# Generación de un modelo murino de encefalomielitis autoinmune experimental crónico progresivo para estudios de farmacología molecular en esclerosis múltiple

Karelia Macías-Cosme¹, Majel Cervantes-Llanos¹, Javier Marín-Prida², Viviana Falcón-Cama¹, Eduardo Pentón-Arias¹, ≤ Giselle Pentón-Rol¹

<sup>1</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, CP 10 600, La Habana, Cuba <sup>2</sup>Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, CEIEB Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, UH Ave. 23 e/ 222 y 214, La Coronela, La Lisa, La Habana, Cuba E-mail: giselle.penton@cigb.edu.cu

# RESUMEN

La inducción de la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) mediante la glicoproteína de la mielina del oligodendrocito (MOG) en ratones C57BL/6 isogénicos y homocigóticos, se caracteriza por un patrón crónico progresivo. Este modelo remeda un amplio espectro de síntomas y signos clínicos típicos de la esclerosis múltiple (EM) en humanos. Se describe el ajuste de las condiciones experimentales con respecto a las referidas en la literatura, y se demuestra la generación del modelo mediante evaluaciones clínicas, moleculares y ultraestructurales. La enfermedad se indujo por inmunización activa con el encefalitógeno constituido por el péptido MOG<sub>35-55</sub> emulsificado en adyuvante incompleto de Freund, suplementado con *Mycobacterium tuberculosis* y dos administraciones adicionales de toxina pertussis. Los animales inmunizados mostraron signos clínicos de EAE, cuya severidad aumentó en forma progresiva y ascendente a partir del día 8 después de la inducción, con un puntaje clínico máximo de 3.5, sin reversión hasta el día 28, en que finalizó el período de evaluación. La disminución del peso corporal estuvo asociada con el inicio del deterioro clínico. Desde el punto de vista molecular, se identificó una regulación positiva de citocinas efectoras en el cerebro de los animales enfermos, principalmente de la IL-17. Se observaron daños ultraestructurales característicos de la EM en la mielina y el axón. Esta metodología permitió la generación de un modelo animal con elementos esenciales de la patogénesis de la EM y, por tanto, útil para el estudio de mecanismos fisiopatológicos, la identificación de nuevos blancos farmacológicos y la evaluación de biomoléculas con fines terapéuticos.

Palabras clave: encefalomielitis autoinmune experimental, glicoproteína de la mielina del oligodendrocito, desmielinización, esclerosis múltiple, C57BL/6

Biotecnología Aplicada 2012;29:162-168

## ABSTRACT

Generation of a murine chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis model for molecular pharmacology studies in multiple sclerosis. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), when induced in syngenic C57BL/6 mice by using myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), usually exhibits a chronic progressive pattern. This model mimics many of the symptoms and clinical signs typical of multiple sclerosis (MS) in humans. The present work describes specific adjustments to the experimental parameters described in the literature that were necessary when implementing this model under our conditions, demonstrating the presence of EAE in experimental animals by means of clinical evaluations, molecular assays and ultrastructural studies. The disorder was induced by active immunization with peptide MOG<sub>35-55</sub> emulsified in Freund's Incomplete Adjuvant supplemented with Mycobacterium tuberculosis, together with two additional administrations of Pertussis toxin. All immunized animals exhibited the typical clinical signs of EAE, with a severity that increased progressively from day 8 post-induction to the end of the evaluation, at day 28 post-induction. The maximum clinical score was 3.5, and the disorder was not reversible. Body weight loss was associated with clinical deterioration at the initial stages of the experiment. From a molecular perspective, it was shown that effector cytokines (mainly IL-17) were positively regulated in the brain of diseased animals. The characteristic ultrastructural changes of MS were also detected; namely, demyelination and axonal damage. The methodology described here enabled the implementation of an animal model that reproduces fundamental aspects of the pathogenesis of MS and is, therefore, highly useful for the study of physiopathological mechanisms, the identification of new pharmacological targets and the evaluation of specific biomolecules with therapeutic purposes.

Keywords: experimental autoimmune encephalomyelitis, myelin oligodendrocyte glycoprotein, demyelination, multiple sclerosis, C57BL/6

# **I**ntroducción

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica desmielinizante y neurodegenerativa, que afecta alrededor de 2.5 millones de personas en el mundo, y constituye la causa más frecuente de invalidez neurológica en adultos jóvenes [1], especialmente en países desarrollados del hemisferio norte. Las terapias internacionalmente aprobadas para el período intercrisis en la EM son interferón beta (IFN- $\beta$ ),

1. Holmoy T, Vartdal F. The immunological basis for treatment of multiple sclerosis. Scand J Immunol. 2007;66(4):374-82.

Copaxone, Natalizumab y la recién aprobada terapia oral Fingolimod (o Gilenya®) [2]. Estos fármacos son altamente costosos (entre 20 y 60 mil dólares anuales por paciente) [3], y tienen un efecto terapéutico relativamente modesto, por lo que la búsqueda de nuevos tratamientos es un área de investigación de fuerte competitividad.

No existe tratamiento curativo para la EM. Las terapias aprobadas para esta enfermedad, así como las que están en fase de estudios clínicos, provienen de evidencias preclínicas obtenidas en la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) [4]. La EAE es una valiosa herramienta para investigar estrategias terapéuticas novedosas, así como su influencia en la modulación de circuitos inmunorregulatorios claves en la patogénesis de la EM.

Desde el punto de vista molecular, la EAE es una enfermedad mediada fundamentalmente por células T CD4+ [5]. Durante mucho tiempo predominó la idea de que se debía exclusivamente a las CD4+ Th1. Sin embargo, actualmente se conoce que las células Th17, secretoras de interleucina 17 (IL-17) e IL-22 [6], tienen una función determinante en los procesos de inflamación y otros eventos moleculares asociados con la patogénesis de la EAE [7, 8]. La entrada de estas células T autorreactivas en el sistema nervioso central, acompañadas de otros mediadores inflamatorios, está favorecida por el aumento de la permeabilidad vascular de la barrera hematoencefálica, que contribuye a la desmielinización y a la pérdida axonal características de la EAE y la EM [5].

La EAE se genera experimentalmente en una especie animal susceptible, como resultado de la inmunización con antígenos de la vaina de mielina. No todas las especies animales son igualmente susceptibles a la inducción de la EAE a partir de los diferentes encefalitógenos, en particular de la glicoproteína de la mielina del oligodendrocito (MOG), lo cual se atribuye comúnmente a la dotación genética y a los polimorfismos existentes en las secuencias alélicas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II y del receptor de células T [9]. Además, los factores ambientales también ejercen una influencia fundamental en el desarrollo de la EAE. En este sentido, se ha descrito la resistencia a la inducción de la enfermedad, en dependencia de las instalaciones y las condiciones de mantenimiento en que se encuentran los animales [10]. Entre otras causas, puede deberse a la presencia de parásitos intestinales, lo cual apoya la denominada hipótesis de la higiene [11].

Sobre la base de estos antecedentes, en la presente investigación nos propusimos detallar las condiciones experimentales que nos permitieron la generación de un modelo de EAE crónico progresivo en ratones C57BL/6." debido a que la obtención del mismo depende de ajustes adecuados y precisos de las condiciones experimentales. En este artículo se describen tales ajustes, imprescindibles y relevantes para garantizar la reproducibilidad y la utilización del modelo por otros investigadores de la temática. La demostración de la generación del modelo se realizó mediante variables clínicas, moleculares y el análisis ultraestructural. Este modelo es robusto y ofrece un valor predictivo adecuado para nuevos fármacos contra la EM.

## Materiales y métodos

#### Animales

Se emplearon 30 ratones hembras de la línea C57BL/6 (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Cuba) de 5 a 6 semanas de edad, con un peso corporal entre 16 y 18 g en el momento de la inmunización. Luego de una semana de adaptación al laboratorio, se utilizaron para los experimentos. Se mantuvieron en condiciones controladas con temperatura de  $19 \pm 2$  °C, humedad relativa entre 55 y 65%, y un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas. Se les suministró alimento concentrado estéril, a razón de 5 g por animal y agua a libre demanda.

Se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos experimentales de 10 animales cada uno: grupo control negativo (ratones que no recibieron inmunización ni tratamiento farmacológico); grupo afectado con EAE (animales inmunizados que recibieron diariamente solución tampón fosfato estéril por vía subcutánea; s.c.); grupo afectado con EAE más hidrocortisona (animales inmunizados y tratados diariamente con 1 mg/kg de hidrocortisona por vía s.c., disuelta en solución tampón fosfato estéril; PBS), desde el día inicial y hasta el día 12 después de la inducción. El comité institucional para el uso y cuidado de animales de laboratorio del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, Cuba), aprobó el estudio de acuerdo con los estándares internacionales [12].

# Inducción de la encefalomielitis autoinmune experimental

Se utilizó el método descrito por Pluchino y cols. [13] con algunas modificaciones. Los ratones se inmunizaron por vía subcutánea en los flancos derecho e izquierdo a nivel torácico en los días 0 y 7, respectivamente, con 200 µg del antígeno inductor, correspondiente a la secuencia polipeptídica de la proteína MOG entre los residuos 35 y 55 (MOG<sub>35-55</sub>: MEVGWYRSPFS-RVVHLYRNGK) con una pureza superior al 98% (CIGB, Cuba). El MOG<sub>35-55</sub> se emulsificó en 200 µL de adyuvante incompleto de Freund (AIF; Sigma, EE.UU.), suplementado con Mycobacterium tuberculosis (MT, cepa H37Ra; Difco, EE.UU.) a una concentración final de 8 mg/mL. Además, los ratones recibieron una solución de toxina pertussis (TP; 200 ng en 100 uL de PBS) por vía endovenosa (vena de la cola), inmediatamente después de la administración del encefalitógeno en el día 0 y luego, en el día 2.

## Preparación del encefalitógeno inductor de la encefalomielitis autoinmune experimental

#### Adyuvante incompleto de Freund más MT

El contenido de un ámpula de MT (100 mg) se transfirió a un mortero pequeño, en el que se redujeron los agregados de la bacteria de forma paulatina (inicialmente de color amarillento), a un polvo fino de apariencia blanquecina mediante el empleo de un pistilo. Seguidamente, poco a poco y con agitación, se agregaron 12.5 mL de AIF a la MT recién triturada, y la mezcla se transfirió a un tubo de 50 mL, en agitación suave constante a 4 °C. Esta mezcla se puede conservar por un período máximo de 2 meses de manera estable a una temperatura entre 2 y 8 °C hasta su uso. 2. Huynh T. The multiple sclerosis market. Nat Rev Drug Discov. 2010;9(10):759-60.

3. Thomson Healthcare. Red Book: Pharmacy's Fundamental Reference. 112 ed. Montvale, NJ: Thomson Healthcare; 2008.

4. Hohlfeld R, Wekerle H. Immunological update on multiple sclerosis. Curr Opin Neurol. 2001;14(3):299-304.

5. Cassan C, Liblau RS. Immune tolerance and control of CNS autoimmunity: from animal models to MS patients. J Neurochem. 2007;100(4):883-92.

6. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular iden-tity and genetic programming. Nat Rev Immunol. 2008;8(5):337-48.

7. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. Nat Med. 2007;13(2):139-45.

8. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. Nat Immunol. 2007;8(9):913-9.

9. Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. Annu Rev Immunol. 1990;8:579-621.

10. Zorzella SF, Seger J, Martins DR, Pelizon AC, Sartori A. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis development in Lewis rats from a conventional animal facility. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(8):931-6.

11. Sewell DL, Reinke EK, Hogan LH, Sandor M, Fabry Z. Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections. Immunol Lett. 2002;82(1-2):101-10.

12. Olfert ED, Cross BM, McWilliam A. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación [Internet]. Estol L, Dugas R, Secretaria Ejecutiva del Consejo Canadiense de Protección de los Animales, editors. Ottawa: Consejo Canadiense de Protección de los Animales [cited 2011 Dec 5]. Available from: http:// www.ccac.ca/en\_/standards/guidelines/ additional/spanish-guide-vol1

13. Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, Gritti A, Salani G, Dina G, et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. Nature. 2003;422(6933):688-94.

# Péptido MOG<sub>35-55</sub>

El péptido  $MOG_{35.55}$  se disolvió en solución tampón fosfato estéril pH 7.4, a una concentración de 2 mg/mL (200 µg/100 µL) y posteriormente se filtró (tamaño del poro 0.2 µm; Corning, Alemania) en condiciones estériles.

# Emulsión MOG<sub>35-55</sub>: AIF + MT

La solución del péptido  $MOG_{35-55}$  se añadió lentamente en partes iguales en el AIF + MT (v/v) a temperatura ambiente, y se mantuvo en agitación mecánica a velocidad media, durante 5 a 10 min. Esto garantiza la formación adecuada de una emulsión de tipo agua/aceite para lograr la inmunogenicidad de la preparación. Posteriormente, la mezcla se transfirió a jeringuillas de cristal de 5 mL unidas por un puente metálico de diámetro 16 G, evitando la inclusión de burbujas de aire durante el proceso. Después de aproximadamente 5 a 8 ciclos de transferencia de la emulsión entre ambas jeringuillas, el puente se sustituyó por otro de diámetro 18 G y se repitió el proceso hasta su mejor consistencia. Para verificar la formación apropiada de la emulsión se dejó caer una gota en una placa de Petri que contenía solución tampón fosfato. A continuación, se envolvieron las jeringuillas en papel de aluminio y se mantuvieron a 4 °C durante la noche. Es recomendable preparar la emulsión aproximadamente 12 h antes de su uso, para garantizar que no ocurra su ruptura (no se debe separar en fases).

Para la inmunización se cargaron jeringuillas plásticas de 1 mL con la cantidad de emulsión requerida por animal (200  $\mu$ L), directamente de la jeringuilla de cristal mediante del puente metálico.

### Preparación de la toxina pertussis

La TP (aislada de *Bordetella pertussis*, Sigma, EE.UU.) se preparó 24 horas antes de la inmunización. Se disolvieron 200 ng de TP en 100  $\mu$ L de solución tampón fosfato estéril pH 7.4, y se conservó a 4 °C hasta su uso, para prevenir la muerte de los animales asociada con el empleo de TP recién preparada. Se inyectaron 200 ng totales de TP en cada inyección.

### Evaluación del modelo

## Monitoreo clínico de la encefalomielitis autoinmune experimental

Diariamente se monitoreó la severidad clínica de la enfermedad en los tres grupos experimentales, a la misma hora, a doble ciegas, por un observador entrenado, a partir del día 0 y hasta el día 28 luego de la inducción. La manipulación del animal durante la evaluación se realizó minimizando el estrés y la sobreexcitación por factores ambientales como el ruido, el dolor y el calor. Se empleó la siguiente escala, confeccionada a partir de lo referido por otros autores para este modelo [14, 15]: 0, No hay signos clínicos detectables; 0.5, Postura encorvada o marcha irregular ligera; 1, Pérdida ligera del tono de la cola o paraparesis (debilidad) ligera de uno de los miembros posteriores; 1.5, Pérdida parcial del tono de la cola y paraparesis (debilidad) ligera de ambos miembros posteriores; 2, Parálisis completa de la cola; 2.5, Parálisis completa de la cola con debilidad marcada de ambos miembros posteriores y ligera caída del tren posterior; 3, Parálisis parcial (hemiparálisis) de los miembros posteriores, el animal se arrastra; 3.5, Parálisis completa de los miembros posteriores, sin movimiento residual de las extremidades; 4, Parálisis completa de los miembros posteriores con debilidad de los miembros anteriores; 4.5, Moribundo y 5, Muerto. Se calculó el índice clínico promedio de cada grupo, a partir de las puntuaciones individuales, y se determinó el índice clínico máximo de cada animal durante el estudio.

## Medición del peso corporal

Diariamente se efectuó la medición del peso corporal de los animales del grupo control negativo y del grupo afectado con EAE, a la misma hora, a partir del día 7 y hasta el día 28 después de la inducción, con el empleo de una balanza analítica (Denver Instrument XP-3000, EE.UU.). Para describir el comportamiento de esta variable, se calculó la diferencia entre el peso diario de cada animal respecto al peso que tenía el día inicial del estudio, y se expresó como la media de cada grupo.

## Evaluación de citocinas efectoras y reguladoras

A los 18 días de la inducción de la enfermedad, se realizaron determinaciones por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qPCR) en los grupos control negativo y el afectado con EAE (2 animales de cada uno). Se evaluaron tres réplicas por cada gen de citocina y el gen de expresión endógena (β-actina). Se extrajo el ARNm a partir del tejido cerebral, según el método descrito por Lech y cols. [16]. Se utilizó un sistema de detección SYBR Green Dye en el termociclador de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real Light Cycler 480 (Roche, Mannheim, Alemania). Todas las etapas técnicas se realizaron de acuerdo con las Guías de información mínima para publicación de experimentos de qPCR (MIQE) [17]. Para la cuantificación relativa, se utilizó la siguiente fórmula [18]:

 $\begin{array}{l} \mbox{Valores relativos (unidades arbitrarias)} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \\ = 2^{-((C_T \mbox{ gen blanco - } C_T \mbox{ gen endógeno) - } \Delta C_T)} \end{array}$ 

donde:

CT representa el número fraccional de ciclos en el que la cantidad de gen blanco amplificado alcanza el umbral preestablecido;  $\Delta$ CT representa la diferencia entre los umbrales de ciclos para los genes blanco y de referencia (véase para más detalle [18]).

La amplificación inespecífica se controló mediante la evaluación de los genes de interés, con respecto al gen de referencia ( $\beta$ -actina). Los oligonucleótidos cebadores específicos empleados a 300 nM (Metabion, Martinsried, Alemania; tabla) se diseñaron mediante un tamizaje de especificidad *in sílico* empleando el programa BLAST [19].

# Estudio ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión

Al finalizar el período de estudio, se escogieron aleatoriamente y se sacrificaron por dislocación cervical tres animales por cada grupo (del control negativo y de los afectados con EAE), a los que se les realizó una disección para tomar muestras de la médula espinal. Las muestras se fijaron en solución de glutaraldehído o paraformaldehído (1 y 4%, respectivamente, Polysciences, EE.UU.) durante 1 h a 4 °C, lavadas en cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.4 (BDH Chemicals, Inglaterra), y fijadas luego en tetróxido de osmio al  Esposito M, Ruffini F, Bellone M, Gagliani N, Battaglia M, Martino G, et al. Rapamycin inhibits relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by both effector and regulatory T cells modulation. J Neuroimmunol. 2010:22011-22152-63.

15. Peiris M, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ, Cabot PJ. A model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice for the characterisation of intervention therapies. J Neurosci Methods. 2007;163(2):245-54.

16. Lech M, Avila-Ferrufino A, Skuginna V, Susanti HE, Anders HJ. Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD-like receptor and inflammasome-related mRNAs in humans and mice. Int Immunol. 2010;22(9):717-28.

17. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative realtime PCR experiments. Clin Chem. 2009; 55(4):611-22.

 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods. 2001;25(4): 402-8.

19. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990;215(3):403-10. 1% (Agar Scientific, EE.UU.), durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente se deshidrataron en etanol (BDH Chemicals, Inglaterra) a concentraciones crecientes (30, 50, 70 y 100%), durante 10 min cada vez, a 4 °C. La inclusión se realizó según lo descrito por Spurr [20]. Las secciones ultrafinas (de 40 a 50 nm) obtenidas con un ultramicrótomo (NOVA, LKB, Alemania) se colocaron sobre rejillas de níquel (Agar Scientific, EE.UU.) de 400 orificios, teñidas con una solución saturada de acetato de uranilo (Polysciences, EE.UU.) y citrato de plomo (Agar Scientific, EE.UU.). Luego se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión (JEOL/JEM 2000 EX, Japón). En este estudio se analizaron 100 microfotografías.

## Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prism Inc., EE.UU.). Los datos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M.), excepto para la variación del peso corporal, el cual se describe como la media por cada grupo. Para la comparación estadística entre los grupos experimentales, se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. En todos los análisis se empleó un nivel de significación menor de 0.05 y un intervalo de confianza del 95%.

# **R**esultados y discusión

La evaluación de los signos clínicos es la variable principal de respuesta en el desarrollo del modelo de EAE, útil para la identificación de posibles candidatos terapéuticos [21]. Por tal razón, es fundamental que el investigador conozca en detalles cómo realizar la exploración clínica del animal según la escala seleccionada. La debilidad en la zona distal de la cola y la marcha irregular son las señales iniciales de la afectación del sistema nervioso central. Para apreciar la marcha irregular se deben observar los ratones sobre una superficie plana. Durante la marcha, los ratones sanos se desplazan con el abdomen en paralelo a la superficie horizontal. En cambio, los animales enfermos tienden a adoptar una posición encorvada y se aprecian irregularidades en la marcha, fundamentalmente en las patas traseras. Durante la evaluación clínica, también se pueden suspender los ratones en el aire por la cola (reflejo de extensión). Si en esta posición se observa retracción de alguna de las extremidades posteriores hacia la región abdominal, es una señal inicial de la enfermedad, ya que se asocia con procesos patológicos en las vías motoras espinales, incluyendo la degeneración axonal [22, 23]. La afectación de este reflejo definió el día a partir del cual comenzaron a desarrollarse los signos clínicos de la enfermedad, explorados a partir de ese momento utilizando la escala cuantitativa.

Otra prueba de utilidad es la observación de los reflejos posturales. Para ello se voltea al animal sobre la región dorsal. Los animales sanos se incorporan más rápidamente que los animales enfermos, que pueden llegar a perder totalmente este reflejo con el incremento de la severidad de la EAE.

La figura 1A representa el índice clínico promedio de cada grupo experimental por día. En los animales enfermos, los signos clínicos comenzaron a manifestarse el día 8 posterior a la inducción. En el modelo desarrollado por nuestro grupo, la EAE se inicia Tabla. Secuencia de oligonucleótidos cebadores empleados para la cuantificación de citocinas efectoras y reguladoras

Gen	Ubicación	Secuencia del cebador (5'-3')	ID
IL-17	sentido antisentido	TGAGCTTCCCAGATCACAGA TCCAGAAGGCCCTCAGACTA	NM_010552
IL-6	sentido antisentido	TGATGCACTTGCAGAAAACA ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC	NM_031168
IFN-γ	sentido antisentido	ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT TGAGCTCATTGAATGCTTGG	NM_008337
<b>IL-1</b> β	sentido antisentido	TGTGAAATGCCACCTTTTGA GGTCAAAGGTTTGGAAGCAG	NM_008361
TNF-α	sentido antisentido	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC AGGGTCTGGGCCATAGAACT	NM_013693
Foxp3	sentido antisentido	TGGCAGAGAGGTATTGAGGG CTCGTCTGAAGGCAGAGTCA	NM_054039
IL-10	sentido antisentido	ATCGATTTCTCCCCTGTGAA TGTCAAATTCATTCATGGCCT	NM_010548
<b>TGF-</b> β	sentido antisentido	GGAGAGCCCTGGATACCAAC CAACCCAGGTCCTTCCTAAA	NM_011577
β <b>-actina</b>	sentido antisentido	GGTCACGCTCAGCTCTCC ATAGCACTGGTCAGCCTTGG	NM_009898

tempranamente, en el período descrito por otros autores: entre los días 7 y 14 después de inmunizados los animales [26, 27]. Se logró alcanzar un índice clínico máximo de 3.5, que evidencia la instauración de la enfermedad, y se mantuvo hasta el final del estudio, de acuerdo con la forma crónica progresiva de la EAE, descrita por Amor y cols. [28].

Según los criterios de Vogel y cols. [29], como parte de la generación de un modelo experimental relevante para una enfermedad dada, es necesario determinar el efecto de los fármacos utilizados en la práctica clínica, así como caracterizar los mecanismos moleculares subyacentes y que remedan los procesos fisiopatológicos que ocurren en los pacientes. La hidrocortisona forma parte del grupo de esteroides que se han usado en los últimos 50 años para el tratamiento de los eventos de recaída en los pacientes con EM, definida como disfunción neurológica de severidad leve o incapacitante, que dura más de 24 horas [30]. El efecto positivo de la hidrocortisona sobre la sintomatología clínica de los animales con EAE (Figura 1A), se corroboró en la comparación estadística (Figura 1B). En la figura 1C se muestra el índice máximo alcanzado por cada animal en la escala clínica. Los animales del grupo afectado con EAE mostraron puntajes clínicos altos, lo cual es una evidencia clínica del establecimiento y evolución de la enfermedad; mientras que los animales tratados con hidrocortisona mostraron una mejoría apreciable con respecto a los animales enfermos. Estos resultados indican que el modelo generado posee un valor clínico que permite establecer una correlación adecuada para estudios preclínicos de nuevos fármacos contra la EM.

El peso corporal es una variable que ofrece información relacionada con el grado de deterioro neurológico del animal. La figura 2 muestra la disminución del peso corporal de los animales del grupo afectado con EAE, a partir del día 11 del estudio. La variación crítica ocurre entre el día 12 y el 17 posterior a la inducción, en correspondencia con el período en que la severidad de la enfermedad comienza a aumentar. A partir del día 17 comienza la recuperación del peso corporal, pensamos que como consecuencia del desencadenamiento de mecanismos fisiopatológicos compen20. Spurr AR. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J Ultrastruct Res. 1969;26(1):31-43.

21. Racke MK. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Curr Protoc Neurosci. 2001;Chapter 9:Unit9 7.

22. Lo AC, Saab CY, Black JA, Waxman SG. Phenytoin protects spinal cord axons and preserves axonal conduction and neurological function in a model of neuroinflammation in vivo. J Neurophysiol. 2003;90(5):3566-71.

23. White SR, Barnes CD. Spinal and spino-bulbo-spinal reflexes in rats with experimental allergic encephalomyelitis. Brain Res. 1975;84(1):123-8.

24. Das J, Ren G, Zhang L, Roberts AI, Zhao X, Bothwell AL, et al. Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. J Exp Med. 2009;206(11):2407-16.

25. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. Immunology. 2010;129(3):311-21.

26. Hemmer B, Hartung HP. Toward the development of rational therapies in multiple sclerosis: what is on the horizon? Ann Neurol. 2007;62(4):314-26.

27. Montero E, Nussbaum G, Kaye JF, Perez R, Lage A, Ben-Nun A, et al. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+ T cells: analysis using depleting antibodies. J Autoimmun. 2004;23(1):1-7.

 Amor S, Groome N, Linington C, Morris MM, Dornmair K, Gardinier MV, et al. Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. J Immunol. 1994;153(10):4349-56.

29. Vogel HG, Vogel WH, Schölkens BA, Sandow J, Müller G, Vogel WF, editors. Drug discovery and evaluation. Pharmacological assays. 2nd ed. New York: Springer-Verlag; 2002.

 Burton JM, O'Connor PW, Hohol M, Beyene J. Oral versus intravenous steroids for treatment of relapses in multiple sclerosis. Cochrane Database Syst Rev. 2009(3):CD006921.



Figura 1. Evolución clínica de los ratones sanos (grupo control negativo), los animales inmunizados con el encefalitógeno y los tratados con solución tampón fosfato (grupo afectado con EAE) o tratados con hidrocortisona (1 mg/kg, por vía s.c.). Se calculó el puntaje clínico promedio por grupo (A), así como el área bajo la curva obtenida (unidades arbitrarias; B) y el puntaje clínico máximo alcanzado por cada animal (C) a partir de una escala publicada previamente [24, 25]. Los resultados se expresaron como la media ± error estándar de la media (n = 10 para todos los grupos). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba U de Mann-Whitney (\*\*p < 0.01).

satorios del organismo, que tratan de atenuar el daño originado, y a su vez reflejan la heterogeneidad de esta enfermedad. En algunas etapas, la evaluación clínica no remeda o no sustituye la molecular, por lo que se exploró la variable peso corporal solo de una forma descriptiva. Se sugiere que el peso corporal tiene una correlación clínica marcada en el período inicial de instauración de los signos clínicos, donde su variación con respecto al peso inicial es negativa. Sin embargo, una vez que la enfermedad alcanza la etapa crónica, se pierde la correlación entre los signos clínicos y el peso corporal, y alcanza una variación desigual pero siempre positiva. En el grupo control negativo se mantuvo una variación positiva sostenida durante el estudio, y por encima, en los animales enfermos.

La disminución del peso corporal en el grupo EAE puede tener diferentes causas. El deterioro motor que sufren los animales puede limitar su acceso al alimento en la caja, por lo que esta variable pudiera ser una evidencia de la severidad de la enfermedad. Otra causa probable está relacionada con la disminución del apetito, que se ha asociado con los efectos de la leptina en este modelo animal [31]. La leptina es un péptido hormonal producido por los adipocitos, que participa en la regulación del balance energético y la toma del alimento en el organismo [32]. Entre sus múltiples acciones, inhibe la sensación de hambre en el hipo-



Figura 2. Comportamiento del peso corporal de los ratones a partir del día 7 y hasta el día 28 después de la inmunización. La variación diaria del peso de cada animal se calculó con respecto al peso del día inicial del estudio, y los resultados se expresaron como la media del peso del grupo por día.

tálamo, y consecuentemente disminuye la ingesta, y estimula los nervios simpáticos, los cuales incrementan la actividad metabólica y el gasto de energía [32]. El aumento de las concentraciones de leptina en sangre una vez inducida la EAE, se correlaciona con el decremento del peso corporal durante una parte del proceso autoinmune [33].

La evaluación por qPCR del patrón de citocinas expresado durante el establecimiento de la EAE, así como los hallazgos histológicos del estudio por microscopía electrónica de trasmisión, contribuyeron a demostrar la generación de este modelo experimental.

Los resultados demuestran que los animales enfermos presentaron una elevada expresión del gen de IL-17, en concordancia con lo descrito por otros autores para este modelo [34]. Los estudios de Langrish y cols. comparando ratones IL-12p35<sup>-/-</sup> e IL-23p19<sup>-/-</sup> demostraron que las células Th17 eran responsables de esta afección [35]. Otras evidencias sobre el papel de las células Th17 en la fisiopatología de la EAE se mostraron en ra-tones deficientes de los factores transcripcionales T-bet<sup>-/-</sup> y STAT6<sup>-/-</sup>, carentes de células Th1 y Th2, respectivamente [24]. Existen evidencias que involucran las células Th17 como efectoras en esta enfermedad [25].

Otras citocinas efectoras (factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6; IFN- $\gamma$ ), marcadores de células Treg naturales (Foxp3) y adaptativas (factor de crecimiento transformante beta, TGF- $\beta$ ) reflejaron que los animales con EAE se caracterizaban por una modulación positiva de citocinas efectoras proinflamatorias y, en consecuencia, una respuesta reguladora aumentada como mecanismo homeostático para restablecer el balance efector-regulador de la respuesta inmune (Figura 3).

El análisis ultraestructural por microscopía electrónica de trasmisión de la médula espinal en el grupo control negativo mostró la presencia de vainas de mielina con estructura compacta y densa, mientras que no se observaron signos de daño axonal (Figura 4A). En los animales del grupo con EAE (Figura 4B), la mayoría de los axones presentaron una pérdida de la continuidad en las capas de la vaina de mielina. Teniendo en cuenta que la desmielinización es una de las características fisiopatológicas de la EM [36], e incluso uno de los blancos farmacológicos de mayor 31. De Rosa V, Procaccini C, La Cava A, Chieffi P, Nicoletti GF, Fontana S, et al. Leptin neutralization interferes with pathogenic T cell autoreactivity in autoimmune encephalomyelitis. J Clin Invest. 2006;116(2):447-55.

32. Guyton AC y Hall JE. Dietary Balances; Regulation of Feeding; Obesity and Starvation; Vitamins and Minerals. In: Textbook of Medical Physiology. 11th. ed. Pennsylvania: Elsevier-Saunders; 2006. p. 865-80.

33. Sanna V, Di Giacomo A, La Cava A, Lechler RI, Fontana S, Zappacosta S, et al. Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. J Clin Invest. 2003;111(2):241-50.

34. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2006;177(1):566-73.

35. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. J Exp Med. 2005;201(2):233-40.

36. Pittock SJ, Lucchinetti CF. The pathology of MS: new insights and potential clinical applications. Neurologist. 2007;13(2):45-56.



Figura 3. Niveles de expresión de citocinas efectoras (IL-17, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) y reguladoras (Foxp3, IL-10 y TGF- $\beta$ ), medidos por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real a partir del ARNm cerebral, el día 18 posterior a la inducción. La cuantificación relativa se realizó mediante la fórmula 2- $^{\Delta\Delta Ct}$  empleando el gen  $\beta$ -actina como control de expresión endógena. Los valores están expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba U de Mann-Whitney (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).



Figura 4. Muestras de médula espinal del día 28 posterior a la inducción, obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. Las flechas indican la presencia de vainas de mielina con una anatomía normal en los animales sanos (grupo control negativo; A) y con una notable desorganización estructural en el grupo afectado con EAE (B). N: núcleo. La barra equivale a 500 nm. relevancia [37], nuestros resultados confirman que el modelo experimental generado es una herramienta robusta para los estudios mecanísticos y de evaluación preclínica en la EM.

# **C**onclusiones

Se generó un modelo de EAE crónico y progresivo en ratones C57BL/6, cuyas manifestaciones de los signos

Recibido en diciembre de 2011. Aprobado en abril de 2012. clínicos comenzaron a partir del día 8, y se mantuvieron de forma progresiva hasta el día 28 después de la inmunización. Los animales alcanzaron un puntaje clínico máximo elevado durante el desarrollo de la EAE, y se observó una correspondencia entre los signos clínicos, la evaluación molecular y el análisis ultraestructural, que evidenció la desmielinización y el daño axonal en la médula espinal.

37. Mullard A. Success of immunomodulators in MS shifts discovery focus to neuroprotection. Nat Rev Drug Discov. 2011;10(12):885-7.