK).

3.11 - Determinación en suero de la producción de inmunoglobulinas

Para determinar la presencia de anticuerpos específicos anti-MOG en el suero de ratones con EAE, extraído en el pico de la enfermedad, utilizamos un ensayo de ELISA. Para llevar a cabo esta técnica, se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano Maxisorb (Nunc), que se tapizaron con 100 µl de MOG35-55 (10 µg/ml) disuelto en tampón de unión pH 9 durante 18-20 horas a 4°C. Posteriormente, los pocillos se lavaron tres veces con 350 µl de tampón de lavado para ELISA y se bloquearon con 100 µl de la solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se añadieron 100 µl de diferentes concentraciones (dilución seriada) del suero obtenido de la punción cardíaca de los distintos grupos de tratamiento y se incubaron 2h a 37°C. Tras lavar cuatro veces, se añadieron durante 1 hora a 37°C 100 µl de anticuerpos anti-IgG1 o anti-IgG2a biotinilados (2.5 µg/ml). Tras la

incubación, se lavaron las placas seis veces para eliminar los anticuerpos no unidos. El resto del procedimiento fue idéntico al descrito para la técnica de ELISA.

3.12 - Análisis de la expresión génica

Utilizando las técnicas de transcripción reversa (RT) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) analizamos la expresión génica de determinados factores en el tejido/población celular de interés, una vez aislado el ARN mensajero (ARNm).

3.12.1 - Aislamiento del ARNm

El aislamiento del ARN se realizó utilizando el reactivo Tripure (Roche), que es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, que mantiene la integridad del ARN a la vez que produce la ruptura de las membranas plasmática y nuclear. Por un lado, el ARN se extrajo del parénquima nervioso (cerebro y medula espinal) de los ratones con EAE, en los tiempos indicados. Para ello, en el momento de sacrificio y recogida de muestras, los órganos se aislaron y se congelaron directamente en N₂ líquido en tubos libres de ARNasas y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de la extracción. Cuando la extracción de ARNm se realizó a partir de células en cultivo, el Tripure se añadió directamente a los pocillos de las placas en los tiempos indicados, una vez retirado el medio de cultivo, y, tras lisado de las células por pase continuo del Tripure por el pocillo, las muestras se guardaron a -80°C hasta su extracción. En el caso de las muestras de tejido, tras descongelarlas, el ARN fue extraído homogenizando el tejido mecánicamente en 1 ml de Tripure utilizando portaobjetos esmerilados. Desde este punto, el protocolo de extracción fue el mismo para tejidos y para cultivos celulares. A las muestras homogenizadas en Tripure se les añadieron 200 µl de cloroformo por cada ml de reactivo (para conseguir la separación del ARN y la precipitación de proteínas). Tras agitar manualmente las muestras vigorosamente e incubarlas 15 minutos a temperatura ambiente, los tubos se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, consiguiéndose así la separación de 3 fases: una fase inferior rojiza (cloroformo y proteínas), una interfase (ADN) y una fase superior acuosa e incolora (ARN), que es la que se recoge. La precipitación del RNA se llevo a cabo añadiendo 500 µl de isopropanol por cada ml de Tripure utilizado. Se incubaron las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se

centrifugaron a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C. El RNA precipitado se lavó una vez con etanol 70% para eliminar los restos de isopropanol, centrifugando a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. El pellet se dejó secar a temperatura ambiente, y el precipitado de ARN se resuspendió en agua libre de nucleasas (Invitrogen). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su cuantificación y uso.

3.12.2 - Cuantificación de ARN

La cuantificación y el grado de pureza de las distintas muestras de ARN se determinaron midiendo la absorbancia de las muestras a 230, 260 y 280 nm en el espectrofotometro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) utilizando capilares de cuarzo. La relación entre las absorbancias 260 y 280 siempre fue mayor de 1.8 indicando que no existía contaminación proteica, y la relación 260 y 230 siempre mayor que 2.0 indicando que no existía contaminación por otros residuos que absorben a 230 como el fenol presente en el reactivo Tripure.

3.12.3 - Transcripción inversa (RT)

La transcripción inversa consiste en la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARNm extraído utilizando una enzima denominada transcriptasa reversa que utiliza el ARN como molde para la síntesis del ADN. Para llevar a cabo esta reacción, se utilizó el Kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), que contiene la enzima transcriptasa reversa M-MuLV que amplifica una secuencia antisentido del RNA (ADNc) empleando para ello pequeños cebadores de seis nucleótidos (Random Hexamer Primers, RHP). Primero, las muestras (1 µg de ARN total en 8 µl de volumen por muestra) se incubaron con 2 µl de ADNasa y tampón durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se paró la reacción utilizando 1 µl de EDTA (10 minutos a 65°C). A continuación se añadió 1 µl de RHP, y la mezcla se desnaturalizó incubándola durante 5 minutos a 65°C tras lo que se añadieron al producto anterior 8 µl de una mezcla formada por: 4 µl de tampón de reacción 5X, 1 µl de inhibidores de ARNsas, 2 µl de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) 10 nM y 1 µl de la enzima transcriptasa reversa M-MuLV, obteniendo un volumen final de reacción de 20 µl. La síntesis del ADNc tuvo lugar incubando la muestra final durante 5 minutos a 25°C, seguida por 60 minutos a 42°C para la actividad enzimática y síntesis del

ADNc, y finalizando con una incubación de 5 minutos a 70°C para la inactivación de la enzima. El producto final de la reacción se diluyó con 80 µl de agua libre de nucleasas y se guardó a -20°C hasta su análisis posterior.

3.12.4 - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta reacción permite la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento específico de DNA, obteniendo como resultado cantidades apropiadas de ese DNA específico a partir de DNA o cDNA. La PCR se llevo a cabo con 2 µl de cada producto cDNA (producto de la RT). Para cada muestra se añadieron 23 µl de una mezcla que contenía 2.5 µl de tampón de la enzima 10x (Biolabs), 1 µM de MgCl₂ 50mM (Biolabs), 0.5 µl dNTPs 20mM (Biolabs), 1 µl de cada cebador específico (2 µl total), 0.125 µl de Taq polimerasa (Biolabs) y 17.85 µl de agua libre de nucleasas. El volumen final de la reacción fue de 25 µl. La PCR se realizó en el termociclador Mastercycler (Eppendorf). En general, las condiciones de los ciclos para la amplificación (consistente en tres etapas) fueron las siguientes: 1) desnaturalización (94°C durante 30 segundos); 2) hibridación de los cebadores a las regiones adecuadas del ADN (temperaturas variables durante 30 segundos); y 3) extensión (72°C durante 30 segundos). El numero de ciclos y la temperatura de hibridación varió de acuerdo con cada par de cebadores (ver tabla de secuencia de cebadores). En todas las reacciones se realizó una incubación previa de 5 minutos a 94°C y una al final de todos los ciclos de 72°C durante 5 minutos. El producto de la PCR se almacenó a 4°C hasta su visualización mediante electroforesis en gel de agarosa.

Genes	Secuencia de los cebadores	Temperatura de anillamiento	número de ciclos
TGF- β	TGC GCT TGC AGA GAT TAA AA AGC CCT GTA TTC CGT CTC CT	60°C	30
MCP-1	AAA AAC CTG GAT CGG AAC CAA CGG GTC AAC TTC ACA TTC AAA G	60°C	30
RANTES	ACA CCA CTC CCT GCT GCT TT GAC TGC AAG ATT GGA GCA CTT G	60°C	30
IFN- γ	TGC TGA TGG GAG GAG ATG TCT TTT CTT TCA GGG ACA GCC TGT T	60°C	35
TNF- α	CGA TCA CCC CGA AGT TCA GTA GGT GCC TAT GTC TCA GCC TCT T	60°C	35
IL-17	GAA GCT CAG TGC CGC CA TTC ATG TGG TGG TCC AGC TTT	60°C	35
IL-12	CAT CGA TGA GCT GAT GCA GT CAG ATA GCC CAT CAC CCT GT	60°C	35
IL-4	AGC TAG TTG TCA TCC TGC TC AGT GAT GTG GAC TTG GAC TC	57°C	35
IL-10	CCA AGC CTT ATC GGA AAT GA TTT TCA CAG GGG AGA AAT CG	58°C	35
BDNF	CCC TCC CCC TTT TAA CTG AA GCC TTC ATG CAA CCG AAG TA	58°C	30
ADNP	AGA AAA GCC CGG AAA ACT GT AAG CAC TGC AGC AAA AAG GT	50°C	30
SST- 1	GCA AGA CGA CGC CAC CGT GA CCG GCC TCA AAG CGT GCT GA	60°C	35
SST - 2	CAG CTG TAC CAT CAA CTG GC ATT TGT CCT GCT TAC TGT CG	60°C	35
SST- 3	GCT GGC TGT GCT CTG GTG GT GCA GCC AAC CAG CCC TAA CCT TAC	60°C	35
SST - 4	CAG GGA CAG CGG GCA TGG TC AAG CAC RGC GCG ACA CAG CA	60°C	35
SST-5	TGG GGT GCA GCC TTC ATC ACT TAC TGG CCG CCC ACT CTT GTC TG	60°C	35
GHSR	CAC CAA CCT CTA CCT ATC AGC ATC TTC ACT GTC TG	52°C	38
Actin	TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA	58°C	23
CST	CCG AGG CAC AGG AGG CAA G GCT GGA GCT GGC TTG GGA AG	53°C	38

3.12.5 - Electroforesis en geles de agarosa

La observación y análisis del producto de la PCR se realizó tras la separación de los fragmentos en geles de agarosa. En general, se utilizaron geles de agarosa al 2% en tampón TAE en cubeta horizontal. La visualización de los patrones de bandas de las muestras y del marcador de peso moléculas (100pb, Invitrogen) se realizó mediante la adición de 0.5 µg/ml de bromuro de etidio antes de la solidificación de la agarosa. Las condiciones de electroforesis fueron de 100 Volts durante 20 minutos. La exposición y documentación se llevo a cabo mediante un transiluminador de luz ultravioleta (Biorad) y la cuantificación de la expresión relativa mediante el uso del programa QuantityOne (Biorad).

3.13 - Ensayo de MTT

La viabilidad de los cultivos celulares con diferentes estímulos en presencia/ausencia de cortistatina se determinó utilizando el sustrato cromogénico MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolico). Para realizar este ensayo, en los tiempos indicados se añadieron a los cultivos una dilución 1:10 de una solución de MTT a 5 mg/ml (disuelto en PBS). Durante la incubación de 4 horas a 37°C, el MTT es captado por las células y reducido por la enzima mitocondrial succinato- deshidrogenasa en cristales de formazan, un compuesto de color azul que se queda retenido en las células. Tras la incubación con el MTT, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se añadieron 100 µl de DMSO, para la solubilización del formazan. La placa se incubó durante 1 hora a 37°C, y se hizo una lectura a 570 nm en el espectrofotómetro.

3.14 - Ensayo colorimétrico para determinación de óxido nítrico (ON)

Los niveles de ON en los sobrenadantes de los diferentes cultivos se estimaron a partir de la acumulación del metabolito estable nitrito mediante un ensayo basado en la reacción de Griess (Current Protocols in Neuroscience (1998) 7.13.1-7.13.22, Philos.Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 154:667-731.). Para este ensayo se prepararon en primer lugar las siguientes soluciones:

- a) 1% sulfanilamide (Sigma) en 5% ácido fosfórico

b) 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride (Sigma).

Para la curva patrón se utilizaron diferentes concentraciones de nitrito de sodio (NaNO_2 , de 0-60 μM). El ensayo se realizó mezclando 90 μl de sobrenadante o de curva patrón con 90 μl de una mezcla de solución a + b (1:1, v/v). Se incubó la placa a temperatura ambiente (hasta un máximo de 30 minutos), y se hizo la lectura en espectrofotómetro a 540 nm.

3.15 - Determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO)

La infiltración de neutrófilos en la pata inflamada y en el fluido sinovial de la rodilla se determinó en base a la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO). El líquido sinovial (25 $\mu\text{l}/0.5\text{ ml}$) y el extracto de las patas (50mg/ml) se homogenizaron en una solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0.5 % (p/v) en tampón fosfato salino (50 mM, pH=6). El bromuro de hexadeciltrimetilamonio actúa como detergente, lo cual facilita la liberación de la enzima MPO de los gránulos de los neutrófilos, donde se encuentra almacenada. A continuación se sometió a un triple proceso de congelación-descongelación, y las muestras se centrifugaron a 30.000 g durante 20 minutos. A continuación, se recuperó el sobrenadante y éste se diluyó 1:30 con tampón fosfato salino (50 mM, pH=6) conteniendo clorhidrato de o-dianisidina (Sigma, 0.167 mg/ml) y peróxido de hidrógeno al 0.0005 % (p/v). La reacción colorimétrica (entre 1 y 3 minutos) se determinó a 450 nm en un espectrofotómetro. La actividad MPO por gramo de tejido se calculó como: actividad MPO (U/ml) = $(A_{450})(13.5)/\text{ml}$ líquido sinovial, o actividad MPO (U/g tejido) = $(A_{450})(13.5)/\text{peso del tejido (g)}$, donde A_{450} es el incremento de la absorbancia a 450nm después del inicio de la reacción. El coeficiente de 13.5 se determinó empíricamente de forma que una unidad de actividad MPO (U) se define como la cantidad necesaria de la enzima para degradar 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de peróxido de hidrógeno.

3.16 - Análisis estadístico

Los resultados se han expresado como los valores de la media \pm error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó aplicando el test ANOVA de una vía para comparaciones entre varios grupos y el test *t* Student para dos grupos. Un valor de $p < 0.05$

refleja que las diferencias obtenidas son estadísticamente significativas. El análisis estadístico ha sido llevado a cabo de forma informatizada con la versión 10.0 del programa Sigma-Plot.

4 – RESULTADOS

4.1 - El tratamiento con CST reduce la incidencia y severidad de la EAE

El efecto terapéutico de la CST se determinó mediante la utilización de dos modelos de EAE que reflejan las características clínicas de la EM: EAE crónica y EAE remisión-recaída (RR-EAE). La EAE crónica (que refleja lo que ocurre en el 20% de los pacientes), se indujo mediante la inyección del péptido MOG₃₅₋₅₅ en ratones de la cepa C57BL/6. Para evaluar los efectos de CST, se trataron los ratones con este neuropéptido durante diferentes fases de desarrollo de la EAE. En primer lugar, se realizó la administración de CST de forma preventiva, durante 4 días antes de inmunizar los ratones y durante 5 días después de la inmunización con MOG. El pretratamiento con CST resultó en un retraso en la aparición del inicio de los signos clínicos junto con una inhibición en el desarrollo de la EAE y una disminución significativa de la severidad de la enfermedad en comparación con el grupo control (tratados con PBS) (Figura 4.1A). La protección alcanzada por la administración temprana de CST nos llevó a evaluar el efecto de dicha administración en la fase activa de la enfermedad. Para ello, se administró CST durante los primeros síntomas de la enfermedad (grado clínico 0.5), lo que bloqueó su progresión (Figura 4.1B). Tomando como referencia el día 36 post-inmunización, observamos que en el grupo control el 32% de los ratones desarrollaron una enfermedad moderada (grados clínicos entre 0.5 y 3) y un 63% desarrollaron EAE severa (grados clínicos entre 4 y 6) sin recuperación de los signos clínicos durante los 30-40 días de seguimiento. En contraste, en el grupo tratado con CST, un 50% de los ratones resultaron asintomáticos y un 39% de los ratones tratados con CST presentaron síntomas leves o moderados de la enfermedad (Tabla 4.1A). Además, pudimos observar una recuperación de los síntomas en los ratones tratados con CST, que no se detectó en el grupo control.

El potente efecto terapéutico de CST alcanzado tras la administración de este péptido antes y durante la fase inicial de la enfermedad activa, nos llevó a evaluar sus posibles efectos sobre la enfermedad en estadios más avanzados. Para ello, retrasamos el tratamiento con CST hasta que los ratones presentaron una pérdida completa de la tonicidad en la cola y flojedad en las extremidades traseras (grado clínico 2). De la misma manera que cuando el tratamiento

se administró en la fase inicial, el tratamiento con CST inhibió de manera significativa la progresión de la enfermedad, mientras que el grupo control prosiguió el curso normal del desarrollo de la enfermedad hacia estadios más severos (Figura 4.1C).

En la mayoría de los pacientes, la EM presenta un curso de remisión-recaída de la enfermedad. Para determinar el efecto de CST en un modelo de RR-EAE empleamos ratones susceptibles (SJL/J) inmunizados con el péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁. En este modelo, en el que el tratamiento con CST se realizó durante el primer brote de la RR-EAE, observamos una reducción significativa de la incidencia y severidad de los brotes subsecuentes (Figura 4.1D). En el día 50 post-inmunización en el modelo de RR-EAE, un 50% de los ratones control desarrollaron una enfermedad severa y el otro 50% presentó síntomas de EAE moderada, mientras solamente un 37.5% de los ratones tratados con CST presentó señales leves de la enfermedad y el resto no presentó síntomas. (Tabla 4.1B).

Estos resultados indican que CST es un potente agente terapéutico en la EAE, en sus dos manifestaciones clínicas principales. La mayor eficiencia se obtuvo cuando la administración se realizó en estadios tempranos de la enfermedad. Sin embargo, CST también presentó un efecto terapéutico cuando se administró durante manifestaciones clínicas más severas. Además, su efecto protector se mantuvo en el tiempo, no observándose progresión de la enfermedad durante 40 días después de la administración del neuropéptido.

Tabla 4.1 – Efecto terapéutico de CST en EAE.

A	Incidencia*(%)				Mortalidad	CDI [§]
	EAE crónica	Severa	Moderata	Leve		
Control	12/19 (63)	5/19 (27)	1/19 (5)	1/19 (5)	12/19 (63)	97.89 ± 11.25
CST	2/18 (11)	3/18 (17)	4/18 (22)	9/18 (50)	0/18 (0)	34 ± 6.08
B	Incidencia*(%)				Mortalidad	CDI [§]
	RR-EAE	Severa	Moderata	Leve		
Control	4/8 (50)	4/8 (50)	0/8 (0)	0/8 (0)	1/8 (12.5)	38.43 ± 8.40
CST	0/8 (0)	0/8 (0)	3/8 (37.5)	5/8 (62.5)	0/8 (0)	20.5 ± 6.56

Ratones C57BL /6 con EAE crónica o ratones SJL /J con RR-EAE se trataron por vía intraperitoneal con PBS (control) o con 1 nmol de CST durante 5 días consecutivos a partir de los primeros síntomas de la enfermedad * La incidencia de la enfermedad se califica como Severa (puntuación clínica: de 4 a 6), Moderada (puntuación clínica: > 2-3), Leve (puntuación clínica: > 0,5 a 2) o sin síntomas. CDI § es la media de la suma de los grados diarios de la enfermedad

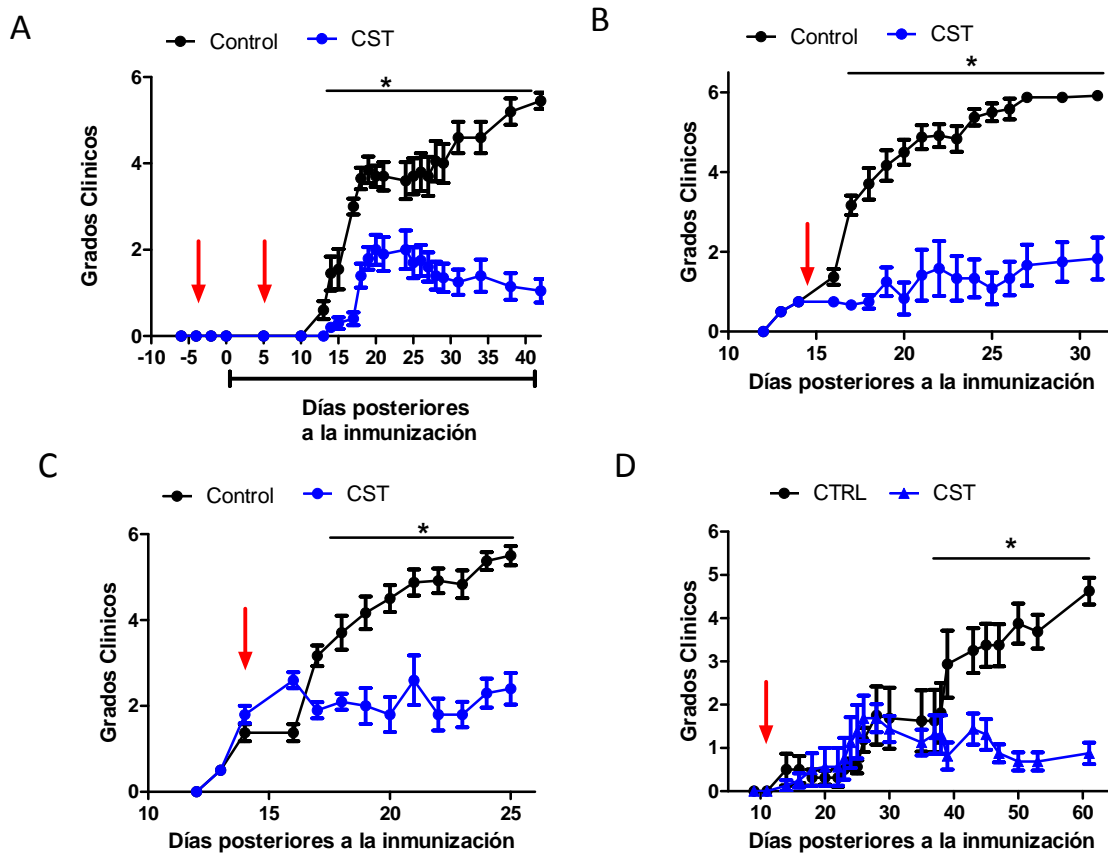


Fig. 4.1 – Efecto terapéutico de CST en EAE. La EAE crónica se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6 (A-C), y la RR-EAE se indujo en ratones SJL / J mediante la inmunización con PLP₁₃₉₋₁₅₁ (D). Los ratones se trataron por vía i.p. con PBS (control) o CST (1nmol/día) durante 4 días antes de la inmunización con MOG, y 5 días consecutivos a partir de la inmunización (A); 5 días consecutivos en ratones inmunizados con MOG después de los primeros signos clínicos (B); o 5 días consecutivos en la fase aguda de EAE crónica (C). En el modelo de RR-EAE el tratamiento con CST (1 nmol/día) durante 5 días consecutivos se inició el día 10 post-inmunización (D). Los signos clínicos de la enfermedad se evaluaron como se describe en Materiales y Métodos. Las flechas rojas indican el inicio del tratamiento con CST. * $p < 0.05$ en comparación con ratones controles. Los valores representan la media del grado clínico de cada grupo \pm S.E.M, $n = 18-19$ ratones por grupo de EAE crónica y $n = 8$ ratones por grupo en RR-EAE.

4.2 - El tratamiento con CST reduce la infiltración y la desmielinización en el SNC de ratones con EAE

Para investigar los mecanismos por los cuales CST ejerce su efecto terapéutico en EAE, analizamos características histopatológicas del SNC afectadas por esta enfermedad. La EM y EAE se caracterizan desde un punto de vista neuropatológico por la presencia de múltiples placas de desmielinización y la presencia de infiltrados inflamatorios. La tinción rápida con azul de Luxol por el método de Kluver- Barrera reveló extensas regiones desmielinizantes a lo largo de la médula espinal de ratones controles. En los ratones tratados con CST, el grado de desmielinización se redujo notablemente y la sustancia blanca presentaba una apariencia normal, similar a la de ratones sanos no inmunizados (*naïve*) (Figura 4.2A). A continuación, también se evaluó el grado de pérdida de mielina mediante la medida de la expresión de MBP por inmunohistoquímica específica para esta proteína. En ratones control con EAE, se pudo observar la presencia de un número elevado de placas desmielinizantes mientras que en los ratones tratados con CST, estas resultaron prácticamente ausentes (Figura 4.2B). De hecho, la evaluación cuantitativa de placas desmielinizantes, demostró que todos los ratones controles analizados (5 por grupo) presentaron un número elevado de placas desmielinizantes. En el grupo de ratones tratados con CST solamente se detectó una placa desmielinizante en un ratón (Figura 4.2C y D). De acuerdo con los resultados clínicos, el análisis histopatológico demostró que el tratamiento con CST resultó en una reducción significativa de la desmielinización en el SNC.

El método de Kluver-Barrera, además de permitir la observación de la desmielinización, también permite la observación del infiltrado celular, debido a su combinación con la tinción de hematoxilina. Como se observa en la figura, los ratones con EAE presentaron un infiltrado inflamatorio intenso en la sustancia blanca de la médula espinal, mientras que en los tratados con CST se observó una reducción drástica del infiltrado inflamatorio (detalle en la Figura 4.2A). Además de este método, la naturaleza del infiltrado inflamatorio se analizó mediante inmunofluorescencia. La evaluación del infiltrado del SNC reveló la presencia de células inflamatorias de origen hematopoyético (CD45+) en la medula espinal de ratones con EAE (Figura 4.3A), con un alto porcentaje de linfocitos T CD4+ (Figura 4.3B). La administración de CST disminuyó significativamente la infiltración de células CD45+ y CD4+ en el SNC en

ratones con EAE. Además, en los ratones tratados con CST se observó una reducción significativa de células Iba1+, un marcador de macrófagos y microglia activados (Figura 4.3C).

El análisis histopatológico confirmó que los efectos beneficiosos del tratamiento con CST fueron atribuibles a una reducción significativa de la infiltración celular y activación de macrófagos/microglía con una consecuente reducción del número de placas desmielinizantes en el SNC. Estos resultados sugieren que la terapia con CST previene la entrada o la retención de las células inflamatorias autorreactivas en el SNC. Asimismo, el tratamiento con CST parece modular la activación de la microglia residente.

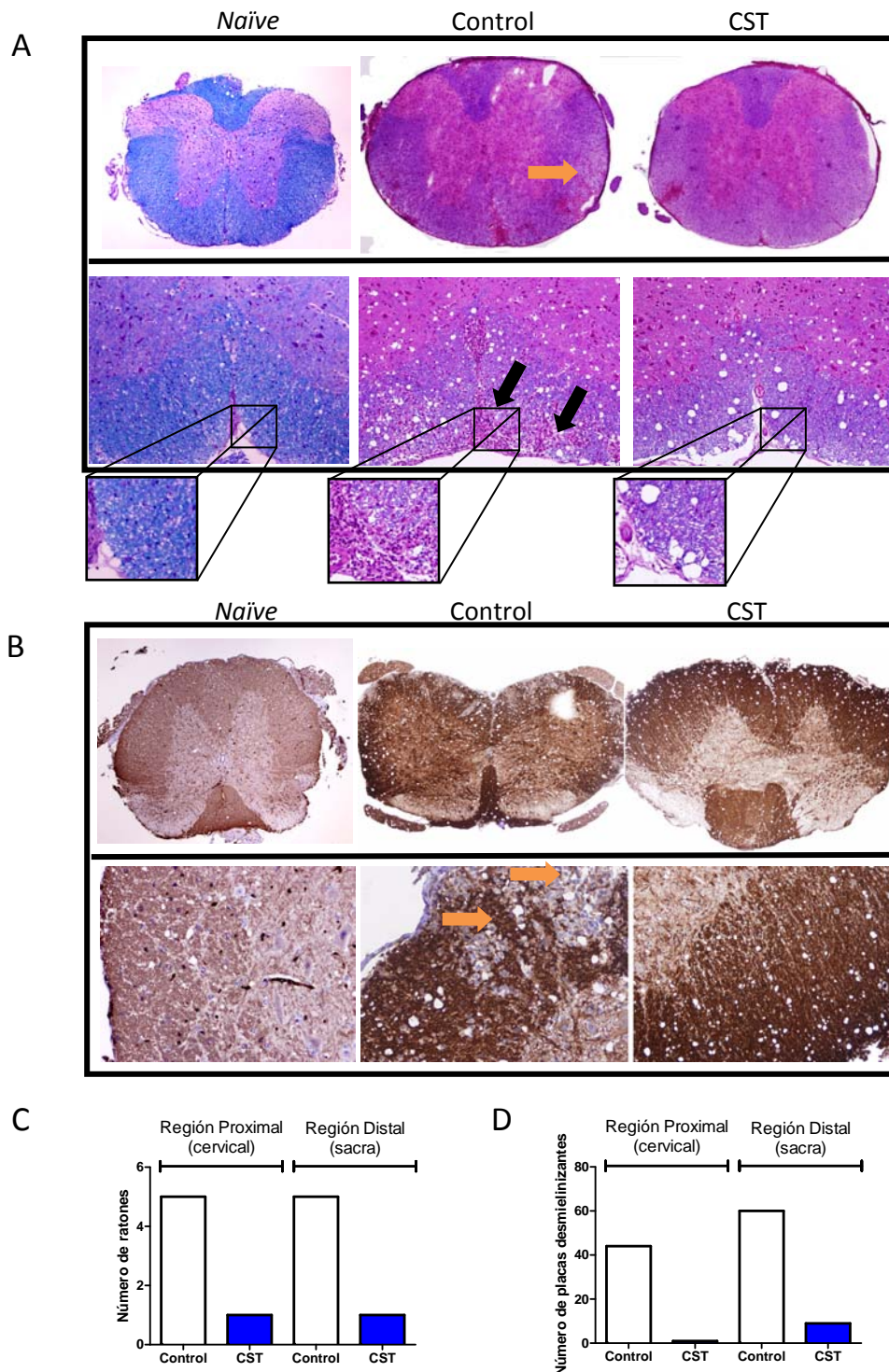


Fig. 4.2 – CST reduce la histopatología en el SNC de ratones con EAE. La EAE crónica se indujo como descrito en la figura 4.1. Dos días después de la última administración, se extrajo la médula espinal diferenciándose la región cervical y lumbar. Secciones transversales de las muestras de médula de cada grupo seleccionadas al azar se tiñeron con azul rápido de Luxol más hematoxilina (A) (para evaluar la desmielinización e infiltración) y con anti-MBP (B). En detalle se muestra una sección histológica representativa de un ratón control con EAE donde se observan áreas de infiltración leucocitaria (flechas negras) y las áreas de desmielinización (flechas de color naranja). Una región comparable de la médula de ratones tratados con CST muestra un aspecto similar a la médula de ratones naïve, sin signos histopatológicos. El número de ratones con placas desmielinizantes (C) y el número de placas (D) se contaron aleatoriamente en varias secciones transversales. Valores representados de n = 5 ratones por grupo. Visión general de las médulas: aumento 40x; detalle en (A): aumento 100x; detalle en (B): aumento 200x.

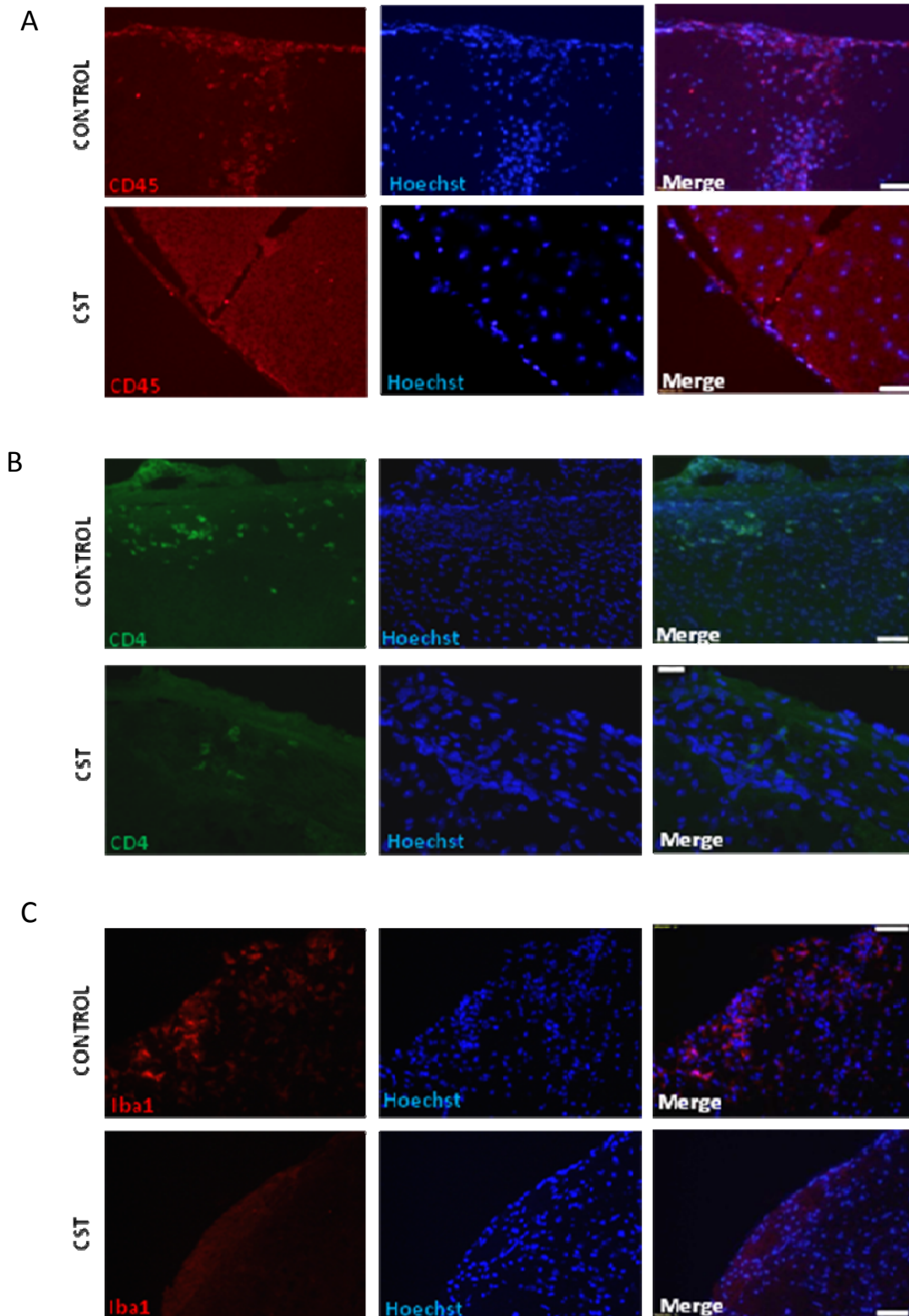


Fig. 4.3 – CST reduce la inflamación en el SNC en ratones con EAE. La EAE crónica se indujo como descrito en la figura 4.1. Dos días después de la última administración, se extrajeron las médulas de los diferentes grupos y se embebieron en OCT, como se describe en materiales y métodos. La determinación de la presencia y tipo de infiltrados inflamatorios en la médula se realizó en criocortes seleccionados al azar de cada grupo experimental utilizando los marcadores anti-CD45 (linaje hematopoyético: A); anti-CD4 (linfocitos T: B), y anti-Iba1 (macrófagos y microglia activados: C). Ampliación 200X de secciones transversales de la médula espinal.

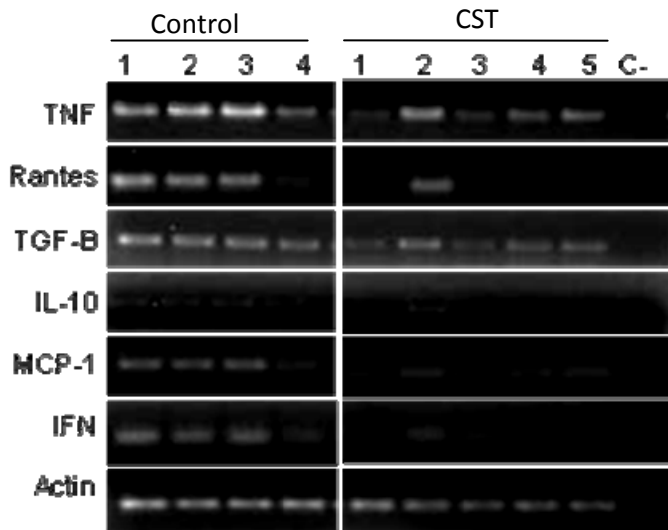
4-3 - El tratamiento con CST reduce la respuesta inflamatoria en el SNC de ratones con EAE

En la EM se encuentran elevados los niveles de mediadores pro-inflamatorios del tipo Th1/Th17 en el SNC. Se ha demostrado que la progresión de la enfermedad se ve reducida mediante la neutralización de estos mediadores, al menos en el modelo de EAE (ResImmunol_149_753_1998). Para determinar el perfil de mediadores inflamatorios en el SNC de ratones tratados con CST, analizamos los niveles de expresión de genes de diferentes citoquinas anti- y pro-inflamatorias en el parénquima nervioso (extracto de cerebro y médula espinal) de ratones con EAE de los diferentes grupos. En los ratones tratados con CST se observó una reducción de la expresión de diversas citoquinas como TNF- α , IFN- γ , IL-17, e IL10 y quimioquinas como MCP-1 (quimioatrayente para macrófagos) y RANTES (quimioatrayente para células T). Sin embargo, no se observaron alteraciones significativas en los niveles de expresión de IL-12, TGF- β y IL-4 en comparación con los ratones control (Figura 4.4A y B). En cuanto a mediadores anti-inflamatorios, se observó una reducción en los niveles de IL-10, probablemente debido a la menor infiltración generalizada, o al momento de la toma de muestras en relación al grado de la enfermedad comparando con los controles. Por otro lado, no hubo cambios en los niveles de las citoquinas anti-inflamatorias TGF- β e IL-4, indicando que, aunque hay menor número de células, éstas no reducen los niveles de citoquinas típicas de un perfil Th2, aunque sí hay una reducción significativa y específica de los mediadores típicos de un perfil Th1/Th17.

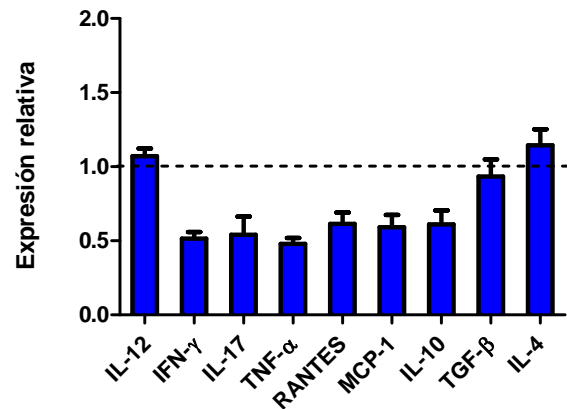
Para confirmar el efecto de CST en la reducción de mediadores inflamatorios en SNC de ratones con EAE, analizamos a nivel proteico la producción de mediadores inflamatorios en extractos del parénquima nervioso de los distintos grupos experimentales. Los ratones tratados con CST presentaron una reducción significativa de diversos mediadores pro-inflamatorios, como las citoquinas IFN- γ , IL-6, IL-12, y como las quimioquinas IP-10 (quimioatrayente para células Th1), MCP-1, RANTES (Figura 4.4C), y una ligera reducción de la expresión de IL-2, IL-17 y MDC (quimioatrayente para células Th2). Además, el nivel de IL-10 a nivel proteico no presenta alteraciones en el SNC entre ambos grupos analizados. Aunque la disminución de los mediadores inflamatorios podría ser el resultado del menor número de células inflamatorias en el SNC, los resultados de los niveles de las citoquinas IL-

10, TGF- β , e IL-4 en los ratones tratados con CST respecto a los controles, indican que existe una reducción/desactivación específica de los mediadores inflamatorios relacionados con una respuesta Th1/Th17, mientras no se afecta la respuesta anti-inflamatoria Th2

A



B



C

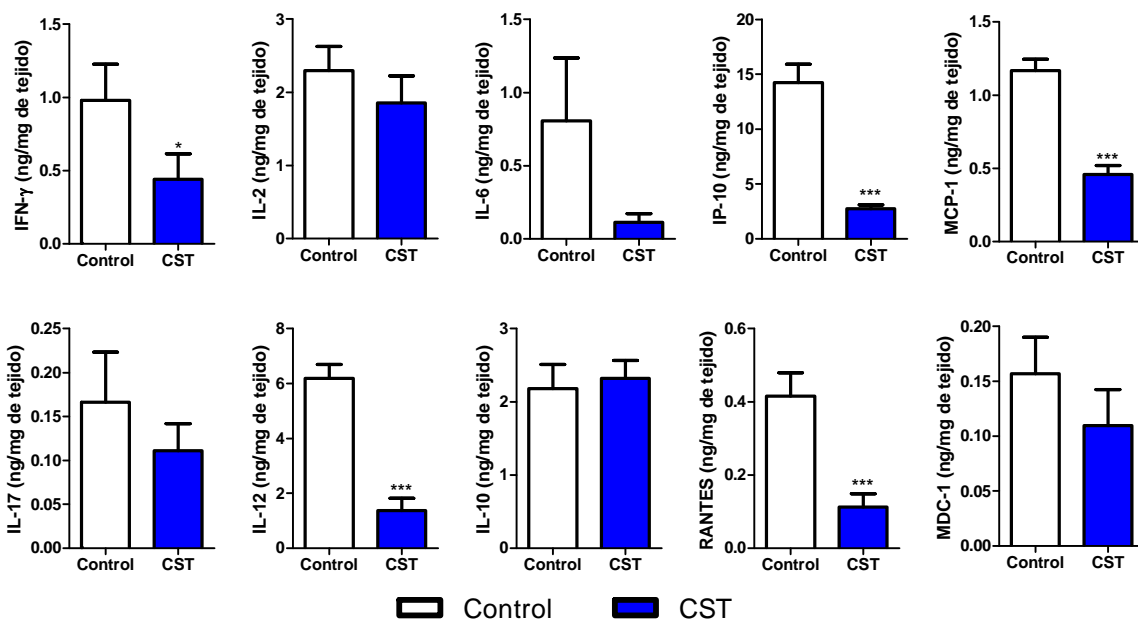


Fig. 4.4 – CST reduce la inflamación en el SNC en ratones con EAE. La EAE crónica se indujo como descrito en la figura 4.1. Dos días después de la última administración, se extrajeron las médulas y cerebros de los diferentes grupos, y se realizó la extracción conjunta de ARNm y proteínas, tal y como se describe en materiales y métodos. Mediante RT-PCR se analizaron los niveles de expresión génica de diferentes citoquinas y quimioquinas inflamatorias (A), y se hizo una cuantificación de la expresión génica por densidometría (B). Los valores representados son relativos a la expresión de los diferentes mediadores en el control. En los extractos de proteínas se determinaron los niveles de citoquinas y quimioquinas por ELISA (C). Los resultados se expresaron como ng de citoquinas/mg de tejido. Los valores se representan como valor medio de la producción/expresión de citoquinas/quimioquinas \pm S.E.M, n = 5-6 ratones por grupo * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0001$ frente al control.

4.4 - El tratamiento con CST reduce la respuesta inflamatoria y autorreactiva en EAE

Dado que el efecto en la reducción de los niveles de citoquinas en el parénquima nervioso de ratones con EAE tratados con CST podría deberse a la reducción de células infiltradas, y/o a la reducción de la respuesta encefalogénica mediada por células T, analizamos el perfil de citoquinas producidas por células inmunes de la periferia. Para ello, analizamos la capacidad autorreactiva de las células T aisladas de ganglios linfáticos drenantes (axilares e inguinales) y bazo frente a un estímulo específico, MOG, o frente a un estímulo no específico como anti-CD3. Los resultados muestran que las células aisladas de ratones con EAE proliferan de forma específica en respuesta al antígeno, mientras que las células aisladas de los ratones con EAE tratados con CST disminuyen la capacidad de proliferación frente al antígeno específico, presentando una reducción de la formación de agregados (*clusters*) indicativos de la proliferación así como en la incorporación de timidina tritiada (Figura 4.5A y B). Este resultado sugiere que la administración de CST durante la progresión de la EAE inhibe parcialmente la expansión clonal de células T autoreactivas.

Para determinar el fenotipo de las células T efectoras, analizamos el perfil de citoquinas de las células aisladas del grupo control y del grupo tratado con CST en presencia del antígeno específico y otros estímulos no específicos. Mientras que las células aisladas de ratones con EAE controles producen altos niveles de citoquinas Th1/Th17, las células aisladas de ganglios linfáticos de ratones tratados con CST secretaron niveles bajos de IL-2, IFN- γ e IL-17 tras la estimulación con MOG. En células aisladas del bazo de ratones tratados con CST, sólo se observó una reducción en la producción de IL-2 y IL-17, mientras que no se observaron diferencias en los niveles de IFN- γ e IL-10 entre ratones controles y tratados CST (Figura 4.5B). De forma importante, no hubo cambios en la expresión de citoquinas entre las células aisladas de ratones controles y ratones tratados cuando las células se estimularon de manera inespecífica con anti-CD3, indicando que el tratamiento con CST no induce inmunosupresión. Considerando la citoquina GM-CSF (del inglés, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), observamos que la producción de esta citoquina disminuyó en los cultivos de células de bazo y ganglios aisladas de los ratones tratados con CST, independientemente del estímulo utilizado, sugiriendo un importante control en la modulación de esta citoquina por parte de la CST (Figura 4.5B). Recientemente, GM-CSF ha sido descrito

como una citoquina encefalogénica crítica en la inducción de la EAE. Células T deficientes en GM-CSF son incapaces de inducir EAE, y, aunque puedan existir altos niveles de IL-17A o IFN- γ , no compensan la pérdida de esta citoquina para desarrollar la enfermedad (Codarri, Gyulveszi et al. 2011). Los resultados obtenidos en células aisladas de ratones tratados con CST, demuestran que este neuropéptido inhibe la capacidad efectora de células Th1/Th17 en la periferia específicas del antígeno MOG, sin que esto implique inmunosupresión. De hecho, las células aisladas de ratones tratados con CST responden de forma eficiente produciendo diferentes tipos de citoquinas al igual que las células de ratones control en presencia de una estimulación policlonal inespecífica. Sin embargo, de manera eficiente, la CST controla la producción del factor encefalogénico GM-CSF de valor predictivo en la progresión de esta enfermedad.

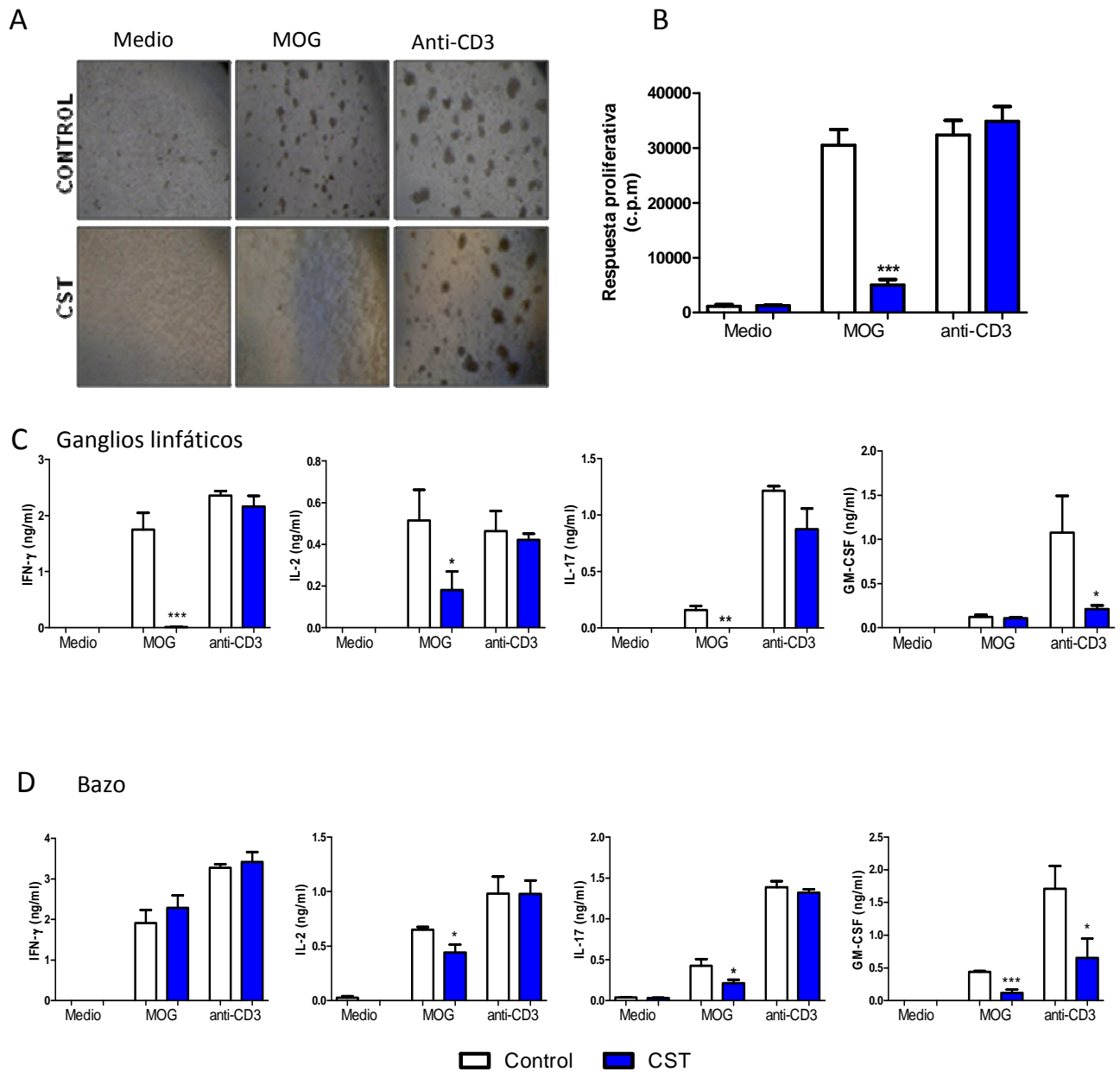


Fig. 4.5 – CST reduce la respuesta autorreactiva en ratones con EAE. La EAE crónica se indujo como descrito en la figura 4.1. Dos días después de la última administración, se aislaron células de ganglios linfáticos drenantes y del bazo y se estimularon *in vitro* con MOG₃₅₋₅₅ (15 μ M). La estimulación con anti-CD3 (1 μ g/ml) se utilizó como control de estimulación no específica. La proliferación se determinó después de 4 días de cultivo. (A) La imagen muestra la proliferación agrupada de los linfocitos (*clusters*) frente a diferentes estímulos. (B) La incorporación de timidina tritiada se presenta como cuentas por minuto (c.p.m). Los niveles de citoquinas y quimioquinas producidos por células de ganglios linfático (C) y del bazo (D) se determinaron por ELISA en los sobrenadantes de los cultivos después de 48 h de estimulación. No hay niveles detectables de proliferación o producción de citoquinas en ausencia de estímulo (medio). Los valores se representan como la media \pm S.E.M, n = 5-6 ratones por grupo * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0001$ frente al control

4.5 - El tratamiento con CST regula los niveles de autoanticuerpos en un modelo de EAE

Los altos niveles de anticuerpos circulantes dirigidos contra antígenos de la mielina acompañan invariablemente el desarrollo de la EM, y su producción es un factor importante en la determinación de la susceptibilidad a la enfermedad. La subclase de IgG antígeno específica inducida después de la inmunización/terapia, es una medida indirecta de la contribución relativa de citoquinas del tipo Th1 o Th2 (Finkelman, Holmes et al. 1990). Por lo tanto, hemos analizado los niveles séricos de autoanticuerpos contra MOG. La proporción de IgG2a/IgG1 se utiliza habitualmente como una medida indirecta de la contribución relativa de la respuesta inmune Th1 o Th2, respectivamente. Una mayor relación de IgG2a/IgG1 sugiere una respuesta inmunitaria predominantemente Th1, mientras que una proporción menor sirve como un indicador de la inmunidad del tipo Th2. En nuestro caso, observamos que los ratones con EAE tratados con CST, presentaron una menor relación IgG2a/IgG1 que los ratones control (Figura 4.6). Estos datos proporcionan una evidencia adicional de que la administración de CST durante la EAE reduce la respuesta Th1 y podría estar modulando la producción de anticuerpos en células B. Además de controlar la inflamación, nuestros resultados demuestran que CST tiene un papel en la desactivación de los clones autorreactivos en la periferia, principalmente de tipo Th1, frente a un estímulo antígeno-específico.

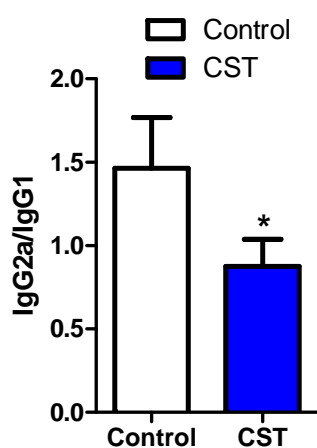


Fig. 4.6 – El tratamiento con CST regula los niveles de anticuerpos específicos contra el autoantígeno MOG. La EAE crónica se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6, que se trataron en la fase efectora de la enfermedad (grados 0.5-1.5) por vía i.p. durante 5 días consecutivos con CST o PBS (control). Dos días después de la última administración se obtuvieron los sueros por punción cardíaca de los ratones tratados y controles. Los niveles de IgG específica para MOG (IgG1 e IgG2a) se determinaron por ELISA. Los datos se presentan como media de la proporción IgG2a/IgG1 ± SEM, n = 14 ratones por grupo *p<0.05 frente al control

4.6 - CST inhibe de forma directa la respuesta inflamatoria y autorreactiva de células T

Hemos demostrado que el tratamiento con CST es capaz de inhibir la respuesta inflamatoria y autorreactiva en el SNC y en la periferia de ratones con EAE. Parece que parte del efecto terapéutico de la CST deriva de la menor infiltración de células autoreactivas en el órgano diana. Pero, una cuestión que nos planteamos fue ¿estaría la CST actuando directamente sobre las células inmunes? Es decir, podría ser que el nivel de actuación de la CST en la periferia fuera suficiente para modular la respuesta inmune en el desarrollo y progresión de la EAE. Hasta ahora, en los experimentos realizados, las células se obtienen de animales tratados y se observa la producción espontánea de mediadores en presencia/ausencia de diferentes estímulos. En este caso, y para entender el posible nivel de acción de CST, se aislaron células del bazo y de los ganglios linfáticos de ratones enfermos con síntomas moderados de la EAE, y se estimularon estas células con MOG en presencia o ausencia de CST durante 48h. El tratamiento *ex-vivo* con CST inhibió de manera significativa la proliferación de células T activadas específicas de frente a MOG (Figura 4.7A). Además, CST fue capaz de inhibir la producción de diversas citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-2, IL-6, IL-17 y TNF- α . En conjunto, estos resultados confirman que CST es un potente modulador de la inflamación tanto en el SNC como en la periferia.

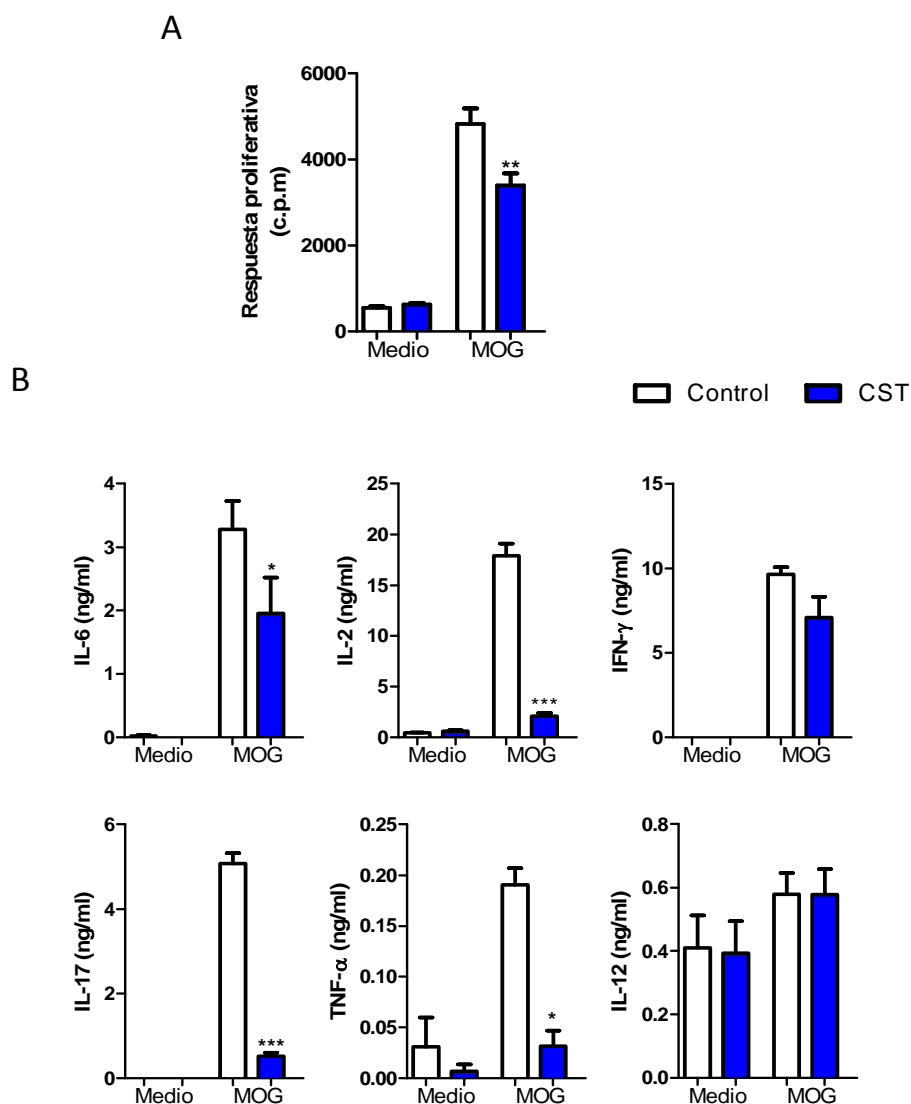


Fig. 4.7 – CST disminuye la respuesta Th1 autorreactiva en la periferia. La EAE crónica se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6. En el pico de la enfermedad (día 14 post-inmunización) se aislaron células de ganglios linfáticos y del bazo y se estimularon con MOG₃₅₋₅₅ (15 μ M) en ausencia (control) o presencia de CST (10^{-7} M). (A) La proliferación se determinó después de 4 días de estimulación mediante incorporación por timidina, presentada por c.p.m. (B) La producción de citoquinas y quimioquinas en los sobrenadantes se determinó por ELISA después de 48 h de estimulación. Valores representados como media \pm S.E.M, de dos experimentos independientes en duplicado (n=5 ratones/experimento) *p<0.05; **p<0.005; ***p<0.0001 frente a las muestras no incubadas con CST.

4.7 – La CST modula la presencia y activación de células inmunes en la periferia en el modelo de EAE.

Nuestros resultados hasta ahora indican que la CST es capaz de desactivar de forma específica la respuesta autoreactiva en el parénquima nervioso en el modelo de EAE, por un lado inhibiendo la secreción de citoquinas, y por otro, reduciendo la migración de células inmunes al tejido diana. Para confirmar esto, analizamos el perfil espontáneo de citoquinas en las células retenidas en los ganglios linfáticos y bazo de los ratones con EAE tratados o no con CST. Se aislaron las células y se estimularon de forma aguda durante 8 horas en presencia de monensina (inhibidor del transporte vesicular afectando al complejo de Golgi). Seguidamente se recuperaron las células y se analizaron diferentes citoquinas mediante tinción intracelular y citometría de flujo. Debido al tiempo y tipo de estímulo (PMA más inonomicina), este ensayo nos permite conocer el perfil celular presente en los órganos linfoides. Interesantemente, el porcentaje de células CD4+IFN- γ , CD4+IL-17+, CD4+IL-10+ y CD4+IL-4+ estaba significativamente más elevada en los órganos linfoides de ratones tratados con CST (Figura 4.8 A y B). Además, durante el procesamiento de los ganglios y bazo, se observó un aumento del tamaño de los mismos en los ratones tratados con CST respecto a los ratones control. Esta observación se correlacionó con el aumento de número de células totales presentes en los órganos de los ratones tratados (Figura 4.8C y D). Nuestros resultados demuestran una posible retención/mantenimiento de las células efectoras en los órganos linfoides de los ratones tratados con CST, mientras los ratones controles con EAE presentan un agotamiento de los órganos linfoides debido a la migración masiva hacia las zonas inflamadas del SNC. Además, estas células son inmunocompetentes pudiendo desarrollar respuestas Th1-Th17/Th2 en relación a un estímulo policlonal inespecífico. Sin embargo, en relación a los resultados del apartado 4.4, las células de ratones tratados con CST en presencia del antígeno específico fueron significativamente menos autoreactivas disminuyendo la producción de mediadores inmunes relacionados con la progresión de la EAE (IFN- γ , IL-17, GM-CSF). Por tanto, estos resultados sugieren que CST no induce una inmunosupresión total pero sí un control altamente regulado de la homeostasis inmune en condiciones en que ésta se halla alterada.

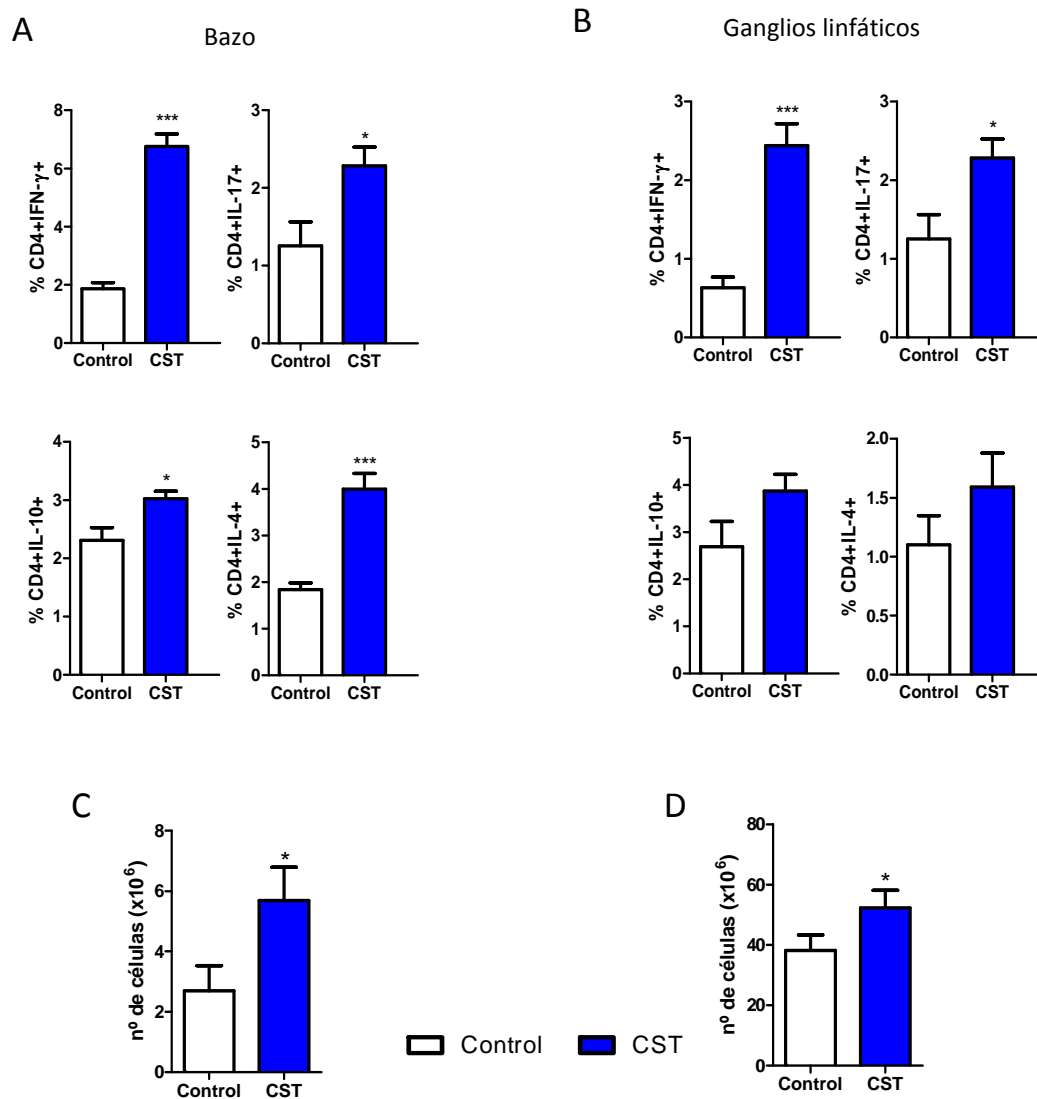


Fig. 4.8 – La CST regula el porcentaje de células inmunes en los órganos linfoides de ratones con EAE.

La EAE crónica se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6, que se trataron en la fase efectora de la enfermedad (grados 0.5-1.5) por vía i.p. durante 5 días consecutivos con CST o PBS (control). Dos días después de la última administración, se aislaron células del bazo (A) y de los ganglios linfáticos (B) y se estimularon *in vitro* con PMA/Ionomicina durante 8 horas en presencia de monensina. Tras la estimulación aguda se analizó la expresión intracelular de citoquinas mediante citometría de flujo. El análisis de citoquinas intracelulares se llevó a cabo exclusivamente en células T CD4+. El número de células viables en ganglios (C) y bazo (D) se determinó utilizando Azul de Tripan utilizando una cámara de Neubauer. Los valores se representan como media \pm S.E.M, n = 6-8 ratones por grupo; n = 3 experimentos independientes *p<0.05; **p<0.005; ***p<0.0001 frente al control

4.8 – El tratamiento con CST induce la aparición de células T reguladoras (Treg) en ratones con EAE

El mantenimiento de la tolerancia inmunológica es un factor clave para la homeostasis inmune. Se sabe que las células T reguladoras son un componente importante para este control, de tal forma que el balance en número y función de estas células es clave en el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes como la EM, donde es patente la pérdida de tolerancia inmune frente a antígenos propios. Ya que el tratamiento tardío con CST, durante la fase inflamatoria siguiente a la activación de células Th1/Th17 antígeno específicas, también fue efectivo en controlar la EAE, nos preguntamos si este efecto podía deberse a la generación de células Treg durante la progresión de la enfermedad. Para ello, aislamos células T CD4⁺ de bazo y ganglios linfáticos, y analizamos la expresión de CD25 y FOXP3, que son comúnmente utilizados como marcadores de células T reguladoras naturales. Ratones con EAE tratados con CST presentaban un porcentaje mayor de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ en los ganglios linfáticos drenantes en comparación con el porcentaje obtenido de ratones no tratados que desarrollaron EAE más severa (Figura 4.9A). Para demostrar que las células Treg generadas en presencia de CST son funcionales, investigamos si células derivadas de ratones con EAE tratados con CST serían capaces de inhibir la progresión de la EAE. Para ello aislamos células totales de ganglios linfáticos y bazo de ratones con EAE tratados o no con CST, y transferimos las células a ratones que ya estaban desarrollando la EAE (grado clínico 1). Los ratones con EAE que recibieron células totales de ratones control, desarrollaron la enfermedad de forma similar que los ratones inmunizados con MOG que no recibieron células, mientras que los ratones con EAE que recibieron células de los ratones tratados con CST presentaron una regresión drástica en los grados clínicos de la EAE (Figura 4.9B). Para confirmar que estos resultados eran debidos a la presencia de las células Treg inducidas por CST, se eliminaron las células CD4⁺CD25⁺ del preparado de células totales de ratones tratados con CST antes de realizar la transferencia a los ratones con EAE. En esta ocasión, los ratones que recibieron células CD4⁺CD25⁻ de ratones tratados con CST desarrollaron la EAE de forma similar a los ratones que recibieron células de ratones control o que no recibieron ningún tratamiento (Figura 4.9C). La retirada de la fracción conteniendo las células CD25⁺ en los ensayos de transferencia se tradujo en una reducción

significativa de la capacidad supresora observada anteriormente en la transferencia de células totales de ratones tratados con CST. Estos resultados indican que el efecto terapéutico de CST es modulado a través de la inducción de células T reguladoras funcionales.

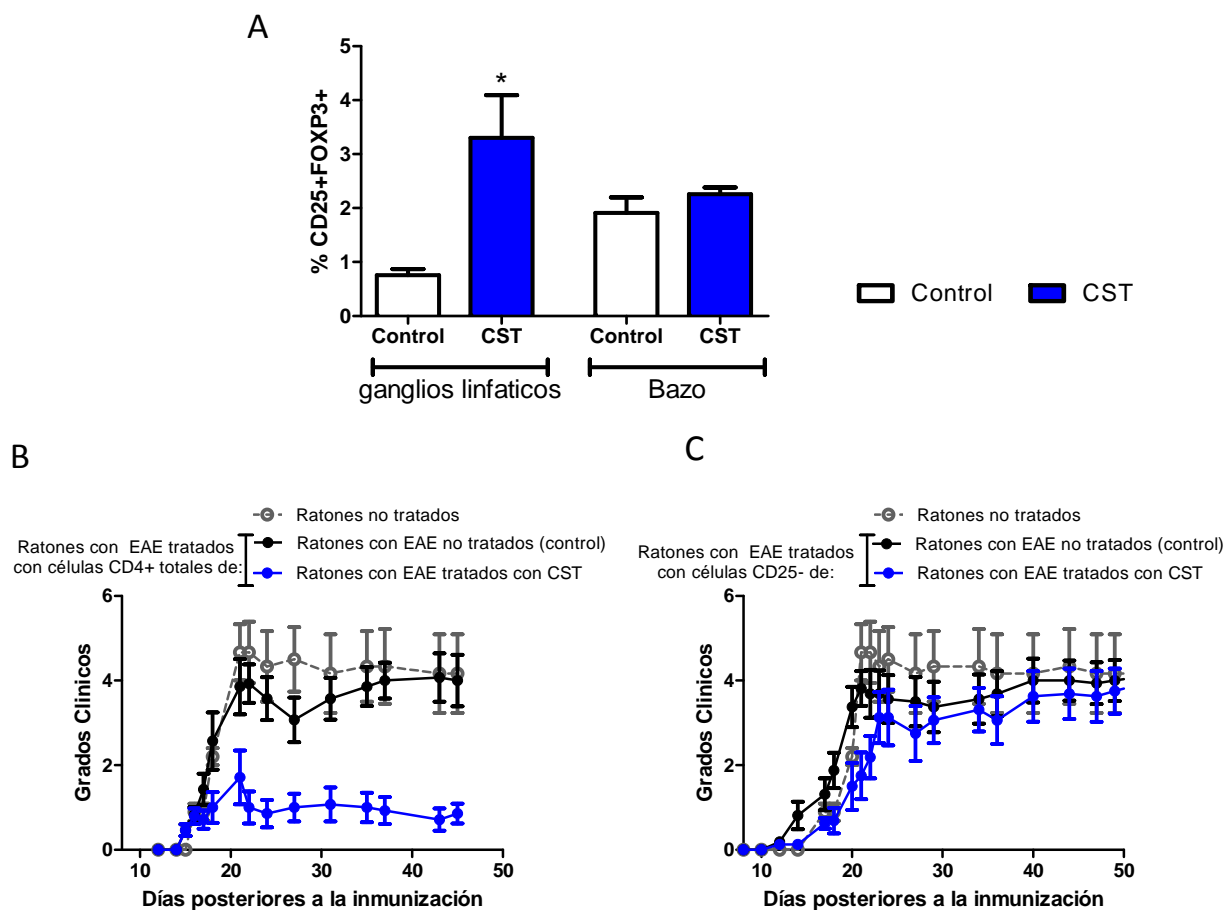


Fig. 4.9 – El tratamiento con CST induce células Treg funcionales en ratones con EAE. La EAE crónica se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6, que se trataron en la fase efectora de la enfermedad (grados 0.5-1.5) por vía i.p. durante 5 días consecutivos con CST (1 nmol /día) o PBS (control). Dos días después de la última administración, se aislaron células del bazo y de los ganglios linfáticos para detección de la expresión de marcadores de células Treg mediante citometría de flujo. (A) Ratones con EAE tratados con CST presentan un mayor porcentaje de células CD4+CD25+FOXP3+ en los ganglios linfáticos comparados con controles. Valores representado como media± S.E.M, n = 6-8 ratones por grupo; n = 3 experimentos independientes (B) Células totales CD4+ aisladas del bazo y de los ganglios linfáticos (10x10⁶ células/ratón) de ratones con EAE tratados o no con CST se transfirieron a ratones previamente inmunizados con MOG en grados clínicos entre 0.5 y 1. (C) Tras eliminar la población de células CD4+CD25+ de las células totales aisladas utilizando bolas magnéticas marcadas diferencialmente, las células resultantes (CD4+CD25-, 15x10⁶ células/ratón) se transfirieron a ratones previamente inmunizados con MOG. Los valores se representan como media± S.E.M, n = 7-9 ratones por grupo *p<0.05, frente al control

4.9 - El tratamiento con CST induce la producción de factores neurotróficos en el SNC.

Los factores neurotróficos son proteínas que actúan directamente en la proliferación y diferenciación de diferentes tipos celulares del SNC, siendo capaces de promover la reparación, supervivencia y recuperación del tejido. Entre ellos destacan por su relevancia en el modelo de EAE el BDNF (del inglés, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) y el ADNP (del inglés, *Activity-Dependent Neuroprotective Protein*). El BDNF es un importante modulador de la función neuronal y la supervivencia. Además de su función fisiológica normal, la inducción de BDNF en el SNC después de la inducción de diversos tipos de daño neuronal sugiere un papel neuroprotector para este factor, ya que promueve el crecimiento de los axones, la remielinización, y la regeneración (Murer, Yan et al. 2001; Riley, Cope et al. 2004). El ADNP es un péptido esencial en la formación del cerebro, y proporciona neuroprotección contra una variedad de daños citotóxicos. ADNP se expresa en muchas células del sistema inmunológico y potencialmente tiene propiedades inmunomoduladoras (Braith, Kawabe et al. 2010). La expresión de ADNP y BDNF se produce en respuesta a la lesión cerebral y se correlaciona con la protección del SNC. Por lo tanto, hemos investigado la expresión a nivel del ARNm para ambos factores en el parénquima nervioso de ratones con EAE. Nuestros resultados muestran que ratones tratados con CST, presentaban una expresión mayor de ADNP y BDNF que los ratones control (Figura 4.10). Estos resultados sugieren que CST, además de ser un factor inmunoregulador, podría ser neuroprotector modulando la producción de factores neurotróficos en el SNC.

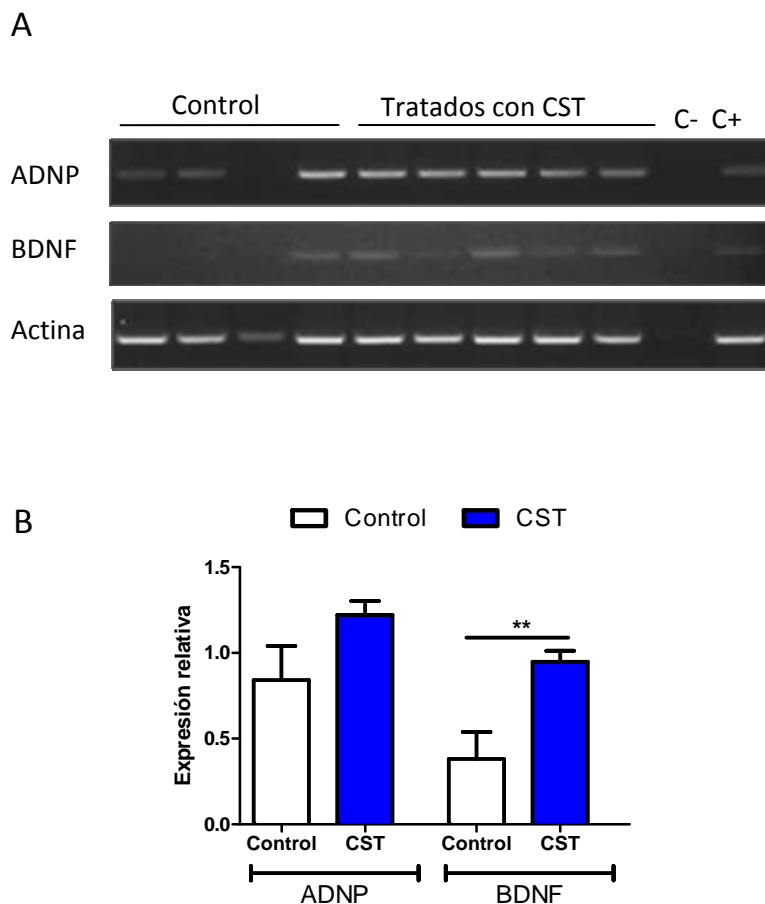


Fig. 4.10 – El tratamiento con CST induce la expresión de factores neurotróficos en ratones con EAE. La EAE crónica se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6, que se trataron en la fase efectora de la enfermedad (grados 0.5-1.5) por vía i.p. durante 5 días consecutivos con CST (1 nmol /día) o PBS (control). Dos días después de la última administración, se aisló ARN total del parénquima nervioso. Mediante RT-PCR se detectó la expresión de ADNP y BDNF (A) y se hizo una cuantificación de la expresión génica por densitometría (B). Los valores representados son relativos a la expresión de Actina. Un aumento significativo en el nivel de expresión de ambos factores se observa en los ratones tratados CST al compararse con el control. Los valores representan la media ± S.E.M, n = 4-5 ratones por grupo, *p<0.05, frente al control. C- es control negativo de la reacción de RT-PCR, C+ es control positivo, muestra de cerebro de un ratón *naïve*.

4.10 - CST inhibe la producción de citoquinas inflamatorias en microglia y astrocitos

Tradicionalmente, se ha considerado que las células de la glía tienen un papel pasivo en el cuidado de las neuronas y mantenimiento de su correcto funcionamiento. Las funciones establecidas de la glía son el apoyo a la neurotransmisión, mantenimiento del equilibrio iónico en el espacio extracelular, y el aislamiento de los axones para acelerar la comunicación eléctrica. Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que la glía, en particular astrocitos y microglia, también tiene un papel activo en la función cerebral, tanto en condiciones fisiológicas normales como patológicas. En la EAE se sabe que los astrocitos y la microglia, tienen un papel crítico en la producción de citoquinas inflamatorias. Estos hallazgos nos llevaron a evaluar el efecto de CST en las células residentes del SNC. Para esto, cultivamos astrocitos y microglia primaria de ratón y activamos estas células con un estímulo inflamatorio (LPS) en presencia o ausencia de CST, intentando mimetizar las condiciones de exposición a un ambiente inflamatorio de las células gliales durante EAE. En primer lugar, evaluamos la expresión de los diferentes receptores de CST y su posible modulación en un ambiente inflamatorio. Nuestros resultados demuestran que, tanto astrocitos como microglia, expresan receptores de SOM, a los cuales se ha descrito que puede unirse CST y señalar de forma específica. Además, se observó que los diferentes receptores se modulan de diferente forma frente a un estímulo inflamatorio. En este aspecto, se observó un aumento de GHSR, SST-1 y SST-5 en astrocitos activados, mientras no se encontraron niveles detectables de este receptor en microglia en estado basal o activado. No en tanto, hay una reducción de la expresión de SST-3 y SST-4 en astrocitos activados con LPS, mientras la expresión de SST-2 no sufre alteraciones significativas (Figura 4.11). En cualquier caso, estos resultados demuestran que CST podría actuar directamente sobre estos tipos celulares en condiciones fisiológicas y patológicas. Por lo tanto, nos propusimos investigar si CST afectaría directamente a la producción de citoquinas/quimioquinas inducidas por LPS en astrocitos y microglia. Tanto astrocitos como microglia, cuando son activados *in vitro* con LPS, son capaces de producir diferentes mediadores inflamatorios. En presencia de CST, se detectó una reducción significativa en la producción de TNF- α en los cultivos de astrocitos (Figura 4.11A) y de IL-6 y óxido nítrico en los cultivos de microglia (Figura 4.11B), aunque no se modificaron los niveles de otras citoquinas o quimioquinas, como RANTES. Estos resultados

sugieren que el efecto de CST en EAE puede, en parte, ser debido a su capacidad de modular directamente la producción de TNF- α , IL-6 y óxido nítrico en las células residentes del SNC activadas durante la progresión de la enfermedad.

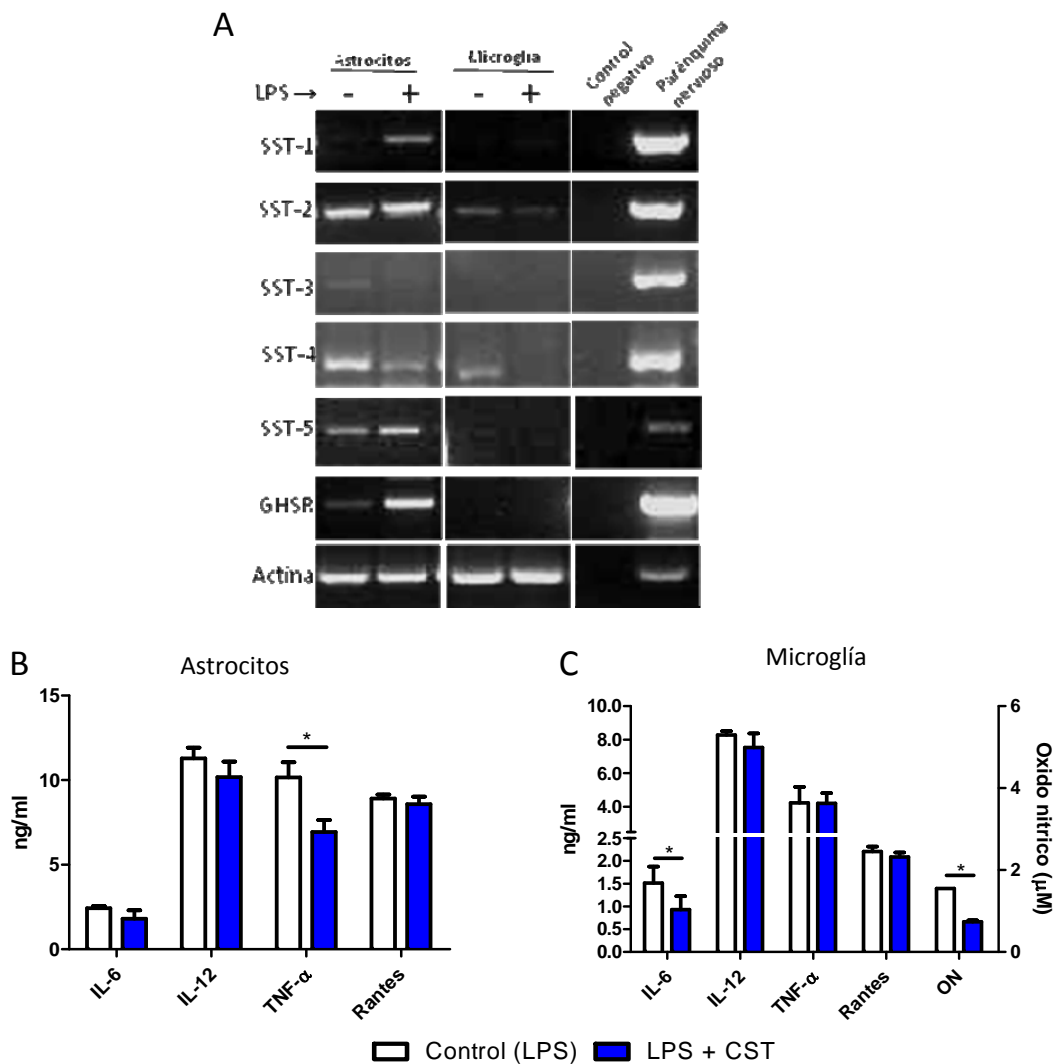


Fig. 4.11 – CST inhibe la producción de citoquinas inflamatorias en microglía y astrocitos. Las poblaciones de astrocitos y microglía primaria se aislaron a partir de cerebros de neonatos (p0-p3) como se describe en materiales y métodos. Los astrocitos y la microglía se estimularon con LPS (0.1 $\mu\text{g/ml}$) durante 6 horas (A) o 24 h. (B, C). (A) Transcurrido el tiempo de estimulación, se aisló el ARNm de las células en cultivo, y mediante RT-PCR se detectó la expresión de diferentes receptores de Somatostatina y el receptor de ghrelina (B: astrocitos; C: microglía). Ambas poblaciones se estimularon con LPS durante 24 h en ausencia (control) o presencia de CST (10^{-7}M). La producción de citoquinas y quimioquinas se evaluó en sobrenadantes de cultivo por ELISA y los niveles de Oxido nítrico (ON) se determinaron tras estimulación de LPS (0.1 $\mu\text{g/ml}$) /IFN (500U/ml) por medio del ensayo colorimétrico de Griess, como se describe en materiales y métodos. Los valores se representan como la media \pm S.E.M, de tres experimentos en duplicado, * $p < 0.05$, frente al control con LPS o con LPS/IFN.

4.11 - Efecto terapéutico beneficioso del tratamiento con Ghrelina (GHR) en la EAE

La CST pertenece a la familia de la somatostatina (SOM) con la que comparte propiedades estructurales y funcionales además de la capacidad de unión a los mismos receptores (SST1-SST5). En el caso de la SOM, resultados recientes han demostrado que la administración de forma oral de este neuropéptido inhibió el curso clínico de la enfermedad, principalmente en base a la inducción de Treg (Brod and Hood 2011). Por tanto, parte del mecanismo de acción de la CST podría estar mediado a través de la unión a los receptores de la SOM. Sin embargo, el efecto terapéutico de la CST fue más eficiente que cuando se usó la SOM, sugiriendo otros posibles mecanismos de acción. En las células del sistema inmune, además de unirse a los cinco receptores de SOM, la CST es capaz de unirse al receptor de ghrelina (GHSR), lo que implica la activación de diferentes vías de señalización. La GHR es un neuropéptido producido principalmente por el estómago y relacionado con la ingesta de comida, del que, recientemente, se ha descrito su función en el sistema inmune. Así, la unión de GHR con su receptor induce un aumento de los niveles de AMP cíclico, que está relacionado con la inhibición de diversas vías anti-inflamatorias. Por tanto, además de unirse a los receptores SST 1- SST5, parte del mecanismo de acción de la CST podría deberse a que puede activar otros receptores. De hecho, la CST ha demostrado parte de su efecto anti-inflamatorio en diferentes modelos a través del receptor GHSR. Interesantemente, aunque este receptor no se expresó en microglia, sí, observamos que existía una inducción de la expresión de este receptor en condiciones inflamatorias en astrocitos (Figura 4.11) el mayor componente de la glía. Uno de los posibles abordajes para examinar la posibilidad de que parte del mecanismo de acción de la CST en EAE esté mediado a través del GHSR, es la utilización de antagonistas específicos de los receptores, que, en el caso de la CST, es complicado debido a la combinación que se necesitaría por la diversidad de receptores a los que puede unirse este neuropéptido, junto con la dificultad adicional de administrar estos compuestos durante el desarrollo de un modelo de larga duración como es la EAE. Otra posibilidad fue determinar si GHR tenía un efecto terapéutico en el modelo de EAE (que no había sido descrito en el momento de realización de esta tesis doctoral).

Por tanto, el efecto de la administración de GHR fue investigado en los dos modelos de la EAE. El tratamiento con GHR durante la fase inicial de desarrollo de ambos modelos (EAE

crónica y RR-EAE) fue capaz de reducir la incidencia y severidad de la enfermedad, mientras el grupo de ratones no tratados desarrollaron una enfermedad moderada/severa sin recuperación de los signos clínicos durante los 60 días de seguimiento (Figura 4.12). En la EAE crónica, en el grupo tratado con GHR, un 32% de los ratones resultaron asintomáticos y un 63% de los ratones tratados con GHR presentaron síntomas de leve a moderados de la enfermedad (Tabla 4.2A), mientras en el grupo control, un 63% de los ratones presentó EAE severa. En el modelo de RR-EAE, 75% de los ratones tratados con GHR eran asintomáticos y los demás desarrollaron brotes con síntomas leves (grado clínico 0.5-2), mientras en el grupo control todos los ratones presentaban síntomas de la EAE a los 50 después de la inmunización, siendo 50% de ellos en grado severo y 50% en grado moderado (Tabla 4.2B).

Para investigar los mecanismos por los cuales GHR ejerce su efecto terapéutico en EAE, analizamos aspectos histopatológicos del SNC. El tratamiento con GHR demostró una reducción significativa del número de placas desmielinizantes, así como la reducción de infiltración de células inflamatorias (Figura 4.13). Para analizar el perfil de mediadores inflamatorios en el SNC de los ratones tratados con GHR, analizamos los niveles de diferentes mediadores anti- y pro-inflamatorios en el parénquima nervioso y en células aisladas de ganglios linfáticos y bazo. Ratones con EAE tratados con GHR presentaron una reducción significativa de diversos mediadores pro-inflamatorios, como las citoquinas IFN- γ , IL-12, IL-17 y quimioquinas IP-10, MCP-1 y RANTES en el parénquima nervioso así como en la periferia (Figura 4.14 A y B). Los niveles de IL-10 y IL-2, no presentaron alteraciones significativas en el SNC de ratones con EAE tratados con GHR comparados con ratones EAE controles. Por otro lado, el tratamiento con GHR generó un aumento significativo de células Treg, que contribuyeron al efecto terapéutico de este neuropéptido. En conjunto, estos resultados muestran un efecto terapéutico beneficioso del tratamiento con GHR en la EAE, capaz de disminuir la incidencia y severidad de la enfermedad, controlando la respuesta autoreactiva y la inflamación en el SNC. Por tanto, mientras que la SOM se une solo a los receptores SST1-SST5, parte del mecanismo de acción de la CST podría deberse a que puede activar otros receptores, como el de GHR, asociado con efectos anti-inflamatorios.

Tabla 4.2 – Efecto terapéutico de GHR en EAE.

A	Incidencia*(%)				Mortalidad	CDI [§]
	EAE crónica	Severa	Moderata	Leve		
Control	12/19 (63)	5/19 (27)	1/19 (5)	1/19 (5)	12/19 (63)	97.89 ± 11.25
GHR	1/19 (5)	5/19 (26)	7/19 (37)	6/19 (32)	2/19 (0)	36.31 ± 6.91

B	Incidencia*(%)				Mortalidad	CDI [§]
	RR-EAE	Severa	Moderata	Leve		
Control	4/8 (50)	4/8 (50)	0/8 (0)	0/8 (0)	1/8 (12.5)	38.43 ± 8.40
GHR	0/8 (0)	0/8 (0)	2/8 (25)	6/8 (75)	0/8 (0)	5.43 ± 2.44

Ratones C57BL /6 con EAE crónica o ratones SJL /J con RR-EAE se trataron por vía intraperitoneal con PBS (control) o con 1 nmol de CST durante 5 días consecutivos a partir de los primeros síntomas de la enfermedad * La incidencia de la enfermedad se califica como Severa (puntuación clínica: de 4 a 6), Moderada (puntuación clínica: > 2-3), Leve (puntuación clínica: > 0,5 a 2) o sin síntomas. CDI § es la media de la suma de los grados diarios de la enfermedad

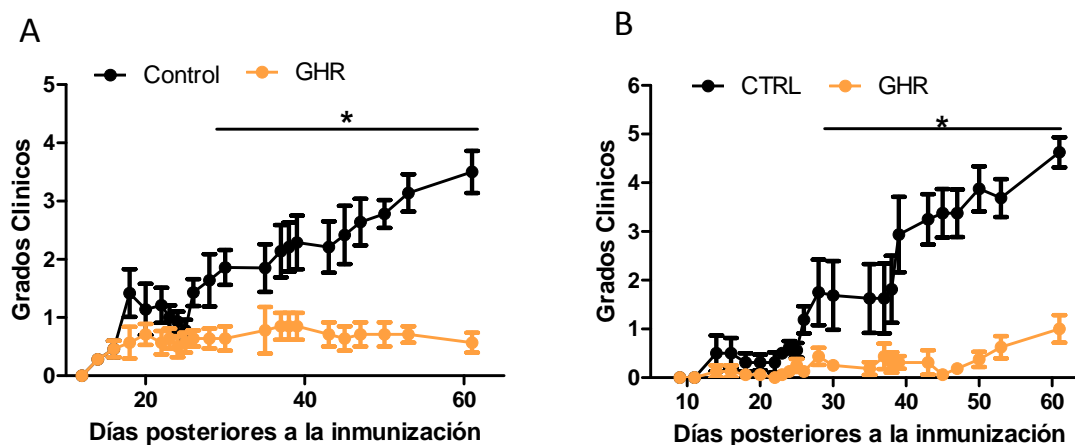


Fig. 4.12 – Efecto terapéutico de GHR en dos modelos de EAE. La EAE crónica se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6, y la RR-EAE se indujo en SJL / J ratones mediante la inmunización con PLP₁₃₉₋₁₅₁. Los ratones inmunizados se trataron por vía i.p. durante 5 días con PBS (control) o GHR (1 nmol/día) a partir de la aparición de los primeros signos clínicos en la EAE crónica (A) o en el día 10 en la RR-EAE (B). Los signos clínicos de la enfermedad se evaluaron como se describe en Materiales y Métodos. **p*<0.05 en comparación con ratones controles. Valores representados como media ± S.E.M, n = 18-19 ratones por grupo de EAE crónica y n = 8 ratones por grupo en RR-EAE.

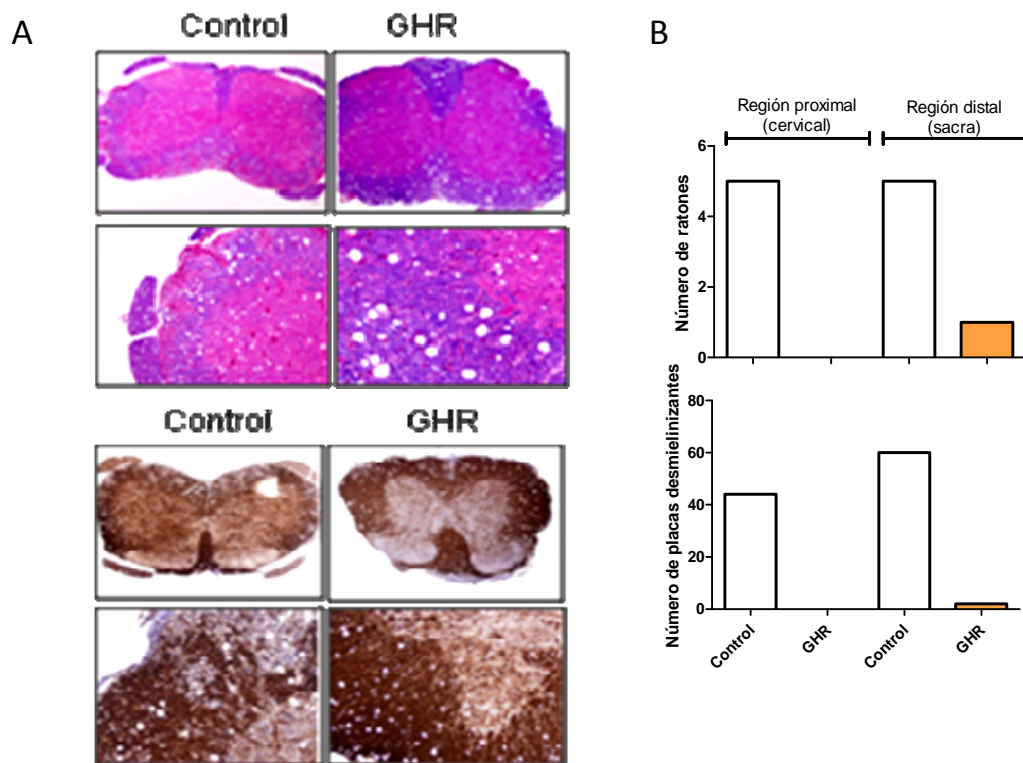


Fig. 4.13 – El tratamiento con GHR reduce la histopatología e inflamación en el SNC de ratones con EAE. La EAE crónica se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6, y a partir del inicio de los signos clínicos, los ratones se trataron por vía i.p. durante 5 días con GHR (1 nmol /día) o PBS (control). Se recogió muestra de la región lumbar de la médula espinal para histopatología y extracto proteico del parénquima nervioso después de dos días tras de la última administración de GHR. (A) Las secciones transversales de la médula espinal se tiñeron con azul rápido de Luxol más hematoxilina o con anti-MBP. (B) El número de ratones y el número de placas desmielinizantes se contó aleatoriamente en varias secciones transversales. Visión general de la médula: aumento 40x; detalle en imágenes de Kluver-Barrera: aumento 100x; detalle en muestras anti-MBP: aumento 200x.

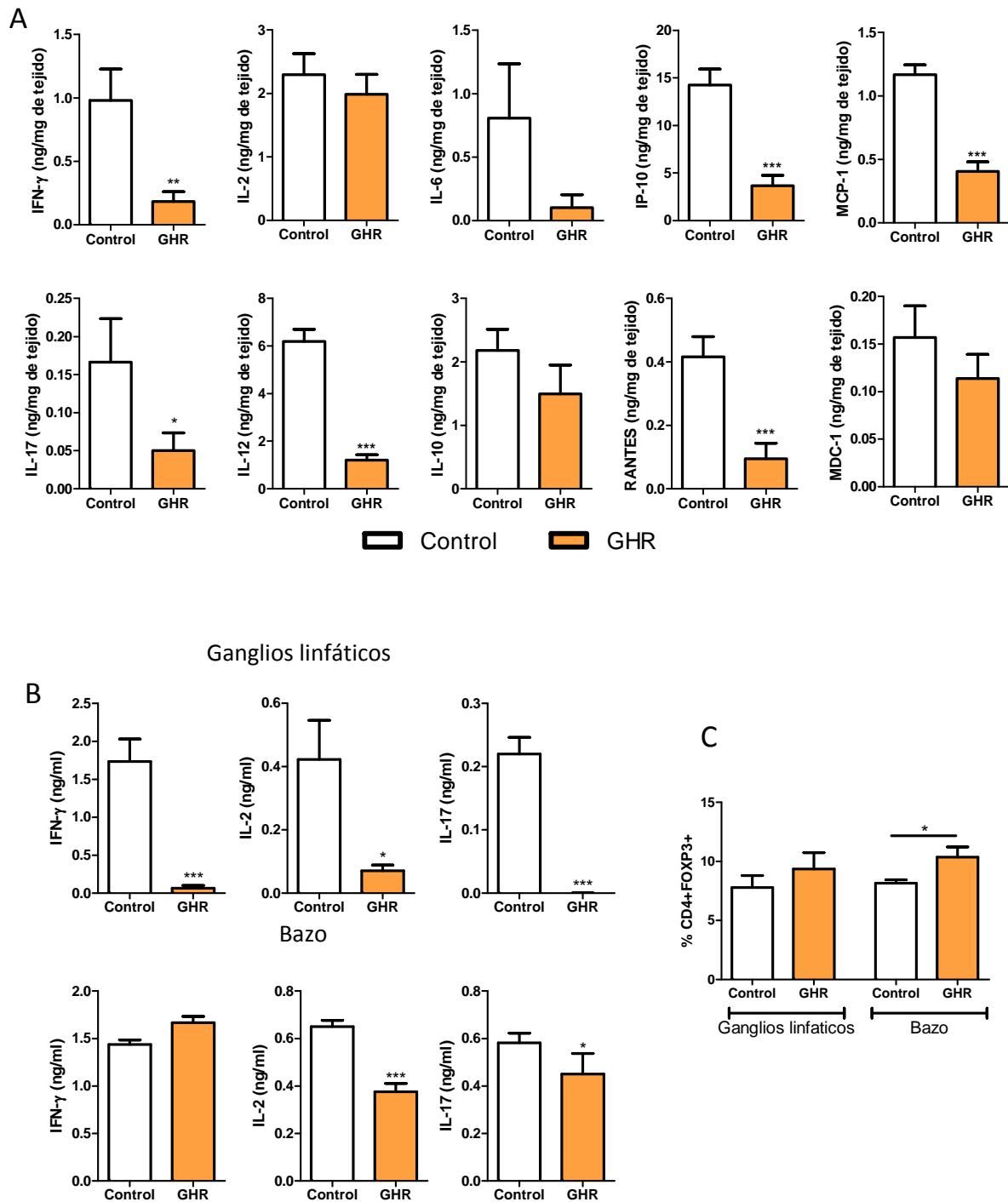


Fig. 4.14 – El tratamiento con GHR reduce la producción de mediadores inflamatorios a nivel local y sistémico en ratones con EAE. La EAE crónica se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6, y a partir del inicio de los signos clínicos se trataron por vía i.p. durante 5 días con GHR (1 nmol /día) o PBS (control). Se determinaron los niveles de citoquinas y quimioquinas en el extracto del parénquima nervioso (A) y en cultivos de células de ganglios linfáticos y bazo (B) mediante ELISA. Valores están representados como media \pm S.E.M, n = 5-6 ratones por grupo *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0001 frente al control.

Los resultados obtenidos hasta ahora demuestran un importante papel de la CST como agente terapéutico en el modelo animal de EAE. A continuación, quisimos comprobar el papel endógeno de este neuropéptido en el desarrollo y progresión de la enfermedad utilizando ratones deficientes en CST (CST-KO).

4.12 - Células inmunes deficientes en CST son más reactivas a estímulos inflamatorios

En primer lugar, quisimos caracterizar el papel de la CST endógena en la respuesta inflamatoria, utilizando células aisladas de ratones CST-KO y células de ratones control (ambos de la cepa C57BL/6J) en respuesta a diferentes estímulos. Por un lado, aislamos macrófagos peritoneales y cultivamos estas células en presencia de un estímulo inflamatorio (LPS). Los macrófagos deficientes en CST presentaron niveles más elevados de los mediadores pro-inflamatorios IL-12, TNF- α , y RANTES. No se observaron diferencias significativas en la producción de IL-6 y óxido nítrico, y hubo una ligera disminución en la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (Figura 4.15A y B). Interesantemente, se observó una mayor supervivencia/actividad metabólica en los macrófagos deficientes de CST comparado con células control (Figura 4.15C). Por otro lado, se aislaron células del bazo y de ganglios linfáticos de ratones CST-KO, y se analizó la capacidad reactiva de estas células frente anti-CD3, un estímulo policlonal inespecífico. Las células aisladas de ratones CST-KO estimuladas produjeron niveles mayores de diversas citoquinas/quimioquinas tanto en células de bazo como en ganglios linfáticos (Figura 4.16A y B), y se observó una mayor proliferación de forma estadísticamente significativa en los cultivos de esplenocitos aislados de ratones CST-KO respecto a las células de ratones control (Figura 4.16C). Previamente se había descrito que monocitos humanos y macrófagos y células dendríticas derivados de monocitos, aumentan significativamente la producción de CST en condiciones de estimulación con LPS, sugiriendo que el aumento de CST en esta situación se debiese a un mecanismo de regulación inmune natural para controlar la inflamación (Dalm, van Hagen et al. 2003). Por tanto, la liberación exacerbada de citoquinas/quimioquinas en células deficientes de CST, confirman la hipótesis de que el neuropéptido endógeno posee un papel inmunomodulador de la respuesta inflamatoria.

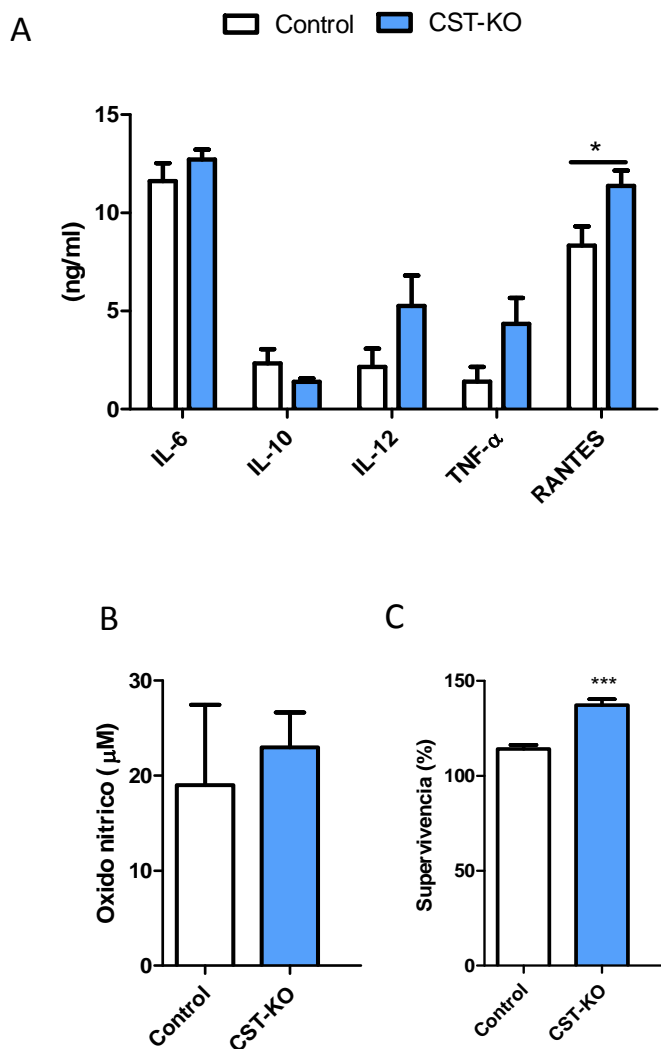


Fig. 4.15 – Perfil de la producción de la respuesta inmune en ratones CST-KO. Se aislaron macrófagos peritoneales de ratones CST- KO y ratones control y se estimularon con LPS (1 μ g/ml) durante 24 horas. La producción de (A) citoquinas se evaluó en sobrenadantes de cultivo por ELISA y (B) los niveles de NO se determinaron por el ensayo colorimétrico de Griess tras la estimulación con LPS. (C) La supervivencia fue evaluada por el ensayo de MTT en los mismos cultivos de los que se recuperaron los sobrenadantes para evaluar el perfil de mediadores inflamatorios. Valores representados como media \pm S.E.M de dos experimentos independientes, n = 5 ratones por grupo *p<0.05 y ***p<0.0001 frente al control

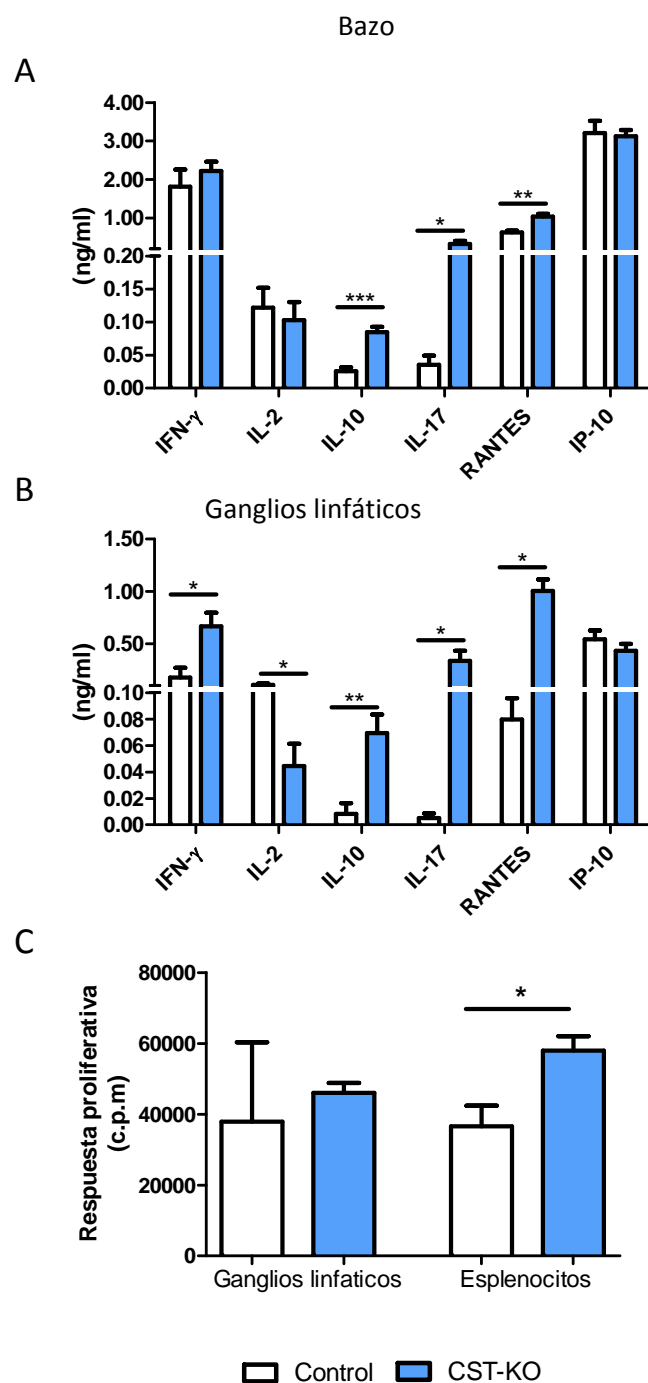


Fig. 4.16 – Perfil de la producción de la respuesta inmune en ratones CST -KO. Se aislaron células de bazo y ganglios linfáticos de ratones CST- KO y ratones control. Se estimularon *in vitro* con anti-CD3 (1 μ g/ml) para evaluar el perfil de la respuesta inmune en ratones CST-KO. La producción de citoquinas en las células de bazo (A) o en las células de ganglios linfáticos (B) se determinó en sobrenadantes tras 48 horas de estimulación mediante ELISA. La proliferación en ambos cultivos se evaluó a las 96 horas tras estimulación con anti-CD3 (C). Se determinó la proliferación mediante la incorporación de timidina tritiada representado en c.p.m. Valores representados como media \pm S.E.M de dos experimentos independientes, n = 8-13 ratones por grupo * p <0.05; ** p <0.005; *** p <0.0001 frente al control

4.13 - Los ratones *CST-KO* son menos susceptibles a la inducción de la EAE

Para entender el posible efecto de la CST endógena en la EM, inducimos el modelo crónico de EAE en ratones *CST-KO*. De forma contraria a los datos esperados, observamos un claro retraso de la aparición de los síntomas, una reducción en la incidencia, y una disminución en la severidad de la enfermedad en comparación con los ratones control durante el desarrollo del modelo (Figura 4.17A). Debido a la similitud estructural y funcional entre la CST y la SOM, nos propusimos estudiar cual sería el desarrollo y progresión de la EAE en ausencia de SOM. Para esto, generamos EAE crónica en ratones deficientes en SOM, y observamos que estos ratones presentaban una mayor susceptibilidad en el desarrollo y progresión de la enfermedad (Figura 4.17B). Estos resultados sugieren que la menor susceptibilidad a la EAE es una característica relacionada específicamente con la ausencia de CST.

Para corroborar los resultados de la observación clínica y comprobar los mecanismos de acción implicados en la resistencia a desarrollar la enfermedad en los ratones deficientes en CST, se llevó a cabo el análisis histológico de la médula espinal de ratones *CST-KO* con EAE. La tinción rápida con azul de Luxol por el método de Kluver- Barrera reveló la presencia de áreas de desmielinización a lo largo de la médula espinal de ratones *CST-KO*, aunque en menor número que en los controles (Figura 4.18A-B). Este resultado se confirmó con la expresión de MBP por inmunohistoquímica y por el análisis cuantitativo del número de placas (Figura 4.18C). Además, se observó cierta infiltración en los ratones *CST-KO*, aunque en menor grado que en los controles. En resumen, los ratones *CST-KO* presentaron una resistencia imprevista de la EAE inducida por MOG, que se reflejó en un perfil de EAE clínica más moderada con reducción de los signos histopatológicos de la enfermedad.

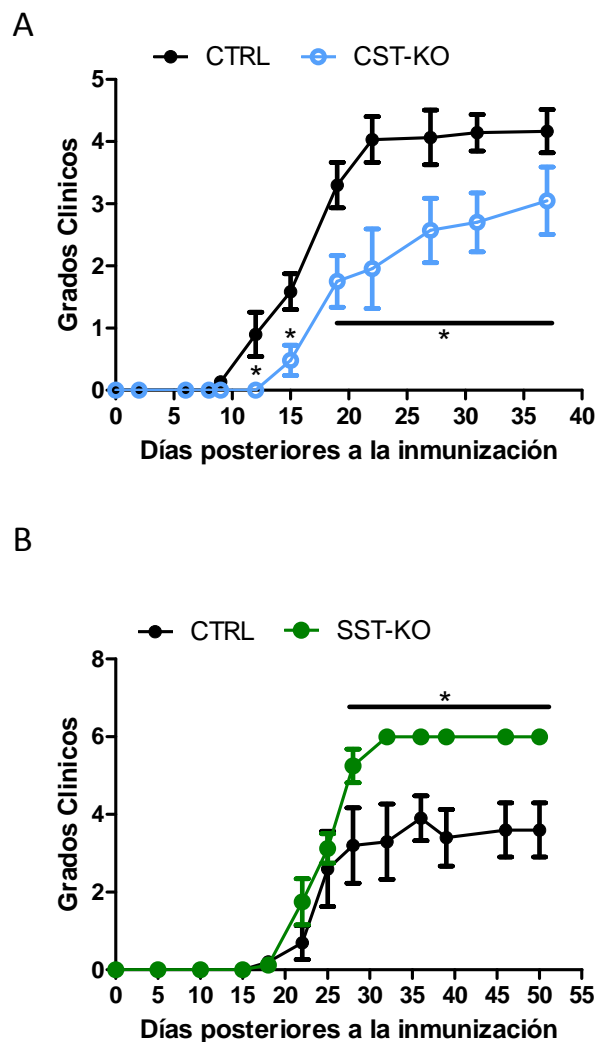


Fig. 4.17 – Ratones deficientes en CST son más resistentes al desarrollo de la EAE. La EAE crónica se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones control, ratones CST-KO (A) y ratones SST-KO (B), todos ellos en el fondo genético de C57BL/6. Los signos clínicos de la enfermedad se evaluaron como se describe en Materiales y Métodos. * $p < 0.05$ en comparación con ratones control. Los valores se representan como media \pm S.E.M, $n = 25-35$ ratones por grupo de EAE en (A) y $n = 4$ en (B).

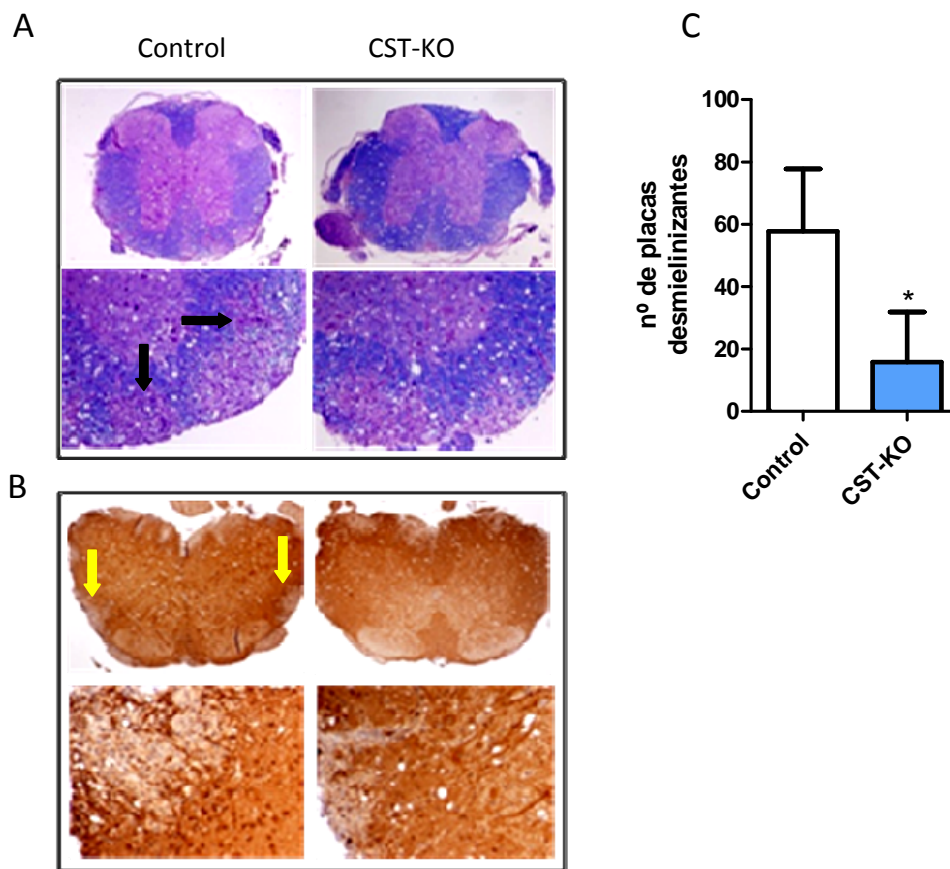


Fig. 4.18 – Análisis histopatológico del desarrollo de EAE en ratones deficientes en CST. La EAE crónica se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones control y en ratones CST-KO. 23 días después de la inmunización se extrajo la médula espinal diferenciándose la región lumbar. Secciones transversales de las muestras de médula de cada grupo seleccionadas al azar se tiñeron con azul rápido de Luxol más hematoxilina (A) (para evaluar la desmielinización e infiltración) y con anti-MBP (B). En detalle se muestra una sección histológica representativa de cada grupo donde se observan áreas de infiltración leucocitaria (flechas negras) y las áreas de desmielinización (flechas de color amarillo). (C) El número de placas desmielinizantes se contó aleatoriamente en varias secciones transversales. Valores representados de n = 5 ratones por grupo. *p<0.05 en comparación con ratones control. Visión general de las médulas: aumento 40x; detalle en (A): aumento 100x; detalle en (B): aumento 200x

4.14 - Los ratones CST-KO no disminuyen *ex vivo* la respuesta autoreactiva de células T en el modelo de EAE

A pesar de presentar una menor susceptibilidad al desarrollo de la EAE, los ratones CST-KO tuvieron órganos linfoides incluso de mayor tamaño que los controles después de la administración con MOG, sugiriendo una fuerte respuesta inmunológica (Figura 4.19A). Estos resultados se correlacionan con los resultados anteriores que demostraron que las células linfoides de estos ratones exhibieron un aumento en la respuesta inmune frente a un estímulo inespecífico (Figura 4.16), respecto a la respuesta de células aisladas de ratones control. Para comparar la respuesta de las células T en los ratones control y CST-KO durante la progresión de la EAE, realizamos ensayos *ex vivo* en diferentes momentos del desarrollo de la enfermedad. Para esto, se aislaron células de ganglios linfáticos y del bazo a los 15 y 23 días después de la inmunización (coincidiendo con el inicio de los síntomas y el desarrollo de la fase efectora, respectivamente), y se re-estimularon *in vitro* con MOG. Es de destacar que en el momento de la toma de muestras, tanto en el día 15 como en el día 23, los ratones CST-KO presentaban una reducción significativa de los síntomas de la EAE comparado con los controles (Figura 4.19B) En el ensayo de proliferación, observamos que los esplenocitos aislados de ratones CST-KO en el día 23 presentaron una menor capacidad autorreactiva, Sin embargo, células de los ganglios linfáticos de estos ratones son capaces de responder de manera similar o más potente a MOG comparado con células del grupo control (Figura 4.19C). Interesantemente, células de bazo y ganglios linfáticos aisladas de ratones CST-KO, produjeron niveles similares o más elevados de diversas citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, como IFN- γ , IL-17, OPN, IP-10 y Rantes (Figura 4.19 D y E). Además, no encontramos diferencias significativas en la producción de autoanticuerpos específicos para MOG entre ratones CST-KO y ratones control (Figura 4.19F). En resumen, a pesar de la menor susceptibilidad a desarrollar EAE, los ratones CST-KO inmunizados con MOG presentan células inmunocompetentes y altamente autoreactivas capaces de responder de forma específica al antígeno de manera similar a los ratones control enfermos.

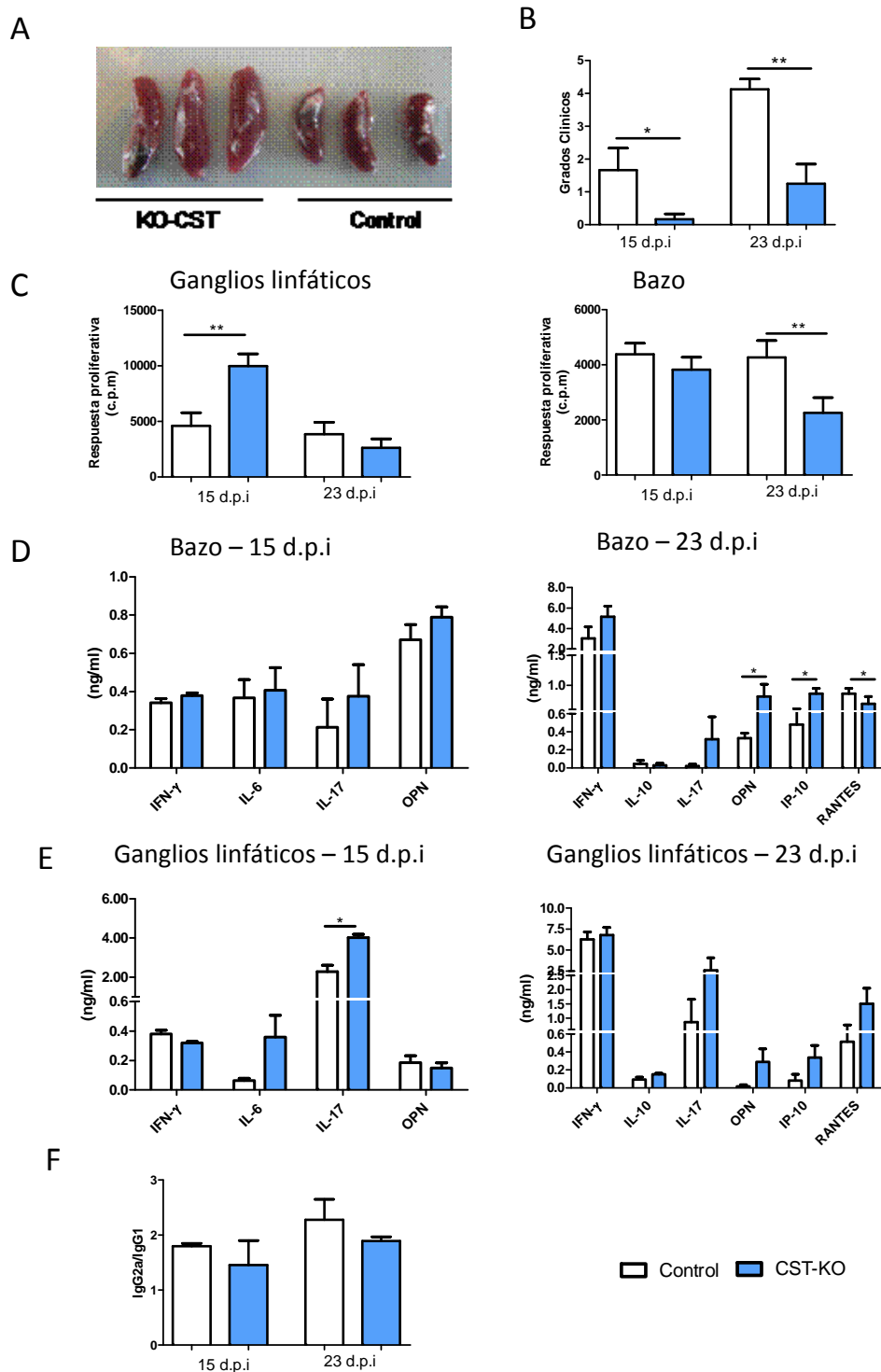


Fig. 4.19 – Ratones CST-KO inmunizados con MOG presentan una respuesta inflamatoria autorreactiva similar a los controles con EAE. La EAE crónica se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones control y en ratones CST-KO. (A) Fotografías de los bazo extraídos el día 23 después de la inmunización (d.p.i) de ratones control y CST-KO, en los que se muestra el tamaño relativo de los mismos. (B) Grados clínicos de los animales de los que se extraen las muestras. Se aislaron células de ganglios linfáticos y bazo a los 15 y 23 d.p.i y se re-estimularon in vitro con MOG₃₅₋₅₅ (15 μ M). Se evaluó la respuesta inducida mediante la proliferación y la producción de citoquinas. (C) La proliferación en ambos cultivos se evaluó a las 96 horas tras estimulación con anti-CD3 mediante incorporación de timidina tritiada. Los niveles de citoquinas y quimioquinas producidos por células del bazo (D) y de los ganglios linfático (E) se determinaron por ELISA en los sobrenadantes después de 48 h de estimulación con MOG (F) Los niveles de IgG específicos para MOG (IgG1 e IgG2a) se determinaron por ELISA. Los valores se representan como media \pm S.E.M, n = 3-4 ratones por grupo *p<0.05, **p<0.005, frente al control

4.15 - Estudios de transferencia adoptiva indican que la resistencia de los CST-KO al desarrollo de la EAE parece residir intrínsecamente en los propios CST-KO.

Los resultados anteriores indican que las células T de ratones CST-KO inmunizados con MOG muestran un fenotipo pro-inflamatorio y responden a la re-exposición a MOG en un ensayo *ex vivo* (Figura 4.19). Por lo tanto, nos interesó determinar si estas células serían capaces de inducir la enfermedad en ratones *naïve* en un modelo de transferencia adoptiva de la EAE. Para esto, se aislaron células de los ganglios linfáticos y bazo de ratones CST-KO y de ratones control el día 15 p.i con MOG. Se volvieron a estimular con MOG durante tres días *in vitro*, y luego se transfirieron estas células a ratones *naïve* o ratones CST-KO. Como era de esperar, la transferencia de células de ratones control con EAE indujo la enfermedad en ratones sanos, con aparición de los primeros síntomas en aproximadamente 7 días y con una progresión continua hacia grados más severos. Del mismo modo, cuando las células de ratones CST-KO se transfirieron a ratones control sanos, estos receptores desarrollaron la EAE, con una relativa antelación en la aparición de los primeros síntomas en relación a los controles y con una progresión ligeramente más severa (lo que corroboraba la hipótesis relacionada con la función inmunomoduladora de la CST). En contraste, cuando las células procedentes de ratones control con EAE se transfirieron a ratones CST-KO sanos, estos receptores desarrollaron al principio una forma leve de la enfermedad, con posterior regresión de los síntomas en la mayoría de los ratones (Figura 4.20). Estos resultados demostraron que las células encefalitogénicas inmunocompetentes aisladas de los ratones con EAE no son capaces de desarrollar una respuesta autoinmune en el SNC de ratones CST-KO. En cambio, las células de los ratones CST-KO enfermos dieron lugar al desarrollo y progresión de la enfermedad en receptores sanos. Por tanto, estos datos sugieren que la resistencia en los ratones CST-KO en desarrollar la enfermedad no reside en la activación inicial de las células T en los ganglios linfáticos y en el bazo, sino en procesos relacionados con las etapas subsiguientes de la EAE, y que parecen estar controlados de manera diferencial por los ratones CST-KO.

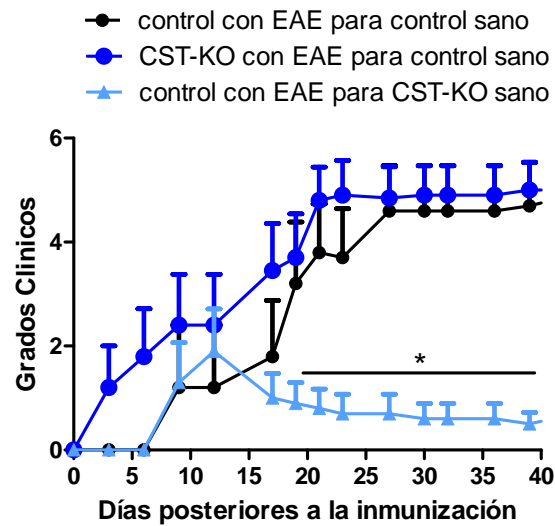


Fig. 4.20 – La transferencia de células encefalitogénicas aisladas de ratones control fallan en inducir la EAE en ratones CST-KO. La EAE crónica se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones control y en ratones CST-KO. El día 15 p.i se aislaron células de ganglios linfáticos y bazo y se cultivaron en presencia de MOG (15 μ M) durante 3 días. La transferencia adoptiva de la enfermedad se hizo por inyección i.p de las células estimuladas *in vitro*. Se recuperaron las células (12.5×10^6) y se inyectaron en ratones sanos controles y CST-KO. Los signos clínicos de la enfermedad se evaluaron como se describe en Materiales y Métodos. * $p < 0.05$ en comparación con ratones controles. Valores representados como media \pm S.E.M, n = 5-10 ratones por grupo

Debido al efecto inesperado en la susceptibilidad para desarrollar EAE en ratones CST-KO, decidimos ampliar los objetivos de nuestro estudio y evaluar la susceptibilidad de los ratones CST-KO en otros modelos diferentes de enfermedades inflamatorias y autoinmunes como en la artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, sepsis, y artritis monoarticular.

4.16 - Ratones CST-KO son menos susceptibles al desarrollo de la artritis reumatoide, la colitis inducida por TNBS y la sepsis inducida por ligación y punción cecal

4.16.1 - Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, de etiología desconocida, que origina la inflamación crónica de las articulaciones y posterior destrucción del cartílago y la erosión del hueso. Las etapas iniciales de la AR implican varios pasos, que se dividen en dos grandes fases: la iniciación y el establecimiento de la autoinmunidad y los acontecimientos posteriores relacionados con la evolución de la respuesta inflamatoria. Aunque la contribución de la respuesta Th1 en la AR sigue siendo un tema de debate, varios estudios realizados en modelos animales indican un papel patogénico de citoquinas derivadas de Th1 en esta enfermedad (Feldmann, Brennan et al. 1996; Brand, Kang et al. 2003). Los niveles excesivos de mediadores inflamatorios, producidos por la infiltración de células inflamatorias Th1 juegan un papel crítico en el daño de las articulaciones.

En trabajos anteriores, nuestro grupo demostró que el tratamiento con CST en un modelo animal de AR, el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA, del inglés, *collagen-induced arthritis*), reducía significativamente la severidad, incidencia y progresión de la enfermedad, inhibiendo por completo la inflamación de las articulaciones y la destrucción de cartílago y hueso. El efecto terapéutico de CST se asoció con una reducción notable en los dos componentes nocivos de la enfermedad, es decir la respuesta Th1 autoinmune y la respuesta inflamatoria. CST inhibió la producción de varias citoquinas y quimioquinas inflamatorias, inhibió la expansión de células Th1 antígeno-específico, e indujo la producción de citoquinas reguladoras, como la IL-10 y TGF- β . En este modelo, se demostró que la CST

afectó las células sinoviales tanto a través de los receptores de SOM como de la GHR. (Gonzalez-Rey, Chorny et al. 2007).

En vista del potente efecto terapéutico de CST en el modelo de artritis, nos propusimos investigar la inducción de CIA en ratones deficientes en CST. La inducción de artritis en ratones normalmente requiere animales susceptibles (DBA/1J), sin embargo los ratones deficientes de CST están generados en la cepa C57BL/6, por lo que desarrollamos el modelo en estos ratones con algunas modificaciones. Así, observamos que la deficiencia en CST originaba un retraso en la incidencia y progresión de la enfermedad (Figura 4.21A). Además, los ratones deficientes en CST presentaron signos clínicos leves en los primeros días de la enfermedad en comparación con los controles. Sin embargo, estas diferencias no se mantuvieron en tiempos más tardíos de la enfermedad llegando a igualarse con la severidad presente en los controles (Figura 4.21B y C).

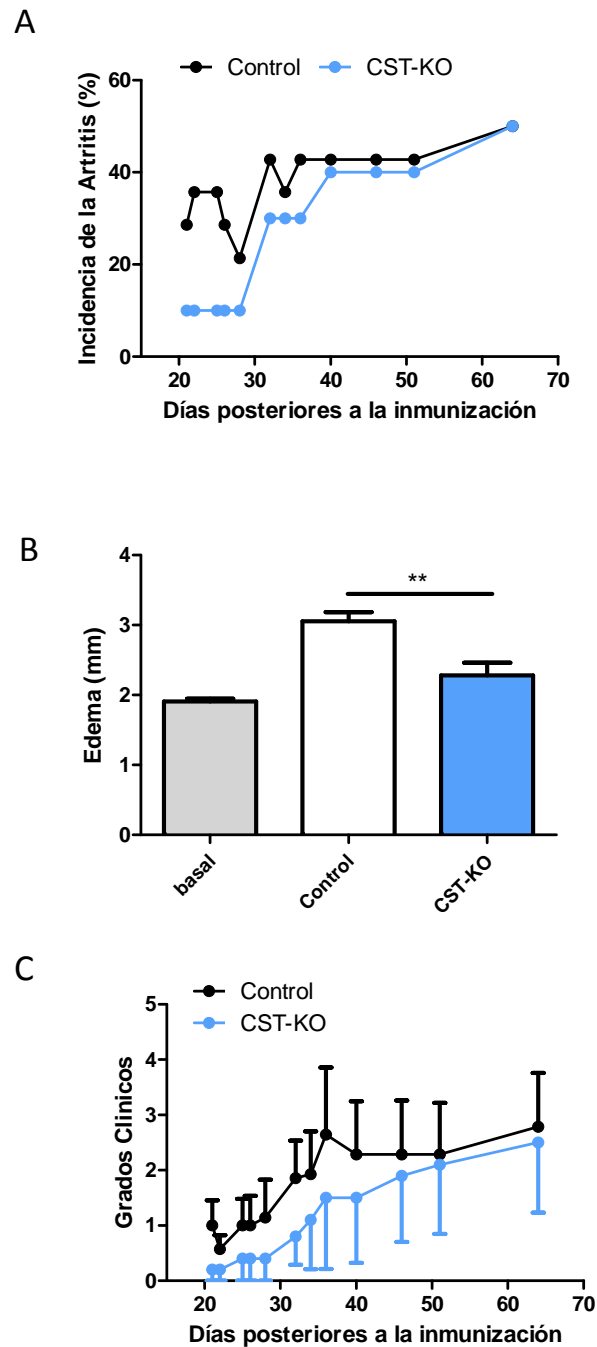


Fig. 4.21 – Ratones CST-KO presentan un retraso en el desarrollo de la AR. Se indujo la AR por inyección s.c. de colágeno tipo II en los ratones controles y CST-KO. (A) La incidencia y la gravedad de la artritis en ratones CST-KO se retrasó en comparación con los controles. (B) Se evaluó la inflamación articular mediante la medida del edema en las articulaciones utilizando un calibre digital. El basal es la medida de la articulación de un ratón *naïve* (C) La evolución clínica de la enfermedad se llevó a cabo visualmente utilizando parámetros clínicos como se describe en materiales y métodos. Cada miembro fue calificado hasta una puntuación máxima posible de 16 por animal. Los valores representan la media \pm S.E.M, n = 10-14 ratones por grupo **p<0.005, frente al control

4.16.2 - Enfermedad inflamatoria intestinal: Enfermedad de Chohn

La enfermedad de Crohn (EC) es una enfermedad autoinmune que conlleva una inflamación crónica incurable, con una serie de síntomas gastrointestinales y extra-intestinales, incluyendo dolor abdominal, sangrado rectal, diarrea, pérdida de peso, trastornos en los ojos y en la piel y retraso en el crecimiento y la maduración sexual en los niños (Rev. Gastroenterol. Disord. 3, 81–92, 2003). Aunque su etiología sigue siendo desconocida, existen evidencias circunstanciales para vincular la EC a un fallo del sistema inmune de la mucosa para atenuar la respuesta inmune frente a antígenos endógenos (Fiocchi 1998). El modelo más utilizado para estudiar esta enfermedad es el modelo de colitis-inducida por TNBS (2,4,6-trinitrobenceno sulfónico). Este modelo muestra características clínicas, histopatológicas e inmunológicas muy similares al desarrollo de la EC humana. En este modelo, la inducción de la autoinmunidad se realiza mediante la administración vía rectal de TNBS en una solución alcohólica, lo que provoca una ruptura de la barrera epitelial permitiendo el acceso del TNBS a la lámina propia intestinal, donde actúa como un hapteno activando una respuesta autoinmune frente a antígenos propios de la mucosa intestinal. De manera similar a la EC humana, la colitis inducida por TNBS está marcada por una respuesta inmune exagerada asociada al intestino, dando lugar a una prolongada y severa inflamación caracterizada por la producción incontrolada de citoquinas inflamatorias y expansión y activación de células T CD4 asociadas con una respuesta Th1 (Strober, Fuss et al. 2002).

Nuestro grupo demostró recientemente que el tratamiento con CST mejora la gravedad clínica e histopatológica de la colitis inflamatoria, inhibiendo la pérdida de peso, diarrea e inflamación, con un consecuente aumento de la supervivencia. El efecto terapéutico de CST en este modelo se asoció con una reducción de la respuesta inflamatoria autoinmune Th1, incluyendo la inhibición de un amplio espectro de mediadores inflamatorios. Además, se demostró la participación de las células T reguladoras secretoras de IL-10 inducidas por CST en el efecto terapéutico de este neuropéptido. Es importante destacar que el tratamiento con CST fue eficaz en la colitis establecida y evitó la recurrencia de la enfermedad. Este trabajo sugiere que CST es un factor anti-inflamatorio con capacidad para desactivar la inflamación intestinal y regular la pérdida de tolerancia (Gonzalez-Rey, Varela et al. 2006).

Considerando estos resultados, y teniendo en cuenta la sorprendente menor susceptibilidad en ausencia de CST al desarrollo de la EAE y la AR, enfermedades autoinmunes con un componente inflamatorio importante, quisimos comprobar el papel endógeno de la CST también en este modelo. Así, observamos que, tras sucesivas administraciones de TNBS, los ratones CST-KO presentaron una pérdida de peso menor que los ratones control, y tuvieron una mayor tasa de supervivencia (Figura 4.22A y B). En contraste con el modelo de CIA, la menor susceptibilidad de los ratones CST-KO es más evidente en tiempos más tardíos (Figura 4.22A y C). En conjunto con los resultados obtenidos en el modelo de EAE y CIA, los resultados en el modelo de TNBS corroboran el hecho de que, al contrario de lo que inicialmente se podía pensar en base a las propiedades inmunoreguladoras de la CST, la deficiencia de este neuropéptido se traduce en una menor susceptibilidad en modelos de enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

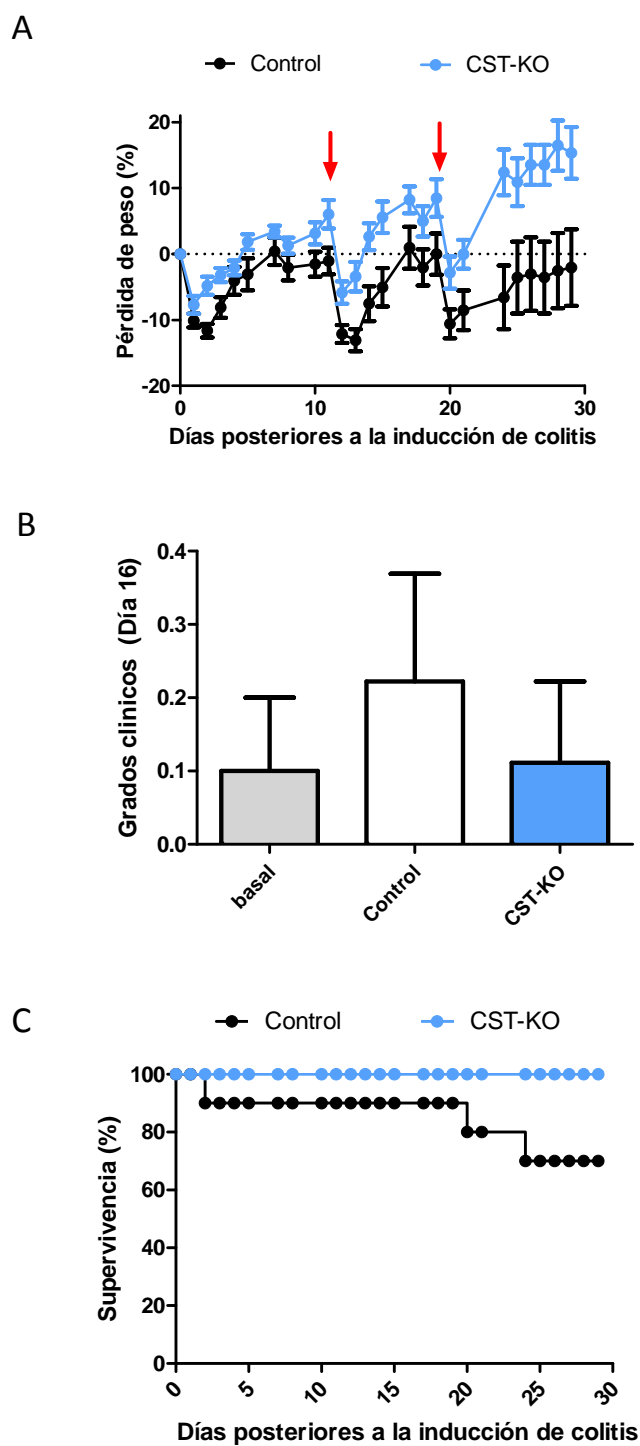


Fig. 4.22 – Ratones CST-KO presentan una menor susceptibilidad a la inducción de colitis por TNBS. Se indujo colitis mediante la administración intrarectal de TNBS (3mg/ratón) en 50% de ETOH. Las flechas indican los momentos de administración de TNBS a lo largo del tiempo de estudio. La evolución clínica y la gravedad se evaluaron en función de los cambios del peso corporal respecto al peso inicial/ratón (A), grados clínicos evaluando consistencia y aspecto de las heces (B), según se describe en materiales y métodos, y supervivencia (C). Valores representados como media \pm S.E.M, n = 10 ratones por grupo * $p < 0.05$, frente al control

4.16.3 - Sepsis

La sepsis es una condición inflamatoria aguda grave causada por una infección sistémica que generalmente conduce a la muerte por el fallo múltiple de distintos órganos. La patología surge tras la presencia de niveles excesivos de endotoxinas bacterianas, que conlleva una hiper-activación de la inmunidad innata (Danner, Elin et al. 1991). Los macrófagos son células efectoras críticas en la respuesta inmune frente a la sepsis. Estas células juegan un papel importante en este proceso mediante la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12, y quimioquinas como MCP-1 o MIP-1 α , que promueven el reclutamiento de leucocitos a los tejidos dañados (Jean-Baptiste 2007). Asociados a la producción de citoquinas pro-inflamatorias, se sintetizan otros mediadores por células inmune que contribuyen al desarrollo y la intensificación de la sepsis, tales como: a) las especies reactivas del oxígeno, que dañan la membrana celular, causando la muerte por necrosis, b) el óxido nítrico, el cual conduce a problemas en el miocardio, c) los eicosanoides, tales como la prostaglandina E2 e I2 (PGE2 y PGI2, respectivamente) y tromboxano A2 (TXA2) que causan la vasodilatación, la agregación plaquetaria, la migración de los neutrófilos y un aumento de la permeabilidad vascular (Lopez-Bojorquez, Dehesa et al. 2004). La producción excesiva de mediadores inflamatorios genera la activación sistémica, que afecta a la permeabilidad vascular y a la función cardíaca e induce cambios metabólicos que pueden conducir a la necrosis de los tejidos y, posteriormente, a la muerte.

Nuestro grupo ha demostrado que la administración de CST protege contra la letalidad inducida por el lipopolisacárido bacteriano de bacterias Gram-negativas (LPS). Además, CST aumentó la supervivencia en dos modelos animales más cercanos a la sepsis humana, como en un modelo de ligación cecal (CLP, del inglés *cecal ligation and puncture*) y tras la inyección de *E. coli*. El efecto terapéutico de la CST se asoció con una disminución en los niveles locales y sistémicos de un amplio espectro de mediadores inflamatorios, incluyendo citoquinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , e IL-12), quimioquinas (MIP-2 y RANTES) y proteínas de fase aguda. El hecho de que CST presentase efectos inhibitorios sobre la liberación de mediadores inflamatorios por macrófagos peritoneales *in vitro* sugiere que la desactivación de las células residentes y los macrófagos infiltrados podrían ser el mecanismo principal de acción anti-inflamatoria de CST (Gonzalez-Rey, Chorny et al. 2006).

A pesar de las diversas demostraciones de las acciones inmunoregulatoras de CST en diferentes modelos inflamatorios autoinmunes, hemos observado un efecto controvertido en ratones deficientes de CST. Por lo tanto, nos propusimos estudiar cual sería el efecto de la ausencia de CST en un modelo principalmente inflamatorio, como es el caso de CLP. Este modelo se realizó tanto en hembras como en machos, y se encontró que ambos géneros de ratones deficientes en CST presentaron una supervivencia al procedimiento de CLP mayor que la de ratones control (Figura 4.23A). Interesantemente, las hembras CST-KO presentaron una supervivencia mayor que los machos CST-KO, todas las veces en que se repitió el experimento, lo que sugería la posibilidad de que algún factor hormonal relacionado con la diferencia entre sexos pudiera influir en esa diferencia. Analizando los niveles de citoquinas/quimioquinas a nivel local (en la suspensión peritoneal, Figura 4.23B) y sistémico (en suero, Figura 4.23C), observamos una ligera reducción en los niveles de IL-6 y TNF- α , factores clave del desarrollo del proceso inflamatorio en CLP. Destacó principalmente, en las muestras extraídas de los CST-KO, la reducción significativa en los niveles de RANTES, quimioquina asociada con el reclutamiento de células inflamatorias a los órganos diana, relacionadas con la amplificación del proceso de sepsis. Por otro lado, destaca la bajada en los niveles de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en los ratones CST-KO, citoquina normalmente asociada con un fenotipo protector en sepsis.

Curiosamente, las células peritoneales aisladas de ratones CST-KO sometidos a CLP produjeron los mismos niveles de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- α e IL-6, que los ratones controles después de 48h en cultivo (Figura 4.24). Resulta interesante que la producción de IL-10 e IP-10, que se había mostrado disminuida en la suspensión peritoneal y suero, sufrió un restablecimiento/ incremento a tiempos más tardíos *in vitro*. (Figura 4.24). Anteriormente demostramos que, macrófagos peritoneales aislados de ratones CST-KO y estimulados con LPS *in vitro*, presentaron un perfil de producción de citoquinas/quimioquinas inflamatorias similar o exacerbado comparado con células de ratones controles (Figura 4.15). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la mayor supervivencia observada tras el procedimiento de CLP en los ratones CST-KO se relacionó con una disminución en los niveles de mediadores inflamatorios clave en el proceso de sepsis como TNF- α , IL-6, RANTES e IP-10, tanto a nivel local como sistémico. Sin embargo, este efecto no está relacionado con una desactivación de las células inmunes, ya que macrófagos aislados de

ratones CST-KO sometidos a CLP producen niveles similares o superiores de dichos mediadores inflamatorios en comparación con los controles.

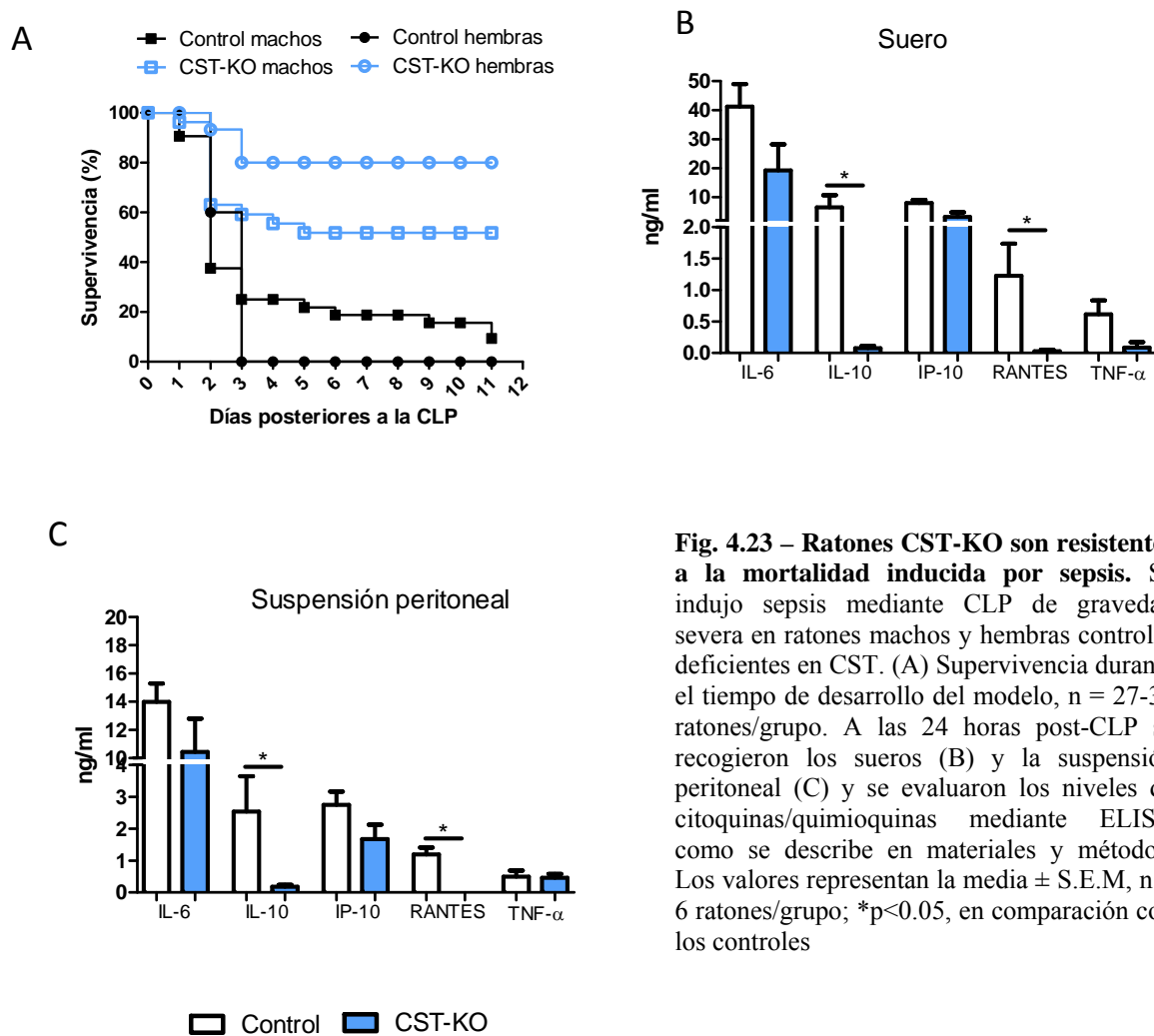


Fig. 4.23 – Ratones CST-KO son resistentes a la mortalidad inducida por sepsis. Se indujo sepsis mediante CLP de gravedad severa en ratones machos y hembras control y deficientes en CST. (A) Supervivencia durante el tiempo de desarrollo del modelo, $n = 27-35$ ratones/grupo. A las 24 horas post-CLP se recogieron los sueros (B) y la suspensión peritoneal (C) y se evaluaron los niveles de citoquinas/quimioquinas mediante ELISA como se describe en materiales y métodos. Los valores representan la media \pm S.E.M, $n = 6$ ratones/grupo; * $p < 0.05$, en comparación con los controles

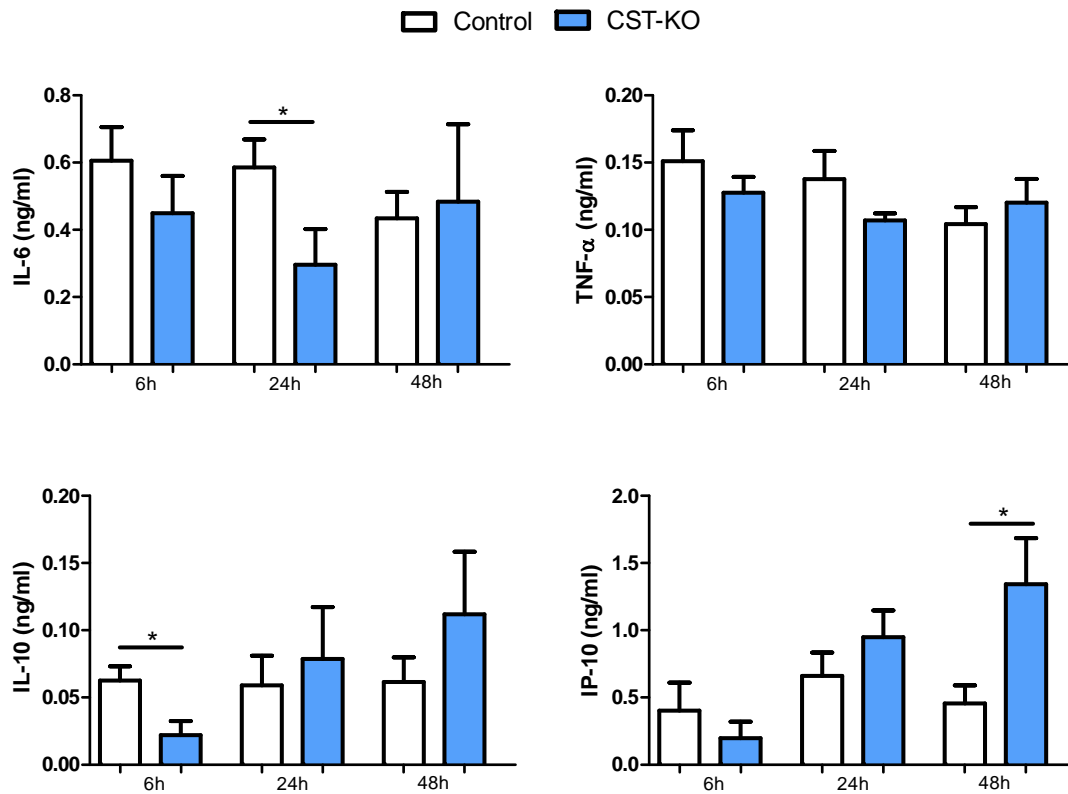


Fig. 4.24 – Las células peritoneales de ratones CST-KO con sepsis no presentan ningún defecto intrínseco en la producción de citoquinas. Se indujo sepsis mediante CLP de gravedad severa en ratones machos y hembras control y CST-KO. Dos días después de la cirugía se aislaron las células peritoneales de cada grupo experimental y se cultivaron en medio DMEM completo. Los sobrenadantes se recogieron a las 6, 24, y 48 horas desde el inicio del cultivo. Los niveles de citoquinas/quimioquinas se determinaron mediante ELISA. Valores representados como media \pm S.E.M, n = 3 ratones por grupo; * $p < 0.05$, en comparación con los controles

4.17 - Los ratones CST-KO presentan alteraciones en el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA)

En conjunto, nuestros resultados indican que la CST es un agente inmunomodulador efectivo desde el punto de vista terapéutico en diferentes procesos inflamatorios y autoinmunes. Sin embargo, los ratones deficientes en CST son capaces de controlar el desarrollo y progresión de procesos inflamatorios así como el desarrollo de autoinmunidad. Aún así, células aisladas de estos ratones tanto en condiciones basales estimulados *in vitro* de forma específica, como aislados de ratones en los que se induce un modelo concreto, fueron más autoreactivas, generando niveles mayores de citoquinas/quimioquinas inflamatorias y Th1-Th17, en comparación con células en las mismas condiciones aisladas de ratones control. Llegados a este punto nos preguntamos: ¿cómo podríamos explicar este efecto paradójico de la CST?

Un mecanismo anti-inflamatorio endógeno ampliamente estudiado son las acciones de los glucocorticoides en el sistema inmunológico. Los glucocorticoides son hormonas esteroideas que juegan un papel fisiológico fundamental en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas. Diferentes estudios han demostrado además que los glucocorticoides son potentes anti-inflamatorios capaces de modular diversos mecanismos del sistema inmunológico. De hecho, los glucocorticoides sintéticos son fármacos ampliamente utilizados como anti-inflamatorios o inmunosupresores en el tratamiento de múltiples patologías autoinmunes. Por lo tanto, determinamos los niveles de glucocorticoides en los ratones CST-KO. Para esto se evaluó los niveles de corticosterona, el principal glucocorticoides producido en roedores. En este trabajo pudimos comprobar que los ratones CST-KO presentan mayores niveles de corticosterona que los ratones control (Figura 4.26). Estos resultados están de acuerdo con el trabajo de Córdoba-Chacón y colaboradores que, durante el desarrollo de esta tesis doctoral, demostraron que ratones CST-KO presentaban niveles elevados de corticosterona frente a ratones control (Cordoba-Chacon, Gahete et al. 2011).

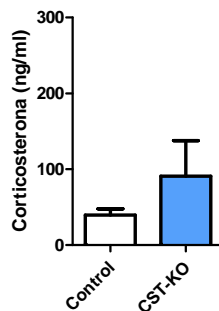


Fig. 4.25 – Los ratones CST-KO presentan niveles elevados de corticosterona en la circulación. Tras obtención de la sangre por decapitación de los animales y obtención de los sueros, se determinaron los niveles de corticosterona circulante en ratones CST-KO y controles en condiciones basales mediante ELISA comercial. Los valores se representan como media \pm S.E.M, n = 5 ratones/grupo.

4.18 - Los ratones CST-KO presentan un estado de ansiedad elevado

Se sabe que el estrés, la ansiedad y el miedo están íntimamente ligados a una elevación de los niveles de glucocorticoides. Tensiones psicológicas pueden modular la función de células inflamatorias y la respuesta inmunológica y hormonal a través de vías neuronales que enlazan el sistema nervioso y el sistema inmunológico. La respuesta más característica frente a una condición estresante es la liberación de la hormona corticotropina (ACTH) y glucocorticoides en la circulación sanguínea como resultado de la activación del eje HPA.

Los niveles elevados de corticosterona bajo condiciones basales de mantenimiento de los ratones CST-KO, sugiere un estado de estrés crónico de estos ratones. De hecho, durante los experimentos con los ratones CST-KO, observamos ciertas alteraciones en su comportamiento comparados con los ratones controles, lo que nos llevó a realizar dos ensayos distintos de análisis de conducta para evaluar el nivel de ansiedad de estos ratones determinando los efectos de la ausencia de CST endógena en condiciones basales sobre el comportamiento: test del laberinto elevado en cruz y en el test de campo abierto.

En el ensayo del laberinto elevado en cruz, los ratones se sitúan en el centro del cruce entre los brazos cerrados y los brazos abiertos. Este modelo se basa en la aversión de los roedores a los espacios abiertos y utiliza los conflictos entre la exploración y la aversión a la elevación y a los lugares abiertos para evaluar la ansiedad. La preferencia por estar en los brazos abiertos más que en los brazos cerrados se asocia con un nivel más bajo de ansiedad. En este contexto, el número de entradas en los brazos abiertos fue significativamente menor en los ratones CST-KO durante todo el ensayo (Figura 4.25A). También observamos diferencias entre ratones CST-KO y controles en el tiempo de exploración de los brazos

abiertos. En condiciones basales, los ratones CST-KO pasaron menos tiempo en los brazos abiertos que los ratones controles (Figura 4.25B).

En el ensayo de campo abierto, la evaluación se efectúa en una caja cuadrada blanca de plexiglás. Se coloca el ratón en la arena, y se les deja moverse libremente durante 10 minutos. En este caso tras la colocación del animal en un ambiente desconocido con paredes circundantes, la tendencia a permanecer en la periferia del campo sin entrar en el centro se interpreta como un comportamiento ansioso de ansiedad. Los ratones CST-KO pasaron más tiempo explorando las zonas periféricas que los ratones control (Figura 4.25C). Estos resultados demuestran que los ratones CST-KO presentaron un nivel de ansiedad elevado en condiciones basales, es decir, en ausencia de un factor externo estresante.

El hecho de que ratones CST-KO muestren un estado de ansiedad elevada en condiciones basales, justifica los niveles elevados de corticosterona en la circulación de estos ratones. En conjunto, el estado crónico de ansiedad y el aumento de corticosterona sugieren un posible papel de los glucocorticoides en la resistencia a los modelos inflamatorios autoinmunes realizados en CST-KO.

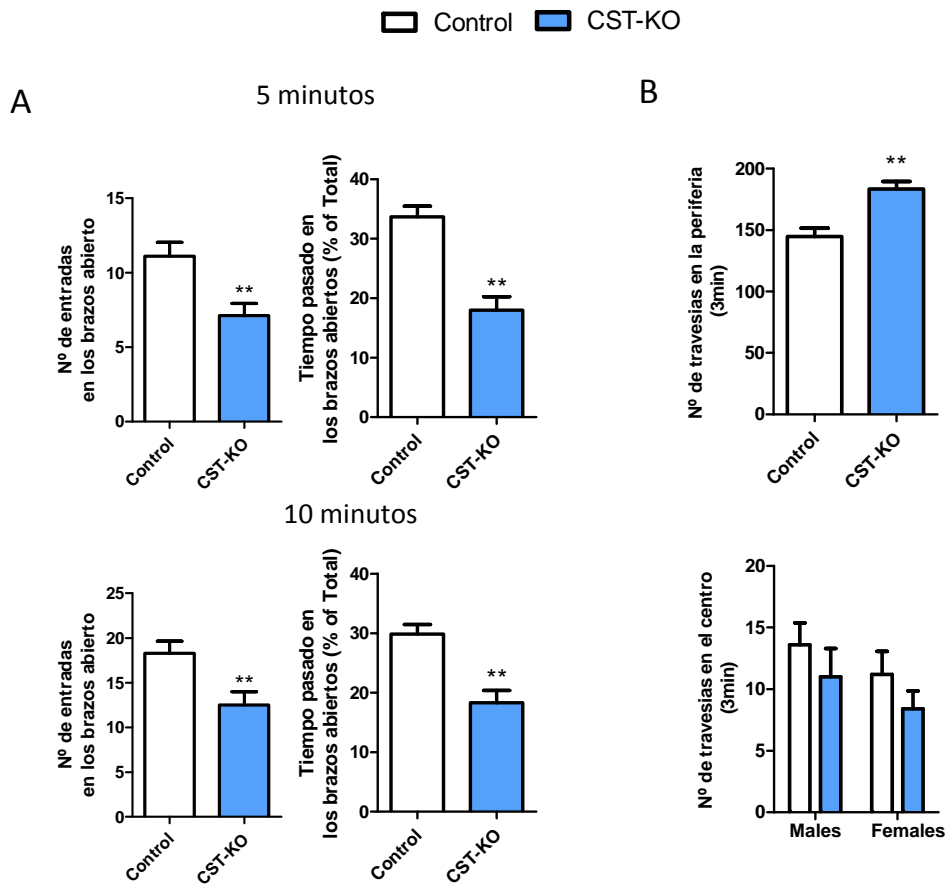


Fig. 4.26 – La deficiencia de CST endógena induce un estado elevado de ansiedad basal. Se analizó el comportamiento de los ratones CST-KO y controles en condiciones basales en el test del laberinto elevado en cruz y en el de campo abierto. (A) En el test de laberinto elevado en cruz se evaluó el número de entradas y el tiempo pasado en los brazos abiertos en estado basal durante los 5 y 10 primeros minutos. Los ratones CST-KO (barra azul) entran un menor número de veces y pasan un tiempo significativamente menor en los brazos. No se observaron diferencias entre machos y hembras en cada grupo. (B) El test de campo abierto se evaluó el tiempo que los ratones pasan en las zonas periféricas y el número de veces que cruzan el centro de la caja. Se han representado los valores correspondientes a los tres primeros minutos del test. Los ratones CST-KO pasaron más tiempo en las zonas periféricas que los ratones controles. Valores representados como media \pm S.E.M, n = 10-19 ratones por grupo por test ** p<0.005 comparados con ratones controles

4.19 - La inhibición de los receptores de glucocorticoides revierte el fenotipo de los ratones CST-KO.

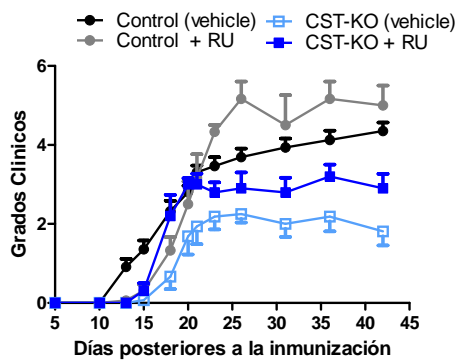
Se sabe que los glucocorticoides son capaces de modular diversas vías de activación y la respuesta del sistema inmunológico frente a condiciones inflamatorias. Los glucocorticoides son capaces de suprimir la maduración, diferenciación y proliferación de linfocitos y macrófagos, inhibir la expresión de moléculas de adhesión, inhibir la producción de citoquinas y quimioquinas, alterar las vías de TLR (del inglés, *Toll like receptores*) e inducir la apoptosis de las células inmunes (Barnes 2006). En concreto, diferentes estudios han demostrado sus efectos y mecanismo de acción en el modelo de EAE, de forma que, actualmente se utilizan ampliamente en el tratamiento de las recaídas agudas en pacientes con EM (Luhder and Reichardt 2009). La alteración del comportamiento y la elevación de los niveles de corticosterona en los ratones deficientes de CST, nos llevo a la búsqueda de un abordaje para comprender el posible efecto de los glucocorticoides en la progresión de la EAE en estos ratones.

Para esto, se llevó a cabo la inducción de la EAE en ratones tratados con RU-486 (RU), un reconocido antagonista de los receptores de glucocorticoides. De hecho, el tratamiento con RU indujo un ligero aumento en la severidad de la EAE, revertiendo parcialmente la resistencia de los CST-KO a desarrollar la enfermedad (Figura 4. 27A). Es importante destacar en el modelo EAE, los componentes autoinmune e inflamatorio juegan un papel clave, de forma que, aunque se pudiera estar controlando el componente inflamatorio, aún quedaría el efecto sobre el componente inmune. Esto podría explicar en parte la ausencia de una reversión completa de la resistencia a la inducción de la EAE en los ratones CST-KO. También indicaría la presencia de otro/s mecanismos endógenos capaz de modular la progresión de la enfermedad en los CST-KO. Por lo tanto, utilizamos el mismo abordaje de inhibición de glucocorticoides en un modelo mayoritariamente inflamatorio. Para esto utilizamos el modelo de CLP, se pudo observar que el tratamiento con RU redujo de manera drástica la supervivencia de los ratones CST-KO sometidos a CLP (Figura 4.27B).

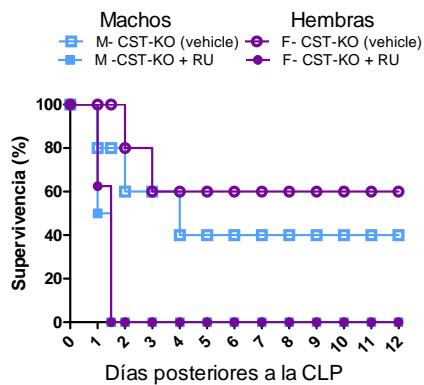
Estos resultados sugieren un papel sistémico anti-inflamatorio de los glucocorticoides en ratones deficientes en CST, responsable parcialmente de la menor susceptibilidad de estos ratones a enfermedades inflamatorias/autoinmunes. De hecho, la administración de CST a los

ratones CST-KO durante al inducción de EAE no tuvo ningún efecto en la mayor/menor susceptibilidad de los mismos (Figura 4.27C).

A



B



C

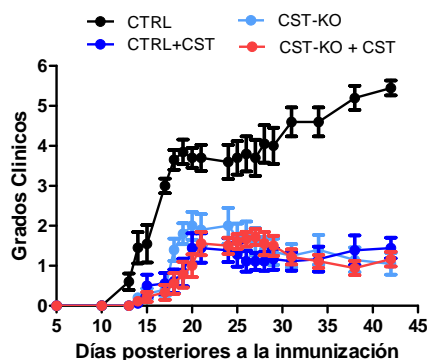


Fig. 4.27 – La inhibición de los receptores de glucocorticoides revierte el fenotipo de los ratones CST-KO.

Evaluación de la supervivencia y desarrollo de enfermedades en ratones CST- KO y controles tratados con RU-486. (A) En el modelo de EAE, la administración de RU se hizo 3 veces/semana comenzando el mismo día de la inmunización con MOG durante un total de 24 días. La administración de RU aumenta la susceptibilidad a la EAE en los ratones CST-KO. Valores representados como media \pm S.E.M, n = 26-18 ratones por grupo (B) En el modelo de CLP, se inyectó RU-486 inmediatamente después de la intervención y 24h post-CLP, y se evaluó el porcentaje de supervivencia durante 12 días. La administración de RU aumenta de manera drástica la mortalidad inducida por CLP en los ratones CST-KO. n = 8-13 ratones por grupo Los ratones controles se trataron con vehículo o RU. (C) La administración de CST no revierte el fenotipo de ratones CST-KO. Se trataron los ratones con CST (1nmol /día, i.p) 4 días antes y 5 días posterior a la inmunización con MOG. Valores representado como media \pm S.E.M, n = 8-9 ratones por grupo.

4.20 – Ratones CST-KO son más susceptibles a la inflamación localizada

4.21.1 - Artritis monoarticular

Además del modelo de CLP, nos planteamos estudiar otro modelo mayoritariamente inflamatorio, como el de la artritis monoarticular. En contraste con CLP, este modelo es considerado como un modelo de inflamación localizada, mientras en CLP ocurre una inflamación sistémica. La artritis monoarticular ocurre en casos como el de los pacientes que sufren de gota (causada por el depósito de microcristales en el espacio de las articulaciones), en la artritis séptica o infecciosa (causada por un agente infeccioso en el espacio de las articulaciones) o en la artropatía debida a un traumatismo. La artritis monoarticular mimetiza los síntomas clínicos de la artritis reumatoide (AR), incluyendo los cambios histopatológicos, infiltración celular e hipersensibilidad y edema en la articulación afectada (Donaldson_JNM_49_5_1993, Wilson 2006). Sin embargo, en la artritis monoarticular no interviene el componente autoinmune y la inflamación está limitada a la articulación.

Existen diversos modelos para el estudio de la artritis monoarticular. En nuestro caso utilizamos el modelo de artritis inducida por adyuvante completo de Freud (CFA). El CFA es un compuesto aceitoso que contiene bacterias muertas o componentes de la pared bacteriana y agentes emulsificantes que en conjunto inducen un proceso inflamatorio agudo cuando se inyecta en las articulaciones. Utilizamos una única dosis intraarticular (i.a) de 10 µg de CFA con *Micobacterium Tuberculosis* en un volumen de 10 µl, que fue suficiente para inducir la inflamación articular. (Pearson 1956; Wilson, Medhurst et al. 2006). En contraste con los modelos anteriores, y de manera sorprendente observamos que los ratones CST-KO presentaban una inflamación mayor en las articulaciones que los ratones control (Figura 4.28A). Al realizar el análisis histológico de las articulaciones observamos un aumento del proceso inflamatorio en los ratones CST-KO (Figura 4.28B), que se correspondió con una mayor producción local de TNF- α y mayor infiltración de células de la inmunidad innata, cuantificada mediante la actividad mieloperoxidasa, una enzima producida mayoritariamente por los neutrófilos (Figura 4.28C). Los neutrófilos y los macrófagos son las células predominantes en la primera línea de defensa del organismo e importantes productoras de

citoquinas inflamatorias. Estos resultados indicaron que los niveles elevados de glucocorticoides en ratones CST-KO afectan sobre todo a procesos inflamatorios/autoinmunes de carácter sistémico, mientras que el efecto es mucho menor o no existe en el caso de un proceso inflamatorio local. De hecho, la respuesta inflamatoria local exacerbada en los ratones CST-KO en este modelo corrobora la hipótesis de que la ausencia de CST endógena es crucial en el control de la inflamación.

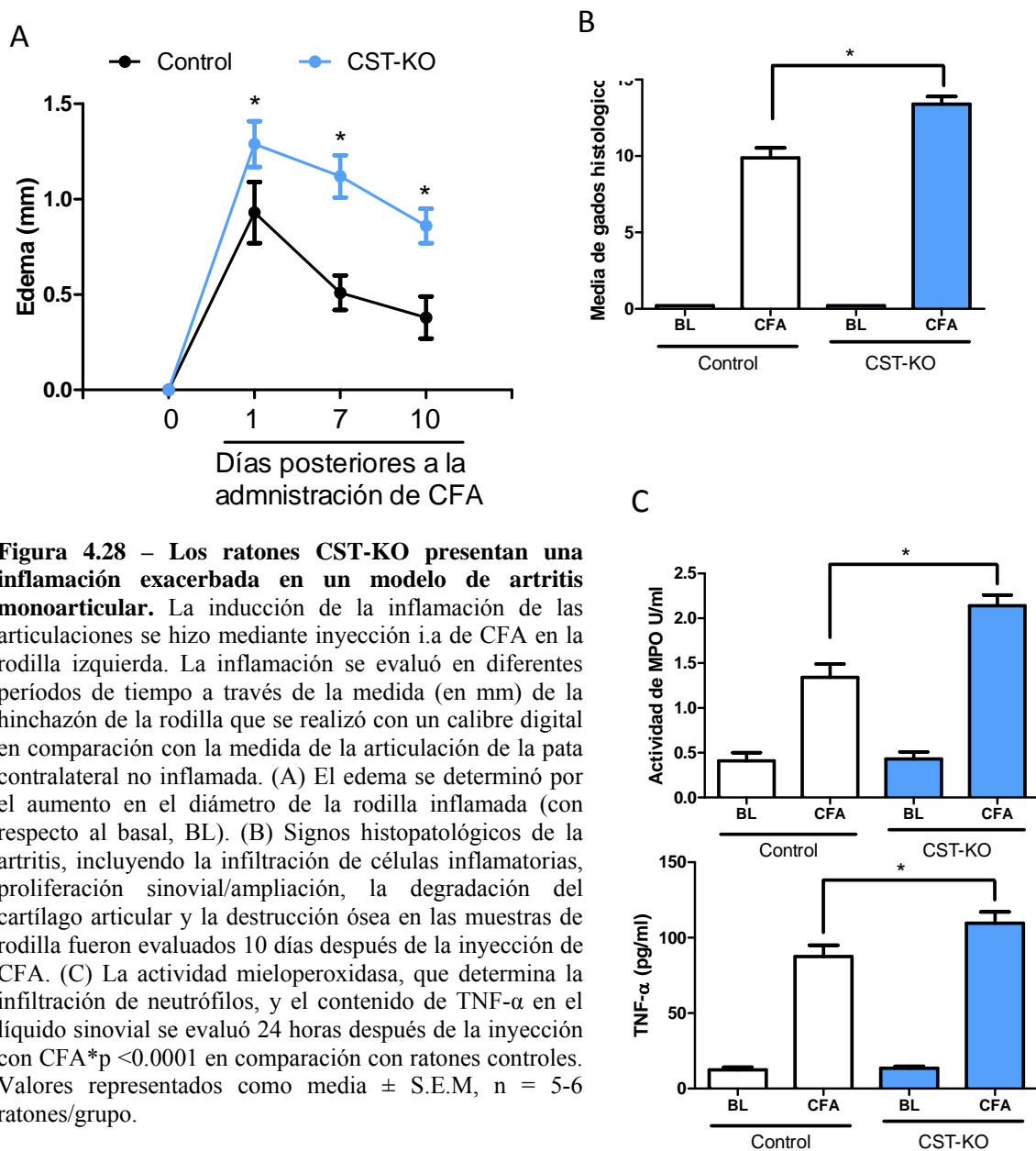


Figura 4.28 – Los ratones CST-KO presentan una inflamación exacerbada en un modelo de artritis monoarticular. La inducción de la inflamación de las articulaciones se hizo mediante inyección i.a de CFA en la rodilla izquierda. La inflamación se evaluó en diferentes períodos de tiempo a través de la medida (en mm) de la hinchazón de la rodilla que se realizó con un calibre digital en comparación con la medida de la articulación de la pata contralateral no inflamada. (A) El edema se determinó por el aumento en el diámetro de la rodilla inflamada (con respecto al basal, BL). (B) Signos histopatológicos de la artritis, incluyendo la infiltración de células inflamatorias, proliferación sinovial/ampliación, la degradación del cartílago articular y la destrucción ósea en las muestras de rodilla fueron evaluados 10 días después de la inyección de CFA. (C) La actividad mieloperoxidasa, que determina la infiltración de neutrófilos, y el contenido de TNF- α en el líquido sinovial se evaluó 24 horas después de la inyección con CFA * $p < 0.0001$ en comparación con ratones controles. Valores representados como media \pm S.E.M, $n = 5-6$ ratones/grupo.

4.21.2 - Dolor inflamatorio

Un síntoma frecuente de la artritis descrito por la mayoría de los pacientes es el dolor causado por el proceso inflamatorio en las articulaciones. La percepción de los estímulos dolorosos implica la participación de varias estructuras neurales, desde los terminales periféricos hasta las zonas somatosensoriales de la corteza cerebral.

En general, cuando ocurre una activación ya sea por estímulos mecánicos, térmicos o químicos, los nociceptores (receptores sensoriales capaces de diferenciar entre estímulos inocuos y nocivos) de tipo aferente conducen los impulsos hacia la médula espinal a través de las fibras A-delta (fibras finas y mielinizadas) y las fibras C (sin mielina) (Julius and Basbaum 2001). Las neuronas sensoriales primarias transfieren la información dolorosa mediante la liberación de neurotransmisores excitatorios que fundamentalmente son el glutamato, la sustancia P y el CGRP (del inglés, *calcitonin gene-related peptide*) que se comportan como neurotransmisores postsinápticos. Las neuronas de primer orden conectan la periferia con la medula espinal, reuniendo los cuerpos celulares en los ganglios de la raíz dorsal (DGR, del inglés, *dorsal root ganglia*). Todos los nociceptores sensoriales primarios hacen conexiones sinápticas con las neuronas en la sustancia gris de la médula espinal. A continuación, se produce la activación de las neuronas espinales de segundo orden, que a su vez, transmiten los mensajes de dolor a los centros superiores del cerebro, incluyendo la formación reticular, el tálamo, y en última instancia, la corteza cerebral (Julius and Basbaum 2001).

La producción excesiva de mediadores inflamatorios, como ocurre en los casos de artritis, resulta en una mayor sensibilidad de las neuronas primarias aferentes provocando la hiperalgesia o alodinia en las extremidades periféricas. La hiperalgesia se caracteriza por una respuesta exacerbada a un estímulo normalmente doloroso y la alodinia es el dolor resultante de un estímulo inocuo (que no causa dolor en condiciones normales).

El modelo de artritis inducida por CFA se considera un modelo de dolor crónico. Este es un modelo particularmente útil para estudiar los cambios provocados por una mayor excitación desde la periferia a la médula espinal, debido a que la hiperalgesia primaria que se produce en la rodilla lesionada se acompaña de hiperalgesia secundaria en la pata ipsilateral. Por lo tanto, hemos evaluado la sensibilidad al dolor hasta 10 días después de la

administración de CFA en los ratones CST-KO. Para evaluar el nivel de dolor utilizamos dos parámetros bien reconocidos: la hiperalgesia mediante calor radiante y la alodinia táctil mediante la respuesta a los capilares de Von Frey.

La inducción de la artritis por CFA en ratones CST-KO, provocó un incremento de las respuestas de hiperalgesia y alodinia en la pata ipsilateral comparado con lo que sucedió con los ratones controles, reflejado en la reducción de la respuesta a los estímulos térmico y mecánico (Figura 4.29A). Dado que la mayor hiperalgesia observada en los ratones CST-KO podría deberse a una inflamación exacerbada en la articulación ipsilateral (Figura 4. 28A), realizamos los mismos tests de dolor en un modelo de inflamación aguda y rápida inducida por la inyección de carragenina (CRG). La CRG es un polisacárido extraído de algas marinas que induce un dolor persistente cuando se administra en la región intraplantar (i.pl) de los ratones. Para evaluar el efecto de la CRG en los ratones CST-KO, administramos 200 µg de CRG en un volumen final de 20µl por vía i.pl. Se evaluaron los parámetros de dolor descritos anteriormente hasta 24 h después de la inyección de CRG.

Del mismo modo que en el modelo de dolor crónico (CFA), los ratones CST-KO mostraron una hipersensibilidad aumentada en comparación con ratones control después de la inyección de CRG (Figura 4. 29B). Interesantemente, durante los experimentos de dolor observamos que en todos los ensayos realizados, los ratones CST-KO presentaban cierta hipersensibilidad basal, es decir, antes de la inducción de la inflamación (puntos BL de las graficas). En conjunto, estos resultados sugieren que la ausencia de CST endógena produce una mayor hipersensibilidad al dolor. De hecho se ha descrito que CST y sus receptores se expresan a altos niveles en las vías nociceptivas en humanos incluyendo las neuronas de los DRGs (de Lecea, del Rio et al. 1997; Flood, Uezu et al. 1997; Robas, Mead et al. 2003). De Lecea et al., 1997). En conjunto, estos resultados sugieren que la CST endógena producida por el sistema nociceptivo local podría desempeñar un papel analgésico.

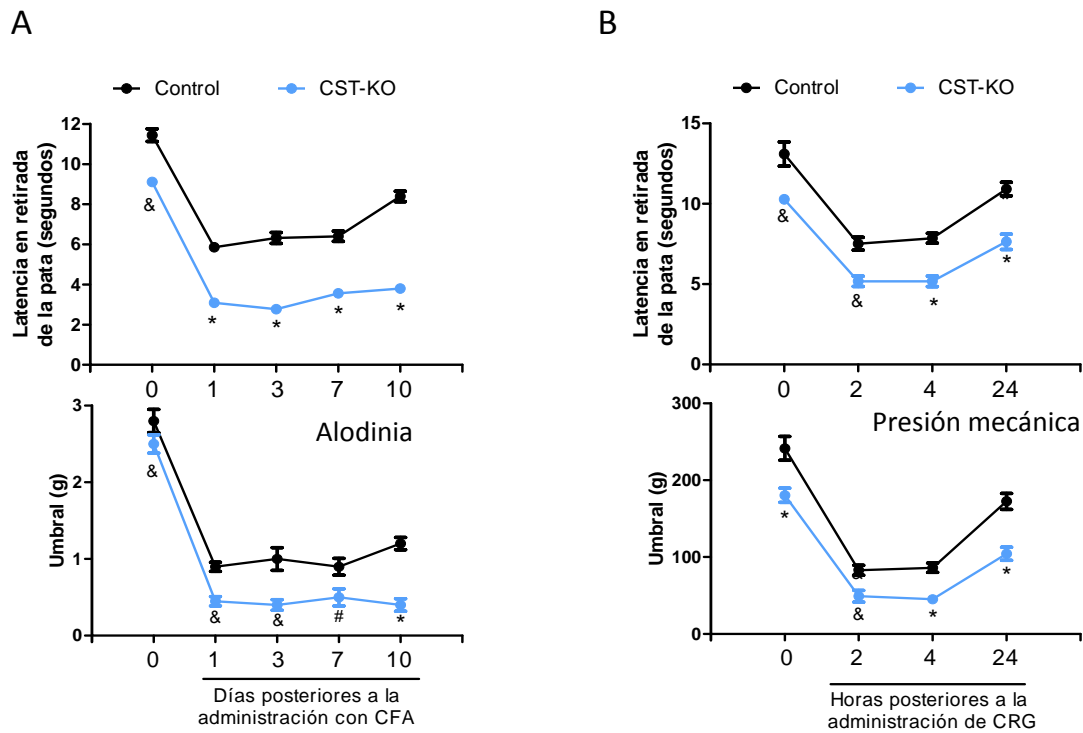


Figura 4.29 – Los ratones CST-KO muestran un aumento de nocicepción, especialmente en los estados inflamatorios. Se inyectaron CFA i.a. (A) o CRG i.pl (B) en ratones CST-KO y en ratones control, y se evaluó el comportamiento de respuesta al dolor. La hipersensibilidad térmica y la hiperalgesia táctil se midió antes (tiempo = 0) y en varias ocasiones después de la administración de CFA o CRG. La medida de hipersensibilidad térmica refleja el tiempo de latencia de retirada de las patas en respuesta a una fuente de calor radiado (paneles superiores). La medida de hiperalgesia táctil se ha evaluado mediante los filamentos de Von Frey (alodinia) (panel A inferior) o mediante la respuesta bajo presión mecánica de la pata por anagelsimetro (panel B inferior); Valores representado como media \pm S.E.M, $n = 6$ ratones por grupo. * $p < 0.0001$, & $p < 0.005$ y # $p < 0.05$ en comparación con ratones control (inyectados con solución salina).

4.22 - La CST reduce la respuesta al dolor en condiciones de inflamación aguda y crónica

Para investigar el posible efecto analgésico de CST, se determinó el efecto de la administración de CST en la nocicepción en condiciones de inflamación localizada aguda y crónica. Se ha descrito previamente que la administración intracerebroventricular de CST en ratas aumentó significativamente la latencia al dolor inducido por calor (Méndez-Díaz et al. 2004). Por lo tanto nos propusimos investigar si la administración local de CST podría presentar efectos analgésicos en los modelos de dolor inducido por CRG y CFA.

La administración local (i.a o i.pl.) de CST en la rodilla afectada en el momento de la inducción del proceso inflamatorio por CRG o CFA, protegió casi completamente el desarrollo de hiperalgesia al calor y la hipersensibilidad táctil en ambos modelos (Figura 4.30A y B, respectivamente). Nuestros resultados están en concordancia con un trabajo publicado durante el desarrollo de esta tesis, en lo cual se demostró que la administración periférica de CST reduce la inflamación y dolor inducidos por carragenina y aceite de mostaza (Markovics, Szoke et al. 2012). Se sabe que la CST presenta efectos antiinflamatorios en una gran diversidad de enfermedades, por lo tanto el efecto analgésico observado anteriormente podría ser mediado principalmente por su capacidad anti-inflamatoria.

Con el fin de investigar la capacidad analgésica de la CST, independientemente de su papel anti-inflamatorio, se inició el tratamiento con el neuropéptido un día después de la inducción de la inflamación por CFA. Lo que pudimos observar, es que una sola inyección i.a. de CST alivió los síntomas de hiperalgesia y alodinia transitoriamente, por un período de al menos 4 horas (Figura 4.30 C). El efecto analgésico de la CST desapareció 24 horas después de su infusión, probablemente debido a su rápida degradación y la persistencia de los estímulos inflamatorios inducidos por CFA. Aunque la acción local antiinflamatoria de CST, obviamente, debe contribuir a su efecto analgésico, la administración de CST no redujo de manera significativa el edema en las rodillas (Figura 4.30 D). Nuestros resultados demuestran que CST atenúa las manifestaciones patológicas del dolor dissociadas de su actividad anti-inflamatoria.

Mediante el uso de modelos de dolor inflamatorio agudo y crónico, hemos demostrado que CST además de ser un potente anti-inflamatorio presenta propiedades analgésicas.

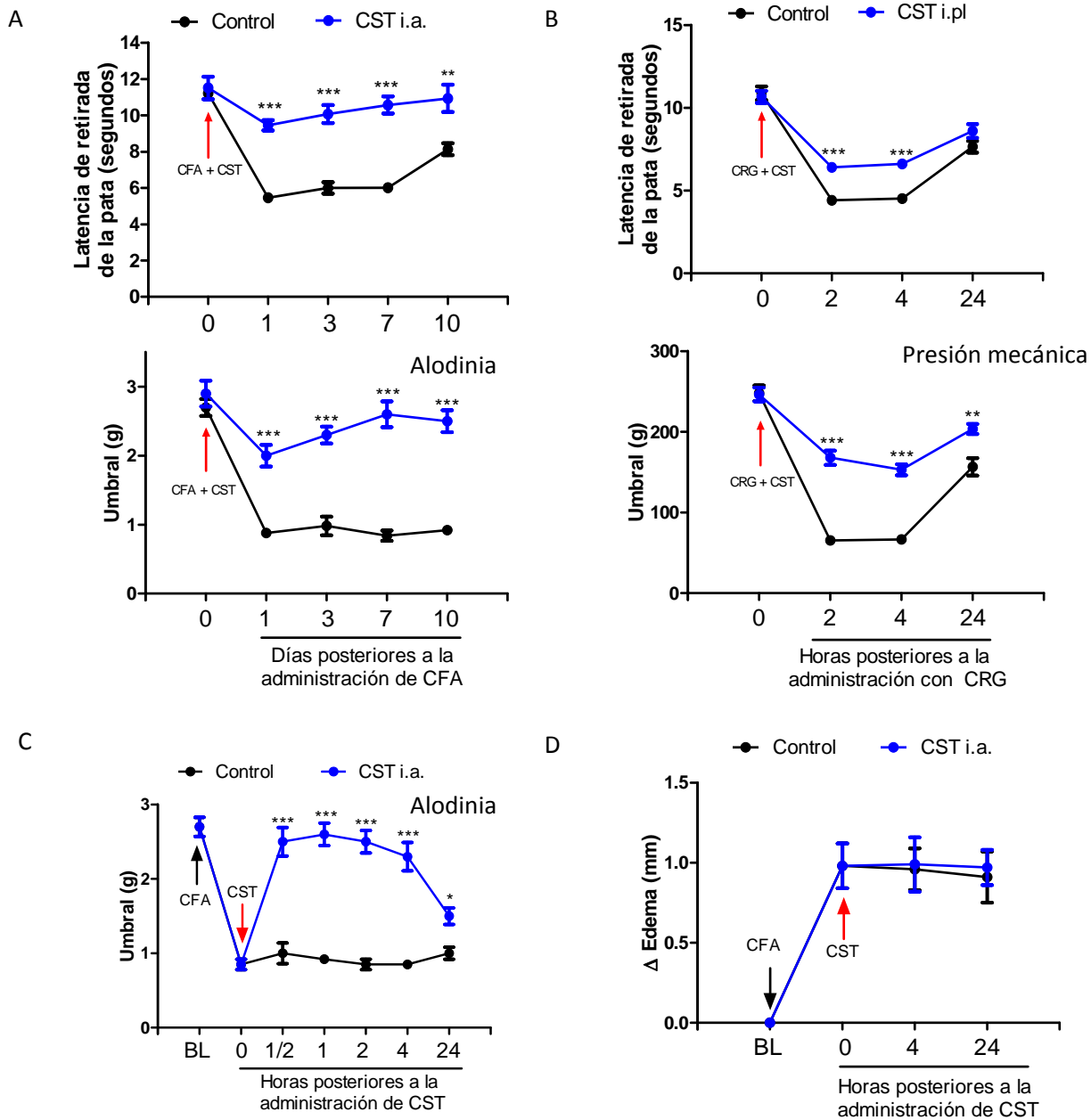


Figura 4.30 – Efectos antinociceptivos de CST en modelos de inflamación crónica y aguda. La artritis se indujo mediante la inyección de CFA i.a. (A) o CRG i.pl (B), y se evaluó el comportamiento de respuesta al dolor tras la administración de CST o PBS (control). La CST se administró por vía i.a. (200 ng) dos veces, 15 minutos y 8 horas después de la inyección de CFA, o se administró CST i.pl. (100 ng) o i.a. 15 minutos antes de la inyección de CRG. Alternativamente, la CST se administró a las 24 horas después de la inyección con CST y la respuesta a la alodinia táctil (C) y el edema (D) se evaluaron en diferentes periodos de tiempo. La medida de hipersensibilidad térmica se ha evaluado mediante el tiempo de latencia de retirada de las patas en respuesta a una fuente de calor radiado (paneles A y B superiores). La hipersensibilidad térmica y la hiperalgesia táctil se midió antes (tiempo = 0) y en varias ocasiones después de la administración de CRG o CFA. La medida de hiperalgesia táctil se ha evaluado mediante los filamentos de Von Frey (alodinia) (panel A inferior y C) o mediante la respuesta bajo presión mecánica de la pata por anagelsimetro (panel B inferior); Valores representado como media \pm S.E.M, $n = 6$ ratones por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ y *** $p < 0,0001$, en comparación con ratones control (inyectados con solución salina).

5 – DISCUSIÓN

La EM se caracteriza por la inflamación y desmielinización en áreas focales del SNC. La hipótesis más aceptada para la etiología de la EM sostiene que la EM es desencadenada por factores ambientales en individuos con perfiles genéticos de riesgo. Las etapas iniciales que inducen la disfunción neurológica en la EM implican varios pasos que se pueden dividir en dos fases principales: eventos tempranos asociados con la iniciación y el establecimiento de la autoinmunidad a los componentes de la vaina de mielina, y eventos posteriores que implican un proceso inflamatorio neurodegenerativo.

Las características patológicas de la EM se estudian principalmente en tres tipos de modelos animales: la inducción de la enfermedad por a) sustancias tóxicas, b) por agentes virales, o c) por diversos autoantígenos (EAE). Uno de los más utilizados es este último. Se considera un modelo muy adecuado debido a sus similitudes histopatológicas e inmunológicas a la EM (Schreiner, Heppner et al. 2009), y la gran mayoría de los estudios para ensayos preclínicos de nuevas terapias para la EM han utilizado este modelo. En la EAE la progresión de la respuesta autoinmune implica la activación de células Th1/Th17 encefalógicas, su entrada en el SNC, la activación de células gliales residentes, y el reclutamiento de células inflamatorias a través de la producción de diferentes mediadores (Bauer, Rauschka et al. 2001; Owens 2003).

En este trabajo demostramos que el tratamiento con CST supone una terapia altamente efectiva para EM, probando el efecto terapéutico del neuropéptido en dos formas clínicas de EAE: la EAE crónica inducida por MOG y la RR-EAE inducida por PLP (Figura 4.1). Interesantemente, la CST fue eficiente incluso en fases plenamente establecidas de la enfermedad, y evitó las recaídas en el modelo de RR. En el modelo de EAE crónica, demostramos que el tratamiento con CST disminuyó la presencia de células CD45+ y células T CD4+, en el parénquima nervioso de la medula espinal, al mismo tiempo que redujo la activación de células residentes como microglia (Figura 4.3). Además, el tratamiento durante la progresión de la EAE redujo en el parénquima nervioso la producción de varios mediadores inflamatorios como las citoquinas IFN- γ , IL-17, IL-6 e IL-12/IL-23, y diversas quimioquinas (Figura 4.4). Como consecuencia, la CST afectó a las dos principales características histopatológicas que definen la enfermedad en humanos: la aparición de infiltrados

inflamatorios en el SNC y la formación de placas desmielinizantes del SNC (Figura 4.2). El efecto de la CST en la producción de agentes inflamatorios podría relacionarse con la menor infiltración del parénquima nervioso. Sin embargo, la administración de CST no alteró la expresión de citoquinas anti-inflamatorias como TGF- β e IL-4 o los niveles de IL-10 e IL-2 (Figura 4.4), lo que sugiere que las pocas células infiltrantes presentes en los ratones tratados no producen citoquinas Th1/Th17, sugiriendo que la CST muestra una desactivación específica de las células inflamatorias/autoreactivas. Es importante destacar que la IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria crucial en la regulación de autoinmunidad. Las acciones de esta citoquina incluyen la regulación negativa de MHC II, reducción de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, reducción de la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y la regulación de generar y mantener células T antígeno-específicas (review IL-10). En contraste, la IL-2 influencia la diferenciación y mantenimiento de diversas poblaciones de células T efectoras pero también es esencial para el mantenimiento de las células Tregs. Por tanto, la no variación de estas citoquinas (junto con TGF- β e IL-4) respecto a otros mediadores inflamatorios es clave, ya que el balance final favorece la función descrita de IL-10 e IL-2 y su efecto positivo en el modelo de EAE tras el tratamiento con CST. Durante muchos años el paradigma principal de la patogénesis de la EAE se ha centrado en células autorreactivas CD4⁺ productoras de IFN- γ (células Th1). Recientemente este paradigma ha sido parcialmente revisado y se ha demostrado un papel central para una nueva clase de células T: las células Th17. Actualmente, diversas evidencias apuntan hacia un papel de estas células principalmente en el inicio de la enfermedad. En este sentido, se han detectado altos niveles de IL-17 en leucocitos circulantes, en placas y LCR de pacientes con EM, existiendo una correlación entre los niveles de IL-17 (a los que contribuyen también las células gliales residentes activadas durante la enfermedad) y la presencia de placas activas de desmielinización (Frisullo, Nociti et al. 2008). La IL-23 es una citoquina que sostiene y estabiliza el fenotipo Th17 (Jager, Dardalhon et al. 2009). Estudios en el modelo de EAE en ratones deficientes en IL-23, demuestran que esta citoquina es necesaria en la fase inicial, pero no en la fase efectora de la enfermedad (Thakker, Leach et al. 2007). En nuestro protocolo utilizamos un anticuerpo anti-IL-12 (subunidad p40) que no distingue entre las citoquinas IL-23 e IL-12. Por tanto, de manera indirecta observamos una reducción en los

niveles de esta citoquina en el parénquima nervioso de los ratones tratados con CST en relación con los controles (Figura 4.4).

Además de la supresión de diversas citoquinas, hemos observado un efecto inhibitorio de CST en diferentes quimioquinas como: IP-10 (quimioatrayente para las células Th1), RANTES (quimioatrayente para células T) y MCP-1 (quimioatrayente de macrófagos y células T), todas implicadas en la patogénesis de la EAE. Las quimioquinas son responsables de la infiltración del SNC y la activación de diversas poblaciones de leucocitos que contribuyen a la neuropatología de la EM. El efecto inhibitorio de CST en la producción de quimioquinas podría explicar en parte la ausencia de infiltrados en el parénquima nervioso. Interesantemente, no se vió una diferencia significativa en la producción de MDC. Esta quimioquina actúa en diversas células dianas, como en las células dendríticas (DC), células NK (del inglés, natural killer) activadas, monocitos y en diferentes sub-poblaciones de células T. Sobre todo hay evidencias consistentes de que MDC es un factor importante en las respuestas Th2 (Mantovani, Gray et al. 2000), de forma que las citoquinas involucradas en la polarización hacia Th2 (IL-4 e IL-13) son potentes inductores o amplificadores de la producción de MDC, mientras que el IFN- γ , IFN- α y IL-12 son inhibitorios (Bonicchi, Sozzani et al. 1998). De acuerdo con estas observaciones *in vitro*, niveles altos de MDC se han observado *in situ* y en la circulación en enfermedades asociadas a las respuestas Th2 tanto en ratones como en humanos.

La disminución de los mediadores de la inflamación en los órganos linfoides podría contribuir a la disminución de la infiltración de células inflamatorias en el parénquima nervioso de los ratones con EAE tratados con CST. Para evaluar esta hipótesis, aislamos células de los órganos linfoides de ratones tratados con CST y observamos que eran menos autorreactivas que células de ratones controles y que las células aisladas de los ratones tratados mostraban una reducción drástica en la producción de citoquinas asociadas a la respuesta Th1 y Th17, como IFN- γ , IL-2, IL-17 y GM-CSF, en respuesta al antígeno específico (Figura 4.5). Para entender el posible nivel de acción de CST, se aislaron células del bazo y de los ganglios linfáticos de ratones enfermos con síntomas moderados de la EAE, y se estimularon *ex vivo* con MOG en presencia o ausencia de CST. El tratamiento directo con el neuropéptido inhibió de manera significativa la proliferación de células T activadas específicas de frente a MOG (Figura 4.7). Además, CST fue capaz de inhibir la producción de

diversas citoquinas proinflamatorias. En conjunto, estos resultados confirman que CST inhibió de manera drástica la producción de citoquinas/quimioquinas correspondientes a la respuesta Th1 y Th17 en el SNC y en la periferia, disminuyendo la respuesta autoinmune y reduciendo la respuesta inflamatoria.

Recientemente un nuevo factor ha sido descrito por tener un papel crítico en el desarrollo de la EAE: el GM-CSF. El GM-CSF se describió por primera vez como un factor de crecimiento hematopoyético que promueve la formación de los granulocitos y los macrófagos. GM-CSF es considerado una citoquina pro-inflamatoria, capaz de inducir la activación, maduración y diferenciación de los macrófagos y células dendríticas, que son esenciales para la iniciación y propagación de las respuestas inmunológicas celulares (Codarri, Gyulveszi et al. 2011). Una de las principales fuentes de GM-CSF son las células T activadas. Diferentes estudios han demostrado que la producción de GM-CSF derivada de células T efectoras es crítico durante la fase efectora de la EAE. De hecho, ratones deficientes en GM-CSF son resistentes a la inducción de EAE, y la presencia de niveles elevados de IL-17A o IFN- γ no compensan la pérdida de GM-CSF, siendo la única citoquina en la que se ha comprobado realmente su implicación directa en el desarrollo de EAE. En este contexto, observamos que, en células periféricas aisladas de ratones tratados con CST estimulados con MOG se producía una reducción significativa de los niveles de GM-CSF (Figura 4.5). Se ha demostrado que células deficientes en GM-CSF son capaces de atravesar la BHE pero no se acumulan en el SNC y fallan en inducir la respuesta efectora. (Codarri, Gyulveszi et al. 2011). Estos resultados sugieren que la inhibición de GM-CSF modulada por CST en la periferia podría contribuir a la acción terapéutica de CST en la EAE.

La opinión más extendida es que la EM es causada por un ataque autoinmune mediado por células Th1/Th17. Sin embargo, es importante tener en cuenta que otras poblaciones de células del también son esenciales en la EM y EAE. Varios hallazgos patológicos, clínicos, inmunológicos y experimentales indican un papel patogénico de las células B y la producción de anticuerpos en la EM, aunque no hay pruebas inequívocas de un antígeno específico desencadenante de la respuesta humoral (Weber, Hemmer et al. 2011). La idea de un papel patogénico de los anticuerpos en la EM es apoyado por el efecto beneficioso observado en pacientes que sufrieron cambio plasmático y por la eficacia clínica en pacientes al realizar la depleción de células B con rituximab (Hauser, Waubant et al. 2008). En este trabajo

observamos que el tratamiento con CST resultó en una reducción de anticuerpos específicos para MOG. La proporción de IgG2a/IgG1 se utiliza habitualmente como una medida indirecta de la contribución relativa de la respuesta inmune Th1 o Th2. Nuestros resultados muestran que ratones con EAE tratados con CST presentaron una menor relación IgG2a/IgG1 que los ratones controles (Figura 4.6). Estos datos proporcionan evidencias de que CST podría estar modulando células B involucradas en la patogénesis de la EAE de forma indirecta o indirectamente influyendo en reducir la respuesta Th1 autorreactivas y promover la respuesta Th2.

Además de controlar la inflamación, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con CST influyó en la desactivación de los clones autorreactivos en la periferia, principalmente de tipo Th1, frente a un estímulo antígeno-específico. Para determinar si la expresión diferencial de citoquinas en ratones con EAE tratados con CST se asoció con cambios en la proporción de células efectoras en la periferia, se realizó un análisis de citoquinas intracelulares mediante citometría de flujo en células de bazo y ganglio linfáticos. Se encontró que, frente a un estímulo agudo como PMA/ionomicina, en los ratones tratados con CST aumentaba la proporción de células CD4+IL-10+ y CD4+IL-4+ en la periferia (Figura 4.8). Curiosamente, los ratones tratados con CST también presentaron niveles elevados de células CD4+ productoras de IFN- γ e IL-17 (Figura 4.8). Se ha descrito en el modelo animal de EAE un gran número de células Th17 específicas de autoantígenos del SNC en los órganos inmunes de la periferia y no en el SNC antes del inicio de los síntomas de la enfermedad. Durante la fase aguda, el mayor porcentaje de células Th17 específicas de autoantígenos del SNC se encuentran en el tejido diana inflamado, aunque la mayoría de las células Th17 en términos generales aún se encuentran en periferia (bazo y ganglios linfáticos). En estos órganos, las células Th17 forman un reservorio desde el que son reclutadas hacia el tejido diana para participar en la agresión al mismo. Durante la fase de recuperación en EAE, un alto número de células IL-17 específicas de autoantígenos aparecen en periferia pero no en el SNC. Por tanto, los niveles de IL-17 se consideran un marcador de severidad de la EM e indica la presencia de la enfermedad de forma activa. Nuestros resultados respecto a la mayor presencia de células IFN- γ + y IL-17+ en los órganos linfoides sugieren la retención de estas células en periferia, mientras los ratones control presentan una migración/retención de estas células hacia el SNC (como se demuestra en el análisis histopatológico de las secciones de

médula). De hecho, ratones tratados con CST presentaron un mayor número de células totales en los ganglios linfáticos y en el bazo, lo que corrobora con la hipótesis de agotamiento del sistema inmunológico en ratones control, ya que estos presentaban órganos linfoides muchos menores y de menor celularidad que los ratones tratados con CST. A tener en cuenta es el hecho de que, a pesar de que los ratones tratados con CST presentaron un mayor número de células IFN- γ ⁺ e IL-17⁺ en los órganos periféricos, presentan una desactivación antígeno-específicas de la respuesta Th1 y Th17 efectora (Figura 4.5).

Los resultados presentados hasta ahora indican que células linfoides derivadas de ratones tratados o estimulados en presencia de CST presentan una reducción de la respuesta antígeno-específica, ya que estas células cuando son estimuladas con MOG, pero no con anti-CD3, presentaron una reducción significativa de la producción de mediadores del tipo Th1/Th17. Estos resultados refuerzan el papel inmunoregulator de la CST en enfermedades inflamatorias/autoinmune. En este sentido es importante destacar que la CST no es un inmunosupresor general. La estimulación policlonal inespecífica (figura 4.5) demostró que la respuesta supresora de CST fue antígeno-específica y mantuvo los órganos linfoides inmunocompetentes, es decir, en condiciones de responder, por ejemplo, ante una infección oportunista.

El efecto protector/beneficioso de CST se correlaciona con la ausencia de signos patológicos en el de SNC, es decir, reducción de la desmielinización, disminución de la infiltración de células inflamatorias y de la microglía activada, reducción de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas, así como una disminución de la respuesta de células T en la periferia, en términos de proliferación y producción de citoquinas pro-inflamatorias. En contraste, CST no altera los niveles de IL-10 en el SNC. El mantenimiento de niveles elevados de IL-10 en ausencia de infiltrados inflamatorios en el SNC en ratones tratados con CST sugiere un papel importante para esta citoquina en el mecanismo de acción de CST, como se comentó anteriormente.

La IL-10 ha sido reconocida recientemente como una citoquina de una población de células T CD4 que ejercen funciones de células Treg, denominadas Tr1. La supresión activa por parte de las Tr1 juega un papel clave en el control de las células T autorreactivas y la inducción de tolerancia periférica in vivo (Thompson and Powrie 2004). Diversas poblaciones de células T supresoras han sido descritas (nTreg, iTreg, Th3 y Tr1) por la capacidad de

modular la respuesta inmunológica. De hecho, la supresión o disfunción de estas células dan lugar a la aparición de múltiples trastornos inflamatorios autoinmunes (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). Numerosas evidencias sugieren que la disfunción, temporal o permanente, de la función supresora de algunas poblaciones de Treg está asociada con la EM y EAE (Zozulya and Wiendl 2008). En particular, los agentes inmunomoduladores disponibles, como el IFN- β y el acetato de glatiramero, ejercen sus efectos beneficiosos en parte a través de las células Tregs. Un estudio confirmó la generación alterada de las células Treg naturales debido a trastornos del timo asociado en pacientes con EM (Venken, Hellings et al. 2008). Nosotros observamos que el tratamiento con CST generó un aumento en la proporción de células CD4+CD25+FOXP3+, marcadores típicos de Tregs (Figura 4.9). Utilizando células totales CD4+ aisladas de ratones con EAE tratados con CST en experimentos de transferencia a ratones con EAE, observamos una disminución en la incidencia y progresión de la enfermedad. Este efecto terapéutico desapareció al deplecionar las células CD25+, indicando que el efecto beneficioso residía en la población CD4+CD25+ de las células aisladas de ratones tratados respecto a ratones con EAE no tratados (Figura 4.9) Por lo tanto, la inducción potencial de Treg funcionales por CST añade un nuevo mecanismo del efecto terapéutico de este neuropéptido en la EAE. Diferentes estudios han indicado que las células Tregs, confieren protección significativa contra la EAE mediante la promoción de las respuestas Th2 y la disminución de células autorreactivas contra el SNC. (Kohm, Carpentier et al. 2002; Reddy, Illes et al. 2004). Es importante considerar que, ya que las células Th17 y las Treg tienen programas de desarrollo y funciones efectoras recíprocas, el número de células Th17 respecto al de Treg podría indicar la cronicidad de la inflamación en el SNC e indicar la progresión de la enfermedad.

En el desarrollo y progresión de la EM, así como de la EAE, distintas poblaciones celulares están involucradas. Además de las células del sistema inmunológico, las células residentes del SNC juegan un papel crucial en el desarrollo de las enfermedades desmielinizantes. Sin embargo, las células gliales presentan un papel dual en las enfermedades neurodegenerativas que es objeto de estudios con resultados controvertidos. A la vez que estas células producen diversas citoquinas inflamatorias potenciando el daño del tejido, las células gliales están involucradas en la producción de factores neurotróficos esenciales en la reparación. (Leme and Chadi 2001). Con este enfoque, demostramos que

CST es capaz de inducir la expresión de factores neurotróficos, como BDNF y ADNP en el parénquima nervioso de ratones con EAE tratados con este péptido (Figura 4.10).

En el SNC, las neuronas son la principal fuente de BDNF. Otra fuente potencial son los astrocitos activados, que están presentes en las áreas inflamadas del SNC, como se ha demostrado en la EAE y en EM. (Lewin and Barde 1996; Stadelmann, Kerschensteiner et al. 2002). Por otro lado, la expresión de las neurotrofinas y sus respectivos receptores también se ha detectado en los órganos linfoides periféricos. De hecho, las células T activadas, las células B y monocitos expresan BDNF *in vitro* y en las lesiones de la EM y EAE. Interesantemente, se ha demostrado que el acetato de glatiramero aumenta la producción de BDNF en las células T humanas y de ratón (Kerschensteiner, Gallmeier et al. 1999; Aharoni, Kayhan et al. 2003). Aunque ratones con células inmunes deficientes en la producción de BDNF presentaron una respuesta inmunológica atenuada en la fase aguda de la EAE, mostraron una discapacidad progresiva con masiva pérdida axonal en la fase crónica de la enfermedad. La inyección de células T transformadas para aumentar la expresión de BDNF condujo a un curso menos severo de la EAE y a una protección axonal directa (Linker, Lee et al. 2010). Además se ha demostrado que los niveles plasmáticos de BDNF estaban reducidos en los pacientes con EM, frente a individuos sanos y que los niveles de BDNF se incrementaron significativamente después de la recidiva de la EM (Frota, Rodrigues et al. 2009). A pesar de todos estos estudios, el papel funcional de BDNF en el sistema inmunológico aún no se comprende completamente.

Otro factor capaz de modular la reparación del SNC es el ADNP. Este factor es una proteína glial que protege el sistema nervioso central contra una amplia gama de insultos y es fundamental para el desarrollo del SNC. La principal fuente de ADNP son los astrocitos, pero se ha demostrado la expresión de ARNm en células del sistema inmunológico en humanos (monocitos, células B y células T, pero no células Tregs CD4⁺ CD25⁺). En este mismo estudio se observó que la expresión de ADNP está reducida en células inmune periféricas de pacientes con EM, frente a la expresión en células de individuos sanos (Braitch, Kawabe et al. 2010).

Se sabe que ADNP es esencial para el desarrollo del cerebro. Además, NAPVSIPQ (NAP), que es un fragmento activo de ADNP, protege potentemente el sistema nervioso contra una variedad de lesiones, y promueve el crecimiento de varios tipos de neuronas a

través de mecanismos que todavía no se conocen por completo (Pinhasov, Mandel et al. 2003). Curiosamente, numerosos estudios han relacionado la inducción de ADNP por VIP (Gozes 2007). Se ha demostrado que VIP regula la expresión de ADNP en áreas específicas del cerebro. La expresión de ADNP se redujo significativamente en la corteza y el hipotálamo de ratones deficiente en VIP, pero no en el hipocampo o el tálamo (Giladi, Hill et al. 2007).

Actualmente aún no conocemos el mecanismo por el cual CST modula la producción de factores neurotróficos. Nuestros resultados sugieren que la modulación de estos factores podría deberse a la posible capacidad de CST en modular la respuesta en las células residentes, ya que ratones tratados con CST presentan una reducida infiltración de células inmunes en el SNC. Sin embargo, no se puede descartar la hipótesis de que CST estaría modulando la secreción de este factor en la periferia y llegue al SNC a través de la modificada barrera hematoencefálica durante la enfermedad.

Hasta hace poco, la comunidad neurocientífica sostenía que las células gliales como astrocitos y oligodendrocitos funcionaban exclusivamente como "apoyo" a las neuronas. Sin embargo, esta visión ha cambiado radicalmente en los últimos años. En la última década, diferentes estudios han proporcionado nuevos conocimientos sobre nuevas actividades de las células gliales como el control de la formación y la función de sinapsis, la comunicación, la regulación del tono vascular cerebral y la neurogénesis en individuos adultos. Estos avances en el conocimiento han modificado el conocimiento acerca del papel de los astrocitos en la fisiología y patología del sistema nervioso (Seth and Koul 2008). En este contexto, demostramos la capacidad de la CST de modular la producción de diferentes agentes pro-inflamatorios como TNF- α por los astrocitos o IL-6 y óxido nítrico por la microglía tras un estímulo inflamatorio (LPS) (Figura 4.11).

TNF- α producido tanto por la microglía, como por los astrocitos está implicado en la patogénesis de la EM. Diferentes evidencias implican a TNF- α en la patología de la EM: niveles elevados de TNF en el sitio de lesiones activas de EM (por biopsia post-mortem); niveles séricos y en LCR elevados de TNF- α que se correlacionan con la severidad de las lesiones; y la evidencia de que las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EM justo antes de la exacerbación de síntomas aumentan la secreción de esta citoquina. Sin embargo, la administración de anticuerpos neutralizantes contra TNF- α en pacientes con esclerosis múltiple se ha asociado con mayor severidad de la enfermedad (Caminero,

Comabella et al. 2011). Además en el modelo de cuprizona en ratones deficientes de TNF- α , la falta de esta citoquina conllevó a un retraso significativo en la remielinización. En este mismo estudio, los autores utilizaron ratones deficientes en los diferentes receptores de TNF- α (TNFR-1 o TNFR-2) y describieron que TNFR-2 pero no TNFR-1, es fundamental para la regeneración de los oligodendrocitos (Arnett, Mason et al. 2001). El TNFR1 se expresa en la mayoría de los tipos de células, y puede ser activado por la unión de cualquiera de las dos formas de TNF: soluble (TNFsol) o adherido a la membrana (TNFtm), con una preferencia por TNFsol. Se sabe que el equilibrio entre TNFtm y TNFsol está influenciado por el tipo celular, estado de activación de la mismo, del tipo de estímulo y de la actividad TACE (enzima que actúa en la transición de la forma transmembrana de TNF- α para la forma soluble)(McCoy and Tansey 2008). El TNFR2 se expresa principalmente en microglia y en las células endoteliales y es preferentemente activada por TNFtm. Estos resultados podrían explicar porqué durante el ensayo clínico con anticuerpos neutralizante de TNF- α se observó un aumento en la progresión de la EM, ya que el anticuerpo utilizado neutralizaba ambas formas de TNF- α .

Por tanto, la modulación de los niveles de TNF- α es crucial, y, dado su papel dual, crítica, probablemente dependiendo del tipo celular y del contexto celular y molecular en que se libere. En nuestros resultados in vitro, observamos que la CST era capaz de reducir los niveles de TNFsol en cultivos de astrocitos, pero no en los cultivos de microglía. Por un lado, esto podría deberse a la baja expresión/ausencia del receptor GHSR en cultivos de microglia, respecto a la modulación dependiente de LPS de este receptor en astrocitos. Además, sería interesante evaluar la forma TNFtm en los dos tipos celulares.

En nuestro estudio el efecto inhibitorio de CST sobre los astrocitos no se observó en los otros mediadores inflamatorios evaluados como IL-6, IL-12 y Rantes. Recientemente se describió que CST es capaz de inhibir la producción de prostaglandina E2 (PGE) vía inhibición de COX-2, en astrocitos y microglía de ratas frente a estimulación con IL-1 β (Dello Russo, Lisi et al. 2009). La COX-2 es una enzima en la producción de prostanoïdes, inducida en procesos inflamatorios. Por tanto, la inhibición de estos mediadores (TNF- α estimulada por LPS y PGE2 estimulada por IL-1 β) en una población aislada de astrocitos, son evidencias suficientes para demostrar la capacidad de CST en modular la respuesta inflamatoria en estas células. La relevancia de la disminución de los niveles de TNF- α viene

dada por el hecho de que la “sobre”-producción de TNF- α en astrocitos, pero no en las neuronas, es suficiente para desencadenar la inflamación y la degeneración del SNC, indicando que los astrocitos pueden influenciar la actividad inflamatoria en el SNC. (Probert, Akassoglou et al. 1997). Los astrocitos en condiciones basales no expresan las moléculas MHC de clase II, sin embargo se ha demostrado que estas células son capaces de funcionar como APCs en lesiones del SNC. Estudios *in vitro* han demostrado que los astrocitos activados son capaces de procesar y presentar epítomos de MBP y PLP a las células T, y estudios inmunohistoquímicos han demostrado que los astrocitos, en placas activas de EM, expresan las moléculas necesarias para actuar como APCs (Ransohoff and Estes 1991; Zeinstra, Wilczak et al. 2003). Estos hallazgos refuerzan que el efecto inhibitorio de CST sobre los astrocitos, podría ser uno de los mecanismos del efecto terapéutico de CST en ratones con EAE. En este contexto, destacar que la inhibición de la producción de TNF- α por astrocitos podría contribuir a la inhibición de la microglía, ya que TNF- α es un potente activador de este tipo celular.

Interesantemente, la CST no afectó la producción de otros mediadores que, en un contexto determinado, podría ser relevante. Un modelo más fisiológico como cultivos mixtos de células gliales podría ser más revelador acerca del papel de CST en el nicho glial.

Respecto al efecto de CST en microglía, a pesar de no afectar los niveles de TNF- α , IL-12 y Rantes en microglía activada por LPS, hemos encontrada una reducción significativa de IL-6 y del óxido nítrico modulada por CST en este tipo celular. Se ha demostrado, mediante inmunohistoquímica, la presencia de IL-6 en las placas agudas y crónicas de paciente con EM, y que la localización de IL-6 fue predominante en las células gliales residentes concentradas en los sitios de desmielinización. Se ha visto un aumento significativo de células positivas para IL-6 en las lesiones con oligodendrocitos preservados, mientras que la ausencia de IL-6 se correlacionó con la pérdida de oligodendrocitos. Estas observaciones indican un posible papel para la IL-6 en la protección y la supervivencia de los oligodendrocitos en lesiones de la EM (Schonrock, Gawlowski et al. 2000). En contraste con este estudio, se ha demostrado un efecto protector en ratones con EAE tratados con anticuerpos neutralizantes contra IL-6. Este estudio sugiere que este efecto fue mediado no sólo a través de la supresión de IL6 inducidas por reacciones inflamatorias, sino también a través de la inhibición de la inducción de células Th1 y Th17 (Serada, Fujimoto et al. 2008). Una vez que se inicia la

inflamación, la producción de IL-6 suprime la generación de Treg inducida por TGF- β y genera células Th17. Cuando las células T naïves están expuestas al TGF- β sólo (sin IL-6), el factor de transcripción FoxP3 se activa, lo que resulta en la diferenciación de células Treg. (Bettelli, Oukka et al. 2007). Estos resultados refuerzan la importancia de la inhibición de IL-6 por CST en microglía activada, en el parénquima nervioso y en células de órganos linfoides periféricos estimulados con MOG.

Además de la reducción de IL-6 en microglia, hemos observado un efecto de CST en la reducción de óxido nítrico producido por estas células. Durante el proceso inflamatorio que tiene lugar en la EAE, la exposición de los macrófagos y la microglia al IFN- γ y al TNF- α da lugar a la activación de la forma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS, del inglés, inducible nitric oxide synthase) y subsecuentemente, altos niveles de óxido nítrico y anión superóxido (O₂⁻). Estas 2 moléculas interactúan formando grandes cantidades de un oxidante muy potente: el peroxinitrito (ONOO⁻). Peroxinitrito es un agente perjudicial de tejido que actúa en la peroxidación de lípidos, la oxidación de grupos sulfhidrilo y nitrosilación de moléculas que contienen tirosina. Los efectos perjudiciales de la inducción de estrés oxidativo a largo plazo incluyen la acumulación de productos de aldehído (productos de la peroxidación de membrana), la alteración de la BHE y el deterioro mitocondrial (Madrigal, Garcia-Bueno et al. 2006). Además, igual a IL-6 y TNF- α , se ha reportado una elevación en los indicadores de la peroxidación lipídica en pacientes con EM (Koch, Mostert et al. 2007). El óxido nítrico, así como los radicales superóxido, fomentan directa o indirectamente la muerte de oligodendrocitos, desmielinización, la disfunción y el daño axonal. La función del óxido nítrico en la EM resulta compleja y es muy probable que sus derivados y particularmente el peroxinitrito, sean definitivamente más tóxicos que el mismo óxido nítrico. Sin embargo, es importante señalar que los radicales libres, como el caso del óxido nítrico, puede activar el factor de transcripción NF- κ B, el cual regula la expresión de una amplia diversidad de genes involucrados en inflamación, como TNF- α , ICAM-1, VCAM-1, COX-2 y la propia iNOS.

El efecto de CST, como mencionado anteriormente, podría ser mediado por su capacidad de unirse a diferentes receptores expresos en las células residentes. De hecho, los cultivos de células de microglia y astrocitos presentan diversos receptores en los cuales CST podría estar actuando, es decir, receptores de SOM y de GHR. Curiosamente, en los astrocitos

estimulados con LPS se ha observado un aumento de la expresión de los receptores de GHR. En contraste, no encontramos niveles detectables de este receptor en la microglia en estado basal o activado (Figura 4.11). Nuestros resultados confirman los resultados de un estudio reciente donde tampoco se detectaron niveles de este receptor (Moon, Kim et al. 2009). De hecho, recientemente se ha demostrado la ausencia de GHSR en poblaciones de microglia aislada de diferentes regiones del SNC, y cómo el ligando endógeno de este receptor, GHR, modula la actividad inflamatoria de la microglia de forma indirecta a través de metaloproteinasas de la matriz (Jiang, Li et al. 2008).

El efecto terapéutico observado en los ratones con EAE tratados con CST podría ser debido tanto a su capacidad por unirse a los receptores de SOM (SST 1-5) como al de Grelina (GHSR). Recientemente, un estudio con SOM administrada oralmente, demostró que este neuropéptido fue capaz de inhibir la EAE mediante la inducción de citoquinas Th2 y células Treg. Sin embargo, la administración de SOM no fue capaz de modular los niveles de IL-2, IL-17, e IFN- γ en el SNC o en la periferia (Brod and Hood 2011). Comparado con los efectos de CST observados en nuestro estudio, estos resultados apoyan el hecho de que las acciones de CST son moduladas, en parte, mediante su capacidad de unirse al receptor de GHR. Por lo tanto, nos propusimos evaluar el efecto de GHR en el modelo de EAE.

De hecho, la GHR presentó un potente efecto terapéutico en ratones con EAE. El tratamiento con GHR redujo de manera significativa los signos clínicos e histopatológicos de la enfermedad (Figura 4.12-4.13, con reducción de citoquinas Th1 e inducción de células Treg (Figura 4.14). En contraste con los efectos observados con el tratamiento de SOM, nuestros resultados demuestran que la administración de GHR redujo significativamente la producción de IFN- γ e IL-17 tanto en el SNC cuanto en la periferia. Durante el desarrollo de este trabajo, Theil y colaboradores demostraron que GHR reduce los signos clínicos de la EAE, pero no encontraron diferencias en la producción de citoquinas Th1 o células Treg entre ratones tratados con GHR versus ratones control (Theil, Miyake et al. 2009). Las diferencias observadas, entre nuestros resultados y el trabajo Theil y colaboradores podría ser debido, principalmente, a las vías y tiempo de la administración de GHR. Estos autores administraron GHR vía s.c. en días alternos, mientras que nosotros administramos GHR i.p. durante 5 días consecutivos. De hecho, la no modulación de citoquinas Th1/Th17 en ratones tratados con

SOM también podría ser explicada de la misma forma, ya que la administración de SOM se hizo vía oral.

En general, estos resultados demostraron importantes ventajas en el uso terapéutico de CST, ya que este neuropéptido es capaz de unirse diferentes grupos de receptores: los de SOM y el de GHR. Además, CST puede unirse con alta afinidad al receptor huérfano MrgX2. A pesar de haber sido encontrado solo en humanos, no se descarta la posibilidad de un receptor homólogo en ratones.

Se sabe que CST, en contraste con SOM, es expresada por diferentes células del sistema inmunológico. El hecho de que un estímulo inflamatorio sea capaz de aumentar la expresión de CST, es un indicio de que CST endógena podría desempeñar un papel protector frente a determinadas condiciones inflamatorias, y que la depleción del gen para este neuropéptido podría conducir a una mayor gravedad de las enfermedades autoinmunes inflamatorias (Dalm, van Hagen et al. 2003). Sin embargo, hasta ahora no se sabe exactamente cual es el papel de la CST endógena en procesos patológicos. Por lo tanto, nos propusimos evaluar el efecto de la deficiencia de CST en el modelo de EAE, utilizando para ello ratones deficientes en CST (CST-KO). En los experimentos previos a la realización de los estudios in vivo, describimos el perfil de la producción de mediadores inflamatorios en células deficientes de CST aisladas de ratones CST-KO. Nuestros resultados han confirmado el papel inmunomodulador de la CST endógena, ya que la ausencia de CST en macrófagos o linfocitos, genera una respuesta exacerbada en la producción de mediadores inflamatorios comparados con células controles (Figura 4.15 y 4.16).

Sin embargo, y de forma contraria a lo que esperábamos, al inducir el modelo crónico de EAE en ratones CST-KO, éstos resultaron ser más resistentes a la inducción de la enfermedad que los controles, presentando menor incidencia y una progresión clínica más leve (Figura 4.17 y 4.18). Utilizando ratones deficientes en SOM observamos que éstos sí sufrían una mayor susceptibilidad a desarrollar EAE, lo que sugería que los efectos observados en CST-KO eran debidos a la pérdida específica de este neuropéptido.

Debido a la complejidad de la EAE, hay muchos pasos en los que la pérdida de CST podría afectar a la enfermedad. Durante la fase de inmunización con MOG, las células presentadoras de antígeno en los ganglios linfáticos que drenan el área de administración,

captan el antígeno e inducen la diferenciación de células T específicas frente a MOG, principalmente hacia fenotipos inflamatorios como Th1/Th17. Los experimentos *in vitro* usando MOG para inducir activación de las células T presentes en los órganos linfoides, demostraron que la activación de células autorreactivas en ratones CST-KO estaba en realidad aumentada en ratones CST-KO en comparación con los ratones control (Figura 4.19). Esto indicaba que la inmunización con MOG en ratones CST-KO es suficientemente fuerte para inducir una respuesta inmunológica frente a este antígeno. Por otro lado, las células T totales aisladas de los ratones CST-KO inmunizados con MOG fueron capaces de inducir la enfermedad EAE tras su transferencia a ratones control, lo que demostró su fenotipo autoreactivo en ausencia de CST (Figura 4.20). Sin embargo, las células T encefalogénicas generadas en ratones control inmunizados con MOG no fueron capaces de inducir EAE al ser transferidas a ratones CST-KO (Figura 4.20), lo que indicaba que la menor susceptibilidad en estos ratones dependía de procesos posteriores a la etapa inicial de inmunización y que tenían que ver con un efecto a nivel general de la ausencia de CST en el ratón.

En este sentido, los resultados obtenidos con ratones deficientes de CST sugieren que este neuropéptido podría desempeñar una acción inesperada, permisiva y/o pro-inflamatoria en el desarrollo de la EAE. Dado que la administración de CST ha mostrado efectos beneficiosos en los síntomas clínicos y en la patología de otras enfermedades, nos propusimos evaluar en profundidad los efectos de la deficiencia en CST en otros modelos autoinmunes y en un modelo típicamente inflamatorio, como el modelo de sepsis. Interesantemente, como ocurrió en el modelo de EAE, los ratones CST-KO resultaron ser resistentes a la inducción de la enfermedad en un modelo de artritis inducida por colágeno (CIA), en la colitis inducida por TNBS y en sepsis inducida por ligación y perforación cecal (CLP). En los modelos de artritis y de colitis, los resultados fueron significativos, aun cuando utilizamos la cepa C57BL/6, que no es el linaje susceptible de desarrollar estas enfermedades. En cambio, en el modelo de sepsis los resultados fueron bastante espectaculares comparando la susceptibilidad de los CST-KO respecto a los controles.

En el caso de la inducción de artritis (CIA), se utiliza la cepa genéticamente susceptible DBA/1 (incidencia de 80 a 100%). La susceptibilidad de los ratones de la cepa C57BL/6 a la CIA es un dato controvertido. Algunos investigadores demostraron poca o ninguna incidencia en el desarrollo del modelo, mientras que otros han demostrado claramente que la CIA se

puede establecer en esta cepa (Brand, Latham et al. 2007). Algunas variables que parecen estar relacionadas con esta discrepancia, son por ejemplo la fuente del proveedor y la edad de los ratones, la cantidad de Mycobacterium utilizado en el adyuvante, y el origen (bovino o de pollo) y proveedores (diferentes casa comerciales) del colágeno. Sin embargo, frente a las mismas condiciones de inmunización, la cepa C57Bl/6 presenta tasas de la incidencia (50-75%) y grados de severidad de la enfermedad menores que los observados en ratones DBA/1 (Inglis, Criado et al. 2007). En cualquier caso, el establecimiento del modelo de la CIA en ratones C57BL/6 se ha empezado a utilizar con más asiduidad en los últimos años, dado que la mayoría de los ratones modificados genéticamente se han establecido utilizando esta cepa.

La colitis inducida por TNBS es un modelo autoinmune importante que cursa con inflamación de la mucosa intestinal. En este modelo, la inducción de la autoinmunidad se realiza mediante la administración vía rectal de TNBS en una solución alcohólica, lo que provoca una ruptura de la barrera epitelial permitiendo el acceso del TNBS a la lámina propia intestinal, donde actúa como un hapteno activando una respuesta autoinmune en el intestino (Strober, Fuss et al. 2002). La colitis inducida por TNBS es una enfermedad mediada principalmente por las células Th1. Por lo tanto la cepa del ratón y el perfil de la respuesta de citoquinas tipo Th1 o Th2 a este hapteno son factores críticos en el desarrollo de la enfermedad. Estudios con ratones deficientes en citoquinas Th1 o Th2 demostraron que ambos animales desarrollan la colitis, sin embargo presentaban distinta tasas de mortalidad y patrones histológicos (Dohi, Fujihashi et al. 2000). Está bien documentado que en ratones de la cepa SJL/J, la administración de TNBS provoca inducción de una rápida respuesta Th1 mediada principalmente por IL-12, mientras que en ratones de la cepa Balb/c la respuesta es iniciada por células Th1 y prolongada por una respuesta Th2 (Strober, Fuss et al. 2002). Por otro lado, la inducción de colitis en ratones de la cepa C57BL/6 aun no está completamente esclarecida. Se ha descrito que ratones de esta cepa presentan una colitis de grado ligero a moderado, con hipertrofia del tejido linfoide asociado al intestino y con poco infiltrado inflamatorio en el epitelio y en la lamina propia (Varona, Cadenas et al. 2003).

A pesar de que los modelos de CIA y colitis no se han realizado utilizando las cepas susceptibles, pudimos observar una tendencia a una mayor resistencia en la inducción de estas enfermedades en ratones CST-KO (Figura 4.21 y 4.22). Las acciones anti-inflamatorias de CST han sido demostradas repetidamente, tanto in vitro como in vivo, lo que sugiere el

potencial terapéutico de este péptido, que ha sido utilizado eficientemente como tratamiento en estas enfermedades en los correspondientes modelos murinos. Sin embargo, los ratones deficientes en CST mostraron una menor incidencia y severidad de estas enfermedades, y en el caso del modelo de TNBS, un aumento en la supervivencia. Junto con los datos obtenidos del modelo de EAE, estos resultados sugieren que la actividad de CST endógena en el sistema inmunológico puede ser muy compleja. Durante la patogénesis de la EAE, así como de la CIA y de la colitis inducida por TNBS, tanto el componente inflamatorio como autoinmune están involucrados. Así que, para intentar diseccionar mejor el efecto de la deficiencia de CST en el sistema inmunitario, realizamos el modelo de sepsis inducido por CLP en los ratones CST-KO, debido a que inmunidad innata es el componente principal en la patogénesis de este modelo.

Así, en el modelo de CLP observamos que los ratones CST-KO tenían una mayor supervivencia que los controles. Analizando los niveles de citoquinas/quimioquinas a nivel local (en la suspensión peritoneal) y sistémico (en suero), observamos una ligera reducción en los niveles de IL-6 y TNF- α , factores clave del desarrollo del proceso inflamatorio en CLP (Figura 4.23). TNF- α se produce rápidamente por las células inmunes y es un importante activador de la ruta de NF-kB, lo que desencadena la expresión de quimioquinas y otras citoquinas pro-inflamatorias, amplificando la respuesta inmune. La IL-6 es una citoquina inflamatoria que está presente en niveles excesivamente altos en sepsis. A pesar de que múltiples tipos celulares contribuyen a los niveles sistémicos de estas citoquinas, las células infiltradas y residentes del peritoneo son la fuente principal de citoquinas en CLP. Se ha demostrado que las células peritoneales juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria inducida por CLP. En este sentido, destacó principalmente en las muestras extraídas de los CST-KO, la reducción significativa en los niveles de RANTES, quimioquina asociada con el reclutamiento de células inflamatorias a los órganos diana, relacionadas con la amplificación del proceso de sepsis. Por otro lado, destacó la bajada en los niveles de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en los ratones CST-KO, citoquina normalmente asociada con un fenotipo protector en sepsis. Diversos estudios han demostrados que la IL-10 juega un papel protector en la respuesta inmunológica en sepsis. La expresión de IL-10 contribuye a la desactivación de leucocitos y macrófagos, además, ha sido identificada como un modulador crucial de la mortalidad en sepsis. La neutralización de la IL-10 provoca una expresión

exagerada de citoquinas pro-inflamatorias y la muerte, mientras la administración de IL-10 recombinante confiere protección terapéutica significativa (Gerard, Bruyns et al. 1993; Standiford, Strieter et al. 1995; Walley, Lukacs et al. 1996). Interesantemente, los ratones CST-KO son más resistentes a la muerte inducida por CLP presentando niveles casi indetectables de IL-10, y niveles similares de TNF- α en la suspensión peritoneal. Además, las células peritoneales de ratones CST-KO sometidos a CLP, presentaron niveles de producción espontánea de IL-6 y TNF- α muy parecidos a los controles cuando se cultivaron in vitro en diferentes períodos de tiempo, mientras la expresión de IP-10 y IL-10, que estaba inicialmente reducida se veía aumentada a lo largo del tiempo.

En conjunto, nuestros resultados sugieren la presencia de un factor sistémico como consecuencia de la ausencia crónica de CST capaz de controlar la inflamación sistémica.

Un mecanismo endógeno anti-inflamatorio ampliamente estudiado es la acción de los glucocorticoides (GC). Los glucocorticoides son hormonas esteroideas sintetizadas por la corteza de las glándulas adrenales. El cortisol es el principal GC natural en humanos, mientras en roedores es la corticosterona. Los principales efectos biológicos de los GC se dan a nivel del metabolismo energético del organismo, crecimiento, reproducción, respuesta al estrés crónico, función cardiovascular, equilibrio hidroeléctrico, conducta, memoria, aprendizaje y regulación del sistema inmune. Por su naturaleza lipofílica los GC presentes en la circulación ingresan en la célula atravesando la membrana celular y se unen a su receptor citosólico (GR, receptores de GCs). Una vez unidos a su receptor, se produce la formación de dímeros de GC-GR y migración hacia el núcleo, donde interactúan directamente con el DNA (lo que se llama acción genómica) o con otras proteínas implicadas en procesos de transcripción. La acción genómica de GCs se da por la interacción de los dímeros de GC-GR con una secuencia palindrómica específica en los promotores de los genes diana, llamados elementos de respuesta a los glucocorticoides (GRE, del inglés, GC-response elements) que pueden ser positivos (pGREs) o negativos (nGREs). La unión del dímero de GR a los pGRE estimula directamente la transcripción de genes de respuesta a la GC, con la participación de los componentes básicos de la maquinaria de transcripción como la RNA polimerasa II y otros factores de transcripción (Beato and Sanchez-Pacheco 1996; Glass and Rosenfeld 2000). En contraste, la unión de los dímeros GC-GR con los nGRE lleva a la represión de la transcripción de los genes diana.

Además los dímeros GC-GR presentan otro mecanismo de represión transcripcional como la inhibición de la transcripción de genes pro-inflamatorios a través de la unión y bloqueo de la función de los factores de transcripción limitantes como el NF- κ B, c-Jun y c-Fos (Scheinman, Cogswell et al. 1995). Esta es la principal vía por la cual los GCs inhiben la síntesis de mediadores pro-inflamatorios como IL-6, IL-2, TNF- α y las prostaglandinas (Song, Gold et al. 2005). Ha sido descrito que los GCs pueden actuar en la inhibición de la vía de señalización utilizada por TLR que desempeña un papel crucial en la inducción de respuesta inmunológica innata (Moynagh 2003).

Además de las funciones genómicas de los GCs, mecanismos de acción no genómicos de los GC incluyen la i) interacciones no específicas de los GCs con las membranas celulares incluyendo la membrana mitocondrial, (ii) efectos no genómicos que están mediados por el GR citosólico y (iii) las interacciones específicas con un GR acoplado a la membrana plasmática. Se han descrito funciones inmunomoduladoras por diferentes mecanismos de acción de los GCs. De hecho, los glucocorticoides se definen como agentes endógenos con capacidad anti-inflamatoria e inmunosupresora. Nosotros encontramos que los ratones CST-KO presentaron niveles elevados de corticosterona. De hecho, durante el desarrollo de esta tesis se publicó un interesante trabajo en el que se caracterizaba por primera vez a nivel endocrino y metabólico estos ratones comparando además la deficiencia en CST con la de SOM (Cordoba-Chacon, Gahete et al. 2011). En este trabajo se mostraba que, los ratones deficientes en CST, tienen valores de ACTH y Corticosterona elevados, siendo especialmente significativos en el caso de las hembras. Este resultado explica la menor susceptibilidad de estos ratones a diferentes modelos de enfermedades autoinmunes inflamatorias debido a los niveles sistémicos elevados de glucocorticoides, y al mismo tiempo, explica porqué las células aisladas de ratones CST-KO, mantenidas y estimuladas en cultivo presentan una respuesta inflamatoria exacerbada, lo que tiene que ver con la ausencia de glucocorticoides en el cultivo y la deficiencia endógena de la CST.

Se sabe que bajo condiciones estresantes, ya sean físicas o emocionales, como traumas, ansiedad y miedo, se produce un aumento de los niveles de glucocorticoides. El concepto de estrés se basa en la observación de que diferentes tipos de condiciones físicas o psicológicas que amenazan la homeostasis induce un conjunto de cambios en el cuerpo. El estrés, en general, puede modular la función de células inflamatorias y la respuesta inmunológica y

hormonal a través de vías neuronales que enlazan el sistema nervioso y el sistema inmunológico. El estrés físico y psicológico, es capaz de activar el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y aumentar los niveles circulantes de las hormonas glucocorticoides. La respuesta inmediata (conocida “primera ola”) al estrés o a la ansiedad, se inicia en cuestión de segundos a través de la activación del sistema nervioso simpático (SNS). Como resultado de ello, la noradrenalina de las fibras nerviosas simpáticas periféricas se libera en los diferentes tejidos, y la adrenalina (epinefrina) de la glándula adrenal se libera a la circulación sanguínea. En seguida, la “segunda ola” activa el eje HPA, esta es más lenta y resulta en la liberación de los glucocorticoides. En respuesta al estrés, las neuronas del núcleo paraventricular hipotalámico secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en la circulación portal de la glándula pituitaria. En la hipófisis anterior, CRH estimula células secretoras de ACTH (corticotropina, del inglés adrenocorticotropic hormone) para que la liberen a la sangre. Esta hormona actúa en la corteza de las glándulas adrenales promoviendo la liberación de glucocorticoides a la circulación sanguínea.

Durante un evento de estrés se estimula el eje HPA y se produce la liberación de glucocorticoides en el cuerpo. Las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo integran la información relevante para el estrés, y estas neuronas liberan hormona liberadora de corticotropina (CRH), que a su vez estimula la síntesis y liberación de adenocorticotropina (ACTH) por la hipófisis. La ACTH estimula la síntesis y liberación de corticosteroides por la corteza suprarrenal (Buckingham 2006). Como se ha comentado, recientemente se ha descrito que los niveles circulantes de ACTH aparecen significativamente elevados en ratones hembras deficientes de CST, en comparación con los controles. A pesar de las diferencias sexo-dependientes en la síntesis y liberación de ACTH, tanto las hembras como los machos de CST-KO muestran los niveles de corticosterona circulante elevados (Figura 4.25)(Cordoba-Chacon, Gahete et al. 2011). Para determinar si las alteraciones en el eje HPA en los ratones CST-KO se correlacionaban con alteraciones en el comportamiento, llevamos a cabo diferentes ensayos conductuales, como el laberinto elevado en cruz o campo abierto, en los cuales mide el nivel de ansiedad. En estos experimentos se observó una diferencia significativa en el nivel de ansiedad entre ratones CST-KO y ratones control (Figura 4.26). Por lo tanto, la alteración del eje HPA en estos ratones podría estar directamente relacionada con la menor susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes. Los glucocorticoides

endógenos son esenciales para la regulación de la actividad inflamatoria. El bloqueo de la secreción de cortisol/corticosterona trae aparejada una crisis inmediata de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Un sistema de estrés hipoactivo, con baja producción de CRH, ACTH, glucocorticoides y adrenalina, tendría como consecuencia una falta de control de la inmunidad Th1. El resultado es una exacerbación anómala de la inmunidad Th1 y la inducción y/o exacerbación de las crisis evidencia el fallo en la regulación fisiológica. La función del Eje HPA es esencial para regular la severidad de enfermedades inflamatorias, lo que se evidencia en el hecho de que al bloquear o remover los GCs se produce un incremento de la actividad de la enfermedad.

En este sentido, para evaluar el papel directo de los GCs en la susceptibilidad de ratones CST-KO, llevamos a cabo ensayos con un conocido antagonista de receptores para GC, la mifepristona (RU-486). Utilizando el modelo de EAE, observamos que la administración conjunta de RU-486 durante la inducción del modelo resultó en una reversión parcial de los signos clínicos de la EAE en ratones CST-KO, mostrando los ratones en esta ocasión mayor susceptibilidad que los CST-KO sin el antagonista (Figura 4.27). Los glucocorticoides suprimen la transcripción de numerosas citoquinas pro-inflamatorias mientras que estimulan a las anti-inflamatorias IL- 4 y 10. Además, los GC limitan la producción de radicales libres como óxido nítrico y la formación de eicosanoides como la PGE2. Los glucocorticoides también favorecen el cambio de linfocitos Th1 hacia Th2 mediante la disminución de citoquinas Th1 que favorecen la expresión de las Th2. La patente sobre expresión de citoquinas tipo Th1 es característica de las enfermedades autoinmunes como diabetes tipo 1, artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM) y lupus eritematoso sistémico (LES), y el déficit de corticoides favorece la susceptibilidad a estas enfermedades (Barnes 1998). Las enfermedades autoinmunes en general son complejas y aun no está muy bien esclarecida su etiopatología. Por lo tanto, un eje HPA hiporreactivo no es necesaria y obligatoriamente un indicador de susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes. La susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes puede depender de otros factores distintos al eje HPA, como factores genéticos, ambientales y conductuales.

Estas consideraciones nos llevaron a evaluar el bloqueo de glucocorticoides en un modelo mayoritariamente inflamatorio (en un intento de separar el componente autoinmune), el modelo de sepsis inducido por CLP. De hecho, demostramos que la administración de

mifepristone (RU486), fue capaz de aumentar significativamente la mortalidad de los ratones CST-KO, sugiriendo un papel de los GCs endógenos en la resistencia a la sepsis en la ausencia de CST (Figura 4.28). En los modelos animales de CLP, los GCs presentan un papel protector en la muerte inducida por la infección polimicrobiana. Sin embargo, el papel de los GCs en la sepsis es bastante controvertido. Se ha demostrado una activación del eje HPA asociado con altos niveles de GCs en plasma de pacientes con sepsis, y que altos niveles de GCs están relacionados con la severidad de la enfermedad y un riesgo mayor de muerte (Christ-Crain, Stolz et al. 2007). Por el contrario, otros trabajos han reportado insuficiencia adrenal en pacientes con shock séptico, acompañada de niveles bajos de GCs. La insuficiencia adrenal promueve una respuesta inflamatoria exacerbada con un incremento en el daño tisular y disfunción de órganos (Soni, Pepper et al. 1995; Annane, Maxime et al. 2006). Se ha demostrado que no hay efectos beneficiosos en la utilización de las terapias con altas dosis de glucocorticoides en pacientes de sepsis (Cronin, Cook et al. 1995). En contraste, se ha demostrado que terapias con GCs utilizando dosis más fisiológicas resultan más efectivas. A pesar de producirse una modulación de la inflamación, la principal ventaja de dosis bajas de los GCs es la disminución de la dependencia de vasopresores como las catecolaminas, que a su vez presentan efectos pro-inflamatorios (Keh, Boehnke et al. 2003; Oppert, Schindler et al. 2005; Patel and Balk 2012).

En conjunto, estos resultados confirman la hipótesis de que la ausencia de CST, un neuropéptido modulador de la actividad locomotora y del sueño, induce un estado de estrés crónico que se refleja en un aumento en los niveles de GCs. Los niveles elevados de GCs en la circulación sistémica generan una menor susceptibilidad a enfermedades autoinmunes en ratones CST-KO. Por otra parte, se ha demostrado que ratones deficientes en SOM (SOM-KO), también presentaron niveles elevados de corticosterona (Zeyda, Diehl et al. 2001), pero, bajo nuestras condiciones experimentales estos ratones presentaron una mayor susceptibilidad a la EAE (Figura 4.17). Esto sugiere que deben existir diferencias en otros factores endógenos en relación a la ausencia de uno u otro neuropéptido cruciales en la modulación de la respuesta inmunitaria. Así, dos hormonas involucradas en inmunomodulación están expresadas diferencialmente en ratones CST-KO y SOM-KO. Se ha descrito que ratones SOM-KO, presentan un nivel elevado de GHR, pero no se determinaron niveles detectables de la forma acilada funcional de este neuropéptido. Los efectos supresores de GHR se deben a la unión de

la forma acilada de GHR a su receptor, lo que conlleva una vía de inmunosupresión mediada por la elevación de AMP cíclico, como se comentó anteriormente. Además nuestro grupo demostró que la administración de GHR presenta un efecto beneficioso en el modelo de sepsis inducida por CLP (Chorny, Anderson et al. 2008), y se sabe que el efecto protector de CST en modelos de sepsis es modulado parcialmente por su unión al receptor de GHR (Gonzalez-Rey, Chorny et al. 2006).

Además se ha descrito que el efecto inhibitor de la GHR es, en parte, debido a la supresión de la actividad nerviosa simpática en modelos CLP (Cheyuo, Jacob et al. 2012). Sin embargo, el mecanismo por el cual la GHR ejerce este efecto sigue siendo poco conocido. Se sabe que las catecolaminas, son los primeros neurotransmisores producidos por el sistema nervioso (simpático) frente un estrés agudo, y que en contraste con los GCs presentan efectos pro-inflamatorios. Sin embargo, hasta ahora no se han descritos los efectos de la ausencia de CST en los niveles de catecolaminas. Por otro lado, los ratones CST-KO presentan una reducción de los niveles de prolactina, mientras los ratones SOM-KO presentan un aumento de esta hormona (Cordoba-Chacon, Gahete et al. 2011). La prolactina es sintetizada principalmente en la hipófisis y ejerce sus efectos endocrinos en una amplia gama de tejidos, y su principal función es la regulación de las glándulas secretoras. Sin embargo, prolactina actúa en diversas funciones biológica como en la reproducción, la lactancia, y en una serie de actividades biológicas homeostáticas inclusive funciones inmune. Se ha descrito que prolactina es capaz de inducir la proliferación e inhibir la apoptosis de diversos tipos de células, incluyendo células del sistema inmunológico, lo que sugiere un papel inmunomodulador para esta hormona. De hecho se ha descrito que prolactina en condiciones inflamatorias *in vitro* promueve la secreción de TNF- α y IL-12 mediante el aumento de la actividad de NF- κ B e IRF-1 (del inglés, interferon regulatory factor-1) (Brand, Frohn et al. 2004). Además, en varias enfermedades, la prolactina antagoniza los efectos inmunosupresores TGF- β y corticosterona, probablemente un mecanismo inducido para la recuperación del sistema hematopoyético (Yu-Lee 2002).

El aumento de la acil-grelina, una hormona antiinflamatoria y reducción de prolactina, una hormona con capacidad pro-inflamatoria podrían explicar los resultados obtenidos de la distinta susceptibilidad a la EAE de ratones CST-KO versus SOM-KO. Los ratones SOM-KO solamente presentan niveles elevados de corticosterona. Sin embargo, no evaluamos si los

niveles de GHR y prolactina estaban alterados en los experimentos con el antagonista de glucocorticoides.

Las hormonas con capacidad inmunomoduladoras actúan principalmente a niveles sistémicos, por lo tanto nos propusimos estudiar un modelo de inflamación localizada, en este caso, el modelo de artritis monoarticular inducida por CFA.

En 1956, Pearson y colaboradores describieron que ratas inmunizadas con CFA que contiene *Mycobacterium tuberculosis* desarrollaban artritis (Pearson 1956). Este modelo de artritis, ha sido ampliamente utilizado como modelo para la artritis reumatoide (AR), sin embargo es un modelo más apropiado para la artritis reactiva e infecciosa en lugar de la AR, debido a la ausencia del componente autoinmune y algunas características histopatológicas. En la artritis monoarticular, el efecto anti-inflamatorio de diversos compuestos ha sido determinado simplemente comparando los volúmenes de las patas inoculadas versus la pata no inoculada, dado que este es un modelo de inflamación localizada que afecta solamente la articulación inoculada.

La artritis inducida por administración intraarticular de CFA genera una fase inicial, en la que se produce un aumento del volumen de la articulación inyectada y una fase tardía/crónica destructiva. La reacción inicial del edema en este modelo es causada por el efecto irritante del adyuvante, mientras que la artritis de fase tardía se supone que son los eventos modulados por el sistema inmunológicos.

En la pata inoculada con CFA se desarrolla una intensa reacción inflamatoria (inflamación primaria) inmediatamente después de la inoculación con CFA. La formación del edema es indicativa de la inducción de la respuesta inflamatoria por el CFA (Yu, Koo et al. 2002). En esta fase, se observa infiltración de células polimorfonucleares (PMN) con predominancia de neutrófilos, en los tejidos periarticulares y en la zona sinovial, junto del espacio articular, además del exudado intraarticular agudo. Recientemente se ha reportado un análisis del perfil de citoquinas en la artritis experimental inducida por adyuvante, y en las primeras 24 horas se demostró un aumento en diversas citoquinas y quimioquinas como MCP-1, MIP-1 α , IL-1 β , IL-17, or IFN- γ (Paquet, Goebel et al. 2012).

La inflamación se caracteriza por enrojecimiento, hinchazón y dolor. Esto ocurre debido a la vasodilatación local, aumento de la permeabilidad capilar y la infiltración de leucocitos. Los mediadores inflamatorios son liberados principalmente por leucocitos activados. Los

mediadores inflamatorios clave son los eicosanoides como, la prostaglandina E2 (PGE2) y el leucotrieno B4 (LTB4), y citoquinas, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 que se han encontrado en altas concentraciones en membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide (Henderson, Pettipher et al. 1987; Feldmann and Maini 1999). A pesar de que estas características son comunes para otros modelos de artritis experimentales, la formación de granuloma en los tejidos periarticulares es una característica única de la artritis inducida por adyuvante. Estos granulomas se forman por acumulación de macrófagos. El crecimiento del tejido granulomatoso en la membrana sinovial lleva a la formación del pannus (tejido sinovial de granulación con características invasivas que recubre el cartilago), que cubre y se adhiere a la superficie articular, pudiendo llevar a la destrucción del cartilago.

La magnitud de la respuesta inflamatoria inducida por la administración intraarticular de CFA se hizo mediante la evaluación de la formación del edema. Interesantemente, ratones CST- KO desarrollaron una respuesta inflamatoria de mayor magnitud que ratones controles (Figura 4.28). En la fase aguda (24 h d.p.i), observamos una mayor actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) y producción de TNF- α en el líquido sinovial de ratones CST-KO. La activación de células polimorfonucleares refleja una respuesta inmunológica primaria en respuesta a trauma y infección (Lau, Mollnau et al. 2005). La actividad de MPO es ampliamente utilizada como marcador de infiltración de neutrófilos y monocitos. Además, la MPO liberada por los neutrófilos y monocitos activados utiliza peróxido de hidrógeno para catalizar la producción de oxidantes potentes. Estos oxidantes han sido implicados como mediadores clave del daño tisular en muchas enfermedades inflamatorias, incluyendo la aterosclerosis, asma, artritis reumatoide, fibrosis quística y algunos cánceres (Koelsch, Mallak et al. 2010). Como resultado, existe un interés considerable en nuevas estrategias terapéuticas para estas enfermedades, dirigidas a la prevención del daño biológico ocasionado por derivados oxidantes de la actividad de la MPO.

Se ha propuesto que los eicosanoides modulan gran parte de la patología temprana de la enfermedad inflamatoria de las articulaciones, tales como la inflamación, el dolor y infiltración y las citoquinas modulan la fase tardía destructiva de la enfermedad que implica la pérdida de cartilago y la destrucción ósea (Henderson, Pettipher et al. 1987). De hecho, mediadores inflamatorios como el óxido nítrico y el TNF- α contribuyen al daño del cartilago por la activación de metaloproteinasas y la inhibición de síntesis de proteoglicanos (Goldring

2002). Terapias anti-TNF son ampliamente utilizadas en la AR y sus beneficios clínicos son bien conocidos en la fase crónica de la enfermedad, a pesar de un aumento del riesgo de enfermedades infecciosas (Hoff, Kvien et al. 2009). Debido a su carácter prominente local, el modelo de artritis inducida por CFA permite el análisis de los patrones de citoquinas en la respuesta inmune a nivel local. Contrario a lo que sucedió en los modelos de inflamación sistémica, los ratones CST-KO presentaron una respuesta inflamatoria exacerbada frente a CFA. En nuestro estudio demostramos que ratones CST-KO presentaban una mayor producción local de TNF- α en el modelo de artritis monoarticular. Esta citoquina es considerada un mediador fundamental en la fase crónica de la enfermedad.

La transición de la inflamación aguda a la inflamación crónica es la fase crucial en que una respuesta defensiva innata se convierte en una respuesta potencialmente dañina para los tejidos (respuesta inmunológica adquirida o adaptativa). Un paso fundamental en esta transición es el reclutamiento de las células de la fase crónica, con consecuente degradación del cartílago y destrucción ósea. En este contexto, mediante la observación de diversas alteraciones histopatológicas demostramos que ratones CST-KO presentaban una mayor severidad de la artritis inducida por CFA en la fase más tardía de la enfermedad.

Durante el transcurso de la artritis, la hinchazón de las articulaciones se relaciona con cierta incapacidad del animal. Se asume que la incapacitación articular es el resultado de la nocicepción alterada tras la inducción de la inflamación en la articulación (Tonussi and Ferreira 1992). El dolor es el síntoma predominante en la clínica de la artritis (Beyreuther, Callizot et al. 2007).

Durante la inflamación de la articulación, el sistema nervioso nociceptivo presenta un estado de sensibilización alterado. En última instancia, esto se traduce en una mayor percepción de los estímulos dolorosos (hiperalgesia), así como un aumento de las sensaciones de dolor causadas por los estímulos que, en condiciones normales no inducen dolor (alodinia). (Julius and Basbaum 2001; Schaible, Richter et al. 2009). En un número significativo de pacientes con artritis, la hiperalgesia primaria inducida por la articulación lesionada se acompaña de hiperalgesia secundaria bilateral en las extremidades no inflamadas (Breedveld and Kalden 2004; Zangger, Keystone et al. 2005).

En resumen, los nociceptores transforman factores ambientales en potenciales de acción que se transmiten hacia el SNC. Los estímulos dolorosos activan las terminales periféricas de

los nociceptores, generando un potencial de acción que se transmite a lo largo de los axones aferentes a la médula espinal. Por medio de la transmisión química, los nociceptores activan las neuronas espinales que envían axones a través de la médula espinal y terminan en el bulbo raquídeo, en el mesencéfalo y el tálamo. Neuronas talámicas proyectan los axones a las regiones de la corteza, incluyendo la corteza somatosensorial (Stucky, Gold et al. 2001).

En este trabajo, demostramos el papel de la CST endógena y la administración de CST sintética en la modulación del dolor inflamatorio. Ratones CST-KO en condiciones inflamatorias articular aguda o crónica (artritis inducida por CRG o CFA, respectivamente) presentaron un incremento de las respuestas de hiperalgesia y alodinia en la pata ipsilateral comparados con los ratones controles (Figura 4.29). Estos resultados se corroboran con la inducción exacerbada de inflamación en ausencia de CST, dado que el proceso inflamatorio causa la sensibilización de las neuronas nociceptivas centrales y periféricas.

La PGE₂, es un potente vasodilatador, y actúa juntamente con otros vasodilatadores, lo que puede ocasionar un derrame vascular y la extravasación de líquido, además potencia el efecto de la bradicinina mediante la sensibilización de las fibras aferentes C para aumentar el dolor. Por lo tanto, los mediadores lipídicos están involucrados en el enrojecimiento, la hinchazón y el dolor que sigue a la inflamación aguda. Se ha descrito que CST es capaz de inhibir la inducción de mediadores inflamatorios lipídicos por células gliales primarias (Dello Russo, Lisi et al. 2009). A pesar de no se saber exactamente el mecanismo por el cual la ausencia de CST estaría actuando, la ausencia de CST en la periferia podría contribuir al aumento del edema y del dolor mediado por la producción de PGE₂. Sin embargo, no se sabe cuál es el efecto de este neuropéptido en la producción de eicosanoides por otros tipos celulares.

Interesantemente, ratones CST-KO presentaron una hipersensibilidad elevada incluso en condiciones basales, es decir, en ausencia de inflamación. Estos resultados sugieren que la CST endógena producida por el sistema nociceptivo local podría desempeñar un papel analgésico. De hecho se ha descrito que CST y sus receptores se expresan a altos niveles en las vías nociceptivas en humanos incluyendo las neuronas de los ganglios dorsales (DRGs) (de Lecea, del Rio et al. 1997; Flood, Uezu et al. 1997; Robas, Mead et al. 2003). De Lecea et al., 1997).

Por otra parte, a través de su unión a los receptores de GHR y de SOM, CST podría actuar de forma similar a estos neuropéptidos presentando un efecto antinociceptivo en el dolor inflamatorio, y con la posibilidad de un efecto sinérgico (Guneli, Onal et al. ; Sibilia, Lattuada et al. 2006; Pan, Wu et al. 2008). Además, la inyección intracerebro-ventricular de CST disminuyó la sensibilidad al calor nocivo en ratas y la secreción de CGRP inducida por la capsaicina en las neuronas del trigémino demostrando su capacidad de regular los centros supraespinales de la nocicepción en el cerebro (Mendez-Diaz, Guevara-Martinez et al. 2004; Capuano, Curro et al. 2011). Datos recientes de nuestro laboratorio indican que existe un alto nivel de expresión de CST en las vías nociceptivas del ratón, sobre todo en las neuronas peptidérgicas.

En este estudio demostramos que CST atenúa las manifestaciones patológicas del dolor que acompañan a la artritis. La administración de CST redujo significativamente la hiperalgesia y la alodinia (Figura 4.30). Aunque la acción local anti-inflamatoria de CST, obviamente, debe contribuir a su efecto analgésico, la administración de CST no redujo de manera significativa el edema en las rodillas. Nuestros resultados demuestran que CST atenúa las manifestaciones patológicas del dolor de forma independiente de su actividad anti-inflamatoria. Resultados de nuestro laboratorio (no publicados) demostraron que CST desactiva directamente los DRG nociceptores primarios frente a estímulos inflamatorios y alógenos tales como TNF- α y capsaicina. Esto sugiere que las acciones que no estén relacionados con la inflamación periférica podrían explicar sus características analgésicas. Nuestros hallazgos tienen importantes implicaciones terapéuticas, especialmente relacionadas con la mejora de la hipersensibilidad a los estímulos mecánicos. La alodinia táctil representa una de las manifestaciones clínicas más debilitantes del dolor patológico, y a menudo resulta difícil de tratar con eficacia mediante el uso de los fármacos convencionales. De hecho, el NS-398, un fármaco anti-inflamatorio potente y analgésico de referencia, es capaz de mejorar la hiperalgesia térmica, pero no la alodinia. En este contexto, actualmente una línea de nuestro laboratorio está centrada en el estudio del mecanismo por el cual CST ejerce sus efectos analgésicos.

6 – COMENTARIOS FINALES

En resumen, en este trabajo, demostramos la acción terapéutica de cortistatina en dos modelos de esclerosis múltiple. Las estrategias terapéuticas actuales contra la EM van encaminadas a tratar de reducir o prevenir los dos componentes principales de la enfermedad, la inflamación y la autoinmunidad y de restaurar la tolerancia inmunológica en el SNC. Por lo tanto CST, además de diversas funciones fisiológicas en el organismo, presenta una serie de características muy atractivas para ser considerada como un posible agente terapéutico frente a la EM. En primer lugar, CST es un agente anti-inflamatorio muy potente a nivel sistémico, que regula un amplio abanico de agentes pro-inflamatorios. En segundo lugar, CST es capaz de inhibir la respuesta tipo Th1/Th17 tras la estimulación antigénica. Por último, CST induce la generación de células T reguladoras (Treg) en varios modelos de autoinmunidad. Una prueba de su eficacia en el tratamiento de enfermedades autoinmunes mediadas por células Th1 e inflamatorias, está en el hecho de que CST tiene efectos protectores y curativos en modelos de artritis reumatoide y enfermedad de Crohn, enfermedades que muestran un perfil patológico muy parecido al de la EM. Por lo tanto, proponemos que CST podría ser una posible alternativa terapéutica en EM.

Sin embargo, como todas las terapias potenciales, el uso de CST presenta algunas desventajas como:

- La inestabilidad, debido a su conformación estructural nativa, la CST y los neuropéptidos en general son extremadamente sensibles a las peptidasas que están presentes en la mayoría de los tejidos.
- Debido a su influencia en ciertas funciones neurológicas, el tratamiento con CST podría afectar el equilibrio del nicho del SNC. Sin embargo, los estudios realizados en ratones con diferentes rutas de administración y concentraciones del péptido no han mostrado efectos secundarios en este sentido.

A pesar de todo esto, utilizar CST como estrategia terapéutica para el tratamiento de la EM y otras enfermedades autoinmunes inflamatorias, presenta un mayor número de ventajas frente a otros potenciales agentes terapéutico, como:

- La CST, como neuropéptido es una molécula pequeña e hidrofílica capaz de obtener un rápido y fácil acceso al sitio de la inflamación, inclusive en el sistema nervioso.
- Presenta una acción potente debido a su alta afinidad de unión a receptores específicos
- En comparación con los actuales fármacos anti-inflamatorios, no presenta efectos colaterales significativos. Los neuropéptidos son compuestos fisiológicos y, como tales, son intrínsecamente no tóxicos, y se elimina rápidamente del cuerpo a través la excreción renal y de los mecanismos naturales de desintoxicación hepática. Además, a menudo las acciones de los neuropéptidos se ven contrarrestadas por otros neuropéptidos, citoquinas o hormonas.
- No generan antigenicidad debido a su pequeño tamaño
- Son fáciles de sintetizar y modificar químicamente en caso de necesidad.
- En este trabajo hemos demostrado que en el caso de CST además de ser un potente anti-inflamatorio presenta propiedades analgésicas.
- No produce inmunosupresión generalizada
- La CST parece modular diferentes tipos celulares en el SNC favoreciendo funciones de neuroregeneración.

7 – CONCLUSIONES

Tanto el tratamiento con CST durante la fase inicial de desarrollo de la EAE, como en estadios más avanzados fue capaz de reducir la incidencia y severidad de la enfermedad, con una reducción significativa del número de placas desmielinizantes, así como una reducción de la infiltración de células inflamatorias.

Los ratones con EAE tratados con CST presentaron una reducción significativa de diversas quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias. Estos resultados confirman el potente efecto anti-inflamatorio de este neuropéptido.

Las células aisladas de ratones con EAE tratados con CST resultaron ser menos autorreactivas que las células de los ratones control, perdiendo la capacidad proliferativa y produciendo niveles reducidos de citoquinas frente al antígeno específico. Estos resultados demuestran que además de controlar la inflamación, CST tiene un papel en la respuesta autorreactiva de células antígeno-específicas.

El tratamiento con CST aumenta la proporción de células T reguladoras en bazo y ganglios linfáticos, productoras de IL10, y la transferencia de células totales de bazo y ganglio inhibe la progresión de EAE, indicando un papel funcional de las células T reguladoras generadas por el tratamiento con este neuropéptido.

El tratamiento con CST en el modelo de EAE aumentó la producción local de factores neurotróficos.

La CST moduló la producción de mediadores inflamatorios de manera diferencial producidos por células gliales en un ambiente neuroinflamatorio.

El efecto terapéutico de CST, podría ser debido a su unión tanto a los receptores de SOM como a los de GHR. En este trabajo demostramos que GHR presenta efectos terapéuticos similares a CST en los modelos de EAE.

Corroborando los efectos anti-inflamatorios del tratamiento con CST, macrófagos y linfocitos deficientes en CST, presentan una producción de citoquinas pro-inflamatorias exacerbada tras la estimulación con LPS o estímulos inespecíficos, respectivamente.

Ratones deficientes en CST presentaron inesperadamente una menor susceptibilidad a la inducción de EAE, así como en otros modelos de enfermedades autoinmunes e inflamatorias como en la artritis, en la colitis y en sepsis.

Ratones deficientes en CST presentan niveles elevados de corticosterona en condiciones basales, y el bloqueo de los receptores de glucocorticoides induce una mayor susceptibilidad a desarrollar la EAE en grados más severos, así como un aumento drástico en la mortalidad en el modelo de sepsis inducido por CLP.

Los ratones CST-KO presentan un estado de ansiedad crónica en condiciones basales, que estaría relacionado con los niveles elevados de glucocorticoides y con una alteración del eje HPA.

Los niveles elevados de glucocorticoides detectados en los ratones CST-KO, no afectan el desarrollo de inflamación localizada. Los ratones CST-KO presentan una mayor infiltración de células polimorfonucleares y producción de TNF- α en el líquido sinovial, y en general alteraciones histopatológicas más severas, es decir, desarrollan una respuesta inflamatoria localizada exacerbada en el modelo de artritis monoarticular inducida por adyuvante.

Los ratones deficientes en CST son más sensibles a estímulos dolorosos en condiciones basales o bajo un proceso inflamatorio, y este efecto parece ser debido a la ausencia de CST endógena dado que este neuropéptido presenta efectos analgésicos.

La administración de CST reduce significativamente la hipersensibilidad inducida por diferentes estímulos inflamatorios, de forma independiente de su efecto como anti-inflamatorio.

8 – BIBLIOGRAFIA

- Abbott, N. J., L. Ronnback, et al. (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." Nat Rev Neurosci **7**(1): 41-53.
- Aharoni, R., B. Kayhan, et al. (2003). "Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14157-62.
- Aktas, O., A. Smorodchenko, et al. (2005). "Neuronal damage in autoimmune neuroinflammation mediated by the death ligand TRAIL." Neuron **46**(3): 421-32.
- Alvarez, J. I., R. Cayrol, et al. (2011). "Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 252-64.
- Anderson, P. and M. Delgado (2008). "Endogenous anti-inflammatory neuropeptides and pro-resolving lipid mediators: a new therapeutic approach for immune disorders." J Cell Mol Med **12**(5B): 1830-47.
- Annane, D., V. Maxime, et al. (2006). "Diagnosis of adrenal insufficiency in severe sepsis and septic shock." Am J Respir Crit Care Med **174**(12): 1319-26.
- Arnett, H. A., J. Mason, et al. (2001). "TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination." Nat Neurosci **4**(11): 1116-22.
- Asquith, D. L., A. M. Miller, et al. (2010). "Apolipoprotein E-deficient mice are resistant to the development of collagen-induced arthritis." Arthritis Rheum **62**(2): 472-7.
- Bar-Or, A., L. Fawaz, et al. (2010). "Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS?" Ann Neurol **67**(4): 452-61.
- Barnes, P. J. (1998). "Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms." Clin Sci (Lond) **94**(6): 557-72.
- Barnes, P. J. (2006). "Corticosteroid effects on cell signalling." Eur Respir J **27**(2): 413-26.
- Bauer, J., H. Rauschka, et al. (2001). "Inflammation in the nervous system: the human perspective." Glia **36**(2): 235-43.
- Baxter, A. G. (2007). "The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis." Nat Rev Immunol **7**(11): 904-12.
- Beato, M. and A. Sanchez-Pacheco (1996). "Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex." Endocr Rev **17**(6): 587-609.
- Bettelli, E., M. Oukka, et al. (2007). "T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity." Nat Immunol **8**(4): 345-50.
- Beyreuther, B., N. Callizot, et al. (2007). "Antinociceptive efficacy of lacosamide in the monosodium iodoacetate rat model for osteoarthritis pain." Arthritis Res Ther **9**(1): R14.
- Blalock, J. E. (2005). "The immune system as the sixth sense." J Intern Med **257**(2): 126-38.
- Bonecchi, R., S. Sozzani, et al. (1998). "Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses." Blood **92**(8): 2668-71.
- Braith, M., K. Kawabe, et al. (2010). "Expression of activity-dependent neuroprotective protein in the immune system: possible functions and relevance to multiple sclerosis." Neuroimmunomodulation **17**(2): 120-5.
- Brand, D. D., A. H. Kang, et al. (2003). "Immunopathogenesis of collagen arthritis." Springer Semin Immunopathol **25**(1): 3-18.
- Brand, D. D., K. A. Latham, et al. (2007). "Collagen-induced arthritis." Nat Protoc **2**(5): 1269-75.

- Brand, J. M., C. Frohn, et al. (2004). "Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells." *Eur Cytokine Netw* **15**(2): 99-104.
- Breedveld, F. C. and J. R. Kalden (2004). "Appropriate and effective management of rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* **63**(6): 627-33.
- Brod, S. A. and Z. M. Hood (2011). "Ingested (oral) SST inhibits EAE." *Autoimmunity* **44**(5): 437-43.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, et al. (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf1, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." *Nat Genet* **27**(1): 68-73.
- Buckingham, J. C. (2006). "Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking." *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**: S258-68.
- Caminero, A., M. Comabella, et al. (2011). "Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), anti-TNF-alpha and demyelination revisited: an ongoing story." *J Neuroimmunol* **234**(1-2): 1-6.
- Capuano, A., D. Curro, et al. (2011). "Cortistatin modulates calcitonin gene-related peptide release from neuronal tissues of rat. Comparison with somatostatin." *Peptides* **32**(1): 138-43.
- Cirelli, C., U. Faraguna, et al. (2006). "Changes in brain gene expression after long-term sleep deprivation." *J Neurochem* **98**(5): 1632-45.
- Codarri, L., G. Gyulveszi, et al. (2011). "RORgammaT drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation." *Nat Immunol* **12**(6): 560-7.
- Compston, A. (1994). "The epidemiology of multiple sclerosis: principles, achievements, and recommendations." *Ann Neurol* **36 Suppl 2**: S211-7.
- Cordoba-Chacon, J., M. D. Gahete, et al. (2011). "Cortistatin is not a somatostatin analogue but stimulates prolactin release and inhibits GH and ACTH in a gender-dependent fashion: potential role of ghrelin." *Endocrinology* **152**(12): 4800-12.
- Criado, J. R., H. Li, et al. (1999). "Structural and compositional determinants of cortistatin activity." *J Neurosci Res* **56**(6): 611-9.
- Cronin, L., D. J. Cook, et al. (1995). "Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature." *Crit Care Med* **23**(8): 1430-9.
- Cheyuo, C., A. Jacob, et al. (2012). "Ghrelin-mediated sympathoinhibition and suppression of inflammation in sepsis." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**(3): E265-72.
- Chitnis, T. and S. J. Khoury (2003). "Role of costimulatory pathways in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Allergy Clin Immunol* **112**(5): 837-49; quiz 850.
- Chiu, C. T., L. L. Wen, et al. (2011). "Cortistatin is induced in brain tissue and exerts neuroprotection in a rat model of bacterial meningoencephalitis." *J Infect Dis* **204**(10): 1563-72.
- Chorny, A., P. Anderson, et al. (2008). "Ghrelin protects against experimental sepsis by inhibiting high-mobility group box 1 release and by killing bacteria." *J Immunol* **180**(12): 8369-77.
- Christ-Crain, M., D. Stolz, et al. (2007). "Free and total cortisol levels as predictors of severity and outcome in community-acquired pneumonia." *Am J Respir Crit Care Med* **176**(9): 913-20.
- Chui, R. and K. Dorovini-Zis (2010). "Regulation of CCL2 and CCL3 expression in human brain endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide." *J Neuroinflammation* **7**: 1.
- Dal Canto, M. C., R. W. Melvold, et al. (1995). "Two models of multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection. A pathological and immunological comparison." *Microsc Res Tech* **32**(3): 215-29.
- Dalm, V. A., P. M. Van Hagen, et al. (2004). "Distribution pattern of somatostatin and cortistatin mRNA in human central and peripheral tissues." *Clin Endocrinol (Oxf)* **60**(5): 625-9.

- Dalm, V. A., P. M. van Hagen, et al. (2003). "Expression of somatostatin, cortistatin, and somatostatin receptors in human monocytes, macrophages, and dendritic cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **285**(2): E344-53.
- Dalm, V. A., P. M. van Hagen, et al. (2003). "Cortistatin rather than somatostatin as a potential endogenous ligand for somatostatin receptors in the human immune system." J Clin Endocrinol Metab **88**(1): 270-6.
- Danner, R. L., R. J. Elin, et al. (1991). "Endotoxemia in human septic shock." Chest **99**(1): 169-75.
- de Lecea, L., J. R. Criado, et al. (1996). "A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties." Nature **381**(6579): 242-5.
- de Lecea, L., J. A. del Rio, et al. (1997). "Cortistatin is expressed in a distinct subset of cortical interneurons." J Neurosci **17**(15): 5868-80.
- Deghenghi, R., M. Papotti, et al. (2001). "Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland." J Endocrinol Invest **24**(1): RC1-3.
- Dello Russo, C., L. Lisi, et al. (2009). "Diverging effects of cortistatin and somatostatin on the production and release of prostanoids from rat cortical microglia and astrocytes." J Neuroimmunol **213**(1-2): 78-83.
- Derbinski, J., A. Schulte, et al. (2001). "Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self." Nat Immunol **2**(11): 1032-9.
- Dittel, B. N. (2000). "Evidence that Fas and FasL contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **48**(5): 381-8.
- Dixon, W. J. (1980). "Efficient analysis of experimental observations." Annu Rev Pharmacol Toxicol **20**: 441-62.
- Dohi, T., K. Fujihashi, et al. (2000). "Mice deficient in Th1- and Th2-type cytokines develop distinct forms of hapten-induced colitis." Gastroenterology **119**(3): 724-33.
- Engelhardt, B. (2006). "Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier." J Neural Transm **113**(4): 477-85.
- Ensoli, F., V. Fiorelli, et al. (2002). "Lymphomononuclear cells from multiple sclerosis patients spontaneously produce high levels of oncostatin M, tumor necrosis factors alpha and beta, and interferon gamma." Mult Scler **8**(4): 284-8.
- Ewing, C. and C. C. Bernard (1998). "Insights into the aetiology and pathogenesis of multiple sclerosis." Immunol Cell Biol **76**(1): 47-54.
- Feger, U., C. Luther, et al. (2007). "Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients." Clin Exp Immunol **147**(3): 412-8.
- Feger, U., E. Tolosa, et al. (2007). "HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation." Blood **110**(2): 568-77.
- Fehervari, Z. and S. Sakaguchi (2004). "CD4+ Tregs and immune control." J Clin Invest **114**(9): 1209-17.
- Feldmann, M., F. M. Brennan, et al. (1996). "Role of cytokines in rheumatoid arthritis." Annu Rev Immunol **14**: 397-440.
- Feldmann, M. and R. N. Maini (1999). "The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." Rheumatology (Oxford) **38 Suppl 2**: 3-7.
- Fenyk-Melody, J. E., A. E. Garrison, et al. (1998). "Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated in mice lacking the NOS2 gene." J Immunol **160**(6): 2940-6.
- Ferber, I. A., S. Brocke, et al. (1996). "Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." J Immunol **156**(1): 5-7.

- Finkelman, F. D., J. Holmes, et al. (1990). "Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection." *Annu Rev Immunol* **8**: 303-33.
- Fiocchi, C. (1998). "Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis." *Gastroenterology* **115**(1): 182-205.
- Flood, J. F., K. Uezu, et al. (1997). "The cortical neuropeptide, cortistatin-14, impairs post-training memory processing." *Brain Res* **775**(1-2): 250-2.
- Frisullo, G., V. Nociti, et al. (2008). "IL17 and IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis." *Cytokine* **44**(1): 22-5.
- Frota, E. R., D. H. Rodrigues, et al. (2009). "Increased plasma levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) after multiple sclerosis relapse." *Neurosci Lett* **460**(2): 130-2.
- Fukusumi, S., C. Kitada, et al. (1997). "Identification and characterization of a novel human cortistatin-like peptide." *Biochem Biophys Res Commun* **232**(1): 157-63.
- Furlan, R., E. Brambilla, et al. (2001). "Intrathecal delivery of IFN-gamma protects C57BL/6 mice from chronic-progressive experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing apoptosis of central nervous system-infiltrating lymphocytes." *J Immunol* **167**(3): 1821-9.
- Genain, C. P., K. Abel, et al. (1996). "Late complications of immune deviation therapy in a nonhuman primate." *Science* **274**(5295): 2054-7.
- Gerard, C., C. Bruyns, et al. (1993). "Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia." *J Exp Med* **177**(2): 547-50.
- Giladi, E., J. M. Hill, et al. (2007). "Vasoactive intestinal peptide (VIP) regulates activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) expression in vivo." *J Mol Neurosci* **33**(3): 278-83.
- Girault, J. A. and E. Peles (2002). "Development of nodes of Ranvier." *Curr Opin Neurobiol* **12**(5): 476-85.
- Glabinski, A. R., M. Tani, et al. (1997). "Synchronous synthesis of alpha- and beta-chemokines by cells of diverse lineage in the central nervous system of mice with relapses of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis." *Am J Pathol* **150**(2): 617-30.
- Glass, C. K. and M. G. Rosenfeld (2000). "The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors." *Genes Dev* **14**(2): 121-41.
- Goetzl, E. J., J. K. Voice, et al. (2001). "Enhanced delayed-type hypersensitivity and diminished immediate-type hypersensitivity in mice lacking the inducible VPAC(2) receptor for vasoactive intestinal peptide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13854-9.
- Goldring, S. R. (2002). "Bone and joint destruction in rheumatoid arthritis: what is really happening?" *J Rheumatol Suppl* **65**: 44-8.
- Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, et al. (2007). "Therapeutic effect of cortistatin on experimental arthritis by downregulating inflammatory and Th1 responses." *Ann Rheum Dis* **66**(5): 582-8.
- Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, et al. (2006). "VIP: an agent with license to kill infective parasites." *Ann N Y Acad Sci* **1070**: 303-8.
- Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, et al. (2007). "Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides." *Nat Rev Immunol* **7**(1): 52-63.
- Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, et al. (2006). "Cortistatin, a new antiinflammatory peptide with therapeutic effect on lethal endotoxemia." *J Exp Med* **203**(3): 563-71.
- Gonzalez-Rey, E., V. Delgado-Maroto, et al. (2010). "Neuropeptides as therapeutic approach to autoimmune diseases." *Curr Pharm Des* **16**(28): 3158-72.
- Gonzalez-Rey, E. and M. Delgado (2006). "Cortistatin as a potential multistep therapeutic agent for inflammatory disorders." *Drug News Perspect* **19**(7): 393-9.

- Gonzalez-Rey, E., A. Fernandez-Martin, et al. (2006). "Therapeutic effect of vasoactive intestinal peptide on experimental autoimmune encephalomyelitis: down-regulation of inflammatory and autoimmune responses." *Am J Pathol* **168**(4): 1179-88.
- Gonzalez-Rey, E., N. Varela, et al. (2006). "Cortistatin, an antiinflammatory peptide with therapeutic action in inflammatory bowel disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(11): 4228-33.
- Goodman, A. D., T. R. Brown, et al. (2010). "A phase 3 trial of extended release oral dalfampridine in multiple sclerosis." *Ann Neurol* **68**(4): 494-502.
- Goverman, J., A. Perchellet, et al. (2005). "The role of CD8(+) T cells in multiple sclerosis and its animal models." *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**(2): 239-45.
- Gozes, I. (2007). "Activity-dependent neuroprotective protein: from gene to drug candidate." *Pharmacol Ther* **114**(2): 146-54.
- Gran, B., G. X. Zhang, et al. (2002). "IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination." *J Immunol* **169**(12): 7104-10.
- Guneli, E., A. Onal, et al. "Effects of repeated administered ghrelin on chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats." *Neurosci Lett* **479**(3): 226-30.
- Hargreaves, K., R. Dubner, et al. (1988). "A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia." *Pain* **32**(1): 77-88.
- Hauser, S. L., E. Waubant, et al. (2008). "B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis." *N Engl J Med* **358**(7): 676-88.
- Hemmer, B., J. J. Archelos, et al. (2002). "New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis." *Nat Rev Neurosci* **3**(4): 291-301.
- Henderson, B., E. R. Pettipher, et al. (1987). "Mediators of rheumatoid arthritis." *Br Med Bull* **43**(2): 415-28.
- Heremans, H., C. Dillen, et al. (1996). "Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CREAE) in mice: enhancement by monoclonal antibodies against interferon-gamma." *Eur J Immunol* **26**(10): 2393-8.
- Herz, J., F. Zipp, et al. (2010). "Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation." *Exp Neurol* **225**(1): 9-17.
- Hillert, J. and O. Olerup (1993). "HLA and MS." *Neurology* **43**(11): 2426-7.
- Hoff, M., T. K. Kvien, et al. (2009). "Adalimumab therapy reduces hand bone loss in early rheumatoid arthritis: explorative analyses from the PREMIER study." *Ann Rheum Dis* **68**(7): 1171-6.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* **299**(5609): 1057-61.
- Huseby, E. S., D. Liggitt, et al. (2001). "A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis." *J Exp Med* **194**(5): 669-76.
- Imitola, J., T. Chitnis, et al. (2005). "Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside." *Pharmacol Ther* **106**(2): 163-77.
- Inglis, J. J., G. Criado, et al. (2007). "Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen." *Arthritis Res Ther* **9**(5): R113.
- Inglis, J. J., E. Simelyte, et al. (2008). "Protocol for the induction of arthritis in C57BL/6 mice." *Nat Protoc* **3**(4): 612-8.
- Jadidi-Niaragh, F. and A. Mirshafiey "Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis." *Scand J Immunol* **74**(1): 1-13.

- Jager, A., V. Dardalhon, et al. (2009). "Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes." *J Immunol* **183**(11): 7169-77.
- Jean-Baptiste, E. (2007). "Cellular mechanisms in sepsis." *J Intensive Care Med* **22**(2): 63-72.
- Jiang, H., L. J. Li, et al. (2008). "Ghrelin antagonizes MPTP-induced neurotoxicity to the dopaminergic neurons in mouse substantia nigra." *Exp Neurol* **212**(2): 532-7.
- Juedes, A. E., P. Hjelmstrom, et al. (2000). "Kinetics and cellular origin of cytokines in the central nervous system: insight into mechanisms of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **164**(1): 419-26.
- Julius, D. and A. I. Basbaum (2001). "Molecular mechanisms of nociception." *Nature* **413**(6852): 203-10.
- Katakai, T., H. Suto, et al. (2008). "Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs." *J Immunol* **181**(9): 6189-200.
- Keh, D., T. Boehnke, et al. (2003). "Immunologic and hemodynamic effects of "low-dose" hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study." *Am J Respir Crit Care Med* **167**(4): 512-20.
- Kerschensteiner, M., E. Gallmeier, et al. (1999). "Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation?" *J Exp Med* **189**(5): 865-70.
- Kluver, H. and E. Barrera (1953). "A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system." *J Neuropathol Exp Neurol* **12**(4): 400-3.
- Koch, M., J. Mostert, et al. (2007). "Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis." *Eur J Neurol* **14**(5): 529-33.
- Kodama, T., J. Ashitani, et al. (2008). "Ghrelin treatment suppresses neutrophil-dominant inflammation in airways of patients with chronic respiratory infection." *Pulm Pharmacol Ther* **21**(5): 774-9.
- Koelsch, M., R. Mallak, et al. (2010). "Acetaminophen (paracetamol) inhibits myeloperoxidase-catalyzed oxidant production and biological damage at therapeutically achievable concentrations." *Biochem Pharmacol* **79**(8): 1156-64.
- Kohm, A. P., P. A. Carpentier, et al. (2002). "Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **169**(9): 4712-6.
- Korn, T., J. Reddy, et al. (2007). "Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation." *Nat Med* **13**(4): 423-31.
- Kuhlmann, T., G. Lingfeld, et al. (2002). "Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time." *Brain* **125**(Pt 10): 2202-12.
- Lafaille, J. J., F. V. Keere, et al. (1997). "Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease." *J Exp Med* **186**(2): 307-12.
- Lalive, P. H., O. Neuhaus, et al. (2011). "Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis: emerging concepts regarding its mechanism of action." *CNS Drugs* **25**(5): 401-14.
- Lan, R. Y., A. A. Ansari, et al. (2005). "Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity." *Autoimmun Rev* **4**(6): 351-63.
- Langrish, C. L., Y. Chen, et al. (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." *J Exp Med* **201**(2): 233-40.
- Larochelle, C., J. I. Alvarez, et al. (2011). "How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis?" *FEBS Lett* **585**(23): 3770-80.

- Lau, D., H. Mollnau, et al. (2005). "Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(2): 431-6.
- Leme, R. J. and G. Chadi (2001). "Distant microglial and astroglial activation secondary to experimental spinal cord lesion." *Arq Neuropsiquiatr* **59**(3-A): 483-92.
- Lewin, G. R. and Y. A. Barde (1996). "Physiology of the neurotrophins." *Annu Rev Neurosci* **19**: 289-317.
- Linker, R. A., D. H. Lee, et al. (2010). "Functional role of brain-derived neurotrophic factor in neuroprotective autoimmunity: therapeutic implications in a model of multiple sclerosis." *Brain* **133**(Pt 8): 2248-63.
- Lopez-Bojorquez, L. N., A. Z. Dehesa, et al. (2004). "Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock." *Arch Med Res* **35**(6): 465-79.
- Lublin, F. D. and S. C. Reingold (1996). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis." *Neurology* **46**(4): 907-11.
- Lucchinetti, C., W. Bruck, et al. (2001). "Multiple sclerosis: recent developments in neuropathology, pathogenesis, magnetic resonance imaging studies and treatment." *Curr Opin Neurol* **14**(3): 259-69.
- Lucchinetti, C., W. Bruck, et al. (2000). "Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination." *Ann Neurol* **47**(6): 707-17.
- Luhder, F. and H. M. Reichardt (2009). "Traditional concepts and future avenues of glucocorticoid action in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis therapy." *Crit Rev Immunol* **29**(3): 255-73.
- Lutton, J. D., R. Winston, et al. (2004). "Multiple sclerosis: etiological mechanisms and future directions." *Exp Biol Med (Maywood)* **229**(1): 12-20.
- Madrigal, J. L., B. Garcia-Bueno, et al. (2006). "Stress-induced oxidative changes in brain." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **5**(5): 561-8.
- Mantovani, A., P. A. Gray, et al. (2000). "Macrophage-derived chemokine (MDC)." *J Leukoc Biol* **68**(3): 400-4.
- Markovics, A., E. Szoke, et al. (2012). "Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of cortistatin-14 and somatostatin-14 in distinct in vitro and in vivo model systems." *J Mol Neurosci* **46**(1): 40-50.
- Martinez-Forero, I., R. Garcia-Munoz, et al. (2008). "IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis." *Eur J Immunol* **38**(2): 576-86.
- Martinez, C., C. Abad, et al. (2002). "Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(2): 1053-8.
- McCoy, M. K. and M. G. Tansey (2008). "TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease." *J Neuroinflammation* **5**: 45.
- McGeachy, M. J., L. A. Stephens, et al. (2005). "Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system." *J Immunol* **175**(5): 3025-32.
- Mecha M , Iñigo PM , et al. (2011). "An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach." *Protocol Exchange*
<http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/2051>.
- Mendel, I., N. Kerlero de Rosbo, et al. (1995). "A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells." *Eur J Immunol* **25**(7): 1951-9.

- Mendez-Diaz, M., M. Guevara-Martinez, et al. (2004). "Cortistatin, a modulatory peptide of sleep and memory, induces analgesia in rats." *Neurosci Lett* **354**(3): 242-4.
- Molina-Holgado, E., J. M. Vela, et al. (2001). "LPS/IFN-gamma cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10." *Eur J Neurosci* **13**(3): 493-502.
- Moon, M., H. G. Kim, et al. (2009). "Neuroprotective effect of ghrelin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation." *Neurotox Res* **15**(4): 332-47.
- Moynagh, P. N. (2003). "Toll-like receptor signalling pathways as key targets for mediating the anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids." *J Endocrinol* **179**(2): 139-44.
- Murer, M. G., Q. Yan, et al. (2001). "Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease." *Prog Neurobiol* **63**(1): 71-124.
- Nair, A., T. J. Frederick, et al. (2008). "Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment." *Cell Mol Life Sci* **65**(17): 2702-20.
- Neumann, H., M. R. Kotter, et al. (2009). "Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration." *Brain* **132**(Pt 2): 288-95.
- Nikbin, B., M. M. Bonab, et al. (2007). "Role of B cells in pathogenesis of multiple sclerosis." *Int Rev Neurobiol* **79**: 13-42.
- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, et al. (2005). "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." *Science* **308**(5726): 1314-8.
- Oleszak, E. L., J. R. Chang, et al. (2004). "Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis." *Clin Microbiol Rev* **17**(1): 174-207.
- Oppert, M., R. Schindler, et al. (2005). "Low-dose hydrocortisone improves shock reversal and reduces cytokine levels in early hyperdynamic septic shock." *Crit Care Med* **33**(11): 2457-64.
- Owens, T. (2003). "The enigma of multiple sclerosis: inflammation and neurodegeneration cause heterogeneous dysfunction and damage." *Curr Opin Neurol* **16**(3): 259-65.
- Pan, H. L., Z. Z. Wu, et al. (2008). "Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors." *Pharmacol Ther* **117**(1): 141-61.
- Paquet, J., J. C. Goebel, et al. (2012). "Cytokines profiling by multiplex analysis in experimental arthritis: which pathophysiological relevance for articular versus systemic mediators?" *Arthritis Res Ther* **14**(2): R60.
- Patani, R., M. Balaratnam, et al. (2007). "Remyelination can be extensive in multiple sclerosis despite a long disease course." *Neuropathol Appl Neurobiol* **33**(3): 277-87.
- Patel, G. P. and R. A. Balk (2012). "Systemic steroids in severe sepsis and septic shock." *Am J Respir Crit Care Med* **185**(2): 133-9.
- Pearson, C. M. (1956). "Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants." *Proc Soc Exp Biol Med* **91**(1): 95-101.
- Perry, V. H. (1998). "A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation." *J Neuroimmunol* **90**(2): 113-21.
- Perry, V. H., J. A. Nicoll, et al. (2010). "Microglia in neurodegenerative disease." *Nat Rev Neurol* **6**(4): 193-201.
- Pinhasov, A., S. Mandel, et al. (2003). "Activity-dependent neuroprotective protein: a novel gene essential for brain formation." *Brain Res Dev Brain Res* **144**(1): 83-90.
- Plosker, G. L. (2011). "Interferon-beta-1b: a review of its use in multiple sclerosis." *CNS Drugs* **25**(1): 67-88.

- Prasse, A., G. Zissel, et al. (2010). "Inhaled vasoactive intestinal peptide exerts immunoregulatory effects in sarcoidosis." *Am J Respir Crit Care Med* **182**(4): 540-8.
- Prinz, M. and A. Mildner (2011). "Microglia in the CNS: immigrants from another world." *Glia* **59**(2): 177-87.
- Probert, L., K. Akassoglou, et al. (1997). "TNF-alpha transgenic and knockout models of CNS inflammation and degeneration." *J Neuroimmunol* **72**(2): 137-41.
- Puebla, L., R. Mouchantaf, et al. (1999). "Processing of rat preprocortistatin in mouse AtT-20 cells." *J Neurochem* **73**(3): 1273-7.
- Randall, L. O. and J. J. Selitto (1957). "A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue." *Arch Int Pharmacodyn Ther* **111**(4): 409-19.
- Ransohoff, R. M. and M. L. Estes (1991). "Astrocyte expression of major histocompatibility complex gene products in multiple sclerosis brain tissue obtained by stereotactic biopsy." *Arch Neurol* **48**(12): 1244-6.
- Rauca, C., K. Schafer, et al. (1999). "Effects of somatostatin, octreotide and cortistatin on ischaemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **360**(6): 633-8.
- Reddy, J., Z. Illes, et al. (2004). "Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(43): 15434-9.
- Riley, C. P., T. C. Cope, et al. (2004). "CNS neurotrophins are biologically active and expressed by multiple cell types." *J Mol Histol* **35**(8-9): 771-83.
- Robas, N., E. Mead, et al. (2003). "MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion." *J Biol Chem* **278**(45): 44400-4.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* **155**(3): 1151-64.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, et al. (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." *Cell* **133**(5): 775-87.
- Scott, L. J. (2011). "Fingolimod: a review of its use in the management of relapsing-remitting multiple sclerosis." *CNS Drugs* **25**(8): 673-98.
- Schaible, H. G., F. Richter, et al. (2009). "Joint pain." *Exp Brain Res* **196**(1): 153-62.
- Scheinman, R. I., P. C. Cogswell, et al. (1995). "Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids." *Science* **270**(5234): 283-6.
- Schonrock, L. M., G. Gawlowski, et al. (2000). "Interleukin-6 expression in human multiple sclerosis lesions." *Neurosci Lett* **294**(1): 45-8.
- Schreiner, B., F. L. Heppner, et al. (2009). "Modeling multiple sclerosis in laboratory animals." *Semin Immunopathol* **31**(4): 479-95.
- Seddon, B. and D. Mason (2000). "The third function of the thymus." *Immunol Today* **21**(2): 95-9.
- Sedzik, J. (2008). "Myelin sheaths and autoimmune response induced by myelin proteins and alphaviruses. I. Physicochemical background." *Curr Med Chem* **15**(19): 1899-910.
- Selmaj, K., C. S. Raine, et al. (1991). "Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin." *J Immunol* **147**(5): 1522-9.
- Serada, S., M. Fujimoto, et al. (2008). "IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(26): 9041-6.
- Seth, P. and N. Koul (2008). "Astrocyte, the star avatar: redefined." *J Biosci* **33**(3): 405-21.

- Sharma, R., M. T. Fischer, et al. (2010). "Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination." Acta Neuropathol **120**(2): 223-36.
- Shibata, M., T. Hisajima, et al. (2008). "Morphological relationships between peptidergic nerve fibers and immunoglobulin A-producing lymphocytes in the mouse intestine." Brain Behav Immun **22**(2): 158-66.
- Sibilia, V., N. Lattuada, et al. (2006). "Ghrelin inhibits inflammatory pain in rats: involvement of the opioid system." Neuropharmacology **51**(3): 497-505.
- Singer, B., A. P. Ross, et al. (2011). "Oral fingolimod for the treatment of patients with relapsing forms of multiple sclerosis." Int J Clin Pract **65**(8): 887-95.
- Song, I. H., R. Gold, et al. (2005). "New Glucocorticoids on the Horizon: Repress, Don't Activate!" J Rheumatol **32**(6): 1199-1207.
- Soni, A., G. M. Pepper, et al. (1995). "Adrenal insufficiency occurring during septic shock: incidence, outcome, and relationship to peripheral cytokine levels." Am J Med **98**(3): 266-71.
- Spier, A. D. and L. de Lecea (2000). "Cortistatin: a member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions." Brain Res Brain Res Rev **33**(2-3): 228-41.
- Stadelmann, C., M. Kerschensteiner, et al. (2002). "BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells?" Brain **125**(Pt 1): 75-85.
- Standiford, T. J., R. M. Strieter, et al. (1995). "Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia. Cooperative effects of macrophage inflammatory protein-2 and tumor necrosis factor." J Immunol **155**(4): 2222-9.
- Steinman, L. (1996). "Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system." Cell **85**(3): 299-302.
- Sternberg, E. M. (2006). "Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens." Nat Rev Immunol **6**(4): 318-28.
- Storch, M. and H. Lassmann (1997). "Pathology and pathogenesis of demyelinating diseases." Curr Opin Neurol **10**(3): 186-92.
- Strober, W., I. J. Fuss, et al. (2002). "The immunology of mucosal models of inflammation." Annu Rev Immunol **20**: 495-549.
- Stucky, C. L., M. S. Gold, et al. (2001). "Mechanisms of pain." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 11845-6.
- Sun, D., J. N. Whitaker, et al. (2001). "Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice." J Immunol **166**(12): 7579-87.
- Tan, Y. V., C. Abad, et al. (2009). "Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide is an intrinsic regulator of Treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(6): 2012-7.
- Thakker, P., M. W. Leach, et al. (2007). "IL-23 is critical in the induction but not in the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **178**(4): 2589-98.
- Theil, M. M., S. Miyake, et al. (2009). "Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by ghrelin." J Immunol **183**(4): 2859-66.
- Thompson, C. and F. Powrie (2004). "Regulatory T cells." Curr Opin Pharmacol **4**(4): 408-14.
- Tonussi, C. R. and S. H. Ferreira (1992). "Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics." Pain **48**(3): 421-7.
- Trapp, B. D., J. Peterson, et al. (1998). "Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis." N Engl J Med **338**(5): 278-85.

- Tsunoda, I. and R. S. Fujinami (2010). "Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis." *J Neuroimmune Pharmacol* **5**(3): 355-69.
- Tsunoda, I., L. Q. Kuang, et al. (2003). "Axonal injury heralds virus-induced demyelination." *Am J Pathol* **162**(4): 1259-69.
- Tzartos, J. S., M. A. Friese, et al. (2008). "Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis." *Am J Pathol* **172**(1): 146-55.
- van Oosten, B. W., F. Barkhof, et al. (1996). "Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2." *Neurology* **47**(6): 1531-4.
- Vargas, M. E. and B. A. Barres (2007). "Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow?" *Annu Rev Neurosci* **30**: 153-79.
- Varona, R., V. Cadenas, et al. (2003). "CCR6 has a non-redundant role in the development of inflammatory bowel disease." *Eur J Immunol* **33**(10): 2937-46.
- Venken, K., N. Hellings, et al. (2008). "Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression." *J Immunol* **180**(9): 6411-20.
- Villoslada, P. (2010). *Esclerosis múltiple*(1ª Edición, Valencia): Marge Médica Books.
- Vollmer, T., T. Stewart, et al. (2010). "Mitoxantrone and cytotoxic drugs' mechanisms of action." *Neurology* **74 Suppl 1**: S41-6.
- Voskuhl, R. R., R. S. Peterson, et al. (2009). "Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS." *J Neurosci* **29**(37): 11511-22.
- Walley, K. R., N. W. Lukacs, et al. (1996). "Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis." *Infect Immun* **64**(11): 4733-8.
- Weber, M. S., B. Hemmer, et al. (2011). "The role of antibodies in multiple sclerosis." *Biochim Biophys Acta* **1812**(2): 239-45.
- Weiner, H. L. (2008). "A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis." *J Neurol* **255 Suppl 1**: 3-11.
- Wilson, A. W., S. J. Medhurst, et al. (2006). "An animal model of chronic inflammatory pain: pharmacological and temporal differentiation from acute models." *Eur J Pain* **10**(6): 537-49.
- Willenborg, D. O., S. Fordham, et al. (1996). "IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **157**(8): 3223-7.
- Winsky-Sommerer, R., A. D. Spier, et al. (2004). "Overexpression of the human beta-amyloid precursor protein downregulates cortistatin mRNA in PDAPP mice." *Brain Res* **1023**(1): 157-62.
- Wosik, K., K. Biernacki, et al. (2007). "Death receptor expression and function at the human blood brain barrier." *J Neurol Sci* **259**(1-2): 53-60.
- Youm, Y. H., H. Yang, et al. (2009). "Deficient ghrelin receptor-mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity." *J Biol Chem* **284**(11): 7068-77.
- Yu-Lee, L. Y. (2002). "Prolactin modulation of immune and inflammatory responses." *Recent Prog Horm Res* **57**: 435-55.
- Yu, Y. C., S. T. Koo, et al. (2002). "Two variables that can be used as pain indices in experimental animal models of arthritis." *J Neurosci Methods* **115**(1): 107-13.

- Zangger, P., E. C. Keystone, et al. (2005). "Asymmetry of small joint involvement in rheumatoid arthritis: prevalence and tendency towards symmetry over time." Joint Bone Spine **72**(3): 241-7.
- Zeinstra, E., N. Wilczak, et al. (2003). "Reactive astrocytes in chronic active lesions of multiple sclerosis express co-stimulatory molecules B7-1 and B7-2." J Neuroimmunol **135**(1-2): 166-71.
- Zeyda, T., N. Diehl, et al. (2001). "Impairment in motor learning of somatostatin null mutant mice." Brain Res **906**(1-2): 107-14.
- Zhou, D., R. Srivastava, et al. (2006). "Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(50): 19057-62.
- Zozulya, A. L. and H. Wiendl (2008). "The role of regulatory T cells in multiple sclerosis." Nat Clin Pract Neurol **4**(7): 384-98.