Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Estudio de estímulos pro-inflamatorios secundarios sobre una lesión desmielinizante en un modelo de inflamación crónica asociado a esclerosis múltiple

Murta, Veronica

2013-08-27

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Murta, Veronica. (2013-08-27). Estudio de estímulos pro-inflamatorios secundarios sobre una lesión desmielinizante en un modelo de inflamación crónica asociado a esclerosis múltiple. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Murta, Veronica. "Estudio de estímulos pro-inflamatorios secundarios sobre una lesión desmielinizante en un modelo de inflamación crónica asociado a esclerosis múltiple". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-08-27.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio de estímulos pro-inflamatorios secundarios sobre una lesión desmielinizante en un modelo de inflamación crónica asociado a esclerosis múltiple.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas:

Lic. Verónica Murta

Director de tesis: Dra. Carina Cintia Ferrari
Consejero de Estudios: Dra. Lidia Szczupak

Laboratorio de terapias regenerativas y protectoras del sistema nervioso
Fundación Instituto Leloir - CONICET

Buenos Aires, Mayo de 2013

Estudio de estímulos pro-inflamatorios secundarios sobre una lesión desmielinizante en un modelo de inflamación crónica asociado a esclerosis múltiple.

RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es un desorden inflamatorio autoinmune del sistema nervioso central, caracterizado por desmielinización, inflamación y pérdida axonal. La etiología de la enfermedad es aún desconocida, pero muchos trabajos en modelos animales han puesto en evidencia un rol importante de la neuroinflamación en su patogénesis y progresión. La mayoría de los pacientes presentan episodios de recaídas y remisiones. A medida que la enfermedad evoluciona el proceso de remielinización comienza a fallar, lo cual resulta en la eventual pérdida de funciones en los pacientes. El rol de la inflamación en la regeneración de la mielina es aún incierto. Considerando la heterogeneidad y complejidad que presenta la EM es importante generar modelos apropiados que recapitulen la enfermedad, pero también otros modelos de estudios más sencillos que faciliten la comprensión de los mecanismos involucrados.

En la presente tesis nos propusimos estudiar el efecto de estímulos inflamatorios repetidos mediante la reinyección de un estímulo pro-inflamatorio crónico, en eventos similares a episodios de recaída. También nos propusimos estudiar la influencia de inflamaciones periféricas sobre las lesiones desmielinizantes en el SNC. Para ello utilizamos un adenovector que expresa interleuquina 1β en forma crónica.

Hemos demostrado que la respuesta a un estímulo central secundario varia dependiendo de si la lesión primaria está activa o no. Así, la presencia de una lesión inflamatoria central aún activa disminuye la respuesta a un estímulo pro-inflamatorio secundario dentro del SNC. Sin embargo, esta repuesta secundaria disminuida no se observa cuando el segundo estímulo se aplica con la lesión primaria completamente recuperada. Por otro lado, un estímulo pro-inflamatorio proveniente de la periferia recrudece la respuesta inflamatoria central previa, incluso cuando la BHE se encuentra intacta.

Los estímulos inflamatorios, tanto centrales como periféricos, deberían ser considerados como factores de riesgo al momento de estudiar la etiología y progresión de la EM. Una mejor comprensión de los mecanismos que intervienen en la recaída/remisión, y de la influencia de infecciones periféricas sobre la misma colaboraría con la identificación y el desarrollo de nuevas terapias para un mejor tratamiento de la EM.

Palabras clave: Interleuquina 1β, desmielinización, neuroinflamación, inflamación periférica, esclerosis múltiple.

Study of secondary pro-inflammatory stimuli on a demyelinating injury in a model of chronic inflammation associated to multiple sclerosis.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune inflammatory disorder of the central nervous system characterized by demyelination, inflammation and axonal damage. The etiology of the disease is still unknown, but many studies have shown a role of neuroinflammation in the pathogenesis and progression of MS. Throughout the development of the disease most patients present relapsing and remitting episodes, while others progress to a chronic stage. The role of inflammation in myelin regeneration is still uncertain. As the disease progresses remyelination fails, resulting in the eventual loss of function in patients. It is as important to generate appropriate models that recapitulate the disease, as well as other more simplistic ones that facilitate the understanding of the mechanisms involved. There are few suitable models for the study of demyelination as a result of chronic inflammation.

In this thesis we studied the effect or repeated inflammatory demyelinating events by re-injecting a chronic pro-inflammatory stimulus, thus mimicking the relapsing-remitting episodes of MS. We also studied the influence of peripheral inflammation on these phenomena in the CNS. For the generation of the chronic inflammatory event we used an adenovector expressing interleukin-1β.

We have shown that the response to a secondary central stimulus varies depending on whether the primary lesion is still active or not: The presence of a previous active injury decreases the response to the second pro-inflammatory stimuli within the CNS. However, this secondary response does not change when the primary lesion is completely recovered. Furthermore, pro-inflammatory stimuli from the periphery exacerbate the central lesion. Inflammatory stimuli, both central and peripheral, should be considered as risk factors when studying the etiology and progression of MS.

Key Words: Interleukin 1β, demyelination, neuroinflammation, peripheral inflammation, multiple sclerosis.

AGRADECIMIENTOS

A Carina, por todos estos años de dirección y compañerismo. Porque no hay mucha gente que pueda decir que aprendió todo de su directora, que laburó codo a codo. Porque me encantó mirar juntas al microscopio, planificar pasos futuros. Porque siempre me apoyaste en las cosas que te propuse, y me tuviste mucha paciencia y soportaste mis tiempos. Porque me llevo muchísimo, y eso es lo que importa.

A Fernando, por haberme incorporado al grupo desde el momento cero. Por escuchar: resultados, propuestas de experimentos, hipótesis, frustraciones… Por siempre tener más fe en mis resultados que yo. Por permitirme hacer todos los experimentos que quise. Porque siempre sos el primero en decir que hay que festejar (un paper, subsidio, beca, cumpleaños, navidad, o un viernes cualquiera), y hasta te encargás de que se materialice!

A todo el 106, concepto amplio si los hay. Son muchísimos años, mucha gente que se fue y otra tanta que llegó. Porque entré siendo una y salgo muy cambiada, y todos ustedes fueron parte de ese proceso. Porque en todos estos años nunca me crucé con un NO a la hora de pedir ayuda. Y también porque supieron quererme, bancarme, estimularme. Por los infinitos mates, cafecitos, rankings locos, chismes, gastadas, salidas, traguetes… Difícil resumir casi 7 años de cotidianidad en un párrafo.

A Marian, que difícil fue que te fueras. Fuiste mi soporte inamovible, me ayudaste con todas mis inseguridades, me empujaste, me estimulaste, me hiciste reír frente a una rata, PCR o inmuno! Me aconsejaste siempre con honestidad, y bancaste todas mis crisis. Porque me llena de alegría llevarme tu amistad de esta experiencia. A Marie, por todos esos mates matutinos y vespertinos, porque tu perseverancia es algo que emociona. A Clarita, por haberme enseñado paso a paso y con infinita paciencia muchas de las técnicas que me llevo. A Amaicha, por siempre estar dispuesta a ayudarme, aconsejarme, proponer experimentos, discutir resultados. Nunca me voy a olvidar que estabas casi recién llegada cuando me licencié y me diste una mano. Porque pensás en mi para proyectos académicos, y cenas con

cervecitas. Porque ya hace rato que te fuiste, y nunca dejé de sentir que puedo contar con vos. A Lu, porque es importante que alguien tenga esa energía positiva hasta a las 8 de la mañana. Porque discutimos y discutiremos resultados experimentales y experimentos de la vida, y todavía seguís teniéndome fe. A Anita Paula!!!! Niña loquita y llena de energía, que lindo fue compartir aunque sea un par de añitos. A Ana por estar siempre dispuesta y con la mejor de las ondas. A Rodolfet, por compartir las pesadillas de los stock, porque lo que tengo de rigurosa y prolija en el lab es gracias a vos. Por mañanas eternas de operación, con conversaciones de todas las índoles. Porque nunca te faltan las energías. A Pato, porque siempre te interesaste por mis cosas…del lab y de afuera. Por estar siempre lista para todo, un placer haber compartidos todos estos años juntas. A Isa, que felicidad que sea martes-jueves-viernes! Difícil imaginar estos años sin tu apoyo incondicional, tus sonrisas, la buena onda siempre bajo la manga. Por estar siempre dispuesta a ayudar y aprender. Por haberte bancado todas mis lágrimas, por preocuparte por mí, y porque tus mimos siempre fueron un lugar de refugio. Porque es lindo compartir con vos, te voy a extrañar. A Joaquín, la buena onda y predisposición personificada. Se van a extrañar las charlas, las profundas y las divertidas. A Vale, gracias esa polenta para ir resolviendo pequeños y grandes problemas. A Pablo, siempre con el mejor de los humores, siempre con buena onda. A Mariana, da gusto ver toda esa energía, en los experimentos y en la vida. A Celeste, llegó con aires de cambios y ganas de aprender. Gracias por escucharme y siempre tener un consejo bajo la manga. A Vero, ese remolino de energía con ganas de hacer cosas y vivir mucho. Siempre dispuesta a dar una mano y un codo. A Juan Cruz, siempre con las mejores ideas de festejos y buenas birras. A Mariana, su interés en mi proyecto y sus palabras de aliento.

A todos los becarios e investigadores de la FIL, presentes pasado y futuros. Por compartir tantos años de pasillo, seminarios, comisiones. Por la energía puesta en hacer ciencia entre todos, y mejorar continuamente. Sin olvidarse de dejar lugar para encontramos en un gran asado.

A La FIL como institución, gracias a cada uno de los que trabajan para que las cosas funcionen, y sea más fácil enfocarse en la mesada. A Doris por siempre recibirme con una sonrisa. Gracias a la gente de administración por facilitar el tramiterio, al grupo de la biblioteca por los infinitos papers que me consiguieron, a los chicos del bioterio, la gente de

sistemas al rescate con las crisis 2.0, y a todo el personal de mantenimiento. A cada uno de ustedes. Porque el instituto fue como mi segundo hogar todos estos años.

A mi comité de seguimiento: Laura Pasquini, María Eugenia Pedreira, y Silvia Moreno. Por estar año tras año, con propuestas y preguntas útiles. Por las recomendaciones a conciencia y con las mejores intenciones en mente. Por ayudarme a ordenar proyectos.

A CONICET, por financiarme todos estos años para que pueda doctorarme. Es un orgullo tener en el país una institución nacional que apoye a la ciencia y a los científicos.

A la Fundación Barón, por haberme financiado durante este último tiempo para que pueda terminar el doctorado y completar el proyecto en esclerosis múltiple.

A La FCEyN, que una vez más me dio el espacio de estudio. Porque es una institución que ya hace más de 10 años que está en mi vida, y me da orgullo. Porque siempre que vuelvo me siento como en casa.

A mis amigos, todos toditos. Son muchos y me llenan la vida. Las chicas del colegio, que adoran mi "biologicidad", y hasta me incitan a hablar de esas cosas. Al grupete de casi todos los findes: Tatu, Vani, Pabli, Juan, nunca me canso de compartir con ustedes. A los Roberto, versión senior y junior, toda una vida compartida…y vamos por más. A la gente de la facu, siempre es un placer la reunión, las risas, la historia, el compartir esta vida tan especial…a corta y larga distancia. A Leti, amiga colgada y entrañable que está siempre presente…te quiero. A Mery, compañera de emociones y oído crítico y comprensivo. A Vale y Carli, las de incorporación reciente pero profunda, porque estos últimos años fueron difíciles pero conocerlas hace la diferencia. A todos ustedes, porque siempre me apoyan, porque son los que le dan equilibrio a mi vida. Porque nunca me siento sola teniéndolos. Porque son capaces de darme la energía que a veces me falta. Porque me inundaron de sobrinas y sobrinos hermosos. Podría agradecerles uno por uno, pero me haría falta un libro entero.

A Anita, porque me hiciste entender lo que es tener una hermana. Porque jamás imaginé que podría tener una amistad tan profunda e incondicional. Porque me haces parte de tu familia, y yo disfruto infinitamente. Porque me encanta ser LA babamadrina de esa gorda

tan hermosa que hicieron. Porque nunca escatimas en las palabras correctas, sean elogios o críticas. Porque siempre que viajo, rio o lloro con vos es mejor. Porque estas siempre.

A la flia, hermanos, cuñadas, sobrinas, tíos y primos primeros/segundos/terceros. A los locales y los que están más lejos. Por el apoyo siempre, por los domingos en familia. Por atravesar la vida juntos. Porque siempre se interesan por mí, por mi doctorado, y mi futuro.

A mamá y papá. Por el apoyo a pesar de las preocupaciones o las visiones diferentes. Porque son los que más tienen que soportar mis locuras y humores, y a pesar de todo me aman y se nota que están orgullosos de mí. Porque soy lo que soy gracias a ustedes, y para mí es importante que compartamos la vida. Porque aunque yo no les dé tanto espacio, siempre están al tanto de las últimas cosas que se hacen en ciencia, y siempre se esfuerzan por entender un poco más. Porque me dieron todo y los amo.

PUBLICACIONES

Trabajos aceptados para su publicación

Murta V, Ferrari C.C. Influence of Peripheral inflammation on the progression of Multiple Sclerosis: Evidence from the clinic and experimental animal models. Review. Mol Cell Neurosci. 2013 Mar;53:6-13. doi: 10.1016/j.mcn.2012.06.004. Epub 2012 Jul 4.

Murta, V, Pitossi, F, Ferrari, CC. CNS response to relapse differs whether the primary demyelinated lesion is active or resolved. Brain Behav Immun. 2012 Oct; 26(7):1102-15. doi: 10.1016/j.bbi.2012.07.007. Epub 2012 Jul 21.

Valeria Roca, Juan Cruz Casabona, Pablo Radice, Verónica Murta, Fernando Pitossi. Gene transfer in Parkinson´s Disease: on the verge of a nervous (inflammation-mediated) breakdown?. Parkinson's Disease, Volume 2011 (2011), Article ID 931572, 8 pages, doi:10.4061/2011/931572.

Trabajos en preparación

Murta V, Pitossi, FJ, Ferrari CC. The effect of peripheral inflammation on an on-going demyelinating inflammatory lesion in the striatum.

INDICE

RESUMEN 2

ABSTRACT 4

AGRADECIMIENTOS 5

PUBLICACIONES 9

INDICE 10

ABREVIATURAS 16

INTRODUCCIÓN 20

1. Inflamación: un fenómeno versátil 20

1.1. Células de la respuesta inflamatoria aguda 21

1.2. Citoquinas e inflamación 23

1.3. Quemoquinas y los procesos inflamatorios 24

2. Inflamación en el sistema nervioso 25

2.1. Perspectiva histórica: el SNC, un sistema con inmunoprivilegio 25

2.2. Características principales de la neuroinflamación 26

2.2.A. Componentes estructurales y celulares 28

2.2.B. Componentes moleculares 34

2.3. Neuroinflamación: una sutil frontera entre la homeóstasis y los procesos patológicos 41

2.3.A. Comunicación periferia – SNC 42

2.3.B. Comunicación SNC – periferia 43

2.3.C. Enfermedades neurodegenerativas y otras patologías 44

3. Esclerosis múltiple: características generales 45

3.1. Una enfermedad inflamatoria 47

3.1.A. Células inflamatorias 47

3.1.B. Moléculas inflamatorias 48

3.1.C. BHE 50

3.2. Modelos animales de EM 50

3.2.A. Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE) 50

3.2.B. Modelo viral 51

3.2.C. Modelos de desmielinización por toxinas 52

3.3. Inflamación periférica en EM y modelos experimentales 52

4. Antecedentes del laboratorio 54

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 56

MATERIALES Y MÉTODOS 58

1. Diseños experimentales 58

1.1. Capítulo I 58

1.2. Capítulo II 59

2. Vectores adenovirales 59

2.1. Amplificación de los stocks de adenovirus 60

2.2. Cuantificación de los adenovirus 61

2.3. Controles de calidad de los stocks adenovirales 63

- Caracterización por mapeo de restricción 63
- Verificación de la Ausencia de virus replicativos 63
- Verificación de la ausencia de LPS 64

3. Animales utilizados 65

3.1. Procedimientos con animales 65

3.1.A. Inyecciones intracerebrales 65

3.1.B. Inyecciones intravenosas 66

3.1.C. Formula Leucocitaria 67

3.1.D. Obtención de muestras para análisis molecular 67

3.1.E. Procesamiento del tejido para histología 67
4. Técnicas histológicas convencionales 69
4.1. Violeta de Cresilo 69
4.2. Red Oil O 70
5. Inmunohistoquimicas e Inmunofluorescencias 71
6. Cuantificaciones 73
6.1. Volúmenes de inflamación y desmielinización 73
6.2. Número de células MHC-II 73
7. Análisis de la integridad de la barrera hematoencefálica 74
8. Extracción de ARN, transcripción reversa y PCR en tiempo real 74
9. Cuantificación de la proteína IL-1β 76
10. Análisis estadísticos 77
RESULTADOS 80
I. RESULTADOS – CAPÍTULO I 80
I.1 Descripción del modelo de trabajo: la expresión a largo plazo de IL-1β induce reclutamiento de neutrófilos y desmielinización reversible 81
Segundo evento inflamatorio: re-inyección del AdIL-1β en el SNC 85
I.2 La inducción de un segundo evento pro-inflamatorio durante el estadio 2 (día 30) produjo una lesión más leve 85
I.2.A Respuesta inflamatoria 86
I.2.B Desmielinización y remielinización 90
I.2.C Expresión del mensajero de IL-1β 92
I.2.D Daño axonal como respuesta al segundo estímulo inflamatorio 92
I.2.E Activación glial frente al segundo estímulo pro-inflamatorio 94
I.3 La re-inyección del AdIL-1β durante el estadio 3 (día 50) induce una lesión similar a la primera 97

I.3.A Respuesta inflamatoria……..97

I.3.B Dinámica de la desmielinización……100

I.3.C Daño axonal frente al segundo estímulo pro-inflamatorio……..101

I.3.D Activación glial frente al segundo estímulo aplicado 50 dpi……..103

I.4 Rol de la expresión de los receptores de IL-1β en la respuesta atenuada al segundo estímulo pro-inflamatorio en el diseño experimental 1 106

II RESULTADOS – CAPÍTULO II 111

Efecto de un estímulo inflamatorio periférico sobre la lesión central desmielinizante 112

II.1 La expresión crónica de IL-1β en la periferia durante el estadio 2 de la lesión central exacerba el daño.....112

II.1.A Verificación del estímulo periférico……113

II.1.B Análisis de la Respuesta inflamatoria……113

II.1.C Análisis de la Desmielinización y la remielinización……115

II.1.DEfecto del estímulo periférico sobre la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE).....117

II.1.E Daño axonal luego de la exacerbación periférica……118

II.1.F Efecto del AdIL-1β_{iv} sobre la activación glial……119

II.1.G Efecto de la exacerbación periférica sobre la expresión de citoquinas y quemoquinas en el CE.....121

II.2 Posibles mecanismos involucrados en la exacerbación de la lesión central pre-existente.....124

II.2.A Órganos periféricos……124

II.2.B Vía hipotalámica……127

II.2.C ¿Cómo ingresa la señal desde la periferia al SNC?

Integridad de la BHE.....128

II.3 La inflamación periférica exacerba la lesión central, aun con la BHE intacta 129

II.3.A Respuesta inflamatoria el estímulo pro-inflamatorio periférico…….130

II.3.B Dinámica de la desmielinización……..132

II.3.C Daño axonal luego de la exacerbación periférica……..134

II.3.D Efecto del AdIL-1β_{iv} sobre la activación glial……..135

II.3.E Efecto del estímulo periférico con la BHE cerrada sobre la expresión de citoquinas y quemoquinas en el CE 137

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES 140

1. Capítulo I: Estudio del efecto de un segundo estímulo pro-inflamatorio desmielinizante central sobre una lesión desmielinizante pre-existente 141

1.1. Un segundo estímulo inflamatorio genera una lesión secundaria atenuada si es administrado cuando la lesión primaria está activa 141

Posible rol de los receptores de IL-1.....142

Participación de otros factores celulares y moleculares en la respuesta disminuida.....145

1.2. El grupo AdIL-1β/AdIL-1β también presentó una disminución en el volumen de la desmielinización.....146

1.3. Un segundo evento pro-inflamatorio no afecta la inflamación, desmielinización y activación microglial cuando la lesión primaria está totalmente recuperada 148

2. Capítulo II: Efectos de un estímulo pro-inflamatorio periférico sobre una lesión desmielinizante pre-existente 152

2.1. La expresión crónica de IL-1β en la periferia al día 30 exacerbó la lesión primaria central 152

Exacerbación de la inflamación y desmielinización.....152

La exacerbación de la lesión central indujo activación glial, daño axonal, y recrudecimiento de la ruptura de la BHE 155

2.2. Efectos del estímulo periférico sobre órganos fuera del SNC.....157

2.3. Efectos del estímulo periférico sobre el hipotálamo 158

2.4. El evento de inflamación sistémica induce una exacerbación de la lesión central en el SNC, aun cuando la BHE está intacta 159

3. Conclusiones finales.....163

BIBLIOGRAFÍA.....166

ABREVIATURAS

ABC: Complejo avidina biotina

Ad: vector adenoviral

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

APP: proteína precursora amiloide

ARN: ácido ribonucleico

B2M: beta 2 microglobulina

β-gal: beta-galactosidasa

BSA: albúmina de suero bovino, del inglés *bovine serum albumin*

BSLCR: Barrera sangre-líquido cefalorraquídeo

C/EBPβ: proteína de unión al *enhancer* CCAAT beta, del inglés *CCAAT/enhancer-binding protein* β

CCL: ligandos de quemoquinas con motivo C-C

CE: cuerpo estriado

CEC: células endoteliales cerebrales

CMV: citomegalovirus

CREB: factor de transcripción de unión a los elementos de respuesta al cAMP, del inglés *cAMP response element binding protein*

CXCL: ligandos de quemoquinas con motivo C-X-C

CXCR2: receptor 2 de quemoquinas de motivo CXC

Cy3: indocarbocianina Cy3

Cyc A: Ciclofilina A

DAB: 3.3´diaminobenzidina

DO: densidad óptica

dpi: días post-inyección

EA: enfermedad de Alzheimer

EAE: Encefalitis experimental autoinmune

EM: esclerosis múltiple

EP: enfermedad de Parkinson

GAPDH: gliceraldehido 3 fosfato dehidrogenasa, del inglés *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos

GFAP: Proteína fibrilar ácida glial

HPA: hipotalámico-hipofisario-adrenal

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1, del inglés intercellular adhesion molecule 1

IF: Inmunofluorescencia

IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo I

IHQ: Inmunohistoquímica

IL: interleuquina

IL-1β: interleuquina 1 beta

IL-1R3: receptor tipo 3 de interleuquina 1 beta

IL-1ra: receptor antagonista de interleuquina1 beta

IL-1RI: receptor tipo I de interleuquina 1 beta

IL-1RII: receptor tipo II de interleuquina 1 beta

IL-8/CXCL-8: interleuquina 8

INF-γ: interferón gamma

Ip: intraperitoneales

IRAK4: quinasa 4 asociada al receptor de IL-1

iv: intravenosa/endovenosa

LCR: líquido cefalorraquídeo

LPS: lipopolisacárido bacteriano

MHC II: Complejo mayor de histocompatibilidad II

MOI: multiplicidad de infección, del inglés *multiplicty of infection*

MyD88: factor de diferenciación mieloide 88

NETs: trampas extracelulares de neutrófilos, del inglés *neutrophil extracelular traps*

NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

OCV: órganos circunventriculares

ON: óxido nítrico

OPC: precursor de oligodendrocitos

PAF: factor agregante plaquetario

PB: buffer fosfato

PBS: buffer fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*

PGE2: prostaglandina E2

PMN: polimorfonucleares

PON: núcleo preóptico

PPRs: receptores de reconocimiento de patrones, del inglés *pattern recognition receptors*

PVN: núcleo paraventricular

qRT-PCR: transcripción reversa y PCR cuantitativa en tiempo real

rpm: revoluciones por minuto

SFB: Suero fetal bovino

SNC: sistema nervioso central

TBP: proteína de unión a la TATA box, del inglés TATA *box binding protein*

TGF-β1: factor de crecimiento transformante beta 1

TICD50: Dosis infectiva al 50%, del inglés *Tissue Culture Infective Dose 50*

TIR: Toll/receptor de IL-1

TMEV: virus Theiler

TNFα: factor de necrosis tumoral alpha

TRAF6: factor 6 asociado al receptor de TNF

UNV: unidad neurovascular

VD: volumen de desmielinización

VI: volumen de inflamación

CINC: quemoatractante de neutrófilos inducida por citoquinas, del inglés *cytokine-induced neutrophil chemoattractant*

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Inflamación: un fenómeno versátil

El sistema inmunológico de mamíferos comprende una amplia gama de respuestas fisiológicas cuyo objetivo principal es proteger al organismo de agentes infecciosos externos. En primera instancia los microorganismos deben superar las barreras físicas y químicas que impone el hospedador. Aquellos que logran atravesarlas se deberán enfrentar a una **respuesta inflamatoria aguda**, un grupo de mecanismos celulares y humorales que concentra moléculas y células inmunes desde el torrente sanguíneo hacia el tejido infectado, produciendo de esta manera un foco inflamatorio (Roitt, 1988). La respuesta inflamatoria aguda, además, forma parte del mecanismo de reparación de tejidos dañados, ya que provee los factores de crecimiento y citoquinas necesarias para iniciar el proceso de reparación (Simpson and Ross, 1972) (Leibovich and Ross, 1975).

Existen dos tipos de defensa del organismo frente a infecciones o daños: la **respuesta inmune innata** y la **respuesta inmune adaptativa**. La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa y comparte muchos de los factores moleculares (p.e. interleuquina 1 [IL-1], factor de crecimiento tumoral alpha [TNFα], lisozimas) y celulares (p.e. neutrófilos polimorfonucleares [PMN], macrófagos, mastocitos) con la respuesta inflamatoria aguda. La respuesta inmune adaptativa se basa en la capacidad de los linfocitos (T y B) de reconocer y responder en forma específica a miles de antígenos. Históricamente la inmunidad innata se identificó como la respuesta inespecífica del sistema inmunológico, sin embargo hoy se reconoce que la inmunidad innata presenta respuestas más bien específicas (por ejemplo los interferones son característicos de las respuestas contra virus), y que muchos de sus componentes (macrófagos, interleuquinas pro-inflamatorias, etc.) también participan de la respuesta inmune adaptativa (Playfair and Chain, 1979).

Además de los efectos locales en el foco inflamatorio, la respuesta inflamatoria puede producir efectos a nivel sistémico: fiebre y síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado, entre otros (Ruffolo et al., 1999).

Los procesos inflamatorios presentan un **rol dual**: si bien la inflamación es esencial para la supervivencia, también lo son los mecanismos que la regulan correctamente. Las respuestas inflamatorias suelen resolverse una vez que se ha eliminado al patógeno foráneo, y/o se ha reparado el tejido. Sin embargo, si el estímulo persiste o si existe alguna desregulación del proceso inflamatorio la inflamación puede tornarse crónica y, generalmente, nociva. Esta respuesta inflamatoria crónica suele involucrar a la respuesta inmune adaptativa, y se caracteriza por presentar un infiltrado compuesto principalmente por linfocitos T y macrófagos, al igual que procesos de fibrosis.

La respuesta inflamatoria aguda involucra diversos tipos celulares y moléculas. A continuación haremos una breve descripción acerca de aquellos que resultan de interés para la presente tesis.

1.1. Células de la respuesta inflamatoria aguda

Los **mastocitos** suelen ser las primeras células en responder frente a una injuria, ya que son células residentes de los tejidos. Estas células de gran tamaño responden al daño tisular liberando el contenido de sus gránulos basófilos. Estos gránulos contienen elementos vasoactivos y heparina, y por lo tanto estimulan el ingreso de leucocitos desde el torrente sanguíneo hacia el tejido dañado (Eming et al., 2007; Playfair and Chain, 1979).

Los **neutrófilos PMN** poseen una vida media corta, y son esenciales en la defensa contra bacterias y hongos (Nathan, 2006). Estos leucocitos presentan diversos mecanismos para eliminar patógenos: la liberación de los agentes bactericidas contenidos en sus gránulos, la fagocitosis y degradación intracelular de microbios (Hampton et al., 1998; Segal, 2005), la producción de especies reactivas del oxígeno (Lehrer and Ganz, 1999), y la liberación de trampas extracelulares neutrófilas (NETs, del inglés *neutrophil extracellular traps*) que contienen fibras de cromatina y proteínas antimicrobiales (Brinkmann et al., 2004). Estos granulocitos son uno de los primeros leucocitos en ser reclutados desde la sangre hacia el foco inflamatorio, y también están involucrados en la activación de macrófagos y en la amplificación de la respuesta inflamatoria mediante la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1β, interleuquina 6 (IL-6), y el TNFα (Eming et al.,

2007; Playfair and Chain, 1979). A pesar de que las funciones de los neutrófilos PMN en la respuesta inflamatoria aguda son claras, existe discrepancia acerca de si su presencia es beneficiosa o perjudicial. Algunos trabajos demostraron que animales depletados de estos leucocitos no presentan diferencias en el proceso de reparación de heridas, pero si se observó una aceleración en la regeneración del epitelio (Dovi et al., 2003; Simpson and Ross, 1972). Además la imposibilidad de reparar eficientemente los tejidos es una característica distintiva de muchas enfermedades con neutrófilos defectuosos, como el Síndrome de deficiencia de adhesión de leucocitos (Kuijpers et al., 1997).

En los últimos años se ha descripto que los neutrófilos PMN se activan mediante un proceso que consta de dos pasos. En primera instancia los neutrófilos pasarían de un estado en reposo (*resting*) a un estadio cebado (*primed)* cuando son estimulados por ciertas citoquinas y quemoquinas (TNFα, IFN-γ, IL-6, IL-8/CXCL-8, PAF, G-CSF). En una segunda etapa, los neutrófilos cebados son reclutados hacia los focos inflamatorios, dónde se activan por completo cuando entran en contacto con componentes microbianos (Condliffe et al., 1996). Algunas características fenotípicas del neutrófilo cebado son: disminución de la apoptosis (Colotta et al., 1992), aumento de receptores de superficie y moléculas de adhesión (Condliffe et al., 1996), y exacerbación de los mecanismos efectores una vez que logra la activación completa (Condliffe et al., 1998).

Los **macrófagos** son células que entran en acción aproximadamente dos días después del inicio de la respuesta inflamatoria aguda. La mayoría de los macrófagos ingresan desde el torrente sanguíneo como monocitos, y una vez extravasados se activan como consecuencia del contacto con mediadores del microambiente inflamatorio (Gordon, 2003). Entre sus principales funciones se encuentra la de fagocitar microorganismos, tejido dañado, y a los propios neutrófilos (una vez que han cumplido su función), al igual que la presentación antigénica (Eming et al., 2007).

Durante mucho tiempo numerosas evidencias indicaron que los macrófagos tenían un rol dual en las respuestas inflamatorias, pudiéndose comportar como agentes pro o anti-inflamatorios según el contexto (Eming et al., 2007). A lo largo de la última década se ha clasificado a los macrófagos en dos (o a veces más) subgrupos, de acuerdo al tipo de activación que sufren. Los **macrófagos pro-inflamatorios M1** siguen la vía clásica de activación sintetizando citoquinas pro-inflamatorias (IL-1β, TNFα, IL-6, IL-23) y liberando

especies reactivas de oxígeno. Este fenotipo es inducido por estímulos asociados a la respuesta de linfocitos T *helper* 1 (Th1) (INF-γ y el TNFα), y genera una optimización de su función anti-microbiana, aunque también puede inducir daño tisular.

En el otro extremo del espectro encontramos a los **macrófagos M2**, cuya activación está asociada a las citoquinas típicas de la respuesta de linfocitos T *helper* 2 (Th2) (IL-4 e IL-13), que regulan negativamente la inflamación y la reparación de heridas (Gordon, 2003; Gordon and Taylor, 2005; Mosser and Edwards, 2008). A pesar de que muchos trabajos aun utilizan esta clasificación dicotómica de los macrófagos, muchos investigadores argumentan que se trataría más bien de una espectro de estadios funcionales. Esta hipótesis surge a partir de la gran plasticidad que presentan estas células, y también de los trabajos que identificaron diferentes subtipos de macrófagos M2: macrófagos regulatorios y macrófagos restauradores (revisado en (Mosser and Edwards, 2008)).

Otro tipo celular (no leucocitario) que posee un rol central en la respuesta inflamatoria aguda, son las **células endoteliales** de los vasos sanguíneos. En condiciones normales (sin inflamación tisular) las principales funciones de éstas células son mantener la fluidez sanguínea, regular el flujo sanguíneo, controlar la permeabilidad de las paredes vasculares, y mantener a los leucocitos circulantes en estado de quiescencia (Pober and Sessa, 2007). Frente a un estímulo inflamatorio las células endoteliales se activan y son responsables de incrementar el flujo sanguíneo local, permitir la entrada de proteínas desde el plasma hacia el tejido en cuestión (edema), y activar y reclutar a los leucocitos circulantes.

1.2. Citoquinas e inflamación

El término citoquina agrupa a un gran número de polipéptidos de bajo peso molecular (generalmente menor a 30 KDa) que pueden ser expresados por una amplia gama de tipos celulares, y que se ven involucrados en variadas funciones biológicas. Además de ser moléculas pleiotrópicas (presentan múltiples efectos sobre diferentes células), la mayoría de las citoquinas son redundantes (varias citoquinas pueden ejercer el mismo efecto). Las interacciones también son variadas, pudiéndose observar efectos sinérgicos o antagónicos (Loddick and Rothwell, 2002).

Las citoquinas fueron inicialmente descriptas como los principales mediadores en respuestas inmunológicas e inflamatorias, entre los cuales se incluyen: la respuesta inflamatoria aguda, la migración de leucocitos a los tejidos, y la regulación del proceso de reparación de tejidos. Sin embargo, en estos últimos años esta moléculas han sido asociadas a otros procesos fisiológicos como la supervivencia celular, la diferenciación de algunos tipos celulares, comportamientos de aprendizaje, comportamientos asociados a la enfermedad (*sickness behavior*), y procesos de mielinización, entre otros (Schmitz and Chew, 2008).

En particular, IL-1 y TNFα son dos de las citoquinas más importantes en el reclutamiento leucocitario. Ambas gatillan la expresión de un patrón similar de citoquinas, incluyendo el aumento de tanto IL-1 como TNFα. Estas citoquinas participan en el reclutamiento de neutrófilos PMN y monocitos en igual medida (Luger and Schwarz, 1990). Haremos una descripción más detallada de estas y otras citoquinas en cuanto a su relación con el tema de la presente tesis en secciones posteriores.

1.3. Quemoquinas y los procesos inflamatorios

Las quemoquinas son un tipo de citoquinas aún más pequeñas (no más de 10 KDa), y que inicialmente fueron asociadas a la quimiotaxis en procesos inflamatorios. Presentan un alto grado de redundancia en la unión a receptores: una quemoquina puede unirse a varios tipos de receptores, y un receptor puede unir muchas quemoquinas (Playfair and Chain, 1979).

La mayoría de las quemoquinas se incluyen dentro de dos tipos de categorías: las **quemoquinas-α o de tipo CXC**, que presentan dos cisteínas conservadas separadas por un aminoácido, y cuya función principal es la de atraer neutrófilos PMN. Por otro lado, las **quemoquinas-β o de tipo CC** contienen dos cisteínas adyacentes y estimulan la migración de monocitos y linfocitos.

2. Inflamación en el sistema nervioso

2.1. Perspectiva histórica: el SNC, un sistema con inmunoprivilegio

Durante muchos años se consideró al SNC como un órgano inmunoprivilegiado, en el cual la respuesta inmune era nula, debido a la existencia de barreras físicas que rodean al SNC impidiendo la comunicación con el sistema inmunológico. De esta forma se evitaba la detección de antígenos, y por ende la respuesta inmune asociada.

Una de las primeras observaciones que dio origen a este concepto surgió a partir de un experimento realizado por Paul Ehrlich en 1885: un colorante acuoso inyectado en la periferia teñía la mayoría de los órganos periféricos pero no las estructuras del SNC, a excepción del plexo coroideo). Sin embargo, si este mismo colorante era inyectado en el espacio subaracnoide, se teñía el cerebro y el líquido cefalorraquídeo (LCR), pero no el resto de los órganos. Estas observaciones representaron una de las primeras evidencias de la existencia de lo que hoy llamamos la barrera hematoencefálica (BHE). La morfología de la BHE fue evidenciada cuando se demostró que las uniones estrechas entre las células endoteliales de los capilares cerebrales eran las responsables de la aislación entre la sangre y el líquido intersticial (Brightman et al., 1970; Reese and Karnovsky, 1967).

La idea del cerebro como un órgano desprovisto de respuestas inmunes surgió a partir de que un injerto tumoral de origen mesodérmico de ratón no era rechazado cuando se trasplantaba al cerebro de una rata (Murphy and Sturm, 1923). Esta aparente segregación de las células inmunes del cerebro, junto con la ausencia de vasos linfoides impulsó la idea del inmunoprivilegio del SNC. Sin embargo, esta teoría fue puesta en duda a raíz de que experimentos posteriores evidenciaron cierto nivel de rechazo por parte del SNC a los injertos heterólogos (Neuwelt and Clark, 1978), y a medida que la idea de una célula inmune residente del SNC (la microglia) fue cobrando importancia (Rio-Hortega del, 1919; Rio-Hortega, 1932).

El concepto de que el SNC es un órgano inmunoprivilegiado se ha redefinido debido a que numerosos trabajos han demostrado la existencia de procesos inflamatorios e

inmunológicos en el sistema nervioso. Sin embargo también se reconoce que las respuestas inflamatorias dentro del SNC están estrictamente reguladas (Muldoon et al., 2013). Las principales propiedades que confieren este carácter de inmunoprivilegio al SNC son: (1) limitación del ingreso de anticuerpos, mediadores inmunológicos, y células inmunes por la BHE; (2) ausencia de vasos linfáticos en el parénquima cerebral; (3) incapacidad de la micro y astroglia de producir una respuesta inmune adaptativa por si solas; (4) ausencia de células dendríticas en el tejido nervioso; (5) bajos niveles de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MCH); (6) respuestas inflamatorias reducidas, retrasadas o incluso ausentes en determinados contextos (Muldoon et al., 2013).

2.2. Características principales de la neuroinflamación

La presencia de una respuesta inflamatoria aguda similar a la que se observa en la periferia podría resultar perjudicial en el SNC, ya que podría generar un importante aumento de la presión intracraneal, acompañada por una vasta destrucción del parénquima nervioso producida por la presencia de los neutrófilos PMN. Esto produciría una desestabilización de la homeostasis del medio extracelular neuronal, el cual asegura el correcto funcionamiento de la transmisión nerviosa y ayuda a mantener la población neuronal post-mitótica (Eikelenboom et al., 2002).

Numerosos trabajos han demostrado que existen diferencias en la respuesta inmune e inflamatoria dentro del SNC con respecto a la observada en tejidos periféricos. Se han observado diferencias en cuanto a la participación de leucocitos y a la acción de citoquinas. Una injuria cerebral puede producir un reclutamiento atípico y desfasado de leucocitos, o incluso ausencia completa del mismo (Andersson et al., 1992a) Lawson, 1994 #1968}(Graeber et al., 1998).

Hoy se reconoce que existen por lo menos cuatro rutas de ingreso de leucocitos al SNC: (1) desde la sangre al tejido subaracnoideo vía los vasos de la leptomeninges; (2) desde la sangre hacia el espacio perivascular del parénquima nervioso vía la BHE; (3) desde el torrente sanguíneo al LCR vía el plexo coroideo; (4) desde la sangre al LCR a través de las meninges o las células ependimales de los ventrículos (Alvarez and Teale, 2007a, b;

Ransohoff et al., 2003). En condiciones de homeostasis el ingreso de leucocitos al parénquima nervioso es relativamente bajo, aunque se observan células que se acumulan en el lado abluminal de pequeños vasos sanguíneos (Wilson et al., 2010) (Engelhardt and Coisne, 2011). Frente a un evento inflamatorio o de infección, el tráfico leucocitario puede incrementarse considerablemente mediante modificaciones estructurales de alguna de las rutas descriptas anteriormente (Greter et al., 2005; Wilson et al., 2010).

Por otro lado se ha demostrado que el rol de algunas citoquinas en la respuesta inflamatoria es diferente en el SNC, y además varía entre diferentes zonas del cerebro. Cuando las zonas de inyección incluyen a las meninges o a los ventrículos (Quagliarello et al., 1991) (Kim et al., 1992) (Megyeri et al., 1992) las respuestas se asemejan a las observadas en eventos inflamatorios periféricos. Sin embargo, si el estímulo se realiza dentro del parénquima cerebral, la respuesta se ve alterada con respecto a la cinética y la calidad del infiltrado inflamatorio (Andersson et al., 1992b). Por ejemplo, inyecciones con IL-1β inducen el reclutamiento de 10 veces más neutrófilos PMN que monocitos, mientras que el TNF-α induce una respuesta dominada por monocitos (Schnell et al., 1999). Además, trabajos de nuestro laboratorio han demostrado que diferentes zonas del parénquima nervioso (hipocampo, corteza, cuerpo estriado, sustancia nigra) responden en forma diferencial a una inyección aguda de IL-1β (Depino et al., 2005). Por lo tanto, las distintas histopatologías inducidas en el cerebro por IL-1β o TNFα sugieren que la red de conexiones de citoquinas que se observa en el SNC difiere de la que se conoce para la periferia.

Luego de varias décadas de investigación respecto de las características distintivas de los procesos inflamatorios asociados al SNC, se ha logrado una mejor comprensión de su funcionamiento en situaciones de homeostasis, así como también en la patogénesis y progresión de enfermedades neurodegenerativas. A continuación profundizaremos sobre algunos de los temas de mayor relevancia para la presente tesis.

2.2.A. Componentes estructurales y celulares

Barrera Hematoencefálica (BHE) y Barrera Sangre-líquido cefalorraquídeo (BSLCR)

La BHE está formada por células endoteliales altamente especializadas que imponen una estricta regulación del transporte paracelular y transcelular de moléculas hidrosolubles (las moléculas liposolubles no están restringidas). El pasaje de células y moléculas se ve restringido por la presencia de un elaborado complejo de uniones estrechas entre las células endoteliales, sumado a la ausencia de fenestras y a la baja actividad pinocítica (Abbott et al., 2010). Por otro lado la incorporación de nutrientes y la exclusión de metabolitos tóxicos necesaria para el correcto funcionamiento del parénquima nervioso se realiza a través de transportadores altamente especializados (Pardridge, 2007).

El microambiente que rodea a las células endoteliales juega un rol fundamental en el mantenimiento estructural y funcional de la BHE. En este sentido, el rol de la **unidad neurovascular (UNV)** ha ido cobrando importancia en la última década. La UNV se compone por un elemento horizontal (estructural) que incluye al endotelio, a la lámina basal del endotelio, y a los pies astrocíticos; y por un elemento vertical (nicho o contexto), dentro del cual se incluyen astrocitos, neuronas, pericitos y microglia (Muldoon et al., 2013). Algunas de sus principales funciones son: la regulación del flujo sanguíneo local, la regulación de la permeabilidad y de los mecanismos de transporte de la BHE, la regulación de las respuestas neuroinmunes, y la remodelación neurovascular (angiogénesis) (Stanimirovic and Friedman, 2012).

El plexo coroideo representa otra de las fronteras entre el ambiente dinámico de la periferia y el regulado microambiente nervioso. El plexo coroideo es el encargado de secretar el LCR hacia los ventrículos, y está compuesto por un epitelio cúbico con uniones estrechas en su cara apical (hacia los ventrículos) que impiden el libre pasaje de moléculas hidrosolubles. Al igual que las células endoteliales de la BHE, poseen sistemas de transporte transmembrana que permiten el ingreso de ciertas moléculas hacia el LCR, y el drenaje de agentes tóxicos fuera del mismo (Engelhardt and Coisne, 2011).

En condiciones normales, macrófagos perivasculares y de las meninges recolectan información desde el SNC y la comunican a los linfocitos T. Si los linfocitos detectan algún antígeno potencialmente peligroso, se activan y abren la BHE, permitiendo el ingreso de células inmunes del exterior y la eliminación de cualquier elemento ajeno al SNC. Por otro lado, en ciertas condiciones la respuesta inmune se vuelve contra los componentes intrínsecos del SNC, lo cual genera una respuesta inflamatoria crónica dentro del parénquima nervioso, como se observa en algunas enfermedades neurodegenerativas del SNC como la esclerosis múltiple (EM)(Figura 2.2.1)(Engelhardt and Coisne, 2011).

Células endoteliales cerebrales

Las células endoteliales cerebrales (CEC) son particularmente sensibles a diversos daños agudos o crónicos (estrés oxidativo, deprivación de oxígeno o glucosa, trauma, infecciones, citoquinas pro-inflamatorias, daño al ADN, y acumulación de fragmentos del péptido β-amiloide) (Rizzo and Leaver, 2010). Estos estímulos nocivos pueden inducir daño en la microvasculatura, afectando su supervivencia e incidiendo sobre la integridad anatómica y funcional de la UNV y la BHE. Como resultado la homeostasis del SNC se puede ver afectada, generando o exacerbando procesos patológicos.

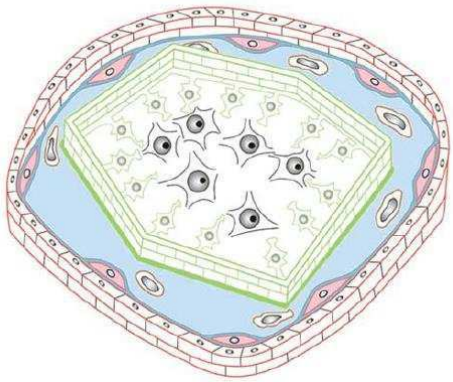


Figura 2.2.1. Modelo del doble fuerte que ilustra la arquitectura funcional de la BHE. En el esquema la pared exterior (ladrillos rojos) representa las células endoteliales, cuya cara interior está recubierta por la membrana basal (línea celeste), en la cual se embeben los pericitos (células rosadas). La fosa entre las murallas (zona celeste) representa el espacio perivascular drenado por el LCR. La pared interna (ladrillos verdes) está compuesta por los pies terminales de los astrocitos, y está protegida por la membrana basal del parénquima (línea verde). La glia y las neuronas se encuentran protegidas en el centro. Las células encargadas de la vigilancia inmunológica (células marrones) se encuentran en el espacio perivascular. Tomado de *Muldoon et al (Muldoon et al., 2013).*

Varios trabajos han reportado que el mal funcionamiento de las CEC podría contribuir con la progresión de la esclerosis múltiple (EM). El aumento en la expresión de ciertas quemoquinas y receptores de quemoquinas en CEC activadas se ha asociado con la facilitación en la migración de leucocitos hacia el parénquima nervioso. En pacientes con EM, la desregulación de la migración de leucocitos activados a través de la BHE se reconoce como uno de los primeros fenómenos de la patología (Grammas et al., 2011).

Astrocitos

En 1909 Santiago Ramón y Cajal describió dos tipos morfológicos de astrocitos: los astrocitos fibrosos (con escasos procesos largos y poco ramificados, asociados mayormente a la sustancia blanca) y los astrocitos protoplasmáticos (con mayor cantidad de procesos y más ramificados, asociados mayormente a la sustancia gris) (Garcia-Marin et al., 2007) (Figura 2.2.2).

Actualmente, los astrocitos se definen según su morfología estrellada y por la expresión de determinados filamentos intermedios específicos, como la proteína fibrilar glial ácida (GFAP) o la proteína de unión a calcio S100B. La población astroglial está compuesta por un grupo heterogéneo de células con numerosas y variables funciones, generalmente asociadas al mantenimiento de la homeostasis (Wang and Bordey, 2008).

En numerosas patologías del SNC (neurotoxicidad, infecciones virales, enfermedades neurodegenerativas, SIDA, demencia, EM, inflamación y trauma), se ha observado una importante astrogliosis o reactividad de los astrocitos (Hatten et al., 1991). Este fenómeno se caracteriza por un aumento en el diámetro celular, en la expresión de GFAP, y una importante hipertrofia (Dong and Benveniste, 2001).

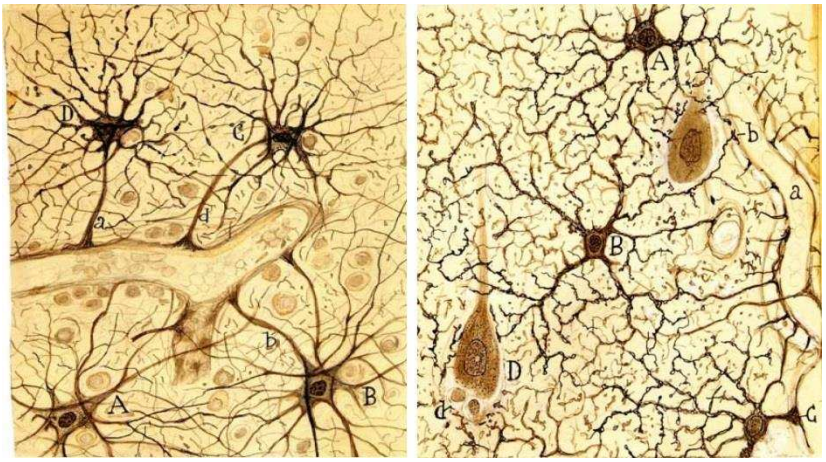


Figura 2.2.2. Astrocitos ilustradas por Ramón y Cajal. (A) Células neuróglicas de la substancia blanca del cerebro humano adulto. Método del oro. A: aspecto de ciertas células donde se divisa un aparato fibrilar; B-C: aspecto ofrecido por otras donde el protoplasma teñido en masa no consiente la percepción de fibras; a, b, d, pies perivasculares **(B)** Trozo de un corte de la substancia gris del cerebro de un hombre adulto. Coloración por el cloruro de oro. A: tipo neuróglico grande; B: tipo neuróglico más pequeño; C: pie inserto en un capilar; D: pirámide cerebral; a: capilar sanguíneo; b: pequeños pedículos perivasculares; d: células satélites no neuróglicas. Adaptado de (Ramon y Cajal).

Los astrocitos tienen una participación importante en la neuroinflamación. Se ha identificado que los astrocitos expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y gatillan respuestas inflamatorias locales (Farina et al., 2007). Una de las evidencias más importante surgió a partir de un estudio en ratones transgénicos donde se comprobó que la vía de NFκB en astrocitos regula la inflamación en el SNC, y su inhibición tiene efectos beneficiosos sobre la regeneración del tejido dañado (Brambilla et al., 2005).

Por otro lado, se ha revelado un rol protector fundamental para los astrocitos activados ya que son los responsables de la generación de una cicatriz luego de una injuria y restringen el área dañada (modulando la inflamación), limitan la extravasación de leucocitos periféricos, promueven la restauración de la barrera hematoencefálica, y promueven la supervivencia neuronal (Bush et al., 1999) (Faulkner et al., 2004).

Microglia

Más de un siglo y medio después de la primera descripción de elementos mesodérmicos fagocíticos dentro del sistema nervioso, hoy se acepta universalmente a la

microglia como el componente celular encargado de la primera línea de defensa dentro del SNC. Los términos “mesoglia” y “tercer elemento del sistema nervioso” fueron acuñados a principios del siglo XX por Robertson (1900) y Ramón y Cajal (1913), respectivamente. Del Río-Hortega (1919-1921) redefinió a la mesoglia como la microglia: una célula pequeña de núcleo chico y conspicuo, con al menos dos procesos espinosos, y de origen mesodérmico (Figura 2.2.3 A, adaptado de (Rio-Hortega del, 1919)). Entre las funciones de la microglia se incluían la de fagocitosis, y una importante participación en procesos inflamatorios y de necrosis dentro del tejido nervioso, durante los cuales adquiría “una morfología en forma de bastón o con cuerpos con gránulos adiposos” (en su estadio final de activación) (Figura 2.2.3 B, adaptado de (Rio-Hortega del, 1919).

Aunque del Rio-Hortega obtuvo evidencias de que la microglia provenía de células que migraban desde la pía hacia el parénquima cerebral, también propuso que este tipo celular podría provenir de los monocitos de la sangre (Rezaie and Male, 2002). Hoy la hipótesis más fuerte propone que las células de la microglia provienen de monocitos derivados del saco vitelino que ingresan al cerebro durante los primeros estadios del desarrollo (Perry and Teeling, 2013). En los animales adultos, estas células se transforman en microglia ramificada (que puede ser activada y adquirir una forma ameboidea fagocítica), retienen la habilidad de dividirse y tienen propiedades inmunofenotípicas compartidas con los monocitos y los macrófagos (Byrne and Roberts, 2004).

A lo largo de muchos años de investigación las células microgliales han sido involucradas en múltiples funciones, tanto en condiciones fisiológicas como en contextos más bien patológicos. Algunas de las funciones más relevantes son: remodelado neuronal durante el desarrollo del SNC mediante la fagocitosis o la secreción de citoquinas y factores de crecimiento; reconocimiento de antígenos patogénicos (foráneos o propios) y presentación antigénica (mediante el complejo mayor de histocompatibilidad [MHC]); fagocitosis en múltiples procesos fisiológicos y patológicos, citotoxicidad mediante la producción de especies reactivas de oxígeno, citoquinas y ciertos aminoácidos; modulación de la inflamación y respuestas inmunes; desmielinización (destrucción de la mielina); y reparación tisular mediante la remoción de debris celular (Boche et al., 2013).

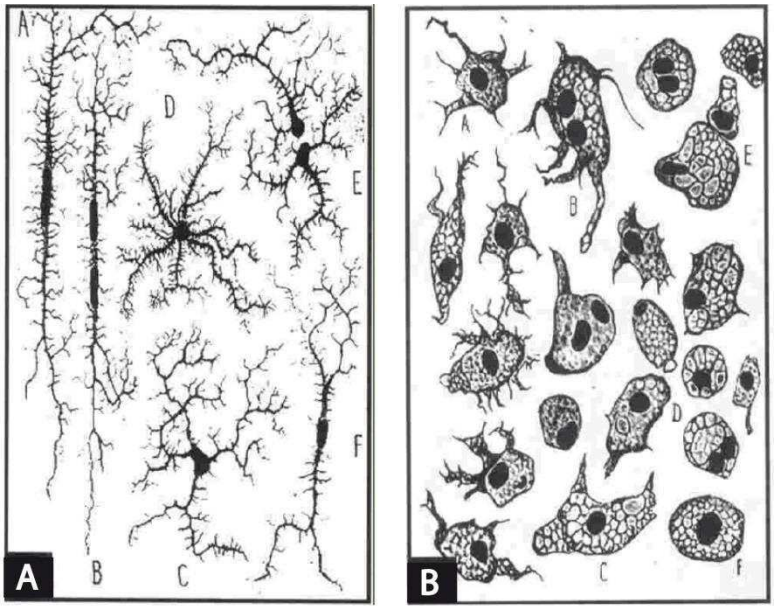


Figura 2.2.3. Células de la microglia en diferentes estadios de activación ilustradas por del Rio-Hortega. (A) Principales morfologías de microglia humana de tejido adulto normal. A: célula bipolar; B: célula grande con dos núcleos; C: célula multipolar con ramificaciones; D: célula multipolar con apéndices con espinas; E: Par isogénico; F: corpúsculo bipolar con apéndices bifurcados. **(B)** Estadios finales en la formación de cuerpos con gránulos adiposos observado en el borde de una lesión cerebral. A: corpúsculo microglial que aún conserva algunas prolongaciones; B: cuerpo binucleado; C-F: formas globulares con estructura reticular y contenido lipídico. Adaptado de (Rio-Hortega del, 1919)

Al igual que los macrófagos las células de la microglia son altamente versátiles. Por ejemplo, cuando estas células entran en contacto con citoquinas como la IL-4 o con bajas concentraciones de IFN-γ, estimulan la diferenciación de células madres neurales. Sin embargo, se observa el efecto contrario cuando se estimula a la microglia con LPS, fragmentos de la proteína β-amiloide o altas concentraciones de IFN-γ (Butovsky et al., 2005) (Butovsky et al., 2006b) (Butovsky et al., 2006a). La regulación de la activación microglial está asociada a procesos protectores como la reparación y remodelación del tejido nervioso, mientras que una activación más intensa o crónica puede resultar en daños irreversibles a las neuronas y demás componentes del parénquima nervioso (London et al., 2013).

En contraste con lo que ocurre en la periferia para la regulación de los macrófagos hacia un fenotipo de activación pro-inflamatorio (M1) o anti-inflamatorio (M2) (ver sección 1.1 de la presente introducción), aun no se comprenden bien los mecanismos y posibles marcadores involucrados en los distintos tipos de activación de la microglia dentro del SNC.

Durante muchos años se ha descrito la activación morfológica de la microglia frente a diferentes procesos fisiológicos y patológicos del SNC (Kreutzberg, 1996). La morfología típica de la microglia en “estado de reposo” presenta varios procesos finos y cortos (Figura

2.2.3 A). Esta **microglia ramificada o tipo 1** se puede observar en tejido de animales naïve y es altamente activa en su función de sensado ambiental (Nimmerjahn et al., 2005). Existen estadios intermedios de activación morfológica (**microglia tipo 2 o 3**), que muchas veces son asociados a patologías especificas en humanos (p.e. la microglia en forma de bastón se observa mayormente en desordenes crónicos como la encefalitis asociada a la infección con sarampión). Luego de que la microglia entra en contacto con estímulos que la activan, aumentan la expresión de ciertas moléculas asociadas a la presentación antigénica como MHC II (London et al., 2013), a pesar de que no parecen poseer la capacidad de actuar como células presentadoras de antígenos (Galea et al., 2007). En el estadio final de activación, la microglia presenta una morfología ameboidea que no es distinguible de los macrófagos fagocíticos de la periferia (**macrófago/microglia tipo 4**) (Boche et al., 2013).

Al igual que ocurre con los macrófagos periféricos, se ha descripto que frente a un primer estímulo inflamatorio débil, la microglia puede encontrarse cebada, presentando un fenotipo relativamente anti-inflamatorio. Sin embargo, si son expuestas a un segundo estímulo inflamatorio, la respuesta que se observa puede resultar aun mayor que la que se observaría frente a los estímulos pro-inflamatorios por separado. Este tipo de exacerbación de la respuesta pro-inflamatoria se ha comprobado en diversos modelos animales, dónde una situación de neurodegeneración a nivel del SNC (por ejemplo en la enfermedad del rpión, la enfermedad de Parkinson [EP], y la EA) se ve exacerbada por un estímulo pro-inflamatorio en la periferia (Cunningham et al., 2009; Holmes et al., 2009; Pott Godoy et al., 2008).

2.2.B. Componentes moleculares

Citoquinas

Existen numerosas y variadas evidencias que corroboran la expresión de citoquinas y su receptores (RNAm y proteína) tanto en el cerebro, como en células aisladas del SNC (Hopkins and Rothwell, 1995). Estas moléculas juegan un rol importante en la supervivencia y la muerte neuronal, que muchas veces es contexto y dosis dependiente (Sternberg, 1997).

Por ejemplo, se ha observado que la estimulación de distintas líneas de astrocitos, microglia y células endoteliales con IL-1β induce un diferente perfil de expresión de citoquinas (An et al., 2011). Además, IL-1α produce neurotoxicidad dosis dependiente en neuronas maduras del ganglio dorsal fetal, mientras que en neuronas inmaduras en cultivo previene la apoptosis (Brenneman et al., 1992). Este rol dual contexto dependiente se ha observado también para TNF-α (Chertoff et al., 2011; Lipton, 1997), entre otras.

Evidencias directas de la función de ciertas citoquinas sobre la actividad neuronal surgieron a partir de inyectarlas en forma sistémica o intracerebral. Estos estudios demostraron que la expresión de citoquinas dentro del SNC puede activar el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA), inducir fiebre, prolongar la fase de sueño profundo, aumentar la ingesta de comida y líquidos, letargia, y depresión, entre otras cosas. Este conjunto de respuestas fisiológicas comportamentales han sido identificadas tanto en estudios en animales (Quan and Herkenham, 2002) como en humanos (Smedley et al., 1983; Spriggs et al., 1987).

Por otro lado, existen numerosas evidencias que exponen el efecto neurotóxico de ciertas citoquinas cuando son sobreexpresadas. De esta forma se ha encontrado que pueden contribuir a la generación y/o progresión de varias enfermedades neurodegenerativas (Sternberg, 1997).

El rol de TNFα en el SNC fue descubierto en 1987, cuando se observó que era producido por células de la microglia (Frei et al., 1987). Se observa un importante aumento de TNF luego de una isquemia la isquemia cerebral (Feuerstein et al., 1998), y se la ha asociado a varios modelos de desmielinización, ya que es una molécula citotóxica para oligodendrocitos (Baker et al., 1994; Probert et al., 1995).

La IL-6 presenta un rol importante en la homeostasis y el desarrollo del SNC. Algunas de las funciones en las que se la ha visto involucrada son: inducción de supervivencia, proliferación, diferenciación, regeneración y actividad de neuronas, astro y oligodendrogénesis, inducción de la fiebre, modulación del eje HPA, y comportamientos emocionales. La IL-6 juega un rol crucial en la neuroinflamación debido a su participación en la activación de astrocitos y microglia, y en la integridad de la BHE (Balasingam et al., 1994; Brunello et al., 2000; Campbell et al., 1993).

Interleuquina 1 (IL-1)

A partir del surgimiento de la neuroinmunología, la familia de las IL-1 ha sido uno de los principales objetos de estudio. A mediados de la década de los 80s, se reconocieron efectos directos de la IL-1β sobre diferentes aspectos del SNC. Así se pudo observar que esta citoquina proinflamatoria actúa sobre variadas funciones neuronales, comportamientos, actividades neuroendocrinas, y metabólicas en el cerebro (Rothwell, 1991; Rothwell and Luheshi, 2000).

Dentro de la familia de IL-1 existen dos agonistas: IL-1α e IL-1β. Estas moléculas presentan una homología de menos del 30% y se unen a los mismos receptores, aunque con distinta afinidad. Durante un tiempo se consideró que ambas moléculas poseían una actividad biológica similar. Sin embargo, los dos agonistas de esta familia de citoquinas poseen diferentes mecanismos de expresión, síntesis, secreción y regulación de su actividad. Aunque tanto IL-1α como IL-1β se sintetizan como precursores de 31 kDa (pro-IL-1α y pro-IL-1β), solamente pro-IL-1α tiene actividad biológica (intracelular), mientras que pro-IL-1β debe ser clivada por una enzima específica (caspasa 1/enzima convertidora de IL-1β [ICE]), luego de lo cual es liberada al medio extracelular. Una vez madura, esta citoquina de 17 kDa tiene la habilidad de circular por el torrente sanguíneo, y cumplir sus funciones en órganos distantes (Gosselin and Rivest, 2007). A diferencia de lo que ocurre con IL-1β, IL-1α no juega un rol central en la interacción entre el sistema inmune y el sistema nervioso (Gosselin and Rivest, 2007). Debido a la mayor importancia relativa de IL-1β en la neuroinmunología y en la presente tesis, nos focalizaremos en este agonista a partir de ahora.

Otra de las moléculas de la familia es el receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra), que se une a los mismos receptores que IL-1α e IL-1β, pero no induce ninguna cascada de señalización intracelular, y por lo tanto actúa como un inhibidor endógeno de la actividad de IL-1. Esta citoquina se encuentra mayormente en el espacio extracelular, y su rol inhibitorio en la vía de IL-1 dentro del SNC ha sido descripto en respuesta a estímulos con LPS (locales y sistémicos) (Dunn, 1992), en modelos de isquemia cerebral y daños excitotóxicos (Relton and Rothwell, 1992), entre otros (Loddick et al., 1997).

Hasta el día de hoy se han descripto tres receptores para IL-1, y dos proteínas accesorias del receptor. Estas cinco moléculas poseen un domino extracelular que forma parte de la superfamilia Ig, y comparten una homología significativa. El primer receptor descripto fue el de 80 kDa, y fue denominado receptor de IL-1 tipo I (IL-1RI) (O'Neill, 1995). El IL-1RI está altamente glicosilado, su expresión en membrana es baja (entre 1-200) y varía entre diferentes tipos celulares, y posee dos sitios de unión a IL-1β. Este receptor es el principal encargado de ejecutar las funciones biológicas de IL-1. IL-1β es capaz de unirse tanto al sitio A como al sitio B, mientras que IL-1ra sólo se une al sitio A (Evans et al., 1995). Como muestra la figura 2.2.4, la cascada de señalización de IL-1 a través del IL-1RI incluye el reclutamiento de la proteína accesoria del receptor de IL-1 (RAcP). Una vez formado el complejo IL-1/IL-1RI/RAcP, la dimerización de los dominios Toll/receptor de IL-1 (TIR) genera la incorporación y activación de varias proteínas adaptadoras: el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), la quinasa 4 asociada al receptor de IL-1 (IRAK4), y el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6). A continuación se produce una serie de fosforilaciones/desfosforilaciones que culminan con la traslocación al núcleo del factor de transcripción NF-κB (vía el complejo de quinasas de IκB), o el factor de transcripción AP-1 (vía de las MAP quinasas) (Dinarello, 1996).

El receptor de IL-1 tipo II (IL-1RII) es una glicoproteína de 68 kDa cuya porción intraplasmática se compone de apenas 35 aminoácidos (en ratas), y que no induce ninguna cascada de señalización. De esta forma este receptor truncado, que es capaz de unirse a los tres miembros de la familia de IL-1, compite con IL-1RI por la unión a IL-1 y actúa como regulador negativo de la actividad biológica de esa citoquina (Gosselin and Rivest, 2007).

Además de IL-1ra e IL-1RII, existen dos componentes adicionales que disminuyen la respuesta biológica de IL-1. Tanto el IL-1RI como el IL-1RII se pueden encontrar en forma soluble (sIL-1RI y sIL-1RII, respectivamente) en sangre y orina de personas saludables, así como también en ciertos fluidos de personas enfermas (p.e. líquido sinovial, o LCR). Estas proteínas de 62 kDa, que se producen a partir del clivaje proteolítico de la porción extracelular de sus respectivos receptores, son capaces de unir y secuestrar a IL-1 (Dinarello, 1996).

Durante muchos años la comunidad científica hipotetizó acerca de la existencia de nuevos receptores de IL-1 en el SNC debido a que se observaban efectos contrapuestos para

esta citoquina (p.e. neuroprotección y neurotoxicidad) (Boutin et al., 2003). Además un conjunto creciente de evidencias demostraron efectos de IL-1 independientes de la presencia de IL-1RI (Loscher et al., 2003; Touzani et al., 2002) o de la activación de la vía canónica (Davis et al., 2006; Sanchez-Alavez et al., 2006), y que incluso no eran inhibidos por IL-1ra (Diem et al., 2003). Recientemente se ha reportado la existencia de un tercer receptor de membrana para IL-1 en ratones, al cual se lo ha denominado receptor de IL-1 tipo 3 (IL-1R3) (Qian et al., 2012). Este receptor se produce a partir de un sitio alternativo de transcripción en el gen de IL-1RI, y se expresa en el SNC y en el hígado. De acuerdo a la estructura predicha para IL-1R3, la falta del sitio de unión A en la porción extracelular impediría la unión a IL-1ra, aunque si es capaz de unirse a IL-1β.

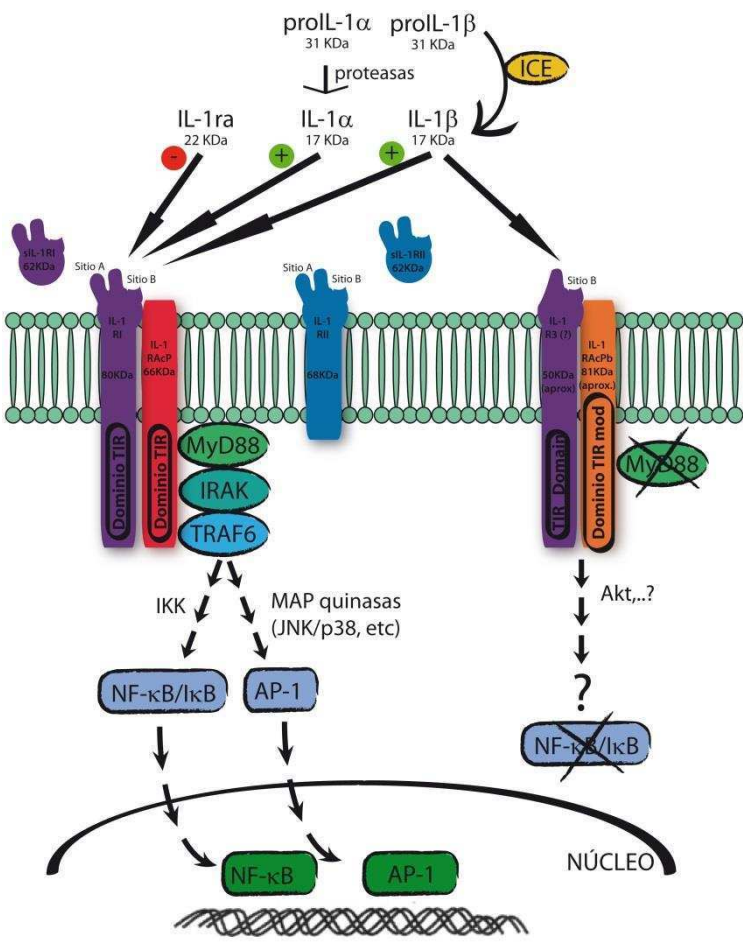


Figura 2.2.4. Mecanismo de acción de la vía de IL-1. Las formas maduras de IL-1α, IL-1β, e IL-1ra ejercen su función biológica principalmente mediante la unión al IL-1RI. Este receptor posee dos sitios extracelulares de unión a IL-1 (A y B). Tanto IL-1α como IL-1β se unen a ambos sitios, mientras que IL-1ra sólo se une al sitio A. La unión de cualquiera de los dos agonistas induce el reclutamiento de la proteína accesoria del receptor de IL-1 (RAcP), y dispara la cascada de señalización mediada por el dominio intracelular de tipo TIR. En la vía canónica la señalización incluye varios pasos de fosforilación, y termina en la traslocación del factor de transcripción NF-κB o AP-1 al núcleo, con la subsiguiente transcripción de genes pro-inflamatorios. Existe otro receptor que une los tres miembros de la familia de IL-1, pero que no es capaz de señalizar: el IL-1RII. Por lo tanto este receptor señuelo inhibe la acción de IL-1, al igual que las versiones solubles tanto del RI (sIL-1RI) como del RII (sIL-1RII). Finalmente, en ratones se ha descripto la existencia de un tercer receptor (IL-1R3), que se asocia a una RAcP específica (RAcPb), y actúa principalmente a través de una vía no canónica independiente de NF-κB. Este receptor sólo posee el sito de unión B, por lo cual no sería capaz de unirse a IL-1ra.

Se ha identificado la presencia de los tres IL-1R dentro del SNC. Tanto el IL-1RI como el IL-1RII se han encontrado en diferentes poblaciones neuronales en condiciones fisiológicas, y sus expresiones aumentan en presencia de estímulos patológicos (Parnet et al., 2002). Es importante destacar que debido a que los anticuerpos, sondas y *primers* para IL-1RI pueden detectar también a IL-1R3, será necesario revisar muchos de los resultados obtenidos anteriormente para IL-1RI.

A nivel celular, además de la presencia de estos receptores en ciertas poblaciones neuronales, se ha observado su expresión y regulación en astrocitos, microglia, y las células relacionadas con la BHE y la BSLCR (células endoteliales, células ependimales, y células epiteliales del plexo coroideo) (Parnet et al., 2002).

La actividad biológica de IL-1 va a depender de la presencia relativa de todos los agonistas, antagonistas y receptores en el momento y lugar de análisis. La regulación de IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-1RI, e IL-1RII se puede dar a nivel transcripcional, traduccional, y de localización celular/extracelular. Además, esta regulación puede variar según el tipo celular o el contexto general que se estudie (Dinarello, 1996).

Quemoquinas

En las últimas décadas se ha localizado la expresión de muchas quemoquinas, y sus receptores dentro del SNC. Se ha observado su expresión en neuronas, en células gliales (atrocitos, microglia, y oligodendrocitos), y en células de la microvasculatura, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Banisadr et al., 2005). Las quemoquinas regulan varias funciones del SNC como el desarrollo, la neuroinflamación, y la actividad sináptica.

Muchas de estas pequeñas citoquinas se expresan solamente en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio, pero otras son expresadas en forma constitutiva (p.e. CXCL12 y sus receptores CXCR4 y CXCR7) (Rostene et al., 2011). Algunas de las funciones fisiológicas en las cuales intervienen las quemoquinas son: respuestas al estrés, variaciones en la temperatura corporal como respuesta a pirógenos, regulación del consumo de alimentos, regulación del balance de agua, la regulación de la liberación de hormonas pituitarias

(Callewaere et al., 2007), y en los comportamientos asociados a la enfermedad *(Fil et al., 2011).*

Varias quemoquinas y sus receptores han sido asociadas a diferentes enfermedades neurodegenerativas con componente neuroinflamatorio como la EM, la EA, la isquemia cerebral, el daño traumático, y la demencia asociada a HIV (Banisadr et al., 2005).

El receptor 2 de quemoquinas de motivo CXC (CXCR2) presenta particular interés para esta tesis debido a que ha sido implicado en varias patologías del SNC (incluida la EM), y en el reclutamiento de neutrófilos. Los principales ligandos de este receptor son CXCL1-3 y CXCL5-8 (Veenstra and Ransohoff, 2012). A pesar de que fue originalmente descripto en la superficie de neutrófilos, también se ha observado que es expresado por oligodendrocitos, linfocitos T, granulocitos basófilos, y células endoteliales (Krieger et al., 1992; Lippert et al., 2004; Raman et al., 2007; Ransohoff et al., 2007).

El CXCR2 está asociado al reclutamiento de neutrófilos a los focos de inflamación, ya que la producción local de IL-1β induce la secreción de ligandos de CXCR2 en las células endoteliales, los macrófagos, o los astrocitos. En paralelo, hay un aumento de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1, del inglés *intercellular adhesion molecule 1*) en las células endoteliales locales (Veenstra and Ransohoff, 2012). Además se observó que CXCR2 posee un papel fundamental en la activación de los neutrófilos. Los animales CXCR2$^{-/-}$ son resistentes a la desmielinización, aun cuando los neutrófilos son reclutados al SNC, tanto en un modelo de desmielinización por cuprizona (Liu et al., 2010) como en el modelo de encefalitis experimental autoinmune (EAE) (Carlson et al., 2008).

Por otro lado, la presencia de CXCR2 en precursores de oligodendrocitos (OPCs) (Glabinski et al., 1997), ha sido asociada a la prevención de la apoptosis, la estimulación de la migración y la proliferación de los mismos. De esta forma se ha observado que el bloqueo de la activación de CXCR2 en OPCs arresta la migración de estos precursores y disminuye el grosor de la mielina. Por otro lado, los OPCs CXCR2+ presentan una disminución de la apoptosis inducida por TNFα en modelos *in vitro* e *in vivo* (Veenstra and Ransohoff, 2012).

El CXCR2 ha sido involucrado en varios modelos de neuroinflamación. En particular se ha observado que en el modelo animal de EM EAE, la presencia de este receptor en células mieloides es esencial para el desarrollo de la enfermedad, mientras que su presencia

en células fuera del linaje mieloide está más bien asociado a la incapacidad de reparación de la mielina (Liu et al., 2010; Tsai et al., 2002). La expresión y señalización del CXCR2 también ha sido asociada a injurias cerebrales traumáticas, donde su presencia fue relacionada con un empeoramiento del daño tisular y la neurodegeneración (Semple et al., 2010), y en modelos de EA dónde su presencia podría presentar un rol perjudicial (Bakshi et al., 2011; Xia and Hyman, 2002).

2.3. *Neuroinflamación: una sutil frontera entre la homeóstasis y los procesos patológicos*

Las primeras evidencias de la relación entre el SN y el sistema inmune fueron inferidas a partir de las respuestas comportamentales observadas frente a infecciones sistémicas. Algunos de estos comportamientos característicos son la fatiga, dolores musculares, apetito reducido, sensación de frío, aumento del tiempo de reposo, y malestar generalizado entre otros. Estos síntomas se han denominado *sickness behavior*, o comportamientos asociados a la enfermedad (Aubert et al., 1995), y suelen coincidir con una variación en la temperatura corporal (fiebre o hipotermia, dependiendo de la especie estudiada) y ciertos cambios a nivel neuroendocrino. La presencia de estos signos de la conducta de la enfermedad en mamíferos, aves y ciertos reptiles confirma la importancia de la comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso, y su gran valor adaptativo (Dantzer and Kelley, 2007). Las citoquinas juegan un rol fundamental en la comunicación entre la periferia y el SNC, y a su vez intervienen en el inicio de las modificaciones a nivel del SNC que luego desembocarán en las respuestas comportamentales (Berkenbosch et al., 1987; Besedovsky et al., 1986).

El descubrimiento de este rol fisiológico de las citoquinas en el SNC, ha llevado a hipotetizar acerca de la función de estas moléculas en enfermedades neurodegenerativas, daños traumáticos o isquemias. Hoy se sabe que la acción desregulada o prolongada de citoquinas y quemoquinas dentro del SNC está involucrada en la mayoría de la enfermedades neurodegenerativas y en otros procesos patológicos, incluyendo ciertas enfermedades psiquiátricas (Dantzer and Kelley, 2007).

2.3.A. Comunicación periferia – SNC

La administración periférica de compuestos que inducen citoquinas pro-inflamatorias (como LPS o Poly I:C, que simula una infección viral), o de las propias citoquinas (IL-1β o TNFα), reproducen todos los síntomas no específicos asociados a una infección. Estos efectos pueden ser bloqueados mediante la administración de antagonistas específicos de estas citoquinas (Crestani et al., 1991; Cunningham et al., 2009; Cunningham et al., 2007; Kent et al., 1992). Las citoquinas actúan a nivel del núcleo preóptico (PON) para generar la fiebre, y a nivel del núcleo paraventricular (PVN) de hipotálamo al momento de regular la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) (Dantzer and Kelley, 2007).

Considerando que las citoquinas son pequeñas proteínas hidrosolubles cabe preguntarse cuáles son las vías mediante las cuales las señales ingresan al SNC. Hasta el día de hoy se han descripto dos rutas principales (Figura 2.3.1). En primer lugar la **vía nerviosa aferente**, que involucra principalmente al nervio vago para las infecciones intraperitoneales (ip), pero también puede incluir otros nervios (p.e. el nervio glosofaríngeo en infecciones bucales) (Romeo et al., 2001). Las ramas aferentes del nervio vago contienen células dendríticas y macrófagos en la vaina perineural que secretan IL-1β en respuesta a una inyección ip o iv. Las neuronas sensoriales del nervio vago expresan el IL-1RI, y por lo tanto la IL-1β circulante estimula la vía vagal aferente (Ek et al., 1998; Goehler et al., 1999). Esta vía es más importante en la respuesta asociada a la enfermedad, que para la activación del eje HPA o la inducción de fiebre (Konsman et al., 2000).

La **vía humoral** es una ruta de comunicación más lenta que presenta varias alternativas para la comunicación hacia el SNC: la primera involucra la entrada directa de citoquinas al cerebro a través de un mecanismo de transportadores saturables que se encuentra en la BHE y la BSLCR. La segunda implica la entrada directa de las citoquinas a través de las fenestras delos OCV. La tercera se realiza a través de receptores presentes en las células endoteliales de la microvasculatura cerebral, la BHE, y la BSLCR, que activan mecanismos intracelulares que transmiten la señal hacia el interior del cerebro. La vía humoral involucra la producción local de citoquinas y mediadores moleculares como la prostaglandina E2 (PGE2) y el óxido nítrico (ON), y es fundamental en la inducción de fiebre y en la activación del eje HPA (Rivest et al., 2000). Además IL-1β puede ingresar al SNC en las

zonas sin BHE, y actuar directamente sobre algunas poblaciones neuronales que expresan el IL-1RI (o probablemente IL-1R3) como el área postrema (van Dam et al., 1992). Luego la señal puede propagarse (vía nerviosa) hacia otros núcleos neuronales efectores (Konsman et al., 1999). Además existen evidencias de que IL-1β puede propagarse a zonas más lejanas a través de cascadas de señalización extracelulares (Vitkovic et al., 2000).

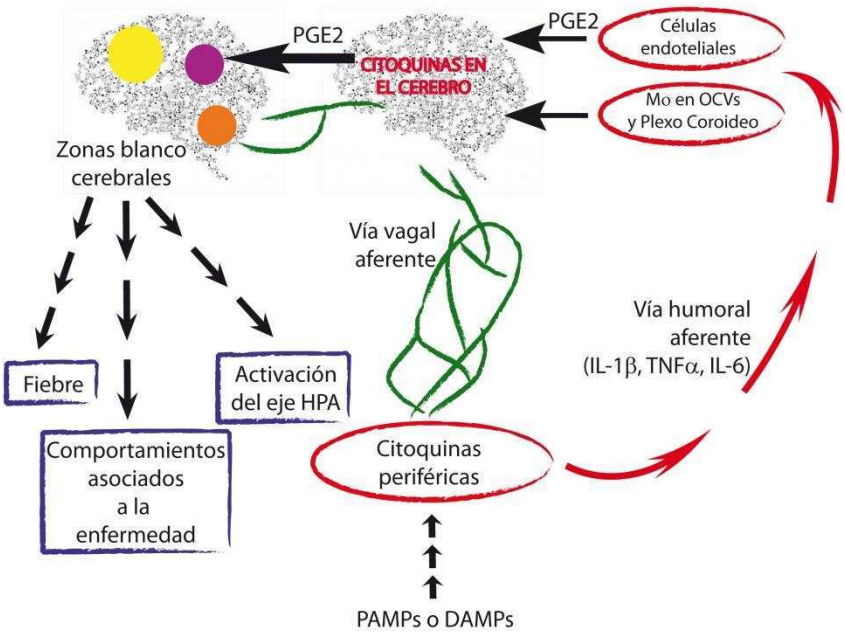


Figura 2.3.1. Comunicación periferia - SNC. Las células de la inmunidad innata se activan en respuesta a PAMPs o DAMPs, y liberan citoquinas. Estas citoquinas pueden activar vías nerviosas aferentes y/o señalizar hacia el cerebro mediante los macrófagos (Mo) de los OCVs y el plexo coroideo, o las células endoteliales (vía PGE2). Cuando las citoquinas (o las señales producidas por ellas) acceden a determinadas zonas del cerebro, se producen los comportamientos asociados a la enfermedad, la fiebre, y la activación del eje HPA. Modificado de (Dantzer, 2006)

2.3.B. Comunicación SNC – periferia

Una injuria o infección tisular induce la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado (Ruffolo et al., 1999). En el caso particular del cerebro también se han observado cambios en la expresión de citoquinas, quemoquinas y otras proteínas de la fase aguda en el hígado luego de lesiones inflamatorias cerebrales como el daño traumático cerebral (Kossmann et al., 1995; Ott et al., 1994), la expresión aguda o crónica de IL-1β (Campbell et al., 2003; Campbell et al., 2005; Wilcockson et al., 2002), y la EAE (Campbell et al., 2010), entre otros. Como respuesta a estas lesiones suele observase un importante aumento en la expresión de quemoquinas en el hígado (p.e. CXCL-1 y CCL-2), con el consecuente reclutamiento de neutrófilos y posterior daño hepático (Mosher et al., 2001). En última

instancia la repuesta de fase aguda en el hígado parece estar asociada a una amplificación de la respuesta infamatoria central (Campbell et al., 2008a; Campbell et al., 2003; Wilcockson et al., 2002).

A pesar que aún no se conocen en detalle los mecanismos involucrados en la señalización entre la lesión central y el hígado, se han propuesto algunas vías nerviosas vagales específicas (Griffin et al., 2011; Ottani et al., 2009), al igual que ciertas vesículas pequeñas derivadas de la membrana de células activadas (micropartículas) (Anthony et al., 2012).

2.3.C. Enfermedades neurodegenerativas y otras patologías

Una alteración en el balance entre citoquinas pro y anti-inflamatorias que implique una mayor cantidad relativa del componente pro-inflamatorio, produce una respuesta exacerbada en el SNC frente a subsiguientes infecciones locales o sistémicas. En los últimos años se ha observado que en un contexto inflamatorio leve pero crónico, como podrían ser la edad (Godbout et al., 2005) o ciertas enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes o la depresión, existe una sensibilización o *priming* de las células de la microglia (Fung et al., 2012; O'Connor et al., 2005; Perry, 2004). En ese contexto un estímulo pro-inflamatorio, proveniente ya sea de la periferia o del SNC, induce una producción exacerbada de citoquinas y otros mediadores dentro del SNC, lo cual puede impactar sobre el comportamiento y/o la progresión de enfermedades neurodegenerativas.

La microglia del parénquima cerebral presenta, en condiciones normales, un estado de reposo en comparación con otros macrófagos del SNC (los macrófagos perivasculares o los de los OCV) (Perry and Teeling, 2013). Varios trabajos han demostrado que la actividad de la microglia está regulada por factores secretados por la astroglia y las neuronas, al igual que por interacciones célula-célula (Lee et al., 2011; Neumann et al., 1998; Pocock and Kettenmann, 2007). Una consecuencia importante de este tipo de regulación de la microglia es que en condiciones de degeneración neuronal, la microglia pasa a un estado de mayor reactividad (Perry and Teeling, 2013). De hecho, mutaciones en genes asociados a la

interacción de la microglia con las neuronas han sido asociados a un aumento en la incidencia de la EA (Golde et al., 2013).

Numerosos estudios experimentales y clínicos han demostrado que estímulos pro-inflamatorios provenientes de la periferia contribuyen a exacerbar el daño en el SNC, mediante un aumento en la producción de moléculas proinflamatorias dentro del SNC (Campbell et al., 2008a; Cunningham et al., 2009; Cunningham et al., 2005a; Cunningham et al., 2005b; Perry, 2004; Perry et al., 2007). En muchos trabajos, el aumento de la inflamación a nivel del SNC se ha asociado a que la microglia cebada en un contexto de neurodegeneración, produce una respuesta inflamatoria exacerbada frente a un estímulo pro-inflamatoria periférico (Perry and Teeling, 2013). En modelos de enfermedad de prion se observa que una infección periférica provoca un cambio drástico en el fenotipo de la microglia, llevándolo de un fenotipo anti-inflamatorio a uno pro-inflamatorio que secreta IL-1, TNF e IL-6 (Combrinck et al., 2002; Cunningham et al., 2005b). En un modelo transgénico de EA, ratones inyectados en la periferia con LPS aumentan la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias en el SNC (Sly et al., 2001). Por otro lado, en diferentes modelos de EP se observó un aumento en la degeneración de neuronas dopaminérgicas y en la producción de citoquinas pro-inflamatorias cuando los animales son inyectados periféricamente con un adenovector que expresa IL-1β en forma crónica (Godoy et al., 2008; Pott Godoy et al., 2008). En cuanto a la enfermedad de EM, nos referiremos a este tema en mayor detalle en las secciones posteriores.

3. Esclerosis múltiple: características generales

La EM es la mayor causa de discapacidad en jóvenes adultos de países desarrollados. El primer caso de estudio acerca de esta enfermedad fue realizado en 1868 por el médico francés Charcot, que notó la heterogeneidad con respecto a la sintomatología y a la neuropatología de la enfermedad (Zipp and Aktas, 2006). Esta enfermedad neurodegenerativa se caracteriza por eventos de desmielinización y remielinización, los cuales conllevan la pérdida de funciones sensoriales y motoras. Algunos de los síntomas que se presentan son debilidad, parálisis, y/o temblor en las extremidades, atrofia muscular,

entumecimiento, dolor facial, alteraciones en la visión, disfuncionalidad en el habla, entre otros.

Parte de la heterogeneidad de la sintomatología se debe a que la patología puede afectar diferentes zonas del SNC. El daño progresivo se debe a la acumulación de deficiencias por la aparición de nuevos focos de desmielinización, y a una falla progresiva en la reparación del tejido dañado luego de repetidos episodios desmielinizantes. Aunque la presencia de múltiples placas de desmielinización es uno de los rasgos más destacados de la enfermedad, también se ha observado desmielinización difusa en la sustancia blanca, desmielinización en la sustancia gris, daño axonal, muerte celular de los oligodendrocitos, activación de las células de la glía y neurodegeneración (Bruck and Stadelmann, 2005; Kieseier et al., 2005; Kutzelnigg et al., 2005; Matute and Perez-Cerda, 2005; Weinshenker et al., 1989).

El curso clínico de la enfermedad es variable: aproximadamente el 85-90% de los pacientes presentan **EM con recaídas y remisiones**, que se caracteriza por la presencia de claros episodios de recaída de la enfermedad, seguida de episodios de remisión donde se observa una recuperación parcial o completa de las funciones nerviosas. El segundo subtipo es el denominado **EM progresiva primaria** (10%), que se caracteriza por el avance progresivo de la enfermedad y sus síntomas desde el comienzo. Un tercer subtipo es la **EM progresiva secundaria**, que presenta una etapa inicial de la enfermedad con recaídas y remisiones, seguida de una segunda etapa donde el avance de la enfermedad resulta progresivo. Finalmente, aproximadamente el 5% de los pacientes presenta **EM progresiva con recaídas**, donde se presencia un progresivo avance de la enfermedad desde su inicio, con claros episodios de recrudecimiento de la misma que pueden estar seguidos, o no, por episodios de remisión (Bradl and Lassmann, 2009; Lazzarini; Weiner, 2008).

La etiología de la enfermedad es aún hoy poco clara, mientras la mayoría de los autores sugieren un origen autoinmune, otros proponen que existe una reacción inflamatoria primaria que originaría la repuesta autoinmune secundaria (Barnett and Prineas, 2004). Se ha postulado que eventos de inflamación sistémicos podrían ser los responsables de gatillar la patología, o los eventos de recaída de la misma (Compston and Coles, 2008). Por otro lado, se han identificado múltiples factores genéticos que afectan la susceptibilidad de una persona a contraer la enfermedad (Ebers et al., 1996; Haines et al.,

1996; Sawcer et al., 1996). Además, se ha propuesto que la interacción entre factores genéticos y ambientales podrían estar involucrados con el inicio de la enfermedad (Compston and Coles, 2008). Se ha sugerido que la etiología de la enfermedad podría ser multifactorial, lo cual podría comenzar a explicar la heterogeneidad que se observa en la progresión de la EM, así como también los diferentes mecanismos de acción que se han caracterizado en distintos grupos y/o estadios (Lucchinetti et al., 2000).

En este sentido resulta de vital importancia abarcar el estudio de la EM a partir de distintos y variados modelos experimentales que permitan el estudio de las distintas variables involucradas en el origen y la progresión de la enfermedad.

3.1. Una enfermedad inflamatoria

La EM ha sido descrita primariamente como una enfermedad autoinmune inflamatoria (Lindquist et al., 2011; Lucchinetti et al., 2004). Las infecciones y otros eventos pro-inflamatorios han sido postulados como posibles disparadores tanto de la patología como de los episodios de recaída. Algunos autores incluso han hipotetizado que la respuesta autoinmune podría ser una consecuencia de un evento pro-inflamatorio primario (Barnett and Prineas, 2004). La inflamación multifocal está asociada a la EM con recaídas y remisiones, mientras que el periodo progresivo de la enfermedad se relaciona con perdida axonal y neurodegeneración (Slavin et al., 2010).

3.1.A. Células inflamatorias

Durante muchos años se consideró a los linfocitos y a los macrófagos como los principales leucocitos involucrados en la patología de EM ya que eran los principales tipos celulares encontrados en las placas de desmielinización. Se ha establecido ampliamente que los linfocitos T activados entran al SNC y producen gran parte del daño inmunológico (Frohman et al., 2006; Hafler et al., 2005). Más recientemente se ha involucrado a los linfocitos B en la patología, ya que se ha descripto una estructura del estilo de folículos

linfáticos en las meninges y el espacio perivascular. Los centros germinales de estos folículos contienen linfocitos B y una red de células dendríticas, que durante el ataque del sistema inmune al SNC producen anticuerpos en las placas desmielinizantes (Baranzini et al., 1999; Bradl and Lassmann, 2009; Kutzelnigg et al., 2005).

Por último, recientemente se ha descripto que algunas células pertenecientes al sistema inmune innato también estarían involucradas en la patología de EM. Se ha observado un rol para los mastocitos, asociándolos a la producción de autoanticuerpos contra la mielina, tanto en la EM como en el modelo de EAE (Kruger et al., 1990; Secor et al., 2000). Por otro lado, los mastocitos pueden secretar un amplio espectro de citoquinas, y de esta forma están involucrados en la diferenciación de algunas células inmunes hacia un fenotipo más regulatorio o efector (Wootla et al., 2011).

En los últimos años los neutrófilos también han sido asociados a la EM. Se ha descripto una importante cooperación de estas células con la acción mediada por los linfocitos Th17 mediante una comunicación reciproca a través de quemoquinas (Pelletier et al., 2010). Además se observó un alto número de neutrófilos activados en pacientes con EM (Naegele et al., 2011), y se ha asociado a los neutrófilos CXCR2+ en el desarrollo de lesiones desmielinizantes en los modelos de EAE (Carlson et al., 2008) y cuprizona (Liu et al., 2010).

3.1.B. Moléculas inflamatorias

Teniendo en cuenta la complejidad del funcionamiento de la red de citoquinas, una comprensión adecuada del rol de estas moléculas en la patología de EM ha sido difícil. De hecho, muchos ensayos clínicos basados en resultados de modelos experimentales han fracasado (Codarri et al., 2010).

El TNFα no solo se encuentra elevado en el LCR y las lesiones activas de pacientes con EM, sino que además se lo ha correlacionado con la progresión de la enfermedad (Maimone et al., 1991; Sharief and Hentges, 1991). Sin embargo pacientes tratados con bloqueantes de esta citoquina han mostrado una exacerbación de la enfermedad (1999). En los ensayos clínicos que involucraron a IL-12 e IFN-γ, también se obtuvieron resultados

contrapuestos a los que se habían observado con animales experimentales (Leonard et al., 1995; Panitch et al., 1987; Willenborg et al., 1996).

El llamado eje IL-23/IL-17 ha sido fuertemente asociado a la EM y sus modelos experimentales en los últimos años, pero aunque ambas citoquinas tienen papeles fundamentales en el desarrollo de la EAE (Haak et al., 2009; Hofstetter et al., 2005), su bloqueo no se ha traducido en mejoras a nivel terapéutico (Segal et al., 2008).

La IL-1β, también ha sido ampliamente asociada a EM. Se ha observado que los pacientes presentan niveles elevados de esta citoquina en suero y LCR, especialmente durante los periodos de recaídas (Brosnan et al., 1995; Dujmovic et al., 2009; Hauser et al., 1990; Tsukada et al., 1991). Además, se han asociado ciertos genotipos de IL-1β, y el balance entre esta citoquina y su antagonista IL-1ra a la severidad, la susceptibilidad, y/o la progresión de la EM (Aggelakis et al., 2010; Borzani et al., 2010; Dincic et al., 2006; Sarial et al., 2008).

Resultados obtenidos a partir de algunos modelos animales han ayudado a comprender mejor los mecanismos mediante los cuales esta citoquina participa en la patología de EM. El aumento de IL-1β ha sido asociado a una mayor severidad de la patología en varios modelos animales (Furlan et al., 2007; Jacobs et al., 1991; Martin and Near, 1995; Moreno et al., 2011), y el IL-1RI es un importante mediador en la generación del modelo experimental de EAE (Li et al., 2011; Matsuki et al., 2006; Ruggiero, 2011; Sutton et al., 2006).

Los efectos observado en modelos experimentales pueden deberse a efectos de IL-1β sobre (1) la activación microglia (Gao and Tsirka, 2011), (2) en el reclutamiento y activación de macrófagos y neutrófilos PMN de la periferia (Furlan et al., 2007; Naegele et al., 2011), (3) la activación de la astroglia (Moynagh, 2005), (4) activación de linfocitos T que reconocen antígenos de la mielina (Furlan et al., 2007).

3.1.C. BHE

La ruptura de la BHE es una de las características salientes de la EM (Larochelle et al., 2011; McQuaid et al., 2009; Watzlawik et al., 2010). De hecho, la entrada de leucocitos activados al parénquima nervioso modifican la permeabilidad de la misma (Larochelle et al., 2011; Lindquist et al., 2011). Sin embargo, también se sabe que existen factores que contribuyen a la patología aun cuando la BHE se encuentra intacta (Buljevac et al., 2002; Lindquist et al., 2011). Se ha descripto que varias citoquinas relacionadas con la EM tienen un efecto sobre la integridad de la BHE: la administración iv de TNFα induce ruptura de la BHE (Tsuge et al., 2010), y la IL-1β aumenta la síntesis del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) durante las recaídas, lo cual induce un aumento en la permeabilidad de la BHE (Argaw et al., 2006; Su et al., 2006). Finalmente, se ha descripto que la EM con recaídas y remisiones está asociada a un compromiso en la integridad de la BHE, mientras que en las modalidades progresivas muchas veces no hay daño detectable en la BHE (Bradl and Lassmann, 2009).

3.2. Modelos animales de EM

Los modelos animales de desmielinización pueden dividirse entre aquellos que intentan replicar la patología de la forma más precisa posible (p.e. EAE y los modelos virales), y otros que utilizan una estrategia más reduccionista que permite comprender aspectos específicos de la enfermedad (como los modelos de desmielinización inducidos por toxinas). A continuación haremos una breve descripción de algunos de los modelos utilizados para estudiar la EM.

3.2.A. Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE)

La EAE es, hoy en día, el modelo autoinmune más utilizado para estudiar la EM. Existen diferentes variantes del modelo, donde se inmunizan ratones, ratas o primates con distintos componentes de la medula espinal (proteínas de la mielina, o péptidos específicos)

(Steinman, 1999). También se inyectan Células T (CD4+, células Th1) que reconocen a la mielina. Cualquiera de éstas variantes es suficiente para gatillar enfermedades que comparten algunos de los aspectos clínicos y neuropatológicos con la EM (Steinman, 1999). El curso que toma la enfermedad es heterogéneo: se observan casos agudos monofásicos (a veces letales), crónicos progresivos, o con recaídas y remisiones (Steinman, 1999).

Muchas de las terapias que se probaron en pacientes con EM han sido basadas en resultados obtenidos en el modelo de EAE. Sin embargo, los ensayos clínicos en pacientes muchas veces han demostrado ser menos eficientes, e incluso empeoraron el progreso de la enfermedad o produjeron nuevos eventos adversos (Friese et al., 2006). Se ha postulado que al inducir artificialmente la respuesta inmunológica contra la mielina, se estarían obviando mecanismos patogénicos claves involucrados en la EM en humanos (Friese et al., 2006).

3.2.B. Modelo viral

Varios estudios clínicos han sugerido que la EM podría estar relacionada con infecciones virales y microbianas. Varios virus han demostrado ser capaces de inducir desmielinización, y hoy existen diferentes modelos virales de EM. Entre ellos se encuentra la encefalomielitis murina producida por el virus Theiler (TMEV), un virus citolítico que infecta y lisa oligodendrocitos, mientras que produce apoptosis en macrófagos. Este virus gatilla inmunopatologías desmielinizantes agudas reclutando células del sistema inmunológico (macrófagos, linfocitos T y B) que en un principio participan en la eliminación del virus, pero que en una segunda etapa serían las responsables de exacerbar la desmielinización y contribuir a su progresión en los animales con enfermedad crónica (Grigoriadis and Hadjigeorgiou, 2006). Algunas cepas del TMEV pueden producir encefalitis aguda fatal, mientras que otras son menos virulentas y generan infección y desmielinización crónica. En todos los casos se observa un gran número de linfocitos T y B en áreas de desmielinización (Grigoriadis and Hadjigeorgiou, 2006).

Teniendo en cuenta pocas veces se ha podido detectar el virus en cuestión en pacientes de EM, y considerando la gran cantidad de contradicciones que surgieron en

estudios relacionados, todavía no existen evidencias concluyentes que relacionen las infecciones virales con la etiología de la EM.

3.2.C. Modelos de desmielinización por toxinas

Existe varios modelos en los cuales se estudia la desmielinización y la remielinización mediante la inyección local (y focal) de toxinas en distintos tractos mielínicos. La lisolecitina (disolvente de membranas) y el bromuro de etidio (intercalante de ADN) son los agentes desmielinizantes más utilizados. Mientras que el primero afecta específicamente a las células del linaje oligodendrocítico, el segundo también afecta a los astrocitos locales. Estos modelos están ampliamente caracterizados, y ofrecen sólo pequeñas variaciones cuando se utilizan diferentes modelos animales, dosis, o de acuerdo al tracto mielínico elegido. Han sido ampliamente utilizados para estudiar el mecanismo de remielinización en presencia o ausencia de degeneración axonal (de acuerdo a la dosis utilizada) (Blakemore and Franklin, 2008). Además, estos modelos no presentan ruptura de la BHE ni infiltración de células inmunes desde la periferia, y por lo tanto son modelos útiles para estudiar el rol de la microglia en la desmielinización y posterior remielinización (Blakemore and Franklin, 2008).

Existen también modelos de desmielinización por administración de toxinas en forma sistémica, el más utilizado de los cuales es el de desmielinización por cuprizona, que afecta principalmente a los oligodendrocitos. En este modelo se observa desmielinización en el cuerpo calloso, la cápsula interna, la sustancia blanca en el tálamo, la comisura anterior y los pedúnculos cerebrales. A pesar de que se observan algunas diferencias de acuerdo al animal y la cepa utilizada, este modelo ha aportado mucho al conocimiento del proceso de remielinización, como ser la importancia de la inflamación como respuesta a la desmielinización original, y el rol pro-remielinizante de TNFα e IL-1β (Blakemore and Franklin, 2008).

3.3. Inflamación periférica en EM y modelos experimentales

Los eventos inflamatorios sistémicos son considerados como factores de riesgo para la EM. En el caso de la EM con recaídas y remisiones existe una clara relación entre los eventos de recaídas y el aumento de citoquinas pro-inflamatorias en el suero y LCR de pacientes (Buljevac et al., 2002; Edwards et al., 2011; Hauser et al., 1990). También se ha observado un aumento de la células secretoras de IL-1β, IL-6, y TNFα (Ysrraelit et al., 2008). Por otro lado, se ha demostrado que existe una relación entre infecciones periféricas y desarrollo de un nuevo episodio de recaída, lo cual frecuentemente empeora el daño neurológico (Buljevac et al., 2002; Panitch, 1994). Otros factores de inflamación periférica asociados a un aumento en el número de recaídas son los niveles altos de leptina (Matarese et al., 2010) (una hormona involucrada en la respuesta inmune y la obesidad) y el estrés (Buljevac et al., 2003; Frank et al., 2010).

Sin embargo, no todas las infecciones tienen un rol perjudicial para la EM: se ha reportado que las infecciones con ciertos parásitos helmintos son protectores, ya que inducen un perfil de linfocitos T CD4+ que secretan IL-1 y TGF-β (Correale and Farez, 2011a, b).

La importancia de eventos de inflamación sistémica sobre lesiones en el SNC también ha sido demostrada en algunos modelos de EM (Moreno et al., 2011; Palma et al., 1996; Serres et al., 2009). La administración de LPS u otras toxinas en forma periférica produjo una exacerbación de los síntomas neurológicos, tanto en el modelo de EAE (Nogai et al., 2005; Schiffenbauer et al., 1993; Serres et al., 2009), como en el modelo viral con TMEV (Palma et al., 1996). Sin embargo, otros grupos han presentado evidencia de que una exposición a LPS en forma perinatal, o previamente a la inducción de EAE en el adulto, produjo una patología de carácter atenuado (Buenafe and Bourdette, 2007; Li et al., 2010).

Como se mencionó en la sección 2.3.B, los neutrófilos CXCR2+ juegan un rol fundamental en la producción de lesiones, tanto en el modelo de cuprizona como en la EAE. En conclusión, la presencia de elementos inflamatorios provenientes de la periferia resulta esencial para el desarrollo de la EAE y la desmielinización por cuprizona.

En cualquier caso resulta evidente que existe una relación importante entre eventos de inflamación periférica y la progresión de la EM, y que un mejor conocimiento de los

mecanismos involucrados en esta interacción resultaría beneficioso para el desarrollo de estrategias terapéuticas.

4. Antecedentes del laboratorio

En el laboratorio se han estudiado los efectos de la expresión aguda o crónica de diferentes citoquinas, en diferentes zonas del cerebro. De particular interés para la presente tesis, se han estudiado los efectos de la expresión aguda y crónica de la IL-1β sobre el cuerpo estriado. La inyección aguda de esta citoquina en el estriado induce infiltrado inflamatorio caracterizado por la presencia de neutrófilos, sin producir daño alguno sobre la integridad del SNC (Andersson et al., 1992a; Depino et al., 2005; Perry et al., 1995), pero sí induce la expresión del ARNm que codifica para IL-1 β y TGF- β (Depino et al., 2005).

El modelo de expresión crónica de IL-1 β se logra mediante el uso de vectores adenovirales de replicación deficiente que permiten la expresión de la citoquina por aproximadamente 30 días. Este modelo presenta un pico de desmielinización acompañado por la presencia de infiltrado inflamatorio (compuesto principalmente por neutrófilos PMN), ruptura de la BHE y ausencia de neurodegeneración. Este proceso es reversible, observándose una remisión del infiltrado inflamatorio, restauración de la barrera hematoencefálica y, posterior restauración de la vaina de mielina (Ferrari et al., 2004).

Estos resultados han permitido el estudio del componente inflamatorio independientemente de la respuesta inmune adaptativa. En conclusión, nuestros datos señalan que la expresión crónica de IL-1β mediada por vectores adenovirales provee un excelente modelo para investigar los procesos de desmielinización y remielinización originados por un único componente del proceso inflamatorio.

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La **hipótesis de trabajo** supone que, como puede ocurrir en lesiones desmielinizantes en la enfermedad de EM, un segundo estímulo inflamatorio induce una exacerbación en la lesión primaria y/o una recuperación incompleta de la misma.

Concomitantemente con esta hipótesis central, se desprende una hipótesis secundaria en la cual el momento y el contexto de la lesión primaria asociada a la naturaleza del segundo estímulo inflamatorio determinan el efecto del mismo sobre la lesión primaria.

El **objetivo general** de esta tesis es estudiar el efecto de un segundo evento inflamatorio sobre una lesión desmielinizante preexistente en el sistema nervioso central. El modelo de estudio permite focalizar el análisis en el rol de una única citoquina pro-inflamatoria, IL-1β. Asimismo pretendemos investigar los posibles mecanismos de acción involucrados en estos fenómenos.

Objetivos específicos

- ***Capítulo I***: *Investigar el efecto de un segundo estímulo inflamatorio a nivel central, y compararlo con la lesión primaria.*

- ***Capítulo II***: *Analizar el rol de inflamaciones sistémicas, sobre la lesión primaria desmielinizante en el SNC*

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseños experimentales

1.1. Capítulo I

Como ya se mencionó previamente, el objetivo principal de esta tesis es analizar el efecto de un estímulo pro-inflamatorio **secundario** sobre las lesiones inflamatorias pre-existentes en el cuerpo estriado, y compararlos con los efectos observados con un único estímulo. En el laboratorio ya se había caracterizado el modelo con una única inyección del adenovector que expresa IL-1β (AdIL-1β) en el cuerpo estriado (Ferrari et al., 2004). La dinámica funcional del modelo fue caracterizada cada vez que se utilizó un nuevo stock adenoviral, para comprobar que la misma se repitiera en cada oportunidad, y de esta forma poder comparar los resultados obtenidos luego de la aplicación de segundo estímulo pro-inflamatorio. Estos grupos de animales serán denominados a partir de ahora como grupos de **inyección-única**. En el primer capítulo de la tesis los animales de inyección-única se sacrificaron 21, 30 o 50 días después de una inyección intracraneal, generando por lo tanto 3 grupos de inyección-única (Figura I.1.1 en la sección de resultados).

Para estudiar el efecto de un segundo estímulo pro-inflamatorio central, todos los animales fueron inyectados en primera instancia en el cuerpo estriado con el AdIL-1β o el Adβ-gal y luego fueron re-inyectados en la misma zona en dos momentos diferentes: cuando la lesión primaria no se había resuelto completamente (30 días) (**Lesión activa**) (Diseño experimental 1, Figura I.2.1 en resultados) o cuando la lesión primaria ya estaba resuelta (50 días) (**Lesión recuperada**) (Diseño experimental 2, Figura I.3.1 en resultados). De esta forma, considerando el primer y el segundo estímulo recibido se generaron cuatro grupos dentro de cada diseño experimental: AdIL-1β/AdIL-1β; AdIL-1β/Adβ-gal; Adβ-gal/AdIL-1β; y Adβ-gal/Adβ-gal.

1.2. Capítulo II

Para estudiar el efecto de un estímulo pro-inflamatorio periférico sobre una lesión central pre-existente los animales fueron inyectados en primer lugar con los adenovectores en el cuerpo estriado, y 30 o 42 días después se inyectaron los vectores periféricamente en forma endovenosa (iv). Para comprobar la efectividad del estímulo pro-inflamatorio intravenoso, se realizó un conteo leucocitario 5 días después de la inyección periférica. Los animales fueron sacrificados a los 7 días de la inyección iv. En este capítulo también se realizaron dos diseños experimentales: uno aplicando el estímulo periférico 30 días después del central, cuando la barrera hematoencefálica (BHE) aún se encontraba abierta (Diseño experimental 3, ver figura en resultados); y otro dónde la inyección intravenosa se realizó luego de 42 días, con la BHE completamente restablecida (Diseño experimental 4, ver figura en resultados). Nuevamente, considerando ambos estímulos y sus combinaciones se generaron cuatro grupos por diseño experimental: AdIL-1β/AdIL-1β_{iv}; AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$; Adβ-gal/AdIL-1β_{iv}; and Adβ-gal/Adβ-gal$_{iv}$.

2. Vectores adenovirales

Los vectores utilizados a lo largo de esta tesis fueron el adenovector que expresa el gen de IL-1β humano (AdIL-1β), y el vector control expresando el gen reportero β-galactosidasa (Adβ-gal). Ambos transgenes se encuentran río abajo del promotor del citomegalovirus (CMV) humano. El Adβ-gal fue amablemente provisto por el Dr. J. Mallet (Hospital Pitie Salpetriere, Paris, Francia), y el AdIL-1β fue generado según *Kolb et al.* (Kolb et al., 2001), y ha sido utilizado de rutina en el laboratorio durante varios años (Ferrari et al., 2004; Ferrari et al., 2006; Pott Godoy et al., 2010).

Ambos adenovectores son derivados del adenovirus humano de serotipo 5, pero han sido modificados de forma tal que no poseen capacidad replicativa: la deleción de la región E1 implica que estos adenovirus sólo pueden replicarse en líneas celulares que proveen las proteínas faltantes y necesarias para la replicación viral. La generación de los adenovectores se realizó en áreas de cultivo celular aisladas, nivel de bioseguridad II, y bajo las normas

institucionales de bioseguridad S2 (Riesgo biológico individual moderado, comunitario mínimo).

2.1. Amplificación de los stocks de adenovirus

Con el fin de generar suficientes adenovectores para llevar a cabo los experimentos, se realizaron amplificaciones a gran escala a partir de alícuotas individuales de cada adenovirus. Se utilizaron células HEK 293, una línea celular derivada de riñón embrionario humano que posee la región E1 adenoviral. La generación del adenovector comienza realizando una primera amplificación a escala media, o *semilla*. Brevemente, se realizó una primera infección en una placa de 15 cm de diámetro (p150) a 80% de confluencia aproximadamente, y con una multiplicidad de infección (MOI, del inglés *multiplicity of infection*) de 1000. Se diluyó el adenovector en medio Dulbecco alta glucosa (DMEM) con 2% de suero fetal bovino (SFB, Natocor), y se colocaron 7 ml del mismo en la placa. Se incubó la placa a 37°C durante 2 horas, durante las cuales se agitó la misma cada 20 minutos para asegurarse un contacto homogéneo de los adenovirus con todas las células. Al término de esta incubación, se remplazó el medio de infección por 18 ml de DMEM alta glucosa 10% SFB y se incubó a 37°C por aproximadamente 18 horas, o hasta que se evidenciara efecto citopático en las células (se visualiza como células refringentes con finas prolongaciones que, a medida que avanza en toda la placa, generan una especie de *malla o red celular)*. En ese momento se procedió a disociar las células mecánicamente con una pipeta de 5 ml. El siguiente paso fue liberar los nuevos adenovectores de las células, para lo cual se realizaron 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento: congelamiento durante 2 minutos en nitrógeno líquido, con posterior descongelamiento a 37°C. Luego de una centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos se recupera el sobrenadante con los adenovectores (*semilla*), y se descartan los pellets que contienen debris celular.

Para realizar el stock adenoviral a gran escala, se utilizaron 30 placas p150 de células HEK 293 a 80% de confluencia. Se diluyeron 6 ml de la *semilla* en 220 ml de DMEM alta glucosa 2% SFB. De forma similar a lo mencionado anteriormente para la realización de la *semilla*, se colocaron 7 ml. del medio con el adenovirus, se incubaron las placas a 37°C durante 2 horas

con agitación cada 20 minutos, se remplazó el medio de infección por DMEM alta glucosa 10% SFB, y se dejaron las placas en la estufa hasta el día siguiente. Las células se levantaron por disgregación mecánica cuando se observó el efecto citopático correspondiente. En este caso se realizó una primera centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos para recuperar las células con los adenovirus en su interior, luego de la cual se realizaron los tres ciclos de congelamiento-descongelamiento y la centrifugación a 4000 rpm.

A continuación se realizó la purificación de los adenovirus a partir del sobrenadante de la última centrifugación. En primer lugar se realizaron dos gradientes consecutivos de cloruro de cesio (ClCs). En el primero se utilizaron 4 tubos de Polyallomer donde se colocaron, en orden, las soluciones de ClCs de 1,60 g/ml y 1,30 g/ml de densidad, y finalmente se colocó el sobrenadante y aceite mineral hasta completar el volumen. Se ultracentrifugaron los tubos a 35000 g durante 90 minutos, a 20°C. Al finalizar la centrifugación se tomó la banda inferior de cada uno de los 4 tubos con una aguja y jeringa, y se colocó todo el contenido en un tubo sobre una solución de ClCs de 1,34 g/ml. Luego de completar el volumen con aceite mineral, se procedió a ultracentrifugar a 35000 g durante 18 horas, a 20°C. Una vez finalizada la centrifugación se observaron dos bandas, la superior contenía las cápsides vacías y la inferior los adenovirus.

Se tomó la banda inferior con una aguja y jeringa, y se la colocó en una columna de Sephadex G25 (PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare Bio-Sciences, ABBjörkgatan 30, 751 84 Uppsala, Suecia) previamente estabilizada con 30 ml. de Tris-Cl 10 mM (pH 7,8), Cl_2Mg 1 mM. Para eluir el virus se pasaron 12 alícuotas de 500 µl de la misma solución, y se recolectaron las fracciones en 12 tubos con 50 µl de glicerol. Para a su cuantificación por densidad óptica se tomaron alícuotas de cada fracción, y se las inactivó mediante el agregado de Tris-Cl 20 mM (pH 7.5), 0,5% SDS y una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Las fracciones con mayor contenido adenoviral se alicuotaron y se mantuvieron a – 80°C hasta su utilización.

2.2. Cuantificación de los adenovirus

El título de las **partículas totales** de adenovirus se obtuvo midiendo la densidad óptica (DO) a 260 nm en un espectrofotómetro. Se determinaron las partículas totales para cada una

de las fracciones recolectadas a partir de la elución de la columna de Sephadex. También se midió la DO a 280 nm, y se tomó la relación 260/280 como parámetro de pureza del stock. Una DO de 1 corresponde a 1,1 x 10^{12} partículas de virus/ml de solución.

La cuantificación de las **partículas infectivas** se realizó utilizando el método de dosis infectiva 50 (TICD50, del inglés *Tissue Culture Infective Dose 50*) en células HEK 293. Se sembraron 10000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, en DMEM alta glucosa 2% SFB. Al día siguiente se retiró el medio, y se lo remplazó por 100 μl de las diluciones del adenovirus en DMEM alta glucosa, 2% SFB, 20 mM de Hepes. Se realizaron diluciones seriadas al décimo del adenovector desde 1 x 10^{-8} hasta 1 x 10^{-14}. La infección con cada dosis se realizó por sextuplicado. Como control de viabilidad celular se utilizó una fila de 6 pocillos incubada con el medio utilizado para realizar las diluciones del adenovirus. Este esquema se realizó por duplicado en dos placas diferentes, partiendo de distintas alícuotas, y realizando las diluciones seriadas en forma independiente. Las placas se incubaron a 37°C durante 10 días, luego de los cuales se cuantificó bajo microscopio el número de pocillos de cada dilución que presentaba efecto citopático. El título del stock, expresado en partículas infectivas/ml, se calculó usando la siguiente fórmula:

$$TICD50 = \log[d + 0{,}5 + \frac{6+n}{6}]$$

Donde *d* es el orden de la última dilución donde se observa efecto citopático en todos los pocillos, y *n* es el número de pocillos con efecto citopático en la dilución que le sigue.

A lo largo de la tesis se utilizaron varios stocks virales, y sus títulos se mantuvieron entre 1 x 10^{11} y 2 x 10^{12} partículas infectivas/ml para los AdIL-1β, y entre 1 x 10^{11} y 9 x 10^{11} partículas infectivas/ml para los Adβ-gal. También se consideró que la relación entre las partículas totales e infectivas, siempre fueran inferiores a 25:1.

2.3. Controles de calidad de los stocks adenovirales

- **Caracterización por mapeo de restricción**

En primer lugar, se obtuvo el ADN de los adenovectores utilizando un protocolo basado en el método de HIRT (Hirt, 1967). Para ello, se partió de una de las fracciones de 500 µl obtenidas a partir de la elución de la columna de Sephadex. Con el objetivo de lisar los adenovectores se agregaron 37,5 µl de SDS 20%, 25 µl de EDTA [0,5 M], y 6,25 µl de proteinasa K [20 mg/ml], y se incubó durante 2 horas a 55°C. A continuación se agregaron 125 µl de NaCl [5M], 1 ml de alcohol 100% y luego de invertir varias veces los tubos se los incubó durante 30 minutos a -80°C para precipitar el ADN. Finalmente se centrifugó a 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante, se lavó el pelet con alcohol 70%, y se lo resuspendió en 40 µl de agua miliQ autoclavada.

Una vez obtenido el ADN adenoviral se procedió a realizar la reacción de restricción enzimática con las enzimas Hind III y Bgl II. De esta forma se confirmó la identidad de cada vector comparando los patrones de restricción obtenidos con cada una de las enzimas con los perfiles conocidos. Para ello se tomaron 2 µl de muestra de ADN y se incubaron durante 15 minutos a 37°C junto con: 13,5 µl de agua roux, 2 µl del buffer enzimático correspondiente, 1 µl de enzima, 0,5 µl de albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *bovine serum albumin*), y 1 µl de RNAsa. A continuación se procedió a sembrar los productos de las restricciones en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) durante 90 minutos a 120 volts.

- **Verificación de la Ausencia de virus replicativos**

Como se mencionó anteriormente los vectores adenovirales no son replicativos debido a una deleción de la región E1. Para comprobar que los vectores no hayan incorporado dicha región por recombinación con el genoma de las células HEK 293, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) utilizando ADN adenoviral

como molde. Como control positivo se utilizó ADN de células HEK 293. La secuencia de los *primers* utilizados para detectar la región E1 fue la siguiente:

Gen	*Primer*	Secuencia (5´a 3´)	Producto de amplificación
E1	F R	GAC GCC CGA CAT CAC CTG TG CGG CGA GCG CCT TCT GGC GG	4000 bp

Tabla 2.1. Secuencias de *primers* y tamaño esperado del producto de amplificación de DNA.

Las muestras se corrieron luego en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio [0.5 mg/ml], y se evaluó la presencia o ausencia de la banda correspondiente al producto de amplificación de la región E1, que tiene aproximadamente 4 Kb. Los adenovectores utilizados en esta tesis no contenían la región E1.

- **Verificación de la ausencia de LPS**

Se evaluó una posible contaminación de los stocks virales con lipopolisacárido bacteriano (LPS) utilizando el kit comercial E-TOXATE reagents (Sigma, St. Louis, MO) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este es un test del tipo LAL (del inglés, *Limulus amebocyte lysate*). El LAL es un extracto acuoso de amebocitos del cangrejo *Limulus polyphemus*. Estos amebocitos reaccionan con el LPS formando un coágulo, propiedad que es utilizada por el test para evaluar la presencia de LPS en una muestra. Este test fue llevado a cabo en el laboratorio por Mariela Chertoff o por Ana Laura De Lella Ezcurra en diferentes oportunidades. Los adenovectores utilizados en esta tesis dieron un resultado negativo para este test.

3. Animales utilizados

Para todos los experimentos se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar (colonia original obtenida de Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA; y mantenida durante varias generaciones en el Bioterio del Instituto Leloir), de 8-10 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en el bioterio del Instituto Leloir a una temperatura constante de 22 ± 2ºC, bajo un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 horas, y con comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo el reglamento del National Institute of Health (NIH) de Estados Unidos, el reglamento interno de la Fundación Instituto Leloir, y con la aprobación de la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto (CICUAL - FIL).

3.1. Procedimientos con animales

3.1.A. Inyecciones intracerebrales

Las operaciones se realizaron por la mañana para evitar posibles efectos de las variaciones circadianas en la expresión de citoquinas sobre las respuestas inflamatorias. Los animales anestesiados con clorhidrato de ketamina (80 mg/kg) y xilacina (8 mg/kg), e inyectados en el cuerpo estriado (CE) izquierdo (Bregma + 0,1 mm; Lateral + 0,25 mm; Ventral - 0,40 mm) (Figura 4.1) ya sea con el AdIL-1β o con el Adβ-gal como control. Las inyecciones estereotáxicas se realizaron con un capilar de vidrio estirado (diámetro aproximado de 50 μm), a fin de minimizar el daño en el tejido nervioso debido a la cirugía *per se*. Los vectores se diluyeron en buffer Tris-Cl 10 mM (pH 7,8) estéril, a una concentración final de 1 x 10^6 partículas infectivas/μl. Se inyectó un volumen final de 1 μl. Las inyecciones se realizaron en un periodo de 5 minutos: en los primeros cuatro se administró el vector (0,25 μl/minuto), y luego se mantuvo el capilar en el lugar durante un minuto adicional a fin de evitar el reflujo de la solución. Finalmente se procedió a limpiar y cerrar la herida suturando la incisión y asegurándose de que toda la zona quedará embebida en Iodopovidona (Pervinox) para

minimizar infecciones e inflamaciones locales. Los animales se mantuvieron bajo una lámpara que les proveía calor hasta que se recuperaron de la anestesia.

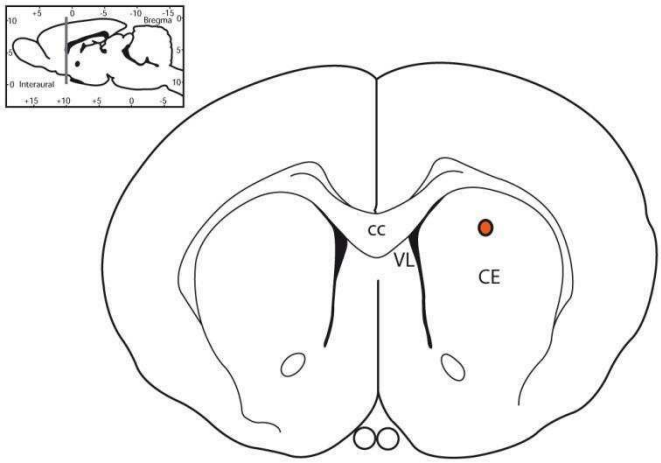


Figura 4.1. Esquema del sitio de inyección del adenovector en el cuerpo estriado (CE). En el recuadro superior se muestra una visión lateral del cerebro de la rata dónde se marca la posición anteroposterior (Bregma + 0,1 mm) a partir de la cual se obtiene el esquema coronal. CC: cuerpo calloso, VL: ventrículo lateral. Imagen modificada a partir de Paxinos and Watson (1997).

3.1.B. Inyecciones intravenosas

Para estudiar el efecto de inflamaciones sistémicas se utilizó como estímulo proinflamatorio el AdIL-1β, aplicado en forma intravenosa. Como control se utilizó nuevamente el Adβ-gal. Los animales fueron anestesiados por un lapso corto de tiempo por inhalación con Isofluorano, una vez dormidos se los colocó bajo luz y se procedió a ubicar la vena lateral de la cola y con una aguja 27G se realizó la inyección: en primer lugar se pasaron 300 µl del adenovector en una concentración de 1,4 x 10^9 partículas infectivas/µl, diluidas en buffer Tris-Cl 10 mM (pH 7,8) estéril; en segundo lugar se pasaron 300 µl de solución fisiológica estéril. Una vez que los animales se recuperaron de la anestesia fueron devueltos a sus respectivas jaulas.

3.1.C. Formula Leucocitaria

La efectividad del estímulo periférico se verificó mediante un recuento leucocitario de la sangre de los animales inyectados tanto con el AdIL-1β como con el adenovector control. Para ello se tomó una gota de sangre a partir de la cola de las ratas, y se realizó un extendido de la misma sobre un portaobjetos de vidrio. Una vez secas, las muestras se tiñeron con la técnica de May-Grünwald/Giemsa (MGG) que permite diferenciar cualitativa y cuantitativamente los principales elementos formes de la sangre. La muestra para realizar los frotis sanguíneos se tomó 5 días después de la inyección iv, ya que trabajos previos del laboratorio habían demostrado que este era el día dónde se observaba el pico de acción del AdIL-1β.

3.1.D. Obtención de muestras para análisis molecular

Los animales previamente anestesiados con isofluorano fueron decapitados. Se disectaron los siguientes órganos y estructuras cerebrales: hígado, bazo, cuerpo estriado, hipotálamo, según el objetivo del experimento. De los órganos periféricos se tomaron muestras de aproximadamente $1cm^3$. Todas las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 ml, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

3.1.E. Procesamiento del tejido para histología

Los animales fueron anestesiados profundamente con clorhidrato de ketamina (80 mg/kg) y xilacina (8 mg/kg), y perfundidos transcardíacamente con una solución salina heparinizada (NaCl al 0,9%, 0.25U/ml de heparina en agua miliQ, aproximadamente 50 ml por rata) seguido por paraformaldehído frío al 4% en buffer fosfato (PB) 0.1M, pH 7.2 (aproximadamente 300 ml por animal). Las perfusiones se realizaron a un flujo constante (300 ml en 30 minutos) utilizando una bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Palmer Instrument Co., IL, USA). Luego, los cerebros fueron extraídos, y post-fijados en la misma solución fijadora a

4°C durante 12 hs. Posteriormente los cerebros se criopreservaron mediante inmersión en una solución 30% de sacarosa en PB 0.1M, hasta que adquirieron mayor densidad que la solución (4-5 días), y se hundieron en la misma. Finalmente, los cerebros se congelaron en isopentano (J.T.Baker, NJ, USA) enfriado en un baño de etanol puro y hielo seco, por 3 a 5 minutos. A continuación los cerebros fueron cortados en un crióstato (Leica) en secciones transversales de 40µm. Las secciones seriadas del cuerpo estriado (entre bregma + 2,2 mm y – 0,80 mm) (Figura 4.2) se conservaron en una solución criopreservadora (3 volúmenes de glicerol, 3 volúmenes de etilenglicol, 4 volúmenes de PB 0.1M) a -20°C hasta su utilización.

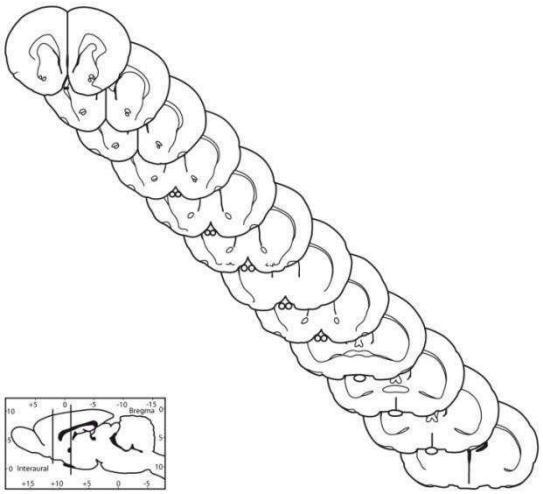


Figura 4.2. Esquema de la zona utilizada para realizar los cortes seriados: entre bregma + 2,2 mm y – 0,80 mm. En el recuadro superior se muestra una visión lateral del cerebro de la rata dónde se marca la zona utilizada. Imagen modificada a partir de Paxinos and Watson (1997).

Para realizar los cortes semifinos, los animales fueron perfundidos de forma similar a lo descripto anteriormente, pero utilizando una solución salina modificada (NaCl al 8%, sacarosa al 0,4%, glucosa al 10%, y 0.25U/ml de heparina), y una solución fijadora compuesta por: glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 4% en buffer cacodilato 0,1M (pH 7,2). Una vez finalizada la perfusión, se realizó una disección bajo lupa del cuerpo estriado y se tomaron muestras de aproximadamente 1 mm^3, tanto del estriado ipsilateral como del contralateral a la inyección intracerebral. Las muestras fueron post-fijadas en la misma solución fijadora toda la noche, luego de lo cual el tejido se conservó en una solución de sacarosa 0,2 M en buffer

cacodilato 0,1M. Las muestras fueron embebidas en Araldita (resina plástica), y los cortes semifinos (aproximadamente 1 μm de espesor) se obtuvieron utilizando un ultramicrótomo Sorvall-Porter-Blum. Las secciones fueron tenidas con Azul de Toluidina y observadas bajo el microscopio óptico (Figura 4.3).

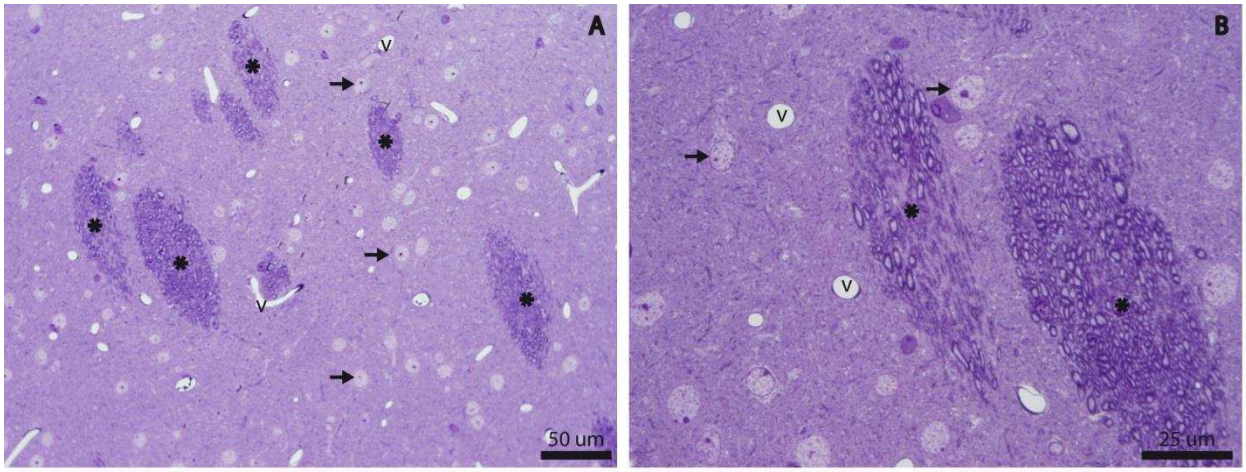


Figura 4.3. Tinción con Azul de Toluidina de cortes semifinos. (A) Se observan los resultados obtenidos realizando una tinción con Azul de Toluidina sobre cortes de aproximadamente 1 μm de espesor del cuerpo estriado. En ésta figura se puede observar la organización del parénquima nervioso estriatal, donde los haces de axones mielínicos (*) se distribuyen entre el neuropilo. También se observan vasos sanguíneos de diámetro normal (V), y somas neuronales (flechas). Barra = 50 μm. (B) En un aumento de la figura anterior también se distinguen los somas neuronales, los haces axonales y los axones individuales cubiertos por mielina. Barra = 25 μm.

4. Técnicas histológicas convencionales

4.1. Violeta de Cresilo

Para analizar el tejido nervioso y caracterizar la respuesta inflamatoria se utilizó la tinción con Violeta de Cresilo. El violeta de cresilo es un colorante basófilo que tiñe núcleos y citoplasma perinuclear de somas neuronales, así como también núcleos de células gliales y del infiltrado inflamatorio (Figura 5.1). Los cortes se ubicaron sobre portaobjetos gelatinizados con

ayuda de pinceles de pelo de marta, en la superficie de una placa p100 con PB 0.1M. Las secciones se dejaron secar durante 24 horas, luego de las cuales se rehidrataron y se tiñeron con el colorante (0.5 gr de Cresyl, 100 ml de Acetato de sodio 0,1 M, pH 3,8). Posteriormente se diferenciaron con alcohol 96º, luego de lo cual se deshidrataron, aclararon y montaron con bálsamo sintético.

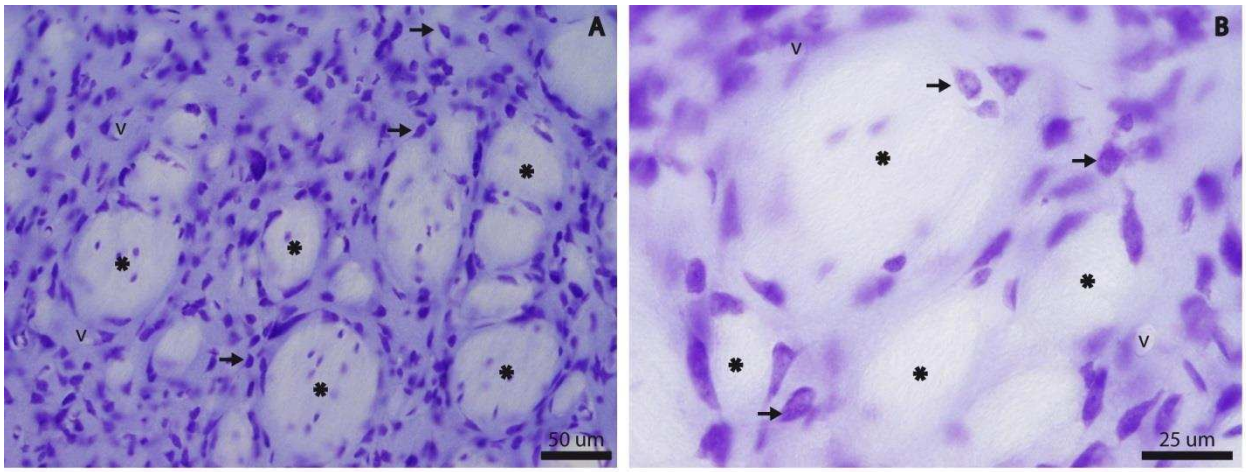


Figura 5.1. Tinción con Violeta de Cresilo. (A) Se observan los resultados obtenidos utilizando la tinción de Nissl sobre cortes de 40 μm del cuerpo estriado, realizados en el criostato. En ésta figura se puede observar la organización del parénquima nervioso estriatal, donde los haces de axones mielínicos (*) se distribuyen entre el neuropilo. También se observan vasos sanguíneos de diámetro normal (V), y cuerpos neuronales (flechas). Barra = 50 μm. (B) En un aumento de la figura anterior se pueden distinguir mejor los somas de las neuronas (flechas) y núcleos de las células gliales presentes en el neuropilo. Barra = 25 μm.

4.2. Red Oil O

Para analizar el grado de desmielinización se utilizó la tinción con Red Oil-O. Este colorante tiene afinidad por los lípidos, y por lo tanto tiñe la mielina (Chari et al., 2006). Como en el caso anterior se montaron los cortes en portaobjetos gelatinizados, dejándolos secar durante aproximadamente 48 horas. A continuación los cortes se hidrataron hasta agua destilada, luego de la cual se procedió con la coloración propiamente dicha. Las secciones se tiñeron con Red Oil O (1 gr Red Oil O, 500 ml isopropanol) durante aproximadamente 15 minutos, cuidando de que no se sequen. Una vez que se observaron las fibras mielínicas

coloreadas, se lavó el portaobjeto con agua destilada, se lo montó con Mowiol y se procedió a sellar los bordes del cubreobjetos con esmalte para uñas (Figura 5.2).

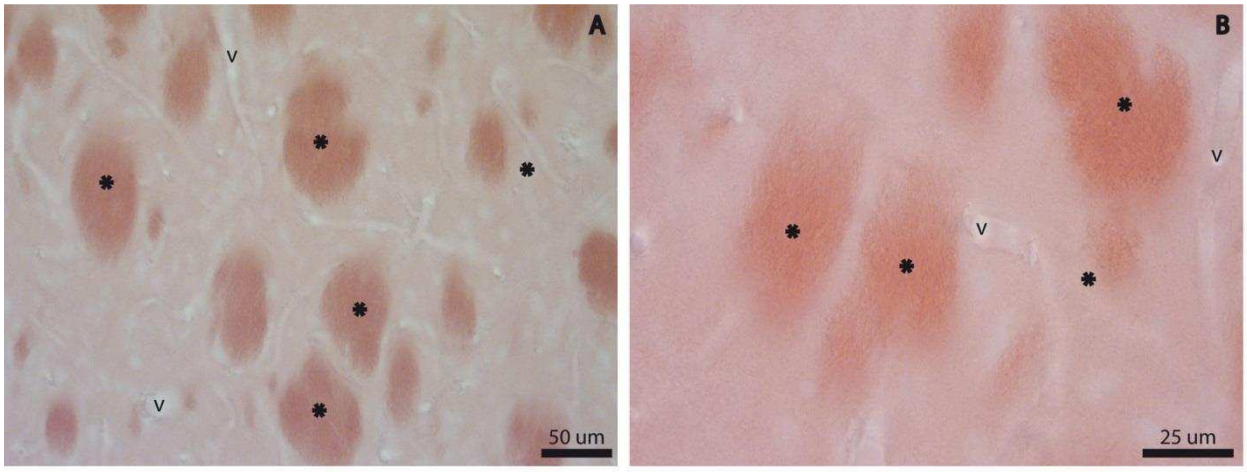


Figura 5.2. Tinción Red Oil-O. (A) En una sección de 40μm representativa del cuerpo estriado teñida con Red Oil O se ponen en manifiesto los haces de axones mielínicos (*) del cuerpo estriado que se tiñen intensamente de colorado y vasos sanguíneos (v). Barra = 50 μm. (B) aumento de la figura A. Barra = 25 μm.

5. Inmunohistoquimicas e Inmunofluorescencias

Las inmunohistoquímicas (IHQ) y las inmunofluorescencias (IF) se realizaron con el método f*ree floating*. En todos los casos se utilizaron los hemisferios contralaterales a la inyección como control negativo de la IHQ o la IF. Para realizar cada IHQ o IF se utilizaron una de cada 6 secciones coronales conteniendo el cuerpo estriado.

Para las IHQ se realizaron dos lavados con PBS- TX 0,1 durante 10 minutos a temperatura ambiente. En caso el caso del anticuerpo APP se requiere una recuperación antigénica, para lo cual se realizaron dos incubaciones con ácido cítrico durante 1 minuto en el microondas. Se dejaron enfriar los cortes, y a continuación se realizó un bloqueo de peroxidasas internas, sumergiendo los cortes en una solución de Metanol: H_2O_2 (60:1) durante 15 minutos. Luego de dos lavados de 10 minutos con PBS- TX 0,1%, se procedió a bloquear las secciones con solución de bloqueo (suero de burro 1%, Tritón al 0,1% en 0,1 mol/L de PB) durante 45 minutos. Una vez terminado el bloqueo, se incubaron los cortes con el anticuerpo primario que reconoce la

proteína precursora amiloide (APP) (1:100, Zymed, San Francisco, CA) durante 48 horas a 4ºC. Una vez finalizada esta incubación se realizaron dos lavados de 10 minutos con PB 0,1M a temperatura ambiente (TA), seguidos de una incubación de 2 horas con el anticuerpo secundario: anti conejo biotinilado en PB 0,1M (1:200, Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA). Una vez terminada esta incubación, y luego de 2 lavados de 10 minutos con PB 0,1M, se procedió a incubar las secciones 2 horas con el Complejo Avidina Biotina (ABC, Vector). Finalmente, se realizaron dos lavados más con PB 0,1M, y se reveló con 3.3´diaminobenzidina (DAB) (Sigma, Saint Louis, Missouri). Los cortes se lavaron con dos pasajes por PB 0,1M. Una vez terminada la inmunohistoquímica, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar, se deshidrataron, se aclararon y se montaron en bálsamo sintético.

Para las IF los cortes fueron enjuagados e incubados en buffer de bloqueo durante 45 minutos, luego enjuagados en Tritón al 0,1% en PB 0,1 M, e incubados durante toda la noche con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti - proteína fibrilar glia ácida (GFAP) para astrocitos (1:700; Dako, Carpinteria, CA), anti - Olig2 (1:1000, Chemicon - Temecula, CA) para linaje oligodendroglial, y anti- complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II) (1:200, Serotec, Oxford, UK) para microglia. Luego las secciones se enjuagaron PB 0,1 M, y se incubaron con indocarbocianina Cy3 (Cy3) conjugada con anticuerpo anti-conejo hecho en burro (1:250; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) durante 2 horas a temperatura ambiente, enjuagados en PB y montados en Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA). Las imágenes digitales fueron tomadas con un microscopio confocal Zeiss LSM 510, equipado con un láser de kripton-argón.

6. Cuantificaciones

6.1. *Volúmenes de inflamación y desmielinización*

Para calcular el volumen de la lesión, se utilizaron una de cada 6 secciones de un seriado de 40 µm de todo el estriado, de acuerdo a Paxinos and Watson (1997).

Las fotografías de las secciones fueron tomadas con una cámara CX900 camera (MicrobrightField Inc., USA) adosada a un microscopio Nikon Eclipse E600 a un aumento de 2x. El volumen de inflamación y desmielinización de cada sección se midió utilizando el programa Image J (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Para ello, se delineo el área de inflamación/desmielinización, ya sea teñida con Violeta de Cresilo o Red Oil-O respectivamente. Todas las mediciones fueron realizadas a doble ciego. El área promedio ($\overline{A}$) de inflamación/desmielinización (IA y DA respectivamente) se calculó para cada animal y el volumen promedio ($\overline{V}$) (IV y DV) se estimó multiplicando cada área promedio por la profundidad de las secciones (0.04mm) y por el número de secciones para todo el estriado, según la siguiente fórmula:

$$\overline{V} = \overline{A} \times 0{,}04 \times \left[\left(nro.\,de\,cortes \times 6\right) - 5\right]$$

6.2. *Número de células MHC-II*

Para la cuantificación del número de células MHC-II positivas se sacaron fotografías del estriado ipsilateral con el objetivo de 20x. Las condiciones de ganancia, poder y offset del láser se mantuvieron constantes para la adquisición de todas la imágenes. Aproximadamente se cuantificaron 12 campos para cada animal usando el programa Zeiss LSM Image Browser. El número total de células positivas se normalizó al total del área medida para cada animal.

7. Análisis de la integridad de la barrera hematoencefálica

Para analizar la integridad de la BHE, los animales fueron previamente inyectados vía endovenosa con 104 U/Kg de peroxidasa de rábano tipo II (HRP, Sigma, St. Louis, MO) treinta minutos antes de la perfusión. Los animales se perfundieron con el fijador Karnosky (paraformaldehído al 1,25%, glutaraldehído al 2,5% en P.B 0,1M, pH 7,2) y los cerebros fueron procesados como se describió previamente para histología. La HRP no es capaz de atravesar la BHE si ésta se encuentra intacta, pero si estará presente en el SNC cuando la integridad de la BHE haya sido comprometida. Para detectar la presencia de la enzima en los cerebros fijados se utilizó el método de Hanker-Yates: se realizaron dos lavados de los cortes en P.B 0,1M, se los colocó durante 10 minutos en la solución de pre-reacción (solución Hanker-Yates y solución de cloruro de cobalto y sulfato de amonio y níquel al 1%C, en una relación 1:3), se realizaron otros dos lavados, y finalmente se los colocó en la solución de Hanker-Yates (p-fenilenediamina al 0,05%, catecol al 0,1% en buffer cacodilato 0,2M; se agrega 1 gota de H_2O_2 30% en el momento de ser utilizada) de 10 a 20 minutos. Una vez que se observó precipitado en los cortes utilizados como control positivo, se realizaron dos lavados con PB 0,1M y se montaron los cortes en portaobjetos gelatinizados. Una vez que los cortes se hubieron secado, se deshidrataron, se aclararon y se montaron en bálsamo sintético.

8. Extracción de ARN, transcripción reversa y PCR en tiempo real

La extracción del tejido para PCR se realizó según descripto en la sección 4.4 de materiales y métodos. Para la extracción de ARN, las muestras fueron procesadas con la ayuda de un homogeneizador (Omni TH Tissue Homogenizer, C Cobb Place Blvd 935, Kennesaw, GA 30144, USA). Según la estructura se utilizaron 1ml (Cuerpo estriado, hipotálamo, y glóbulos blancos) o 1,5 ml (Bazo e Hígado) de Trizol (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Los homogenatos se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se mantuvieron en hielo hasta que se terminaron de procesar la totalidad de las muestras. A continuación se agregaron 200 µl de cloroformo por cada ml de Trizol utilizado, se mezclaron por inversión y se mantuvieron en hielo durante 15 minutos. Luego de 15 minutos de centrifugación a 1200rpm a 4°C, se

removió cuidadosamente la fase acuosa y se mezcló con 500 µl de isopropanol frio. A continuación se precipitaron las muestras durante 45 minutos a -20°C, y se centrifugaron a 1200rpm a 4°C durante 10 minutos. El exceso de sal se eliminó con alcohol al 70% y luego el RNA se resuspendió en 20 µl de agua libre de ARNasas. El ARN se cuantificó con el nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilington, Delaware, USA), y 10 µg de ARN se utilizaron para hacer la transcripción reversa con *primers* Oligo-dT de acuerdo a lo indicado por el fabricante (Superscript II, Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Una muestra sin transcriptasa reversa se utilizó como control de contaminación genómica.

La cuantificación comparativa se realizó por PCR en tiempo real, utilizando el método fluorescente de SYBR-green, y ROX como referencia pasiva. Se utilizó el equipo Stratagene Mx3005P y el programa Stratagene MxPro TM QPCR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Para cada molécula, las muestras se corrieron en paralelo con una curva estándar que fue utilizada para transformar los Cts a valores de ADNc (ADN copia). En todos los casos se utilizaron al menos dos genes *housekeeping* (genes de expresión constitutiva) por muestra para relativizar los valores obtenidos para los genes de interés. A lo largo de la tesis se utilizaron los siguientes genes como *housekeeping*: TBP (del inglés *TATA Box binding protein*), Cyc A (Ciclofilina A), GAPDH (del inglés *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), β-actina, y B2M (beta 2 microglobulina).

En caso de ser posible, los *primers* fueron diseñados para hibridar con dos exones diferentes a fin de evitar amplificación genómica. En los casos dónde esto no resultó posible, las muestras fueron procesadas con DNAasa (Ambion, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.) según las instrucciones del fabricante antes de realizar la retrotranscripción. Las secuencias y el tamaño de los productos de amplificación se especifican en la tabla 2. Las muestras se corrieron por triplicados y la especificidad fue controlada utilizando curvas de disociación.

Los resultados de las PCR en tiempo real se expresan como la cantidad de ADNc del gen de interés sobre la cantidad de ADNc del gen *housekeeping*. Además, estos valores fueron normalizados a la media obtenida para el grupo control en cada caso.

Gen	*Primer*	Secuencia (5´a 3´)	Producto de amplificación
IL-1β	F R	TCC ATG AGC TTT GTA CAA GG GGT GCT GAT GTA CCA GTT GG	237 pb
IL-1RI	F R	TGA ATG TGG CTG AAG AGC AC GCC CGT GAC GTT GCA GA	206 pb
IL-1RII	F R	CAT GGG AGT AGC AGG CTA TT TGG TGG TGT AGC CCC TCA G	297 pb
IL-1ra	F R	GAC CCT GCA AGA TGC AAG CC AGA GGA ACC ATC CTG GAC AG	348 pb
CXCR2	F R	CAG CAG TGT TCT GTT GCT AGC CT CCA AGT GTC TCT TCT GGA TCA GTG T	92 pb
TNF-α	F R	TTG TCT TTG AGA TCC ATG CC TCT CAT CAG TTC TAT GGC CC	168 pb
IL-6	F R	AAG ACA AAG CCA GAG TCA TTC AG GCT TTC AAG ATG AGT TGG ATG GT	181 pb
TBP	F R	ACC GTG AAT CTT GGC TGT AA CCG TGG CTC TCT TAT TCT CA	114 pb
Cyc A	F R	GAA GAG TGC GAT CAA GAA CCC ATG AC GTC TCT CCT CCT TCT CCT CCT ATC TTT ACT T	70 pb
GAPDH	F R	ACA ACT CCC TCA AGA TTG TCA GCA TTC TGA GTG GCA GTG ATG GCA T	136 pb
B2M	F R	TCT TTC TGG TGC TTG TCT C AGT GTG AGC CAG GAT GTA G	242 pb
HPRT	F R	AAA AGG ACC TCT CGA AGT GTT GGA TCC CTG AAG TGC TCA TTA TAG TCA	107 pb
β-Actina	F R	TCT GTG TGG ATT GGT GGC TCT A CTG CTT GCT GAT CCA CAT CTG	69 pb

Tabla 9.1. Secuencias de primers y tamaño esperado del producto de amplificación de DNA. Interleuquina-1β (IL-1β), Receptor I de Interleuquina-1 (IL-1RI), Receptor II de Interleukin-1 (IL-1RII), Receptor antagonista de Interleuquina-1 (IL-1ra), receptor 2 de quemoquinas de motivo CXC (CXCR2), factor de necrosis tumoral α (TNFα), interleuquina 6 (IL-6), Proteína de unión a secuencia TATA box (TBP), Ciclofilina A (Cyc A), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), beta 2 microglobulina (B2M), Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT), β-Actina.

9. Cuantificación de la proteína IL-1β

Para la extracción de proteínas, los animales fueron decapitados y los estriados fueron removidos rápidamente, congelados en nitrógeno líquido y mantenidos a -80°C hasta su

posterior utilización. El tejido se homogeneizó en 400 μl de buffer Tris-HCl (pH 7.3) con inhibidores de proteasas (aproteinina μg/ml, peptastina μg/ml, leupeptina μg/ml, PMSF mmol/L, Sigma). Las muestras siempre se mantuvieron en hielo. Los homogenatos fueron centrifugados a 10,000 g a 4°C por 10 min, y el sobrenadante se ultracentrifugó a 40,000 rpm por 2 horas. Los sobrenadantes de la ultracentrifugación se alicuotaron, y se realizaron ensayos de Bradford para determinar la concentración total de proteínas. La cuantificación de IL-1β de rata se realizó con un kit de ELISA específico para IL-1β de rata (R&D, Minneapolis, MN), y fue utilizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

10. Análisis estadísticos

Los resultados se expresaron como la media ± SEM (erros estándar de la media) en los diferentes grupos. Todos los experimentos con más de dos grupos se analizaron por un análisis de varianza (ANOVA) de uno o dos factores seguidos por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni o por el test de comparaciones múltiples de Dunnet como post test (para ANOVA de un factor). Para comparar dos grupos se utilizó el test t de Student no pareado. Las variables se testearon para normalidad utilizando el test de Kolmogorov–Smirnov y la homogeneidad de la varianza con el test de Bartlett, realizándose las transformaciones requeridas en caso de ser necesarias. Cuando no se puedo obtener normalidad y homocedasticidad mediante ninguna de las transformaciones utilizadas, se realizó un ANOVA de dos factores no paramétrico a partir de los datos ranqueados, y utilizando pivotes Chi cuadrado (Scheirer et al., 1976). En todos los casos las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si la probabilidad de error de tipo I fuera menor o igual que 5% ($p \leq 0.05$). Para mayor claridad cada test se halla especificado en cada figura. Los test estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA), o el Statistix8 (Analytical Software: Statistix 8. Tallahassee. 2003).

Resultados

_____Resultados – Capítulo I

Estudio del efecto de un segundo estímulo pro-inflamatorio desmielinizante central sobre una lesión desmielinizante pre-existente

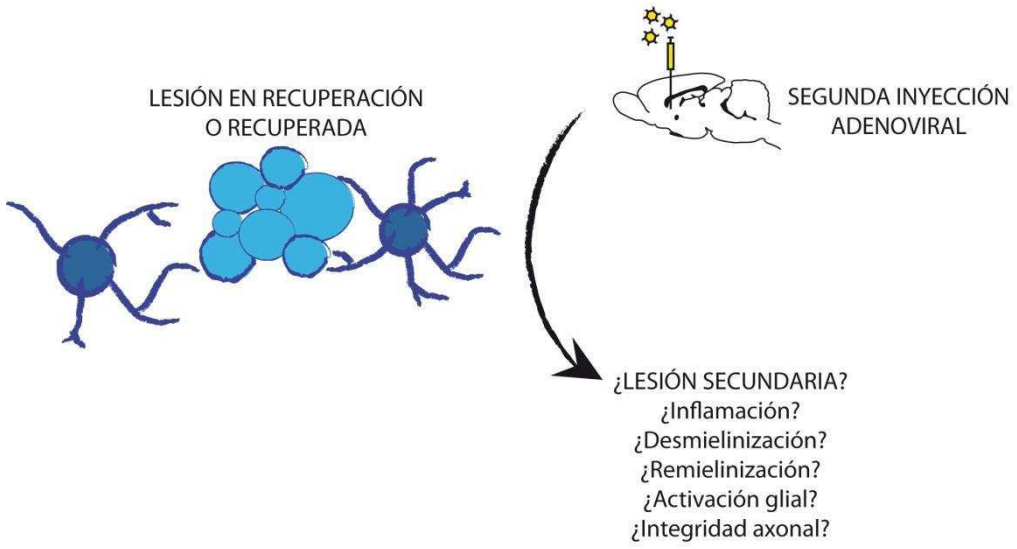
RESULTADOS

I. RESULTADOS – CAPÍTULO I

Hipótesis y Objetivos

La **hipótesis** supone que un segundo evento pro-inflamatorio en el cuerpo estriado podría exacerbar los síntomas en la lesión o incluso retrasar la recuperación de la misma.

El **objetivo específico** de este capítulo es evaluar y caracterizar los efectos de un estímulo pro-inflamatorio crónico secundario sobre una lesión preexistente basada en la expresión a largo plazo de la citoquina pro-inflamatoria interleuquina 1β.



Esquema de los objetivos generales del capítulo I. Se realizarán dos inyecciones consecutivas en el cuerpo estriado de machos *Wistar* adultos, y se evaluarán los efectos de la segunda inyección intracerebral sobre la inflamación, desmielinización, remielinización, activación glial e integridad axonal.

I.1 Descripción del modelo de trabajo: la expresión a largo plazo de IL-1β induce reclutamiento de neutrófilos y desmielinización reversible

En el laboratorio se han estudiado los efectos tanto de la expresión aguda (Depino et al., 2005) como crónica (Ferrari et al., 2004) de la citoquina pro-inflamatoria IL-1β sobre el cuerpo estriado (CE). Con el objetivo de poder comparar el efecto de una segunda inducción de la expresión crónica de IL-1β con la respuesta obtenida luego de un único estímulo pro-inflamatorio, se repitieron los experimentos dónde las ratas fueron inyectadas una sola vez con el AdIL-1β (1 x 10^6 partículas infectivas en 1 μl), y perfundidas 21, 30 o 50 días más tarde (grupos de **inyección-única**), según se muestra en el esquema de la figura I.1.1.

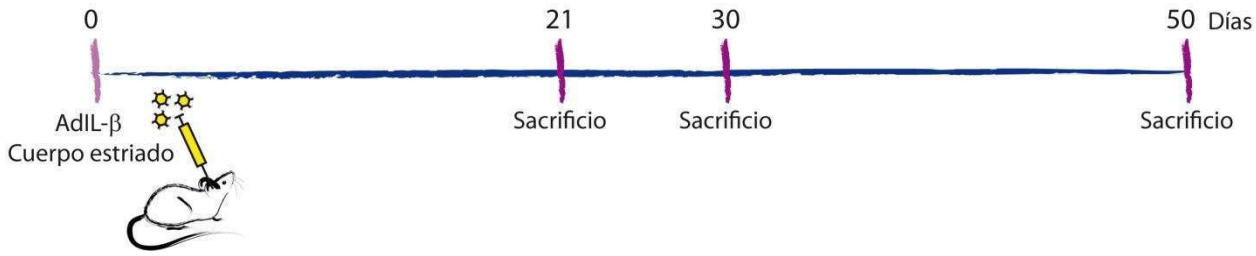


Figura I.1.1. Protocolo de grupos de inyección única. Ratas *Wistar* macho de entre 8-10 semanas fueron inyectadas en el cuerpo estriado con el adenovector que expresa la citoquina IL-1β el día 0. Los animales fueron perfundidos al día 21 (inyección única 21 días), 30 (inyección única 30 días) o 50 (inyección única 50 días) y sus cerebros procesados para análisis posteriores.

En la caracterización realizada inyectando el AdIL-1β en el cuerpo estriado se pudieron reproducir los resultados observados previamente en el laboratorio (Ferrari et al., 2004): se pudo observar que el modelo presenta un pico inflamatorio alrededor del día 21 **(estadio 1)** (Figura I.1.2 A y Figura I.1.3 A), y que el volumen de desmielinización (VD) también se encuentra en su punto máximo en el día 21 (Figura I.1.2 B). Luego de este pico inflamatorio y de desmielinización, la lesión comienza su proceso de recuperación y en el día 30 **(estadio 2)** se observa que tanto la inflamación como las desmielinización han disminuido considerablemente (Figura I.1.2 A-B, Figura I.1.3 B).

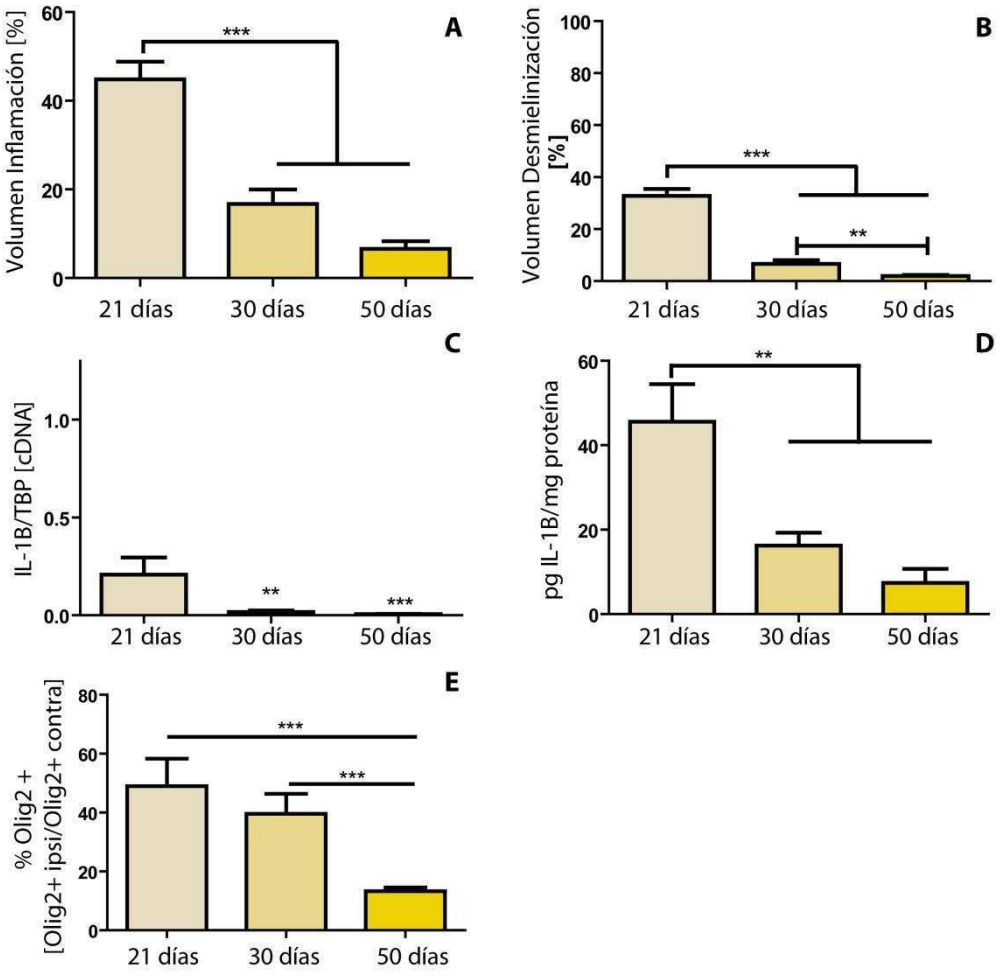


Figura I.1.2. Caracterización de grupos de inyección única: 21, 30 o 50 días post inyección (dpi). (A) Volumen de inflamación (VI) en el estriado ipsilateral a la inyección intracerebral con el AdIL-1β. Se observa el pico inflamatorio a los 21 días dpi (ANOVA de un factor con post-test de comparaciones múltiple de Bonferroni). **(B)** Volumen de desmielinización (VD) en los grupos de inyección única. Se observa que el estadio 1 presenta mayor VD que el estadio 2 y 3 (ANOVA de un factor con post-test de comparaciones múltiple de Bonferroni). **(C)** Expresión relativa del RNAm de IL-1β en los estriados ipsilaterales medidas por PCR en tiempo real (ANOVA de un factor de una transformación Ln de los valores). **(D)** Cuantificación de la proteína IL-1β de rata en los estriados de los grupos de inyección única (ANOVA de un factor de una transformación Ln de los datos). **(E)** Porcentaje de precursores de oligodendrocitos (OPCs) en los estriados ipsilaterales/contralaterales de los grupos de inyección única. (ANOVA de un factor de una transformación Ln de los datos). ** $p<0.01$; *** $p<0.001$. N = 6-10/grupo para histología; N = 5-6/por grupos para PCR en tiempo real y ELISA.

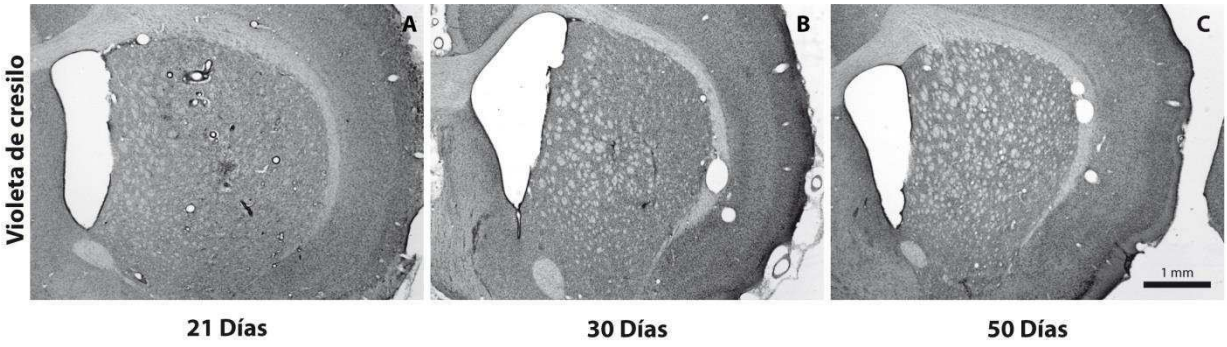


Figura I.1.3. Violeta de cresilo representativos de los grupos de inyección única. (A) En el grupo de inyección única 21 días se observa un importante infiltrado inflamatorio, edema, y vasodilatación. **(B)** La fotografía representativa del grupo de inyección única 30 días demuestra que hay una pequeña lesión inflamatoria. **(C)** Los animales del grupo de inyección única 50 días no presentaron infiltrado inflamatorio. Barra = 1 mm.

Observando los cortes teñidos con violeta de cresilo se pueden distinguir algunos de los tipos celulares presentes en el infiltrado inflamatorio. Cabe destacar que el perfil celular del infiltrado también varía a medida que la lesión se restaura: Durante el estadio 1 se observan mayormente neutrófilos polimorfonucleares (PMN), células que se distinguen por poseer un núcleo conspicuo y multilobulado, y un citoplasma escaso. Sin embargo, estas no fueron las únicas células encontradas, también se reconocieron algunos macrófagos/microglia tipo 4, con su citoplasma espumoso y núcleo redondeado y claro. Cómo se explicó en la introducción, la microglia es la célula residente encargada de la respuesta inmunológica en el SNC. Cuando se activa su morfología varia, y en su estado de activación más alto (tipo 4), no es distinguible de un macrófago, es por eso que la denominamos macrófago/microglia tipo 4. El estadio 2 presenta una mayor proporción de macrófagos/microglia tipo 4, y sólo se visualizan escasos neutrófilos PMN (caracterización realizada en los cortes tenidos con Violeta de Cresilo, y confirmada posteriormente con una inmunofluorescencia anti-neutrófilos; (Ferrari et al., 2004)).

Luego de 51 días de la inyección con el AdIL-1β **(estadio 3)** la lesión ya se encuentra completamente recuperada: no se observa inflamación (Figura I.1.2 A, Figura I.1.3 C), desmielinización (Figura I.1.2 B), ni presencia de células positivas para el marcador de macrófagos/microglia 4 MHCII (complejo mayor de histocompatibilidad II) (Figura I.1.4 B). Sólo se observa una pequeña cicatriz en el parénquima nervioso.

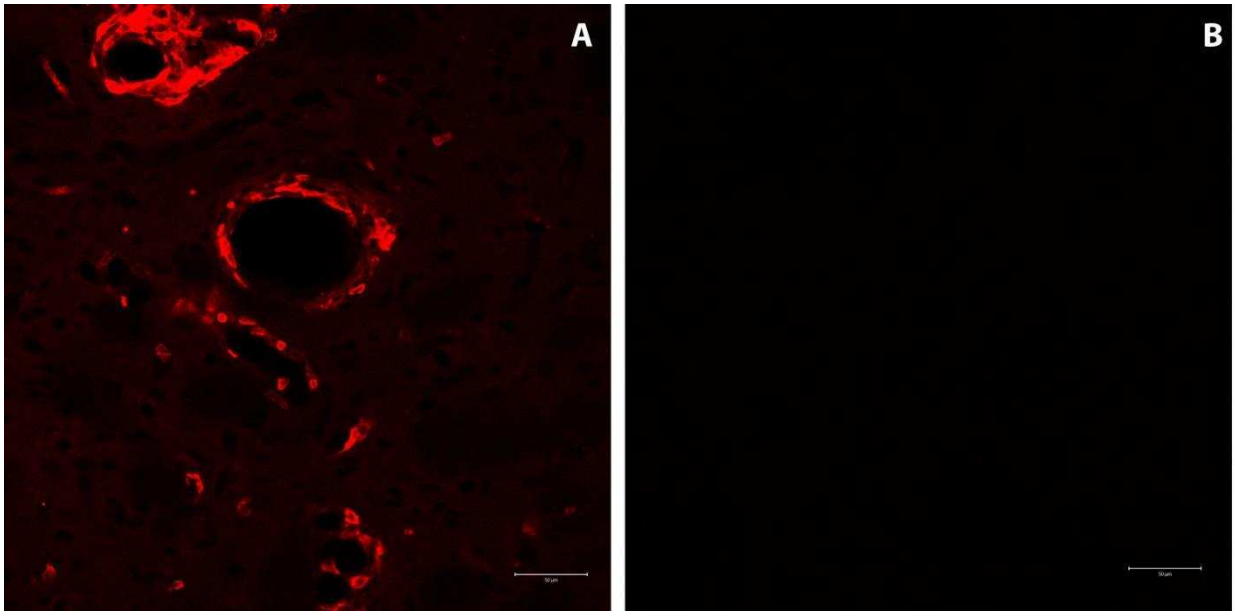


Figura I.1.4. Expresión del marcador MHC II en los grupos de inyección única: 30 o 50 días post inyección (dpi). **(A)** Luego de 30 días de la inyección con el AdIL-1β en el CE se observan células MHC II positivas, mayormente cerca de los vasos sanguíneos, pero también en el parénquima nervioso. **(B)** A los 50 días de la inyección intracraneal, no se observan células MHC II positivas en el CE ipsilateral. Barra = 50 μm.

Para evaluar el rol de los precursores de oligodendrocitos (OPCs) se utilizó el marcador Olig2. Observamos que había un aumento de células Olig2+ como resultado de la inyección con el AdIL-1β que se evidenciaba tanto el grupo de inyección única 21 días como 30 días (Figura I.1.2 E). Los animales del grupo 21 días presentaron aproximadamente un 50% de células positivas (% ipsilateral/contralateral), mientras que en el grupo de inyección única 30 días este porcentaje fue de alrededor del 40%. Ambos grupos presentaron una diferencia significativa con el grupo de inyección única 50 días, cuyo porcentaje fue del 10%.

Para terminar de caracterizar el modelo, se midieron los niveles de expresión del RNA mensajero (RNAm) de IL-1β (transcripción reversa del RNA total y posterior PCR en tiempo real [qRT-PCR]) y de la proteína (ELISA) en el cuerpo estriado ipsilateral a la inyección adenoviral. La dinámica observada a nivel histológico para la inflamación y la desmielinización coincide con el perfil de expresión de la citoquina: tanto de su mensajero (Figura I.1.2 C), como el de la proteína (Figura I.1.2 D).

Los animales no mostraron signos de enfermedad ni cambios comportamentales (pelo con aspecto normal, actividad y locomoción normal, no se observaron variaciones en el consumo de comida) en ninguno de los tiempos estudiados. No se observó respuesta inflamatoria en los animales inyectados con el adenovector control (1 x 10^6 partículas

infectivas/μl) y perfundidos 21 días más tardes, ni en los CE contralaterales de las ratas inyectadas con el AdIL-1β (Figura I.1.5).

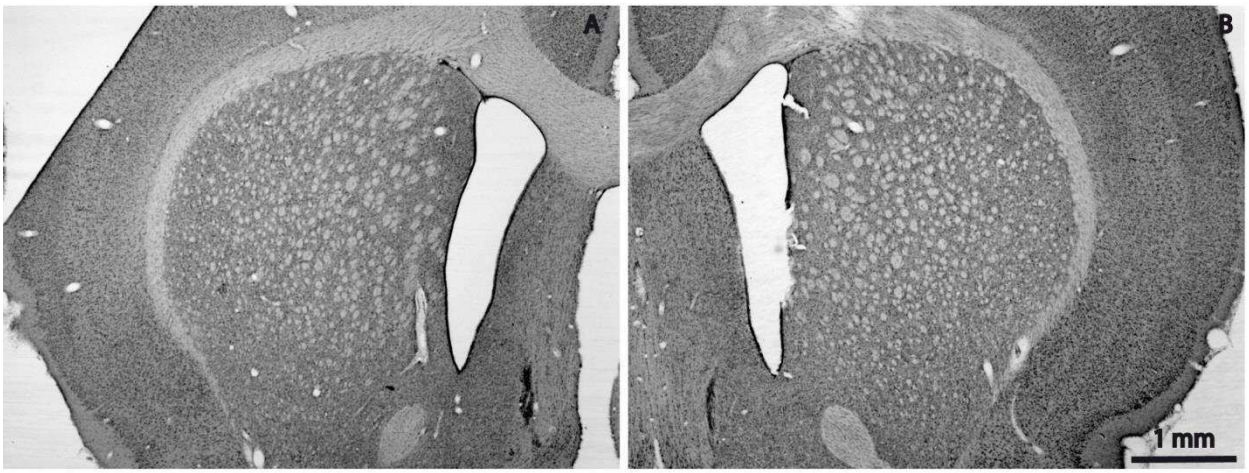


Figura I.1.5. Controles de los grupos de inyección única 21 dpi. (A) Luego de 21 días de la inyección con el AdIL-1β en el CE no se observó ningún tipo de infiltrado inflamatorio en el estriado contralateral. **(B)** Los animales inyectados con el Adβ-gal y perfundidos 21 días más tarde no presentaron evidencias de una respuesta inflamatoria. Barra = 1 mm.

Segundo evento inflamatorio: re-inyección del AdIL-1β en el SNC

I.2 La inducción de un segundo evento pro-inflamatorio durante el estadio 2 (día 30) produjo una lesión más leve

Con el fin de evaluar el efecto de un segundo estímulo pro-inflamatorio se utilizó el **diseño experimental 1**, según el cual se re-inyectó el AdIL-1β en el CE 30 días después de la primera inyección. Los animales fueron sacrificados 20 días más tarde (Figura I.2.1).

Figura I.2.1. Protocolo de inyección para el diseño experimental 1. Ratas *Wistar* macho de entre 8-10 semanas fueron re-inyectadas el día 30 en el cuerpo CE ipsilateral a la primera lesión con el adenovector que expresa la citoquina IL-1β, o el adenovector control. Los animales fueron perfundidos 20 dpi, y sus cerebros procesados para análisis posteriores.

Como se describió en la sección anterior, en el presente diseño experimental el segundo estímulo pro-inflamatorio fue administrado centralmente durante el periodo de recuperación de la primera lesión.

I.2.A Respuesta inflamatoria

En primer lugar se analizó el grado alcanzado por la respuesta inflamatoria 21 días después de la segunda inyección con el AdIL-1β. Como se observa en la figura I.2.2 A, el grupo AdIL-1β/AdIL-1β presentó un volumen inflamatorio (VI) mucho menor (VI = 11,51 ± 2,08) que el observado para los animales que recibieron el AdIL-1β solamente en la segunda inyección (VI = 47,67 ± 3,64) ($p \leq 0.001$ para Adβ-gal/AdIL-1β vs. AdIL-1β/AdIL-1β).

El VI del grupo Adβ-gal/AdIL-1β es similar al observado para el grupo de inyección única 21 días (VI = 44,81 ± 4,01; Figura I.1.2 A), siendo el VI del grupo Adβ-gal/AdIL-1β levemente mayor. Esta diferencia podría deberse al efecto de la cirugía previa, o a una respuesta residual hacia el Adβ-gal de la primera inyección, que podría permanecer mayor tiempo en el parénquima nervioso. No se observa respuesta inflamatoria cuando el segundo estímulo es el adenovector control.

Con el objetivo de estudiar la repuesta del tejido nervioso en mayor detalle, se realizó un análisis cualitativo del infiltrado inflamatorio, y de la morfología del CE. Para ello se utilizaron los cortes teñidos con violeta de cresilo, y se prestó especial atención a la morfología general del parénquima nervioso, la presencia o ausencia de edema inflamatorio, el grado de vasodilatación, los tipos celulares presentes en el infiltrado, y la localización de las células inflamatorias (**leucocitos marginados**, en lado luminal del endotelio; **leucocitos perivasculares**, en la cara abluminal del endotelio; y **leucocitos reclutados**, en el parénquima). Se muestran fotografías representativas de los grupos de mayor relevancia: grupo de inyección

única 21 días (Figura I.2.3 A-B), grupo Adβ-gal/AdIL-1β (Figura I.2.3 C-D), y grupo AdIL-1β/AdIL-1β (Figura I.2.3 E-F).

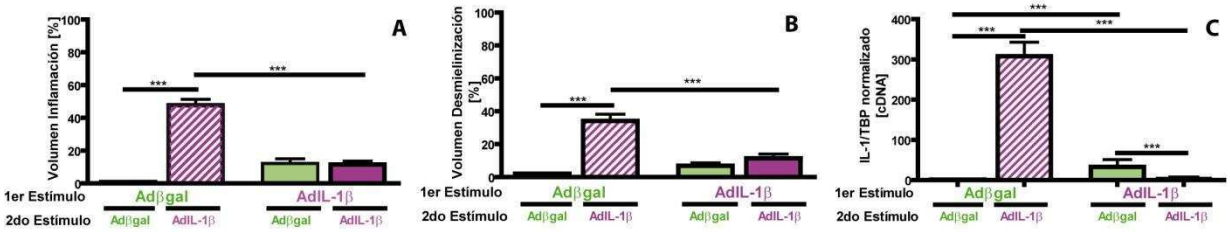


Figura I.2.2. Inflamación, desmielinización y expresión de IL-1β en el diseño experimental 1. (A) Cuando se re-inyectó el AdIL-1β en el CE 30 días después de la primera inyección se observó que el VI era menor comparado con el observado para el grupo Adβ-gal/AdIL-1β (ANOVA de dos factores; Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*). **(B)** Análisis de la desmielinización con la técnica de Red Oil O. En este caso también se observa que el grupo AdIL-1β/AdIL-1β presenta una desmielinización menor cuando se lo compara con el grupo que sólo recibió el AdIL-1β en el primer estímulo (ANOVA de dos factores de los datos transformados con la raíz cuadrada de las proporciones; Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*). **(C)** La expresión de IL-1B medida por qRT-PCR demostró que existe menor cantidad del mensajero de esta citoquina en el grupo que recibió el estímulo pro-inflamatorio en ambas oportunidades. (ANOVA de dos factores; Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*). ***p < 0,001. N = 6–8/grupo para histología; N = 6/grupo para real-time PCR.

En el grupo de animales que fueron inyectados primero con el AdβGal y luego con el AdIL-1β (Figura I.2.3 C) se observa que el infiltrado inflamatorio ocupa todo el cuerpo estriado, incluso más que el volumen inflamatorio observado para el grupo de inyección única 21 días (Figura I.2.3 A). Además, en ambos grupos se observa una gran desorganización del parénquima nervioso, siendo difícil distinguir la típica morfología del CE, el cual se caracteriza por la presencia de haces de axones mielínicos que se intercalan con el neuropilo, los somas de neuronas y con las células gliales. En algunas zonas se puede observar la presencia de edema inflamatorio, que se observa como una acumulación anormal de líquido intersticial y células del infiltrado inflamatorio, lo cual implica una respuesta inflamatoria más intensa y concentrada. En los cortes se evidencia como una porción del tejido dónde existe una desorganización total del parénquima, que es remplazada por una invasión de células de la inflamación. La zona edematizada también presenta cuerpos apoptóticos. En algunos casos se puede observar que el infiltrado invade el cuerpo calloso y la corteza, particularmente en el grupo Adβ-gal/AdIL-1β.

Aunque los animales de los tres grupos presentan una considerable vasodilatación, los vasos de los animales Adβ-gal/AdIL-1β se encuentran muy dilatados a lo largo de todo el CE, e incluso se observa un efecto similar en el cuerpo calloso y la corteza adyacentes a la zona de estudio (Figura I.2.3 A, C, y E).

En cuanto a la composición del infiltrado inflamatorio, los animales inyectados en ambas oportunidades con el AdIL-1β presentan en su mayoría células del tipo **macrófagos/microglia tipo 4** (Figura I.2.3 F). Estas células se reconocen en los cortes teñidos con violeta de cresilo por presentar un **núcleo redondeado y claro, con el citoplasma vacuolado** (flechas blancas). Estas células se observan mayormente como leucocitos marginados y perivasculares. Ocasionalmente también se puede observar la presencia de células del tipo inflamatorio en el parénquima nervioso. En contraposición, tanto las ratas del grupo de inyección única 21 días como las del grupo Adβ-gal/AdIL-1β se caracterizan por un infiltrado inflamatorio compuesto mayormente por **neutrófilos polimorfonucleares (PMN)** (Figura I.2.3 B y D, respectivamente). Estos leucocitos son fácilmente reconocibles por su **núcleo conspicuo y multilobulado, y su citoplasma escaso y basófilo** (puntas de flecha negras). Estas células inflamatorias se observan tanto en el lumen de los vasos como dispuestos en capas concéntricas alrededor de los mismos. También se puede observar una gran cantidad de células inflamatorias en el parénquima nervioso y en el edema.

En todos los caso, el hemisferio contralateral a las inyecciones mantiene su morfología normal, sin evidenciar signos de inflamación o desorganización del parénquima. No se observan signos de inflamación en las meninges.

Con el objetivo de descartar un efecto de la cirugía *per se*, se realizó un último grupo control en el cual se inyectó el buffer de dilución del adenovector al día 0, y 30 días después se realizó la inyección con el AdIL-1β (Figura I.2.4). En este grupo de animales se pudo observar que el efecto del estímulo pro-inflamatorio en la segunda inyección es muy similar a lo observado para el grupo de inyección única 21 días, en cuanto al área que abarca el infiltrado en el CE, así como también el grado de vasodilatación, y la presencia de edema (Figura I.2.4 A). A mayor aumento se observa que en este caso el componente principal del infiltrado inflamatorio son los neutrófilos PMN (Figura I.2.4 B).

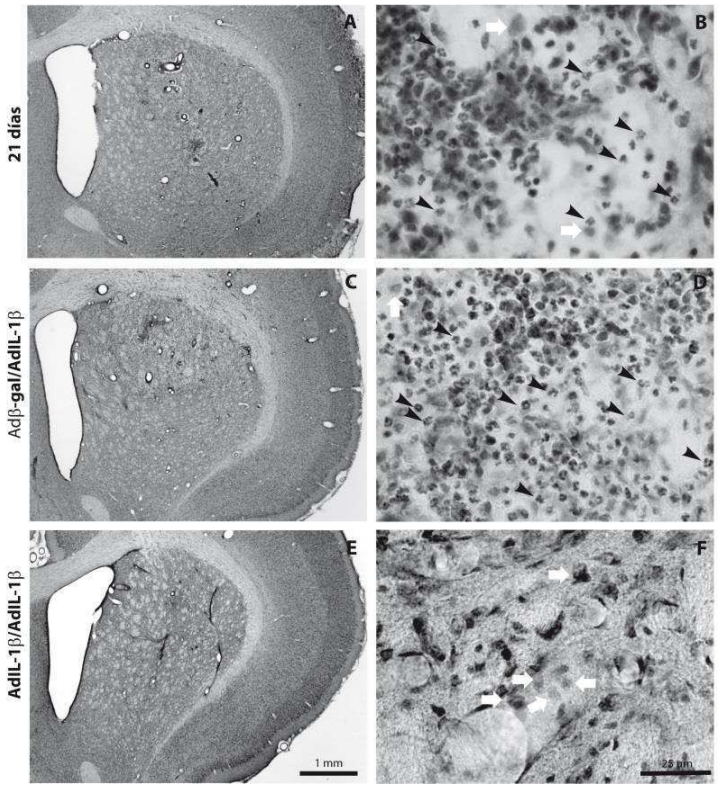


Figura I.2.3. Fotografías representativas de cortes teñidos con violeta de cresilo. (A) A bajo aumento se observa que los animales del grupo inyección única 21 días presentan un importante infiltrado inflamatorio, con desorganización del parénquima nervioso, zonas con edema, y vasodilatación. **(B)** A mayor aumento se evidencia que el componente celular principal del infiltrado son los neutrófilos PMN (puntas de flecha negras). **(C)** El grupo Ad-βgal/AdIL-1β presenta mayor evidencia con respecto a la desorganización del tejido, las zonas de edematización y la vasodilatación que el grupo anterior. **(D)** Nuevamente se observa una mayoría de neutrófilos PMN en el infiltrado inflamatorio. **(E)** El grupo AdIL-1β/AdIL-1β sólo presenta signos leves de infiltrado, desorganización del parénquima, y vasodilatación. **(F)** En este caso, a mayor aumento se evidencia una mayor proporción de macrófagos/microglia 4 (flechas blancas) en el infiltrado inflamatorio. Barra (A, C, y E) = 1 mm. Barra (B, D, y F) = 25 µm.

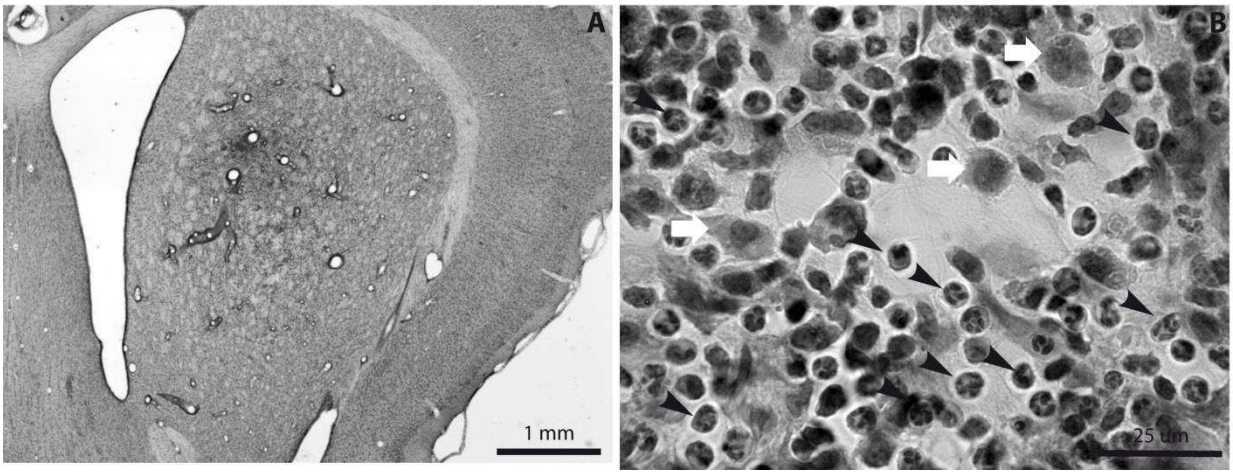


Figura I.2.4. Fotografías representativas de cortes teñidos con violeta de cresilo del grupo control buffer/AdIL-1β. (A) A bajo aumento se observa que el infiltrado inflamatorio abarca un área similar al observado en el grupo de inyección única 21 días. Barra = 1 mm. **(B)** En un detalle a mayor aumento del mismo corte se puede evidenciar que la principal célula inflamatoria que invade el tejido nervioso en este grupo es el neutrófilo PMN (punta de flecha negra); aunque también se observan algunos macrófagos/microglia 4 (flecha blanca). Barra = 25 µm.

La siguiente tabla sintetiza la caracterización realizada para la respuesta inflamatoria observada luego de un segundo estímulo crónico pro-inflamatorio, cuando este es aplicado con la lesión primaria aun activa (Diseño experimental 1).

	Inflamación	Edema	Tipos celulares	Vasodilatación
Inyección única 21 días	++	Si	+++ PMN + Macrófagos	++
Adβ-gal/AdIL-1β	+++	Si	+++ PMN + Macrófagos	+++
AdIL-1β/AdIL-1β	+	No	+ PMN ++ Macrófagos	+

I.2.B Desmielinización y remielinización

Para realizar un análisis del efecto del segundo estímulo pro-inflamatorio sobre la desmielinización se utilizaron los cortes seriados realizados para cada animal, y teñidos con Red Oil-O. La figura I.2.5 muestra fotografías representativas de los grupos más relevantes, en las cuales se observa que el grado de desmielinización es mayor en los grupos de inyección única 21 días y Adβ-gal/AdIL-1β, que en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β.

Al cuantificar el volumen de desmielinización (VD) se observó un escenario similar a lo descripto para la inflamación: Los animales del grupo Adβ-gal/AdIL-1β presentaron un VD mayor (VD = 34,09 ± 4,11) que el obtenido para el grupo AdIL-1β/AdIL-1β (VD =11,34 ± 2,68) ($p \leq 0.001$ para Adβ-gal/AdIL-1β vs. AdIL-1β/AdIL-1β) (Figura I.2.2 B). También en este caso se obtuvo un VD similar para el grupo Adβ-gal/AdIL-1β y el grupo de inyección única 21 días (VD = 32,79 ± 2,67; Figura I.1.2 B).

No se observan alteraciones de la mielina en los estriados derechos de ninguno de los grupos analizados.

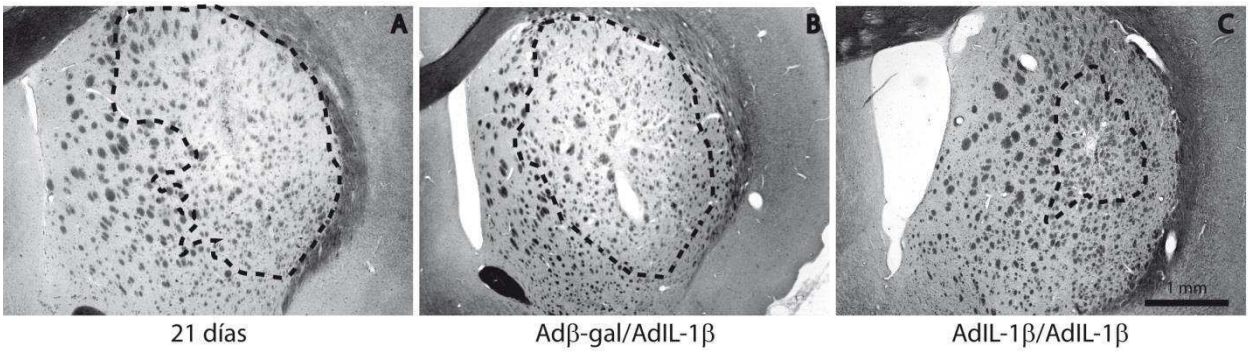


Figura I.2.5. Fotografías representativas de cortes teñidos con Red Oil O de los grupos más relevantes. (A) Los animales del grupo inyección única 21 días presentaron un área extensa de desmielinización, que se observa en la fotografía como la zona marcada con una línea punteada. **(B)** El grupo Adβ-gal/AdIL-1β también presenta una extensa área de desmielinización. **(C)** En el caso de las ratas que recibieron en ambas oportunidades el AdIL-1β se observó que la desmielinización fue menor. Barra = 1 mm

Teniendo en cuenta las diferencias observadas para la desmielinización entre los grupos Adβ-gal/AdIL-1β y AdIL-1β/AdIL-1β, nos propusimos evaluar si existía una diferencia en cuanto al proceso de remielinización. Para ello modificamos levemente el diseño experimental, y sacrificamos a los animales 50 días después de la segunda inyección, procesando el tejido para cortes semifinos. Se eligió observar el estado de mielinización de los axones 50 días después de la segunda inyección porque, como se describió en la sección I.1, la lesión debería encontrarse completamente recuperada 50 luego del estímulo pro-inflamatorio.

No se observaron diferencias entre los cortes semifinos de los animales del grupo Adβ-gal/AdIL-1β y los del grupo AdIL-1β/AdIL-1β. La zona de la lesión en ambos casos presentaba mayormente axones mielinizados, aunque también se observaron algunos paquetes axónicos en procesos de remielinización (Figura I.2.6).

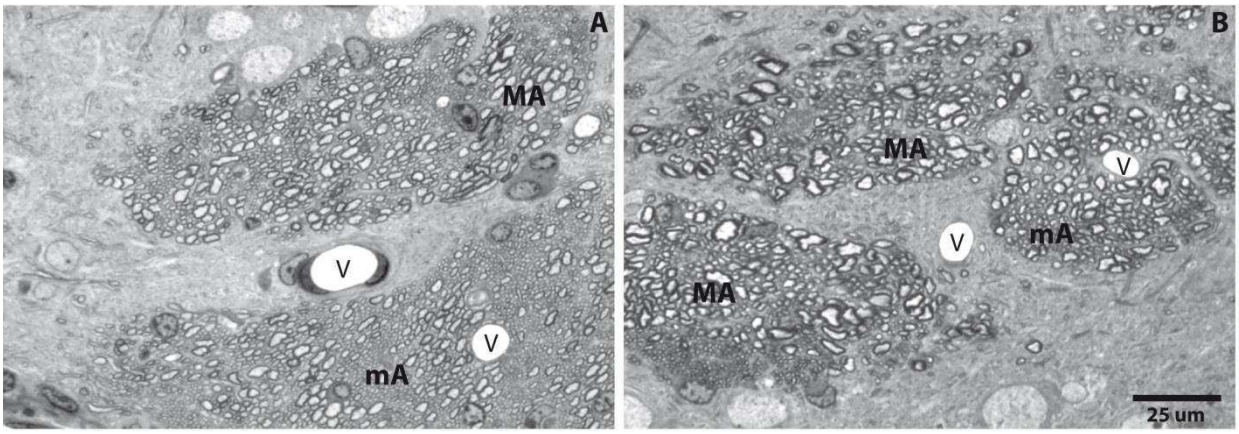


Figura I.2.6. Fotografías representativas de cortes semifinos teñidos con Azul de toluidina. (A) En las secciones semifinas del grupo Adβ-gal/AdIL-1β se observaron mayormente axones mielinizados (MA), y también algunos grupos de axones en procesos de remielinización (mA). **(B)** Los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β no presentaban diferencia en cuanto a la remielinización. V = vasos sanguíneos. Barra = 25 μm.

I.2.C Expresión del mensajero de IL-1β

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la inflamación y desmielinización, quisimos examinar la expresión de la citoquina IL-1β. Para ello se utilizó la técnica de qRT-PCR en tiempo real. En concordancia con lo observado para la inflamación, la expresión del mensajero (ARNm) de IL-1β se encontró elevado en animales AdβGal/AdIL-1β, pero casi no puedo ser detectado en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β ($p < 0.001$ para βgal/IL-1β vs. IL-1β/IL-1β) (Figura I.2.2 C). Este resultado podría explicar la poca inflamación y desmielinización observada en el grupo AdIL-1β, aunque se necesitaría un análisis más profundo para comprender porque la segunda inyección del AdIL-1β parecería inducir una menor expresión génica de la citoquina en cuestión, al menos con el presente diseño experimental.

I.2.D Daño axonal como respuesta al segundo estímulo inflamatorio

Como se mencionó en la introducción, la perdida axonal es una de las características principales de la esclerosis múltiple, he incluso ha sido asociada a la progresión de la enfermedad, a la falta de remielinización, y a la pérdida de función. Para evaluar la integridad

axonal en nuestro modelo de inflamaciones centrales repetidas, utilizamos como marcador un anticuerpo contra el precursor de la proteína β amiloide (APP).

Como se observa en la figura I.2.7, tanto los animales del grupo Adβ-gal/AdIL-1β (Figura I.2.7 A) como los del grupo AdIL-1β/AdIL-1β (Figura I.2.7 B) presentaron axones positivos para el marcador de daño axonal APP. En ambos casos se pudieron reconocer varios de los aspectos morfológicos descriptos para axones en degeneración: desde pequeños engrosamientos (puntas de flecha blancas) a grandes estructuras del tipo esferoidales de las terminaciones axónicas (puntas de flecha negras). Es común la observación de fibras con varicosidades (cuentas de rosario) (flechas negras) (detalle Figura I.2.7 A y B). Sin embargo, el grado de daño axonal no fue igual para ambos grupos, ya que los animales del grupo Adβ-gal/AdIL-1β presentaron un mayor número de axones en degeneración (Figura I.2.7 C) ($p < 0.01$). Es decir que la cantidad de axones degenerados también se vio relacionado con los patrones de inflamación y desmielinización, siendo los animales que recibieron doble estímulo inflamatorio los que presentaron menor daño axonal.

No se observaron axones positivos para el marcador APP en ninguno de los CE contralaterales a la inyección, confirmando que la marca observada en los CE ipsilaterales resultaba específica para la degeneración axonal.

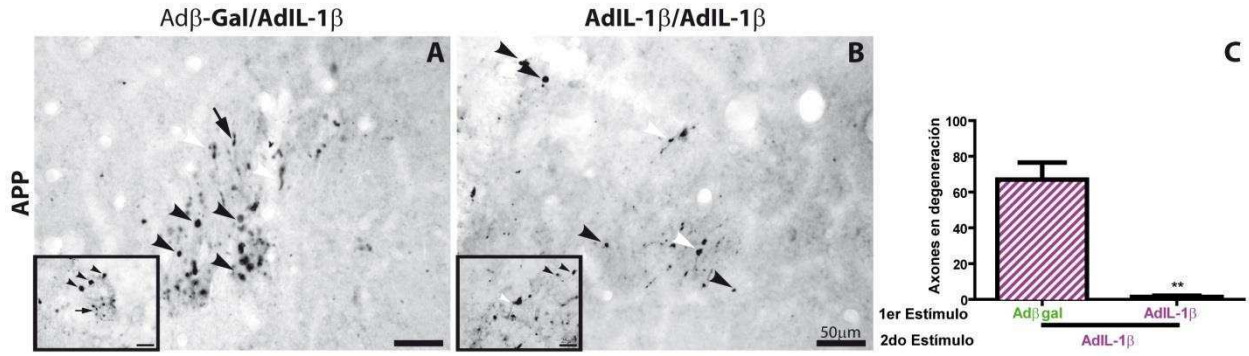


Figura I.2.7. Análisis de la integridad axonal con el marcador APP. Los axones APP + demuestran la presencia de axones en degeneración, tanto en los animales Adβ-gal/AdIL-1β **(A)**, como en las secciones del grupo AdIL-1β/AdIL-1β **(B)**. En los detalles de las fotografías se pueden identificar las diferentes morfologías de los axones en degeneración: pequeños engrosamientos (puntas de flecha blancas), grandes estructuras del tipo esferoidales de las terminaciones axónicas (puntas de flecha negras), y fibras con varicosidades (cuentas de rosario) (flechas negras). **(C)** El número de axones APP+ fue significativamente menor en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β, Test t de Student con corrección de Welch, ** $p < 0.01$. N = 4–5/grupo. Barras: (A - B). 50 μm; detalles 25μm.

I.2.E Activación glial frente al segundo estímulo pro-inflamatorio

Los fenómenos descritos anteriormente nos llevaron estudiar el aporte de las células gliales en la respuesta disminuida frente a un segundo estimulo inflamatorio. Para ello utilizamos la proteína ácida fibrilar de los astrocitos (GFAP) como marcador para analizar la reactividad de los astrocitos, y el complejo mayor de histocompatibilidad-II (MHC-II) para estudiar la respuesta de los macrófagos/microglia tipo 4.

Los astrocitos responden a estímulos adversos aumentando considerablemente la expresión de GFAP, con cambios en su morfología (sus procesos se ensanchan), y con proliferación activa. Este fenómeno se conoce como astrocitosis (ver introducción). En un análisis cualitativo de las inmunofluorescencia contra GFAP se pudo observar que la activación astroglial también era menor en los animales inyectados en ambas oportunidades con el AdIL-1β, cuando se los comparaba con los animales Adβ-gal/AdIL-1β o con los animales de inyección única 21 días (Figura I.2.8). Esta diferencia en la astrocitosis podría ser el resultado de la menor expresión de IL-1β, o bien tratarse de una respuesta atenuada por parte de los astrocitos dado que se encuentran en un contexto de inflamación y desmielinización moderado.

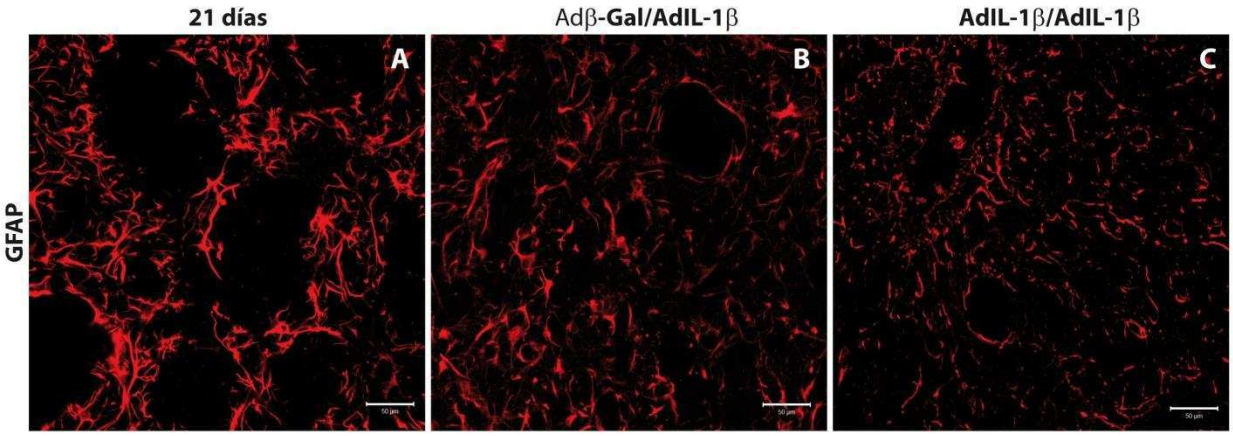


Figura I.2.8. Análisis de la activación astroglial con el marcador GFAP. Fotografías representativas de los grupos de mayor relevancia. (A) En los animales que fueron inyectados una única vez con el AdIL-1β, y perfundidos 21 días más tarde se pudo observar una gran activación de los astrocitos. **(B)** Los animales Adβ-gal/AdIL-1β también presentaron astrocitos con morfología de astrocitos activados, y una marca general más conspicua de GFAP. **(C)**. Como muestra la fotografía representativa del grupo AdIL-1β/AdIL-1β, en este caso la activación de la astroglia es más moderada, ya que se ve una expresión menor de GFAP, y se observan menos células con morfología de activación. Barra = 50 μm.

El MHCII es un antígeno relacionado con la repuesta inmunológica celular, y en este caso lo utilizamos para evaluar la presencia de una respuesta inmune (observada como activación de las células de la microglia) en el cerebro de los animales con doble estímulo pro-inflamatorio. Pudimos observar que, para el presente diseño experimental, los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β presentaron significativamente menos células MHCII + (100,9 ± 21,02) que las ratas inyectadas con el AdIL-1β solamente en la segunda oportunidad (365,1 ±43,96)($p < 0.001$ para Adβ-gal/AdIL-1β vs. AdIL-1β/AdIL-1β) (Figura I.2.9 D). Esta diferencia también se pone en evidencia en las fotografías representativas de las inmunofluorescencias: en la figura I.2.9 C (AdIL-1β/AdIL-1β) se observan menos células positivas para el marcador MHC II que las evidenciadas en las figuras A (inyección única 21 días) o B (Adβ-gal/AdIL-1β). Es decir que, en cuanto al componente microglial de la segunda lesión inflamatoria, se observó que la respuesta inmune siguió un patrón similar al observado para el resto de los componentes analizados previamente.

No se observó activación de ninguna de las células gliales en los CE contralaterales a la inyección, ni en los animales del grupo Adβ-gal/Adβ-gal (excepto por una pequeña cicatriz en el sitio de inyección). La poca activación glial presente en algunos casos para el grupo AdIL-1β/Adβ-gal probablemente se debe al efecto de la IL-1β de la primera inyección.

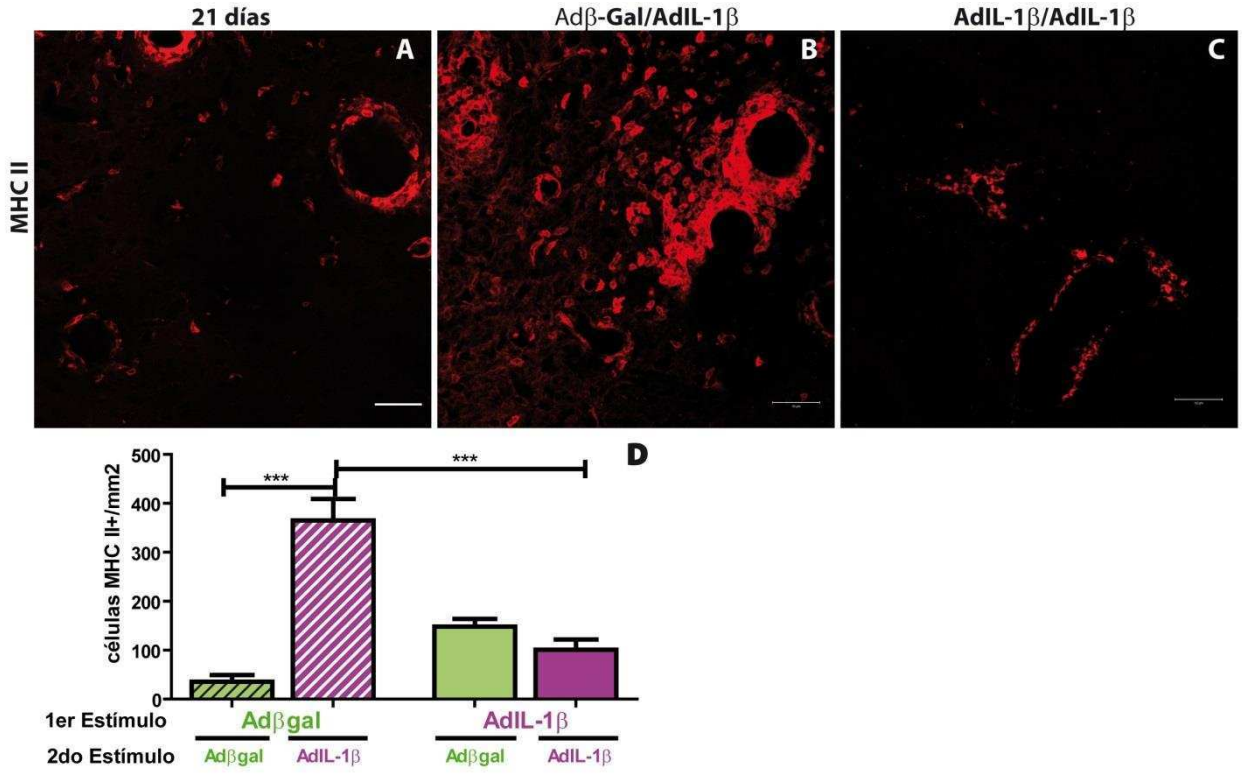


Figura I.2.9. Análisis de la respuesta de los macrófagos/microglia 4. (A) Fotografía representativa de los animales del grupo inyección única 21 días. Se pudo observar la presencia de abundantes células MHCII+. **(B)** Los animales Adβ-gal/AdIL-1β presentaron aún más cantidad de células MHC II +. **(C).** Como muestra la fotografía representativa del grupo AdIL-1β/AdIL-1β, sólo se observan algunas células MHCII+, particularmente cerca de los vasos sanguíneos. **(D)** El análisis cuantitativo del marcador demostró que el grupo Adβ-gal/AdIL-1β contenía aproximadamente cuatro veces más células MHCII+, que los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β. ANOVA de dos factores de los datos transformados (raíz cuadrada de la proporción), con Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*), ***p ≤ 0.001. N = 5–8/grupo. Barra = 50 μm

En conclusión, una re-exposición al AdIL-1β en el CE 30 días después de la primera produjo una lesión más atenuada en todos los parámetros investigados: inflamación, desmielinización, daño axonal, y activación glial. No se observaron diferencias en cuanto a la remielinización.

I.3 La re-inyección del AdIL-1β durante el estadio 3 (día 50) induce una lesión similar a la primera

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el diseño experimental 1, nos preguntamos si la disminución en la respuesta generada por el segundo estímulo de AdIL-1β podía estar relacionada con el hecho de que el estímulo secundario hubiese sido administrado durante el periodo de reparación de la primera lesión (estadio 2). Entonces, como segundo aproximamiento al estudio de estímulos pro-inflamatorios repetidos en el SNC decidimos realizar la segunda inyección del adenovector en el estadio 3 de la primera lesión (día 50), es decir una vez que la lesión se hubiera recuperado definitivamente. El diseño experimental 2 se realizó según se esquematiza en la figura I.3.1.

Figura I.3.1. Protocolo de inyección para el diseño experimental 2. Ratas *Wistar* macho de entre 8-10 semanas fueron re-inyectadas el día 50 en el cuerpo CE ipsilateral a la primera lesión con el adenovector que expresa la citoquina IL-1β, o con el adenovector control. Los animales fueron perfundidos 20 dpi, y sus cerebros procesados para análisis posteriores.

I.3.A Respuesta inflamatoria

Cuando se realizó la segunda inyección 50 días después de la primera, y se analizó la respuesta inflamatoria en los cortes seriados teñidos con violeta de cresilo, se observó que para este nuevo diseño experimental no se observaban diferencias significativas en el VI del grupo Adβ-gal/AdIL-1β (47,12 ± 9,01) con respecto al grupo AdIL-1β/AdIL-1β (41,53 ± 5,80) ($p = 0.47$ para la interacción, $p > 0.05$ para Adβ-gal/AdIL-1β contra AdIL-1β/AdIL-1β) (Figura I.3.2

A). Además, el VI de los grupos mencionados también resultó similar al observado en los animales inyectados una única vez con el AdIL-1β, y perfundidos 21 días más tarde (VI = 44,81 ± 4,01; Figura I.2.2 A).

Para el caso de los animales que recibieron el adenovector control en la segunda inyección, no se identificó una respuesta inflamatoria más allá de una pequeña cicatriz en el sitio de inyección. Los animales de todos los grupos estudiados no mostraron signos de enfermedad ni cambios comportamentales (pelo con aspecto normal, actividad y locomoción normal, no se observaron variaciones en el consumo de comida).

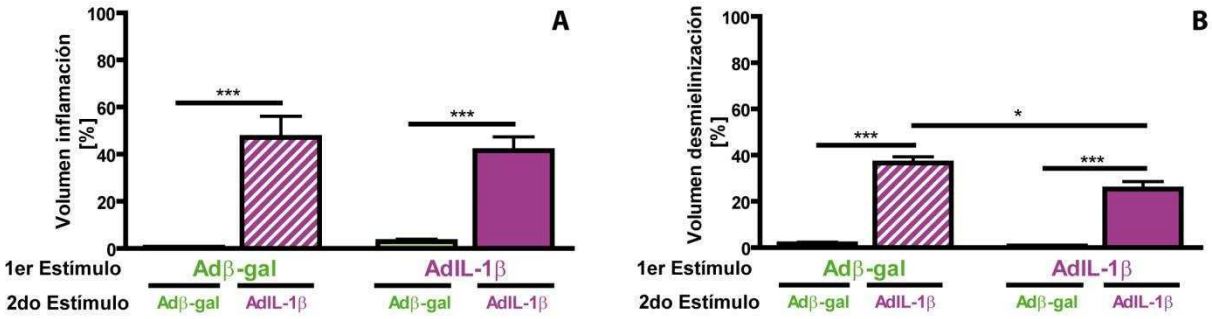


Figura I.3.2. Inflamación y desmielinización en el diseño experimental 2. (A) La re-inyección del AdIL-1β en el CE 50 días después de la primera inyección (dpi). Se observó que el VI no era significativamente diferente que el observado para el grupo Adβ-gal/AdIL-1β (ANOVA de dos factores; Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*). **(B)** Análisis de la desmielinización con la técnica de Red Oil O. En este caso se observa una sutil diferencia en el VD similar entre los dos grupos inyectados con el AdIL-1β en la segunda oportunidad, siendo el VD menor para el grupo AdIL-1β/AdIL-1β (ANOVA de dos factores de los datos transformados con la raíz cuadrada de las proporciones; Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*). ***p < 0,001; * p < 0,05. N = 5–8/grupo para histología.

Realizando un análisis más detallado de la respuesta inflamatoria en los cortes teñidos con violeta de cresilo se pudo observar que tanto los animales del grupo Adβ-gal/AdIL-1β, como aquellos que habían sido inyectados con el AdIL-1β en ambas oportunidades presentaban una importante vasodilatación en el CE ipsilateral, que muchas veces se extendía por fuera de la estructura en estudio y abarcaba parte del cuerpo calloso y la corteza circundantes (Figura I.3.3 C y E). Esta respuesta vascular también estuvo presente en el grupo de inyección única 21 días (Figura I.3.3 A). Otra de las características de la respuesta inflamatoria que se observó en los tres grupos fue una importante desorganización del

parénquima nervioso del CE, en el cual en muchas ocasiones podía observarse la presencia de edema en el sitio de mayor inflamación.

La composición celular del infiltrado también resultó similar en los tres grupos mencionados anteriormente (Figura I.3.3 B, D, y F): Se pudieron reconocer pocas células con la morfología característica de macrófagos/microglia 4 ya que la mayor parte del infiltrado está compuesto por neutrófilos PMN, tanto marginados y perivasculares, como reclutados en el edema y en el parénquima estriatal.

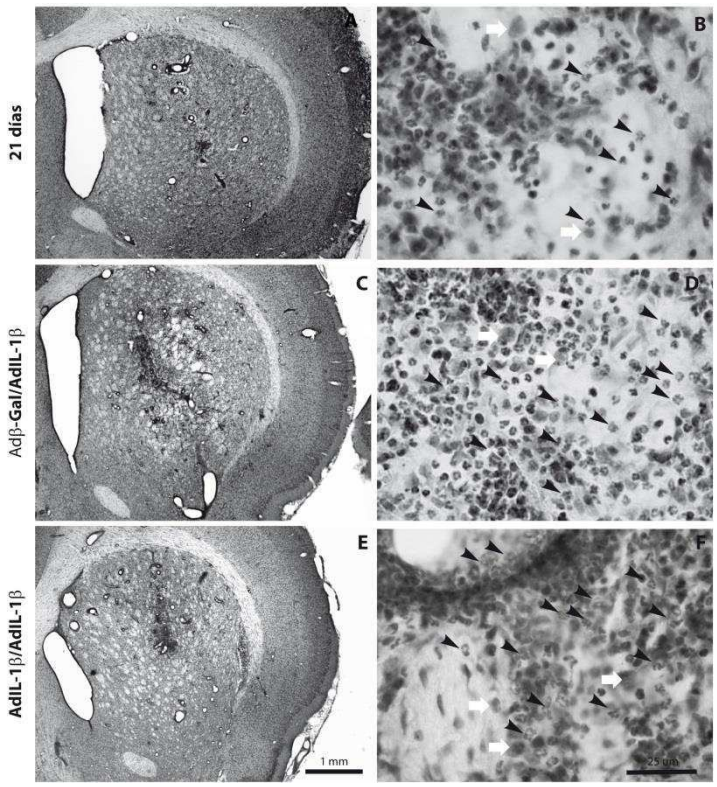


Figura I.3.3. Fotografías representativas de cortes teñidos con violeta de cresilo. (A) Los animales del grupo inyección única 21 días presentan un importante infiltrado inflamatorio, con desorganización del parénquima nervioso, zonas con edema, y vasodilatación. **(B)** A mayor aumento se evidencia que el componente celular principal del infiltrado son los neutrófilos PMN (puntas de flecha negras), aunque también se observan algunos macrófagos/microglia 4 (flechas blancas). **(C)** El grupo Ad-βgal/AdIL-1β presenta una desorganización del tejido similar, con abundantes zonas de edematización y mucha vasodilatación. **(D)** Nuevamente se observa una mayoría de neutrófilos PMN en el infiltrado inflamatorio. **(E)** El grupo AdIL-1β/AdIL-1β tiene una respuesta inflamatoria similar a la de los grupos anteriores. **(F)** La calidad del infiltrado también es semejante. Barra (A, C, y E) = 1 mm. Barra (B, D, y F) = 25 µm.

La siguiente tabla sintetiza la caracterización realizada para la respuesta inflamatoria observada luego de un segundo estímulo crónico pro-inflamatorio, cuando este es aplicado una vez que la lesión primaria se ha recuperado por completo (Diseño experimental 2).

	Inflamación	Edema	Tipos celulares	Vasodilatación
Inyección única 21 días	++	Si	+++ PMN + Macrófagos	++
Adβ-gal/AdIL-1β	+++	Si	+++ PMN + Macrófagos	+++
AdIL-1β/AdIL-1β	+++	Si	+++ PMN + Macrófagos	+++

Tomando en cuenta todos los resultados descriptos para la respuesta inflamatoria se podría concluir que un segundo estímulo pro-inflamatorio aplicado 50 días después que el primero presenta una dinámica inflamatoria similar a la observada en la primera lesión. Además, la caracterización general del infiltrado inflamatorio también es similar. Por otro lado, este resultado es diferente si el segundo estímulo se aplica cuando la lesión primaria aún se encuentra en vías de reparación (diseño experimental 1), en el cual se ha demostrado que la injuria secundaria es más leve.

I.3.B Dinámica de la desmielinización

A continuación estudiamos el efecto sobre la desmielinización de un segundo estímulo pro-inflamatorio aplicado con la lesión primaria ya resuelta. Para ello utilizamos los cortes seriados teñidos con Red Oil O. En este segundo diseño experimental observamos que el grupo AdIL-1β/AdIL-1β presentaba una desmielinización similar a la del grupo Adβ-gal/AdIL-1β y el grupo de inyección única 21 días (Figura I.3.4).

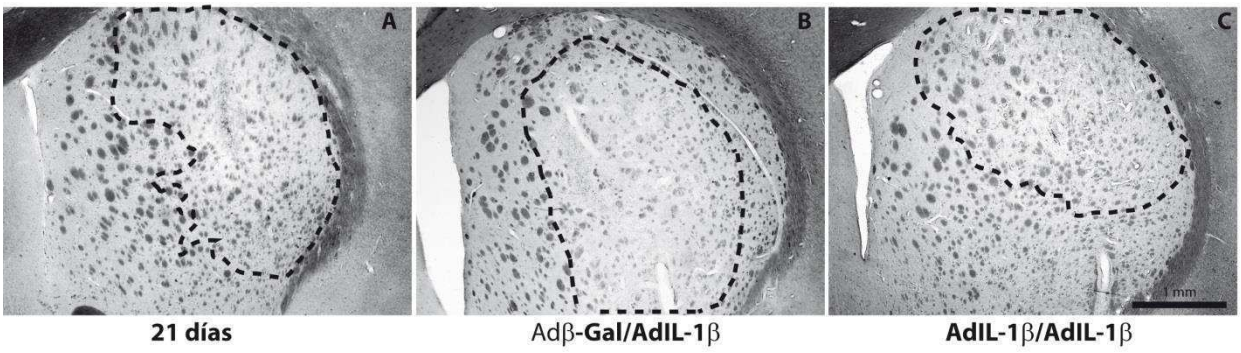


Figura I.3.4. Fotografías representativas de cortes teñidos con Red Oil O de los grupos más relevantes. (A) Los animales del grupo inyección única 21 días presentaron un área extensa de desmielinización, que se observa en la fotografía como la zona marcada con una línea punteada. **(B)** El grupo Adβ-gal/AdIL-1β también presenta una extensa área de desmielinización. **(C)** En el caso de las ratas que recibieron en ambas oportunidades el AdIL-1β se observó una desmielinización similar. Barra = 1 mm

Cuando cuantificamos esta desmielinización (Figura I.3.2 B) se observó que el VD del grupo AdIL-1β/AdIL-1β (VD = 25,39 ± 3,12) era levemente menor que el observado para el grupo Adβ-gal/AdIL-1β (VD = 36,62 ± 2,66) ($p \leq 0.05$ para Adβ-gal/AdIL-1β contra AdIL-1β/AdIL-1β). Esta diferencia es mucho menor a la que se verificó entre los mismos grupos experimentales del diseño experimental 1. La desmielinización del grupo de inyección única 21 días también fue similar (VD = 32,79 ± 2,67; Figura I.1.2 B).

Por lo tanto se puede concluir que, para el diseño experimental 2 la desmielinización parecería estar en parte asociada a la dinámica e intensidad de la respuesta inflamatoria descrita anteriormente.

I.3.C Daño axonal frente al segundo estímulo pro-inflamatorio

Para estudiar la degeneración axonal en los animales que recibieron el adenovector que expresa IL-1β en la segunda inyección, 50 días después de la primera, utilizamos el marcador de axones en degeneración APP. Tanto los animales del grupo Adβ-gal/AdIL-1β como los del grupo AdIL-1β/AdIL-1β tuvieron axones con marca positiva para APP (Figura I.3.5 A y B). En ambos casos (Figura I.3.5 A y B, detalles) se observaron los tres tipos de morfología característica de los axones en degeneración: pequeños engrosamientos (puntas de flecha

blancas), grandes estructuras del tipo esferoidales de las terminaciones axónicas (puntas de flecha negras), y fibras con varicosidades (cuentas de rosario) (flechas negras).

Cuando se cuantificó el número de axones positivos para APP vimos que el grupo AdIL-1β/AdIL-1β tenía significativamente menos axones en degeneración que los animales del grupo Adβ-gal/AdIL-1β ($p \leq 0,05$). Este resultado nos sorprendió ya que no se correspondía con lo observado para la respuesta inflamatoria, dónde no hubo diferencia significativa entre los grupos que recibieron el AdIL-1β como segundo estímulo. Sin embargo, si se corresponde con lo ocurrido con la desmielinización, dónde se vio una pequeña diferencia entre los grupos antes mencionados. Tomando en consideración toda esta información una posible explicación sería que el grado de daño axonal está ligado tanto a la dimensión de la respuesta inflamatoria, como al nivel de desmielinización.

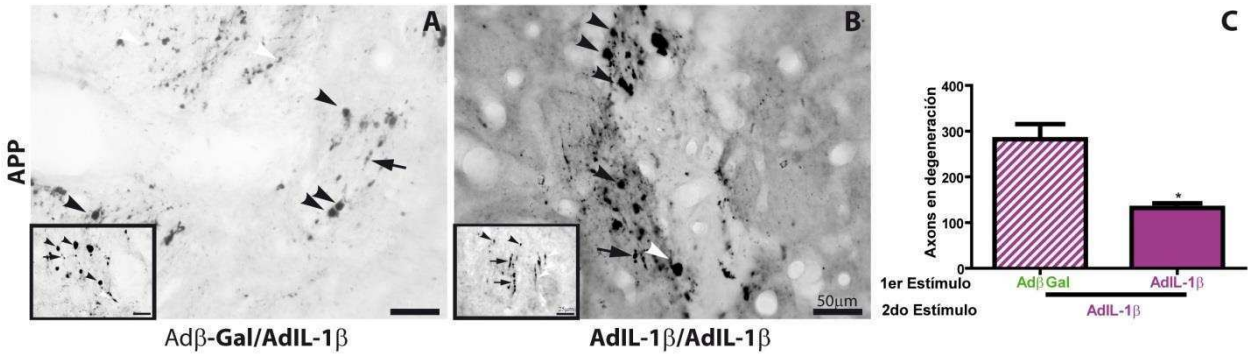


Figura I.3.5. Análisis de la integridad axonal con el marcador APP para el diseño experimental 2. El daño axonal fue identificado como axones APP positivos, tanto en los animales Adβ-gal/AdIL-1β **(A)**, como en las secciones en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β **(B)**. En los detalles de las fotografías se pueden identificar las diferentes morfologías de los axones en degeneración: pequeños bultos (puntas de flecha blancas), grandes esferoides terminales (puntas de flecha negras), y fibras varicosas (flechas negras). **(C)** El número de axones APP+ fue significativamente menor en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β, Test t de Student no pareado * $p < 0.05$. N = 4–5/grupo. Barras: (A - B). 50 µm; detalles 25µm.

Una vez más, los CE contralaterales a las inyecciones no presentaron marca para APP, lo cual indica que la marca observada en los estriados ipsilaterales era específica.

I.3.D Activación glial frente al segundo estímulo aplicado 50 dpi

A continuación nos propusimos investigar el rol de las células gliales en la lesión generada a partir de una segunda inyección con el AdIL-1β, pero esta vez aplicada con la injuria inicial completamente recuperada. Para ello utilizamos el marcador GFAP como indicador de la reactividad de los astrocitos, y el complejo MHC-II para estudiar la respuesta de los macrófagos/microglia 4.

No se observó una diferencia cualitativa en la astrogliosis entre el grupo Adβ-gal/AdIL-1β y el grupo AdIL-1β/AdIL-1β (Figura I.3.6 B y C). Es más, el grado de activación de los astrocitos en estos dos grupos resultó similar al observado en los cortes de animales del grupo de inyección única 21 días. Es decir que para el caso de los astrocitos, la activación estuvo relacionada con el grado de la respuesta inflamatoria, lo cual implica que no se vio una diferencia entre la primera y la segunda expresión crónica de IL-1β.

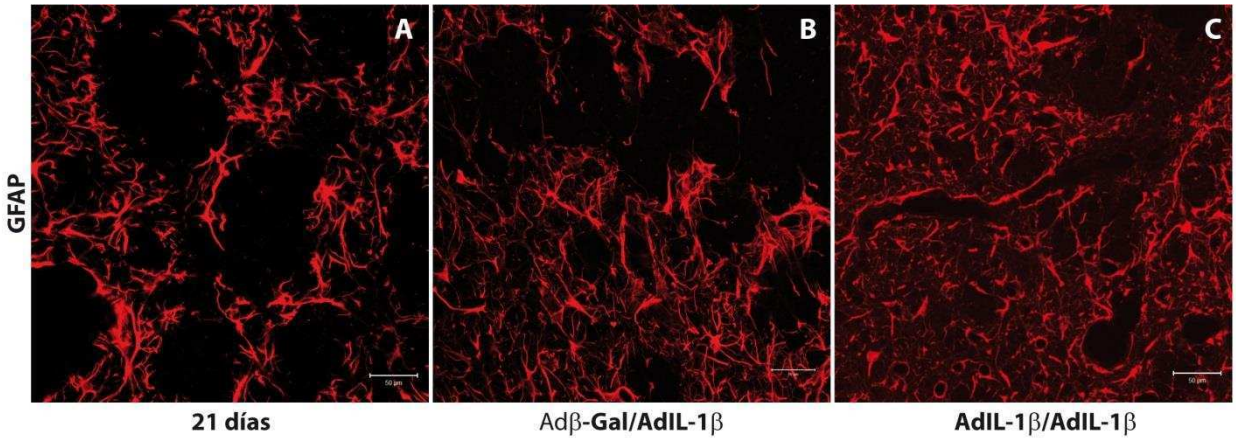


Figura I.3.6. Análisis de la activación astroglial con el marcador GFAP. Fotografías representativas de los grupos de mayor relevancia, para el diseño experimental 2. (A) En los animales del grupo de inyección única 21 días se pudo observar gran activación de los astrocitos. **(B)** Los animales Adβ-gal/AdIL-1β también presentaron astrocitos con morfología de activada, y una marca general más conspicua de GFAP. **(C)** Como muestra la fotografía representativa del grupo de animales que recibió la inyección con el AdIL-1β en ambas oportunidades, la astrocitosis resultó similar a la observada en los dos grupos anteriores. Barra = 50 μm.

Para estudiar la activación de los macrófagos/microglia tipo 4 utilizamos el marcador MHCII, que marca células microgliales en estado de activación. Así analizamos los cuatro grupos de animales del diseños experimental 2, y también los comparamos con los animales

que habían recibido una única inyección del AdIL-1β, y que fueron perfundidos 21 días más tarde.

Cuando se analizan las fotografías representativas de los tres grupos de mayor relevancia se puede observar que, cualitativamente no parece haber diferencia entre los grupos en cuanto a la activación de la microglia (Figura I.3.7 A-C). En los tres grupos se ven abundantes células MHCII +, que se ubican cerca de los vasos, pero también en el parénquima nervioso del CE. Este resultado se verifica en la cuantificación de la inmunofluorescencia contra MHCII, realizada a lo largo de todo el CE (cortes seriados). Como demuestra el gráfico de la figura I.3.7 D, no se observa diferencia significativa en el número de células MHCII +/mm^2 ($p = 0,1$ para la interacción; $p > 0,05$ para Adβ-gal/AdIL-1β contra AdIL-1β/AdIL-1β) entre los grupos Adβ-gal/AdIL-1β (532,8 ± 42,87) y AdIL-1β/AdIL-1β (445,0 ± 129,5).

Los grupos que recibieron el adenovector control en la segunda inyección casi no presentan células positivas para el marcador analizado. Tampoco se observó inmunomarcación en los estriados contralaterales a la inyección.

La activación inmunológica, medida con el marcador MHCII, siguió el mismo patrón que lo observado para la respuesta inflamatoria: no se observó diferencias en los animales que recibieron el AdIL-1β en la segunda inyección.

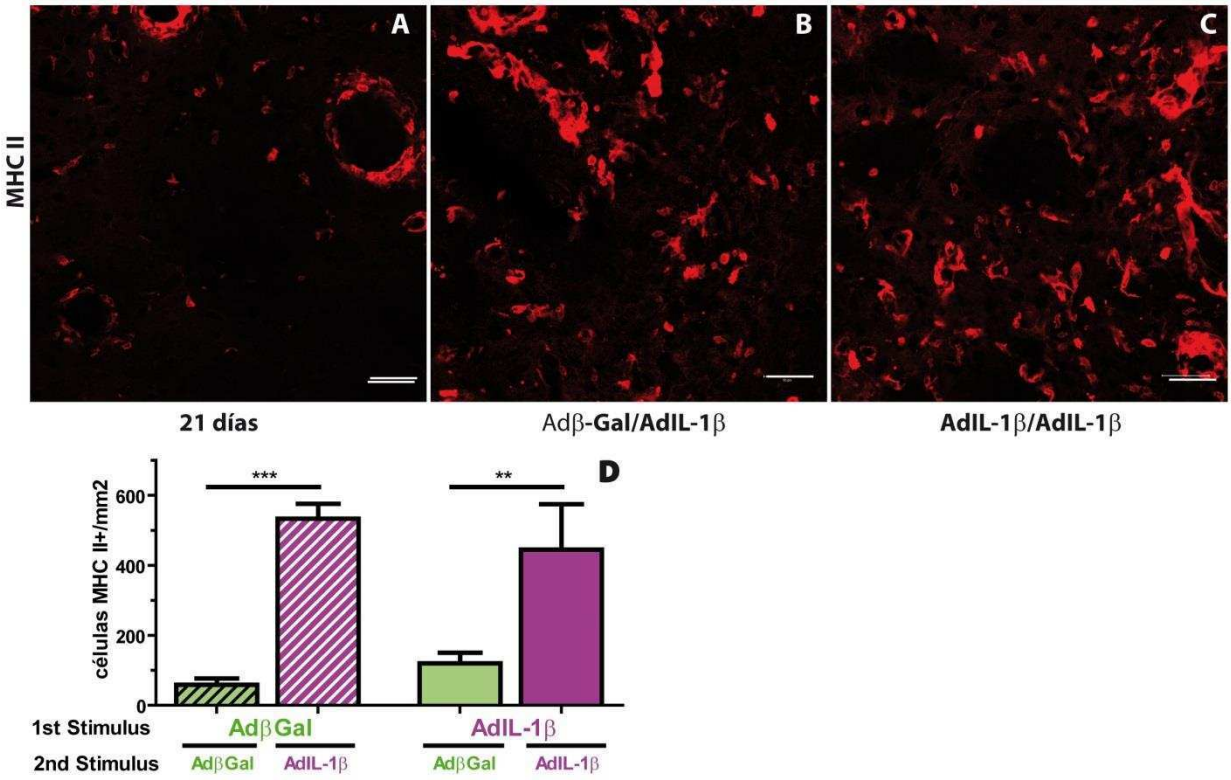


Figura I.3.7. Análisis de la respuesta de los macrófagos/microglia 4. (A) Fotografía representativa de los animales del grupo inyección única 21 días. Se pudo observar la presencia de abundantes células MHCII+. **(B)** Los animales Adβ-gal/AdIL-1β también presentaron una gran cantidad de células positivas para el marcador en cuestión. **(C).** La fotografía representativa del grupo AdIL-1β/AdIL-1β indica que en este caso también hay muchas células MHCII +. **(D)** El análisis cuantitativo del marcador demostró que no hay diferencias significativas entre los animales del grupo Adβ-gal/AdIL-1β y los del grupo AdIL-1β/AdIL-1β. ANOVA de dos factores de los datos transformados (raíz cuadrada de la proporción), con Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*, ***p ≤ 0001; ** p ≤ 0,01. N = 5/grupo. Barra = 50 μm.

En conclusión, cuando el segundo estímulo pro-inflamatorio fue aplicado una vez que la lesión primaria estuvo completamente resuelta (estadio 3) la respuesta inflamatoria y glial fue igual a la observada para la primera inyección. Al evaluar la desmielinización y la degeneración axonal se observó un pequeña diferencia para el grupo AdIL-1β/AdIL-1β, aunque está respuesta no fue tan atenuada como la obtenida en el diseño experimental 1.

I.4 Rol de la expresión de los receptores de IL-1β en la respuesta atenuada al segundo estímulo pro-inflamatorio en el diseño experimental 1

Como se mencionó en la introducción, la citoquina IL-1β ejerce su acción a través de un receptor de 80kDa, denominado receptor tipo I de IL-1 (IL-1RI). Sin embargo un segundo receptor, el receptor tipo II (IL-1RII) también se une a IL-1β, pero esta unión no induce respuesta fisiológica. Por otro lado, otro componente de la familia IL-1 es el receptor antagonista (IL-1ra), el cual es un competidor selectivo de IL-1 que se une funcionalmente a IL-1RI, pero no induce una respuesta. Todos los miembros de la familia IL-1 descrita anteriormente son expresados en forma endógena en el SNC.

Teniendo en cuenta el mecanismo de acción conocido de IL-1β, hipotetizamos que la disminución en la respuesta observada luego de la segunda inyección AdIL-1β en el diseño experimental 1 podría deberse a un comportamiento diferencial en la expresión tanto de los receptores de IL-1, como del IL-1ra. Para responder esta pregunta, estudiamos el mARN de estas moléculas con la técnica de qRT-PCR.

Teniendo en cuenta que la segunda lesión se vio disminuida cuando el segundo estímulo pro-inflamatorio fue administrado con la lesión primaria aun activa (diseño experimental 1), pero no cuando se lo administró con la lesión completamente resuelta (diseño experimental 2), decidimos investigar la expresión de los receptores en el momento de realizar la segunda inyección (30 o 50 dpi).

Comparando los animales del grupo de inyección única 30 días con los del grupo de inyección única 50 días, no se detectaron diferencias significativas en la expresión del IL-1RI ($p = 0.81$), IL-1RII ($p = 0.66$) o IL-1ra ($p = 0.39$) (Figura I.4.1).

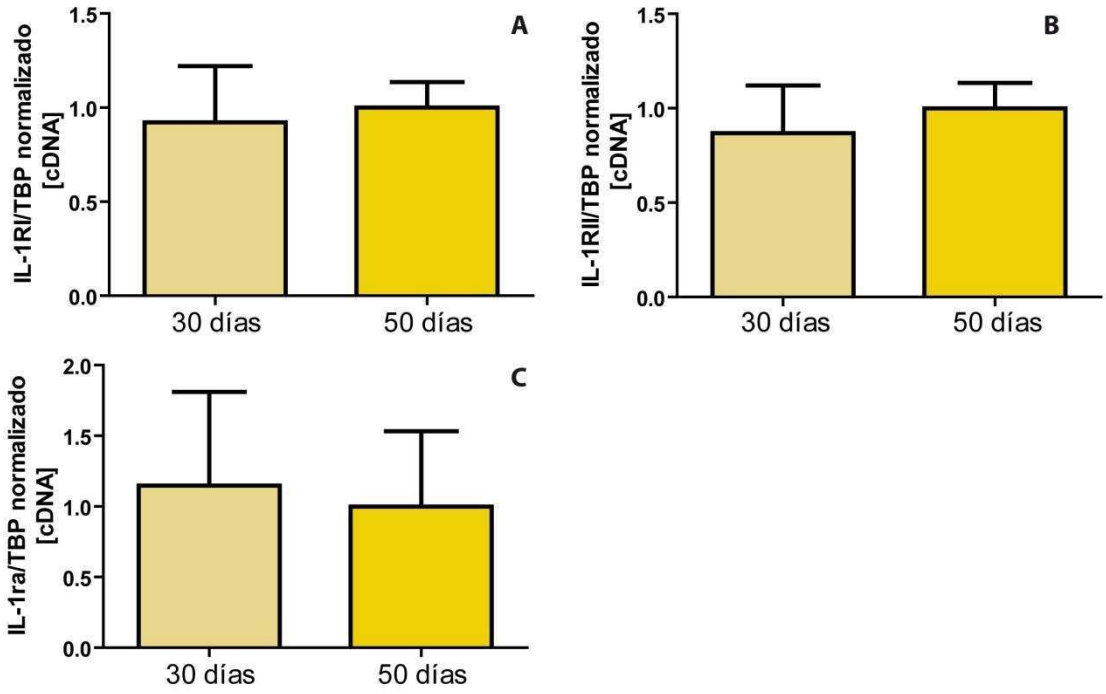


Figura I.4.1. Variación de los niveles de mARN de los receptores de IL-1β y del receptor antagonista (IL-1ra) para los grupos de inyección única 30 y 50 días. Los valores se expresan como ADNc relativo al gen de referencia TBP, y normalizado al grupo de inyección única 30 días. **(A)** Receptor 1 IL-1β (IL-1RI), Test de Student no pareado, ns. **(B)** Receptor II de IL-1β (IL-1RII), Test de Student no pareado, ns. **(C)** IL-1ra, Test de Mann Whitney, ns. N=5-6/grupo.

Considerando que no se vieron diferencias en la expresión de los receptores o del receptor antagonista entre los dos días en que se realizó la segunda inyección, decidimos estudiar la expresión de estas moléculas luego del segundo estimulo. Para ello, analizamos el diseño experimental 1, en el cual la respuesta disminuye en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β. Las muestras fueron obtenidas 21 dpi del segundo vector. Los animales que recibieron el adenovector control en ambas ocasiones (Adβ-gal/Adβ-gal), no mostraron ninguna evidencia de reacción al adenovector *per-se*, ya que la expresión de ambos receptores y de IL-1ra mostraron una respuesta similar a la encontrada en los animales de inyección única 50 días, cuando la lesión estaba totalmente recuperada.

Los animales inyectados por segunda vez con un estímulo pro-inflamatorio (Adβ-gal/AdIL-1β) mostraron un aumento en la expresión de IL-1RI, demostrando que en la respuesta al AdIL-1β se involucra un mayor número de receptores disponibles para transducir

la señal (Figura I.4.2 A). Por otro lado, también hay un incremento en la expresión de moléculas que regulan negativamente la actividad inflamatoria de IL-1β (IL-1RII e IL-1ra) (Fig. I.4.2 B, C). Este patrón de expresión podría deberse que estamos analizando el pico de la respuesta inflamatoria y por ende se observa un aumento tanto en los elementos que intervienen en regulación positiva (que llevaron a la respuesta a su pico máximo), como un aumento en la expresión de los reguladores negativos (que intentan poner un freno a la respuesta inflamatoria).

Es interesante destacar, que la respuesta de los dos receptores y de IL-1ra es totalmente diferente si el primer estimulo es el AdIL-1β. En el caso del grupo AdIL-1β/AdIL-1β se observa una disminución significativa comparada con la descrita para el grupo Adβ-gal/AdIL-1β ($p < 0.001$ para IL-1RI; $p < 0.01$ para IL-1RII; $p < 0.01$ para IL-1ra), demostrando que la presencia del primer estimulo pro-inflamatorio reduce la respuesta a una segunda inyección de AdIL-1β (Figura I.4.2). Más aun, cuando se comparan a los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β con los del grupo AdIL-1β/Adβ-gal se observa una disminución en la expresión de IL-1RI ($p < 0.001$), mientras que IL-1R2 y IL-1ra no varían. Este resultado indicaría una participación en la expresión diferencial de los receptores en cuanto a la respuesta disminuida observada en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β.

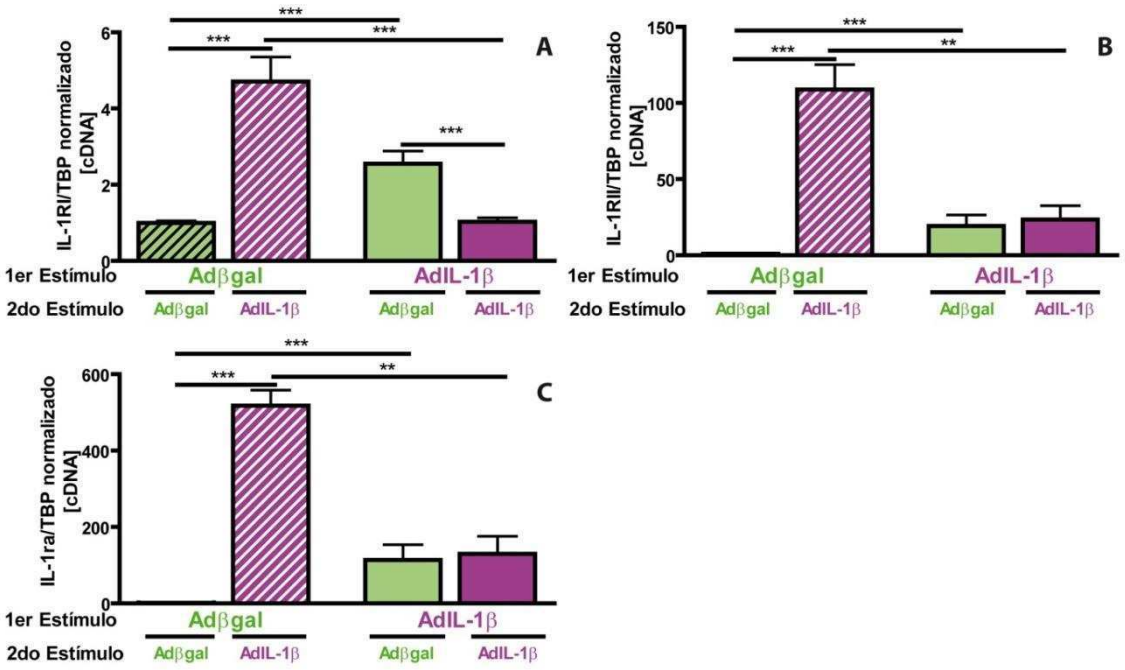


Figura I.4.2. Variación de los niveles de mARN de los receptores de IL-1β y del receptor antagonista (IL-1ra) para el diseño experimental 1. Los valores se expresan como ADNc relativo al gen de referencia TBP, y normalizado al grupo control Adβ-gal/Adβ-gal. **(A)** Receptor 1 IL-1β (IL-1RI), ANOVA de dos factores de los datos transformados (Ln), con Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*. **(B)** Receptor II de IL-1β (IL-1RII), ANOVA de dos factores de los datos transformados (Ln), con Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*. **(C)** IL-1ra, ANOVA de dos factores de los datos transformados (Ln), con Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*. N=5-6/grupo.

En resumen, cuando se investigó la expresión de algunas de las moléculas involucradas en el mecanismo de acción de IL-1β se observó una disminución en su expresión para los animales inyectados en ambas oportunidades con el AdIL-1β según el diseño experimental 1. No se observaron diferencias significativas en los mRNA de ninguno de los dos receptores ni de IL-1ra cuando se analizó su expresión a los 30 o 50 dpi.

_____Resultados – Capítulo II

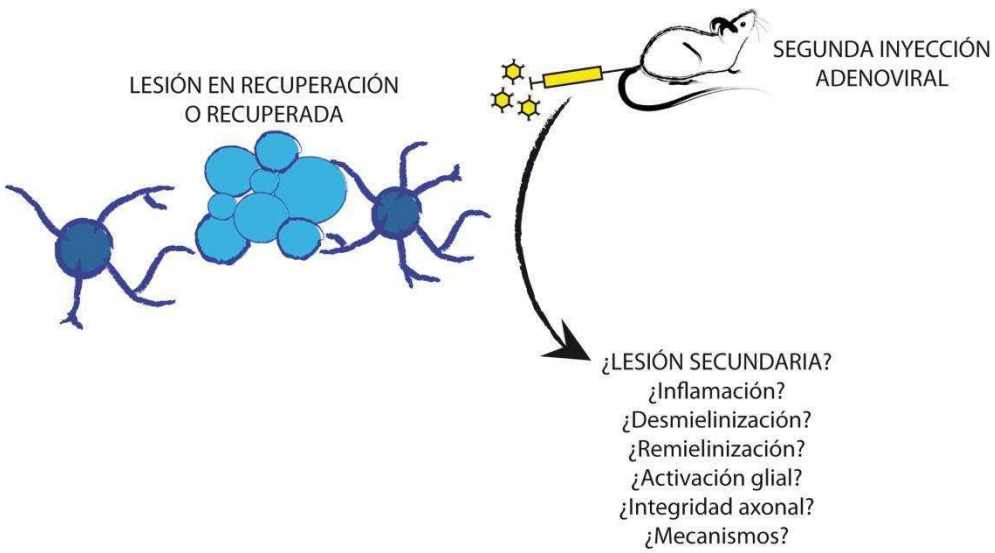
Efectos de un estímulo pro-inflamatorio periférico sobre una lesión desmielinizante pre-existente

II RESULTADOS – CAPÍTULO II

Hipótesis y Objetivos específicos

La **hipótesis** planteada supone que una inflamación procedente de la periferia podría exacerbar la lesión central.

El **objetivo específico** de este capítulo es estudiar el efecto de un estímulo pro-inflamatorio crónico periférico sobre una lesión desmielinizante en el SNC. Se evaluará especialmente el rol de interleuquina 1β, tanto central como periférico



Esquema de los objetivos generales del capítulo II. Durante el estadio de recuperación de la injuria en el cuerpo estriado, se inyectará el estímulo pro-inflamatorio en forma endovenosa en machos *Wistar* adultos. Se evaluarán los efectos del estímulo periférico sobre la inflamación, desmielinización, remielinización, activación glial e integridad axonal.

Efecto de un estímulo inflamatorio periférico sobre la lesión central desmielinizante

II.1 La expresión crónica de IL-1β en la periferia durante el estadio 2 de la lesión central exacerba el daño

Con el fin de evaluar el efecto de un estímulo pro-inflamatorio periférico se utilizó el **diseño experimental 3**, según el cual se inyectó el AdIL-1β el día 0 en el CE, y 30 días más tarde se aplicó el adenovector pero en forma endovenosa. Para corroborar el efecto específico del AdIL-1β, se realizaron frotis sanguíneos de los animales 5 días después de la inyección intravenosa (Figura II.1.1). En ratas *naïve* la formula leucocitaria es de 14-20% de neutrófilos PMN y 70-85% de linfocitos. Las ratas que recibieron el estímulo pro-inflamatorio presentan un aumento significativo en el porcentaje de neutrófilos PMN. Los animales fueron sacrificados al día 37.

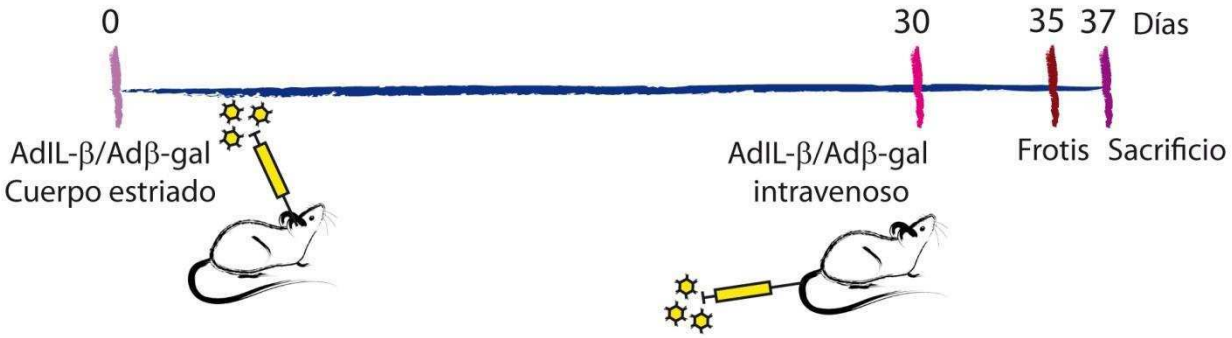


Figura II.1.1. Protocolo de inyección para el diseño experimental 3. Ratas *Wistar* macho de entre 8-10 semanas fueron inyectadas con los adenovectores en el CE al día 0. Al día 30 los animales fueron inyectados con el AdIL-1β o el adenovector control endovenoso. Como control del funcionamiento del estímulo periférico se tomaron muestras de sangre al día 35. Los animales fueron perfundidos 37 luego de la inyección central, y sus cerebros procesados para análisis posteriores.

Cabe destacar que, como se describió en el capítulo I, en el presente diseño experimental el estímulo periférico fue administrado durante el periodo de recuperación de la lesión central.

II.1.A Verificación del estímulo periférico

En primer lugar se verifico el funcionamiento del estímulo periférico, para lo cual se realizó el recuento leucocitario en los frotis realizados a los 5 días post-inyección del estímulo endovenoso. Los animales inyectados con el AdIL-1β_{iv} demostraron un incremento en el número de neutrófilos PMN cuando se los comparo con el grupo inyectado periféricamente con el adenovector control ($p \leq 0,01$).(Figura II.1.2 A).

II.1.B Análisis de la Respuesta inflamatoria

El análisis de la respuesta inflamatoria se realizó en los cortes teñidos con violeta de cresilo en los animales en cuales se ha verificado el funcionamiento del estímulo periférico. Los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} presentaron un volumen inflamatorio (VI = $39,31 \pm 8,27$) mucho mayor que el resto de los grupos, en los cuales la respuesta inflamatoria fue casi nula ($p \leq 0,001$ para AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} contra AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ o Adβ-gal/AdIL-1β_{iv}) (Figura II.1.2 B). Por lo tanto, estos resultados demostraron que la expresión crónica de IL-1β en la periferia exacerbó la lesión en el SNC.

En ningún caso se observó respuesta al estímulo periférico en los animales en los cuales las lesiones primarias fueron generadas por el adenovector control por lo tanto muchos de los análisis posteriores fueron realizados solamente para los grupos que recibieron el AdIL-1β como estímulo primario central.

Un análisis más detallado de la respuesta inflamatoria en los dos grupos de mayor relevancia demostró que los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ presentaron una respuesta inflamatoria escasa. No se evidenció vasodilatación, desorganización del parénquima, ni edematización en el CE (Figura II.1.3 A). Se pudieron observar solamente algunas células

inflamatorias en el lumen y/o periferia de unos pocos vasos sanguíneos. En este caso, el componente celular principal se identificó como macrófagos/microglia 4 (flechas blancas, Figura II.1.3 B).

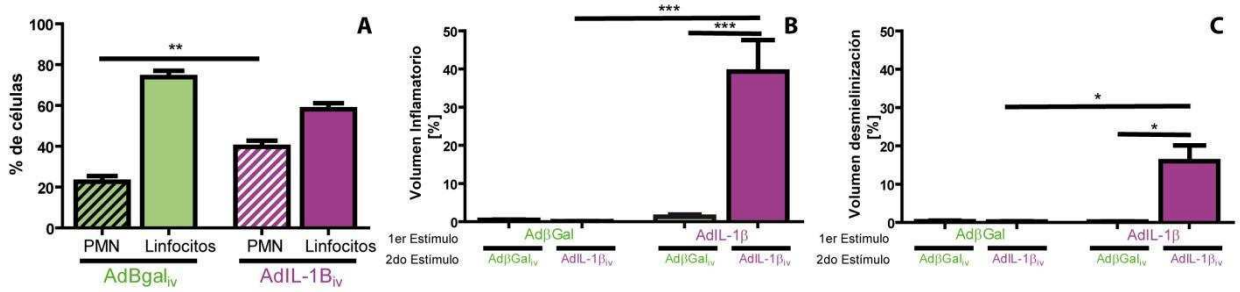


Figura II.1.2. Un estímulo pro-inflamatorio periférico sostenido exacerbó la lesión central. (A) El aumento del porcentaje de neutrófilos PMN 5 días después de la inyección iv verifican el funcionamiento del estímulo periférico. **(B)** Análisis de la inflamación en los cortes teñidos con violeta de cresilo. El grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ presenta una exacerbación del VI (ANOVA de dos factores de los datos transformados [Ln]; Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*). **(C)** El análisis de los VD se realizó a partir de los cortes seriados teñidos con Red Oil O, donde se observó una diferencia significativa para el grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$, el cual presentó una mayor desmielinización (ANOVA de dos factores no paramétrico de los datos ranqueados; Análisis de la varianza por contrastes como test *post-hoc*). ***p ≤ 0,001; * p ≤ 0,05. N = 5/grupo.

Por el contrario, la respuesta inflamatoria de los animales que recibieron el AdIL-1β iv fue mucho más evidente, ya que el infiltrado inflamatorio ocupa gran parte del CE e incluso también se extiende a zona adyacentes a esta región como el cuerpo calloso. El CE de estos animales presenta un alto grado de desorganización acompañado por una importante vasodilatación y en muchos casos edema (Figura II.1.3 C). El infiltrado inflamatorio está compuesto mayoritariamente por un gran número de neutrófilos PMN (puntas de flecha negras, Figura II.1.3 D), que se encuentran tanto en los vasos, como en el edema y el parénquima nervioso.

En todos los casos, el hemisferio contralateral a las inyecciones mantiene su morfología normal, sin evidenciar signos de inflamación o desorganización del parénquima.

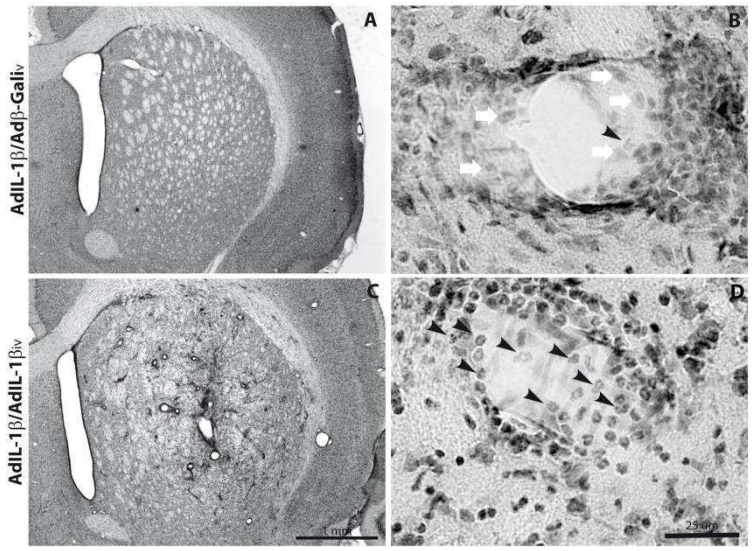


Figura II.1.3. Fotografías representativas de cortes teñidos con violeta de cresilo. (A) Los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ presentan muy poco infiltrado inflamatorio, **(B)** En un detalle de la fotografía anterior se observa que las células que componen el infiltrado tienen en su mayoría morfología de macrófagos (flechas blancas. **(C)** El grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ presenta una importante respuesta inflamatoria, con desorganización del parénquima nervioso, zonas edematizadas, y vasodilatación. **(D)** A mayor aumento se evidencia que el componente celular principal del infiltrado son los neutrófilos PMN (puntas de flecha negras). Barra (A y C) = 1 mm. Barra (B y D) = 25 μm.

En la siguiente tabla se resumen los resultados descriptos anteriormente en cuanto a la caracterización de la inflamación en el CE, para los animales de los grupos de mayor relevancia del Diseño experimental 3.

	Inflamación	Edema	Tipos celulares	Vasodilatación
AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$	-	No	+ PMN + Macrófagos	-
AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$	+++	Si	++ PMN + Macrófagos	+++

II.1.C Análisis de la Desmielinización y la remielinización

Con el objetivo de realizar el análisis del efecto de estímulo pro-inflamatorio periférico sobre la desmielinización, utilizamos los cortes seriados teñidos con Red Oil-O. Fotografías representativas de los dos grupos más relevantes se muestran en la figura II.1.4. El estímulo

periférico exacerbó la desmielinización en la lesión central en el grupo AdIl-1β/AdIL-1β_{iv} (Figura II.1.4). Sin embargo, los animales del grupo AdIL-β/Adβ-gal$_{iv}$ presentaron escasas zonas de desmielinización (sólo se observó una tinción más suave en el sitio de inyección).

La cuantificó del VD demostró un escenario similar a lo descripto para la inflamación: los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} presentaron un VD bastante alto (VD = 16,00 ± 4,01), mientras que el resto de los grupos estudiados casi no presentó signos de desmielinización ($p < 0.05$ para AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} contra AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ o Adβ-gal/AdIL-1β_{iv}) (Figura II.1.2 B).

No se observan alteraciones de la mielina en los estriados contralaterales de ninguno de los otros grupos analizados.

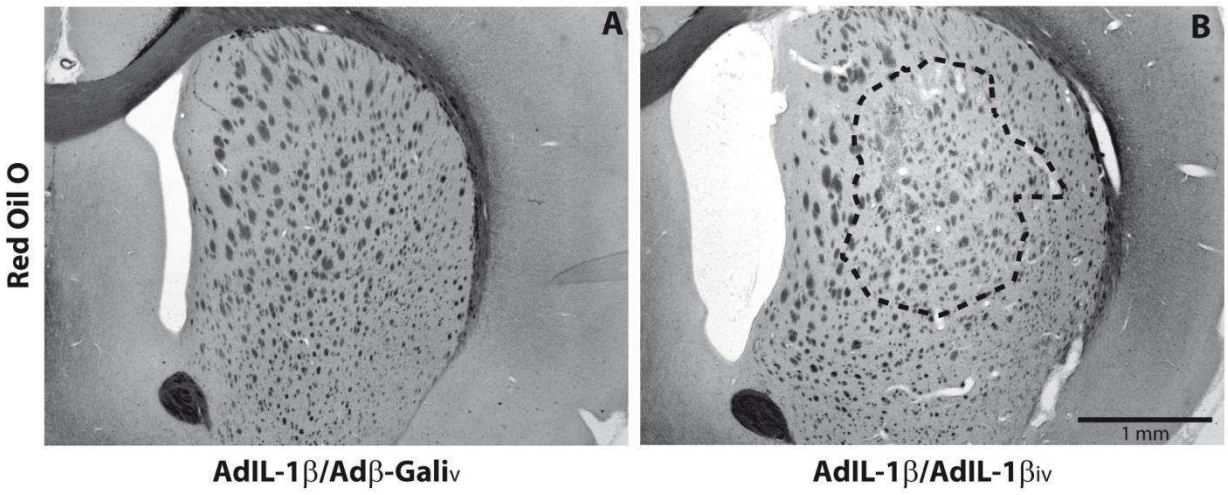


Figura II.1.4. Fotografías representativas de cortes teñidos con Red Oil O de los grupos más relevantes. (A) Los animales del AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ no presentaron signos de desmielinización. **(B)** El grupo AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} tiene una extensa área de desmielinización, que se observa en la fotografía como la zona marcada con una línea punteada. Barra = 1 mm.

Considerando que sólo se observó desmielinización para los animales que recibieron el AdIL-1β tanto en el CE como en la periferia, decidimos analizar el proceso de remielinización para este grupo. Para ello modificamos levemente el diseño experimental, y sacrificamos a los animales 30 o 50 días después de la inyección endovenosa y procesamos el tejido para cortes semifinos. Como no conocíamos previamente la dinámica de la lesión en cuanto a la remielinización, decidimos analizar la remielinización a dos tiempos distintos, 30 y 50 días después del estímulo periférico.

Los animales sacrificados 30 días después de la inyección periférica presentaban algunos axones aun desmielinizados (DA), pero también muchos en proceso de remielinización (Ma). Después de 50 días del estímulo endovenoso, la gran mayoría de los axones se encontraba mielinizados (MA), aunque también se pudieron observar algunos en proceso de remielinización (mA) (Figura II.1.4).

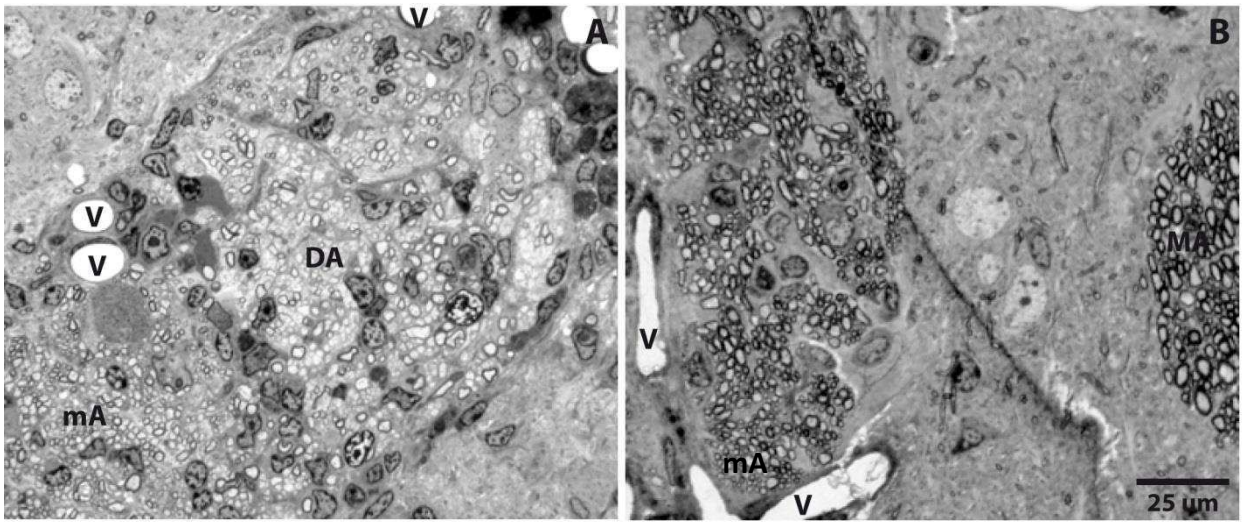


Figura II.1.4. Fotografías representativas de cortes semifinos teñidos con Azul de toluidina del grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$. (A) En las secciones semifinas de los animales inyectados con el AdIL-1β en el CE y en la periferia y perfundidos 30 días luego del estímulo periférico se observaron algunos axones desmielinizados (DA), y otros en proceso de remielinización (Ma). **(B)** 50 días después de la inyección periférica se observaron mayormente axones en remielinización (Ma), y axones mielinizados (MA). V = vasos sanguíneos. Barra = 25 µm.

II.1.D Efecto del estímulo periférico sobre la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE)

La expresión crónica de IL-1β en el CE produce ruptura de la BHE con posterior recuperación (Ferrari et al., 2004). Con el objetivo de investigar el efecto del AdIL-1β periférico sobre la integridad de la BHE utilizamos la técnica de Hanker-Yates en cortes de animales sujetos al diseños experimental 3. Como se explicó en la sección de materiales y métodos, para realizar esta técnica los animales son inyectados endovenosamente con la enzima peroxidasa de rábano (HRP), y perfundidos 30 minutos más tarde. Cuando la BHE se encuentra intacta, la enzima no es capaz de atravesarla y no ingresa al SNC. Por lo tanto al poner los cortes de

cerebro en contacto con el sustrato de la enzima, solamente se observa precipitado cuando la integridad de la BHE está comprometida.

El grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ presentó un importante depósito del producto de la enzima HRP sobre el parénquima nervioso, observado como depósitos oscuros rodeando a los vasos, lo cual demuestra una exacerbación en el daño a la BHE Los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ también presentaron daño en la BHE, pero en este caso fue mucho menor envergadura que el que se observó para los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$. (Figura. II.1.5).

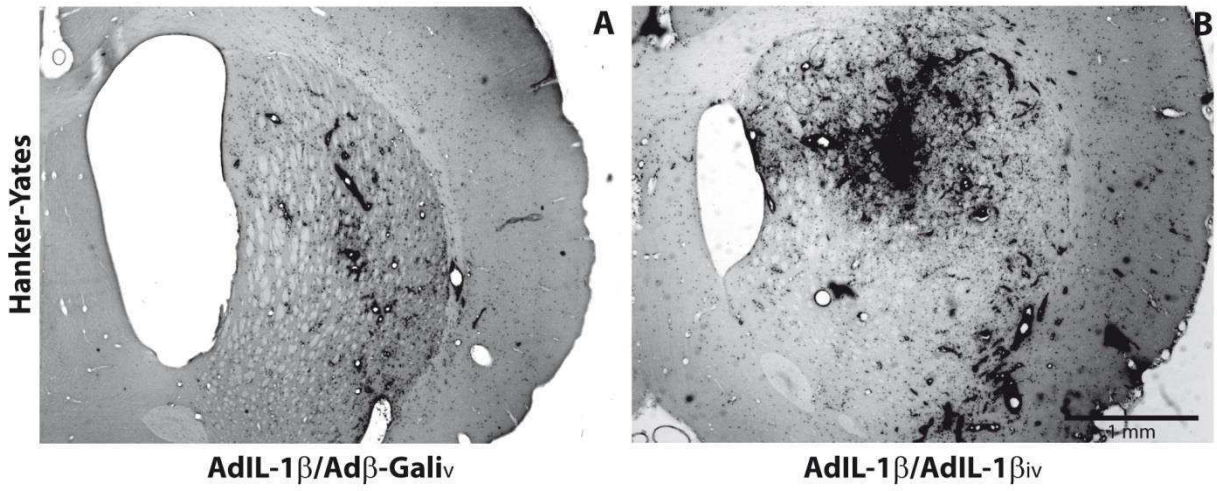


Figura II.1.5. Fotografías representativas de cortes expuestos a la técnica de Hanker-Yates para estudiar la integridad de la BHE. La enzima HRP inyectada en forma endovenosa sólo atraviesa el endotelio de los vasos del sistema nervioso cuando la BHE está dañada. **(A)** Los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ presentaron daño en la BHE. **(B)** La integridad de la BHE se vio altamente comprometida en los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$. Barra = 1 mm.

II.1.E Daño axonal luego de la exacerbación periférica

La integridad axonal en el modelo de exacerbación periférica fue evaluada con el anticuerpo contra el precursor de la proteína β amiloide (APP), que marca la presencia de axones en diferentes estadios de degeneración.

Tanto los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ (Figura II.1.6 A) como los del grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ (Figura II.1.6 B) presentaron cortes con axones positivos para el marcador

de daño axonal APP. En ambos casos se pudieron reconocer varios aspectos morfológicos típicos de axones en degeneración: desde pequeños engrosamientos (puntas de flecha blancas) a grandes estructuras del tipo esferoidales de las terminaciones axónicas (puntas de flecha negras) y fibras con varicosidades (cuentas de rosario) (flechas negras) (detalle Figura I.2.6 A y B). Sin embargo, como se observa en la fotografía representativa, los animales que recibieron el AdIL-1β en ambas oportunidades tenían más cantidad de axones APP + (Figura II.1.6 B).

No se observaron axones positivos para el marcador APP en ninguno de los CE contralaterales a la inyección, confirmando que la marca observada en los CE ipsilaterales resultaba específica para la degeneración axonal.

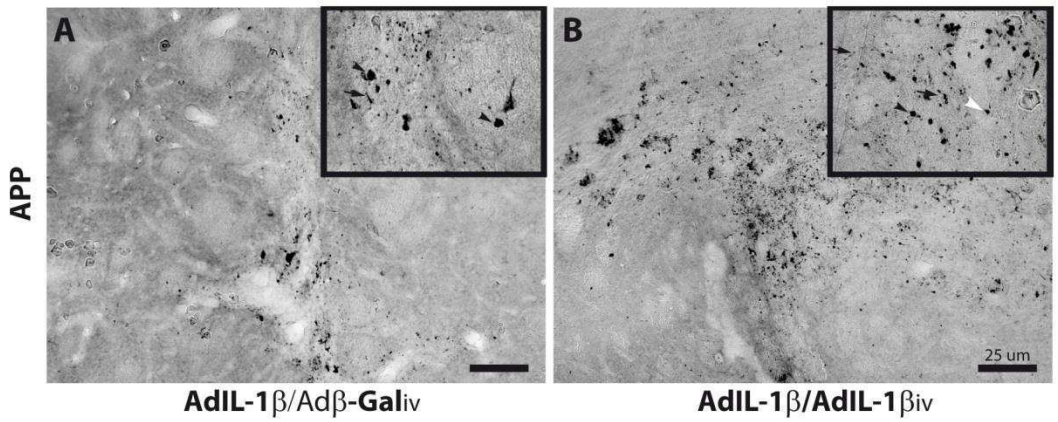


Figura II.1.6. Análisis de la integridad axonal con el marcador APP. (A) Los animales AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ presentaron marca positiva que indica daño axonal **(B)** En las secciones del grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ se observaron mayor número de axones APP +. En los detalles de las fotografías se pueden identificar las diferentes morfologías de los axones en degeneración: pequeños engrosamientos (puntas de flecha blancas), grandes estructuras del tipo esferoidales de las terminaciones axónicas (puntas de flecha negras), y fibras con varicosidades (cuentas de rosario) (flechas negras). N = 4–5/grupo. Barra: 25μm.

II.1.F Efecto del AdIL-1β$_{iv}$ sobre la activación glial

Como vimos en la introducción y también en los resultados del capítulo I, los eventos inflamatorios dentro del SNC muchas veces involucran respuestas o activación de las células gliales. El rol de las células gliales en la exacerbación de la lesión central luego de un estímulo

pro-inflamatorio, fue estudiado con inmunomarcadores específicos como GFAP para activación astroglial y MHC-II para indicar activación de los macrófagos/microglia estadio 4.

Realizando un análisis cualitativo de la expresión de GFAP y la morfología astroglial pudimos observar que los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ presentaron escasa activación astroglial, que sólo se evidenció como un sutil aumento de la expresión de GFAP, y la visualización de algunas células astrogliales con procesos engrosados (Figura II.1.7 A). Sin embargo, los animales AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ presentaron una evidente e intensa activación de los astrocitos. Esta activación se distinguió por presentar mayor cantidad de células GFAP+ con características de astroglia activada (con procesos más robustos) y una importante distribución antero-posterior en el CE, ya que se identificó en un gran número de cortes seriados con marca GFAP+ (Figura II.1.7 B). Estos resultados indican que la activación de la astroglia acompaña la exacerbación de la inflamación y la desmielinización.

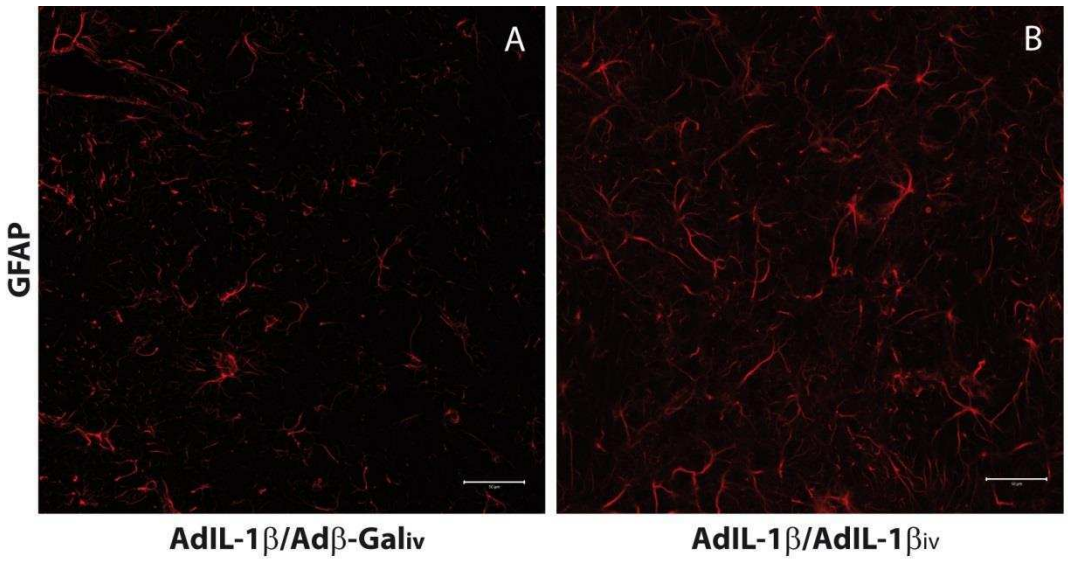


Figura II.1.7. Análisis de la activación astroglial con el marcador GFAP. Fotografías representativas de los grupos de mayor relevancia. (A) En los animales que fueron inyectados con el AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ se observó una escasa activación de los astrocitos. **(B)** Los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ presentaron una mayor activación astroglial, demostrada por una marca GFAP más conspicua y mayor número de células GFAP+ con morfología activada. Barra = 50 μm.

Para evaluar la activación de las células microgliales en el modelo descrito anteriormente utilizamos el anticuerpo MHC-II, el cual marca las células microgliales en casi todos los estadios de activación, pero no marca el estadio de reposo. Casi no se observaron

células MHCII + en los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ (Figura II.1.8 A); sin embargo, se observan gran cantidad de células MHCII + en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ (Figura II.1.8 B). La cuantificación de las células MHCII + a lo largo del CE ipsilateral a la lesión central se observó que los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ presentaban un número significativamente mayor (525,0 ± 105,4) que las que se observaron en los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ (68,35 ± 35,78; p ≤ 0,05) (Figura II.1.8 B). Es decir que, la activación de la microglia sigue un patrón similar al observado en los componentes analizados previamente en respuesta a la exacerbación periférica.

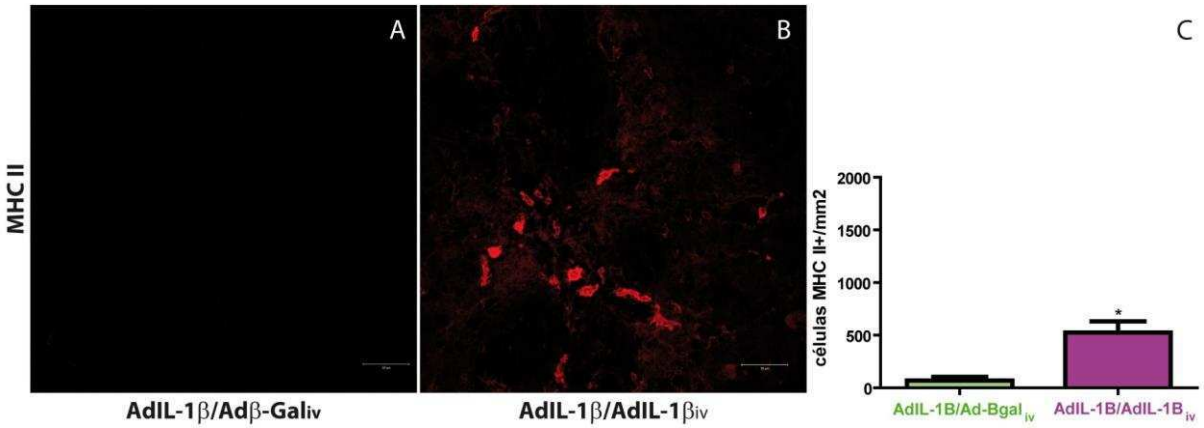


Figura II.1.8. Análisis de la respuesta de los macrófagos/microglia 4. (A) Fotografía representativa de los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$, se observaron escasas células MHCII+. **(B)** Los animales AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ presentaron mayor cantidad de células MHCII+. **(C).** El análisis cuantitativo del marcador demostró que el grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ presentaba aproximadamente siete veces más células MHCII+, que los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$. Test t de Student no pareado * p < 0.05. N = 5/grupo. Barra = 50 μm

No se observó activación de ninguna de las células gliales en los CE contralaterales a la inyección, ni en los animales del grupo Adβ-gal/Adβ-gal (excepto por una pequeña cicatriz en el sitio de inyección).

II.1.G Efecto de la exacerbación periférica sobre la expresión de citoquinas y quemoquinas en el CE

Con el objetivo de comprender mejor el mecanismo involucrado en la exacerbación de la lesión central a partir de la expresión prolongada de IL-1β en la periferia, analizamos la expresión de algunas citoquinas y quemoquinas en los CE ipsilaterales a la inyección central, mediante la técnica de qRT-PCR en tiempo real. El experimento se realizó según el protocolo detallado en la figura II.1.1, y se verificó que el efecto del AdIL-1β periférico hubiese funcionado en cada caso mediante el recuento leucocitario al día 5 después de la inyección endovenosa (Figura II.1.9 A).

En primer lugar se evaluó el rol de la citoquina IL-1β en la exacerbación de la lesión central (Figura II.1.9 B). Se observó un aumento significativo del mARN de IL-1β en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} (219,4 ± 25,69) con respecto a lo observado tanto para el grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ (84,98 ± 39,62; $p \leq 0,01$), como para el grupo Adβ-gal/AdIL-1β_{iv} (2,5 ± 0,85; $p \leq 0,001$). Este resultado demuestra que la lesión secundaria generada por la expresión crónica de IL-1β en la periferia, involucra la re-expresión de esa misma citoquina dentro del sitio donde se indujo la injuria originalmente.

Por otro lado, también nos interesó estudiar la expresión de otra importante citoquina pro-inflamatoria asociada a varias enfermedades neurodegenerativas, y a la esclerosis múltiple en particular (ver introducción): el factor de necrosis tumoral alpha (TNF-α). Dentro del SNC, la expresión de esta citoquina no está asociada a la de IL-1β, como ocurre en las respuestas inmunológicas fuera del SNC (ver introducción). Nuestros resultados demuestran que el TNF-α también aumenta su expresión en los animales AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} (12,25 ± 2,22), con respecto a los del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ (3,4 ± 0,85; $p \leq 0,001$) y Adβ-gal/AdIL-1β_{iv} (0,4863 ± 0,07; $p \leq 0,001$), lo cual indicaría que esta citoquina también intervendría en la exacerbación de la lesión central (Figura II.1.9 C).

Finalmente, considerando que varios trabajos en bibliografía han asociado lesiones desmielinizantes en varios modelos experimentales con el receptor 2 de quemoquinas con motivo CXC (CXCR2) (ver introducción), decidimos estudiar su participación en nuestro modelo de exacerbación por inflamación periférica. Observamos que la expresión de CXCR2 también aumenta en los animales AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} (40,71 ± 4,97), con respecto a los del grupo AdIL-

1β/Adβ-gal$_{iv}$ (20 ± 9,47; p ≤ 0,05) y Adβ-gal/AdIL-1β$_{iv}$ (1,05 ± 0,52; p ≤ 0,001), lo cual indicaría que este receptor podría participar en la exacerbación de la lesión central (Figura II.1.9 D).

Ninguna de las moléculas estudiadas presentó un aumento en su expresión para el grupo de animales inyectados en ambas oportunidades con el adenovector control.

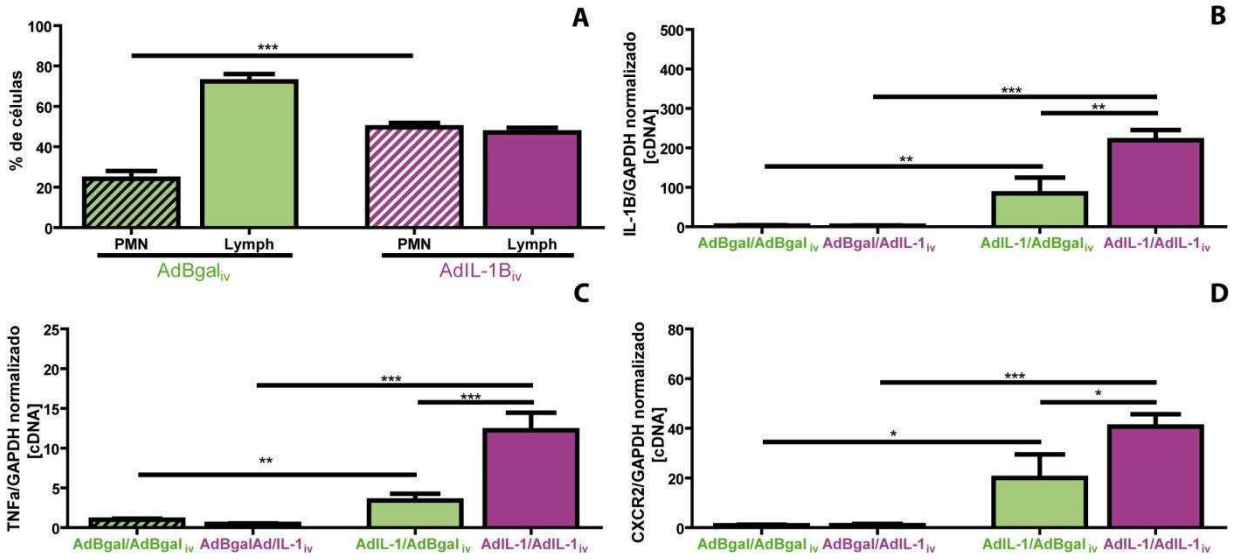


Figura II.1.9. El estímulo pro-inflamatorio periférico de largo término induce un aumento en la expresión de algunas citoquinas y quemoquinas. (A) El recuento leucocitario de los frotis realizado al día 5 comprueban la efectividad del estímulo pro-inflamatorio periférico. Test t de Student no pareado. **(B)** Al analizar la expresión de IL-1β se observó que hay un aumento significativo de la citoquina en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ con respecto a la cantidad expresada en el grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ y al grupo Adβ-gal/AdIL-1β$_{iv}$ (ANOVA de dos factores de los datos transformados [raíz cuadrada]; Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*). **(C)** Al examinar la expresión de TNF se observó un aumento de aproximadamente 3 veces para el grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ con respecto al AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ (ANOVA de dos factores de los datos transformados [Ln]; Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*). **(D)** La expresión de CXCR2 también tuvo un aumento significativamente mayor en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ (ANOVA de dos factores de los datos transformados [Ln]; Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. N = 6/grupo.

En conclusión, la expresión crónica de IL-1β en forma periférica, indujo la exacerbación de la lesión central preexistente. Este estimulo secundario generó una lesión secundaria con re-activación de la inflamación, la desmielinización, el daño axonal, la activación glial y la expresión de IL-1β. Además, también se observó un aumento en la expresión de otras moléculas relacionadas con la inflamación como TNF-α y CXCR2.

II.2 Posibles mecanismos involucrados en la exacerbación de la lesión central pre-existente

Con el objetivo de comprender mejor los resultados obtenidos en la sección anterior, nos propusimos investigar algunos de los mecanismos a través de los cuales la información del estímulo pro-inflamatorio periférico podría estar llegando al SNC. Para ellos estudiamos la expresión de citoquinas en ciertos órganos periféricos, en el hipotálamo, y el la permeabilidad de la BHE.

II.2.A Órganos periféricos

Numerosos artículos han descrito el rol de algunos órganos periféricos podrían en la expresión de citoquinas en el SNC (ver introducción). Para estudiar el rol de estos órganos periféricos en la respuesta observada en central inyectamos animales con los adenovectores en la vena de la cola. A estos animales se les extrajo sangre para realizar el frotis sanguíneo, para comprobar la efectividad del estímulo periférico. A los 5 días post inyección, los animales se sacrificaron y los órganos (hígado, glóbulos blancos y bazo) fueron procesados para RT-qPCR.

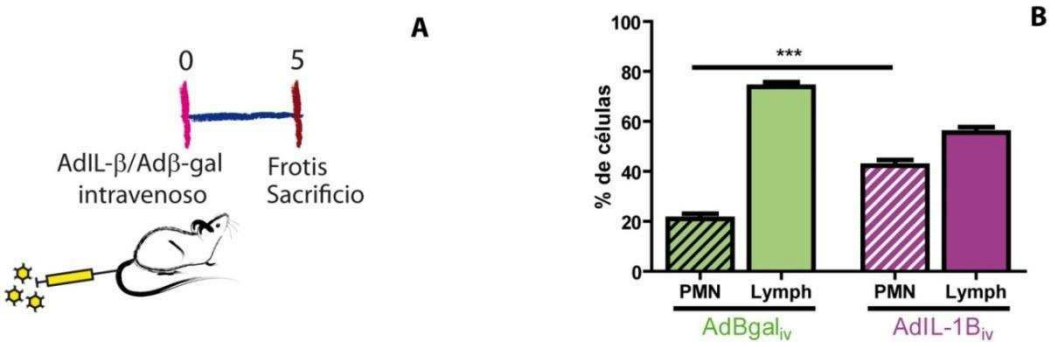


Figura II.2.1. Caracterización del estímulo periférico. (A) Ratas *Wistar* macho de entre 8-10 semanas fueron inyectadas con los adenovectores en la vena de la cola. Al día 5 los animales fueron decapitados, y sus órganos fueron procesados para RT-PCR. Como control del estímulo periférico se tomaron muestras de sangre antes del sacrificio de los animales. **(B)** Se comprobó el correcto funcionamiento del estímulo periférico, ya que se observó una inversión en la formula leucocitaria, habiendo un aumento significativo en la cantidad de neutrófilos PMN en los animales inyectados con el AdIL-1β_{iv} (Test t de Student no pareado). *** $p \leq 0{,}001$.

En primer lugar quisimos evaluar la respuesta del hígado luego de la inyección endovenosa del AdIL-1β. Para ello analizamos la expresión de citoquinas en el hígado. Los animales que recibieron el AdIL-1β endovenoso presentaron un aumento de aproximadamente 2,5 veces en la expresión de IL-1β (Figura II.2.2 A; $p \leq 0{,}001$). Este grupo presentó, además, un aumento de 3 veces en la expresión de IL-6 (Figura II.2.2 C; $p \leq 0{,}001$). No se observaron diferencias significativas de TNF-α entre los grupos estudiados (Figura II.2.2 B; $p = 0{,}31$).

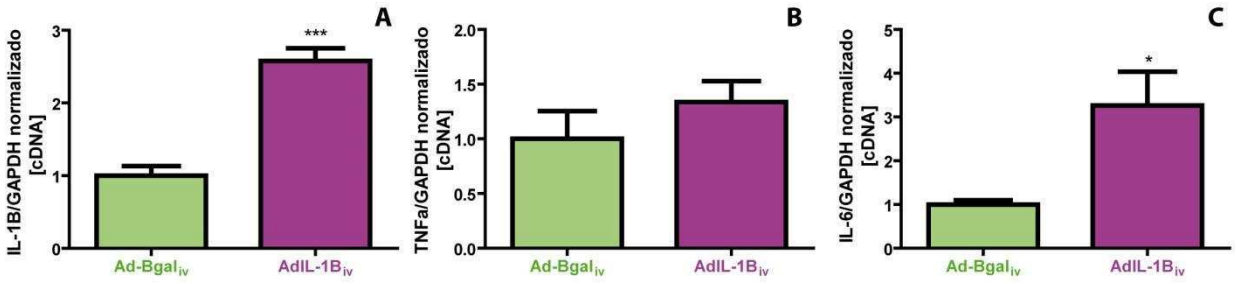


Figura II.2.2. Efecto del estímulo periférico sobre la expresión de citoquinas en el hígado. (A). Se observó una diferencia significativa en la expresión de IL-1β en los animales inyectados vía endovenosa con el AdIL-1β (Test t de Student no pareado). **(B)** No se observaron diferencias significativas en la expresión de TNF-α (Test t de Student no pareado). **(C)** Los animales del grupo AdIL-1β_{iv} tuvieron una expresión significativamente más alta de IL-6 que los animales inyectados con el adenovector control (Test t de Student no pareado con corrección de Welch). * $p \leq 0{,}05$; *** $p \leq 0{,}001$. N = 5-8/grupo.

En segundo lugar realizamos un análisis de la expresión de varias citoquinas en leucocitos aislados de sangre (glóbulos blancos). En este caso pudimos observar una diferencia importante en la expresión de todas las citoquinas analizadas, siendo mayor la expresión en los animales del grupo AdIL-1β_{iv} (Figura II.2.3). IL-1β y TNF-α presentaron una expresión 60 veces más grande para el grupo AdIL-1β_{iv} ($p \leq 0{,}001$) (Figura II.2.3 A y B). En el caso de IL-6, el mensajero de esta citoquina sólo se pudo detectar en los animales inyectados con el AdIL-1β.

(Figura II.2.3 C) Por lo tanto, se puede observar una diferencia importante en la expresión de todas las citoquinas analizadas, siendo mayor su expresión en los animales del grupo AdIL-1β_{iv} (Figura II.2.3).Cabe destacar que para realizar el análisis en leucocitos, no se pudo encontrar un gen *housekeeping* que no variara con el tratamiento. Sin embargo los resultados fueron iguales cuando se normalizaron los valores de las citoquinas a cuatro diferentes genes *housekeeping*, y a un promedio de todos ellos. Este último valor fue el que se utilizó para ilustrar los resultados en la figura que se encuentra a continuación.

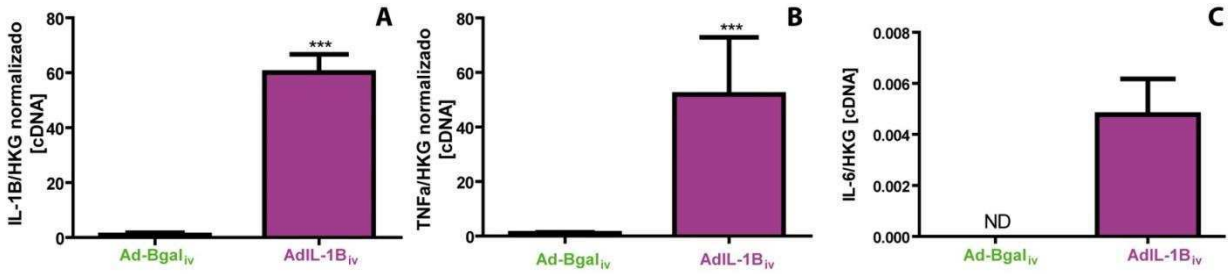


Figura II.2.3. Efecto del estímulo periférico sobre la expresión de citoquinas en leucocitos. (A). Se observó una diferencia significativa en la expresión de IL-1β en los animales inyectados por vía endovenosa con el AdIL-1β (Test t de Student no pareado con corrección de Welch). **(B)** También se vio un aumento en la expresión de TNF-α en los leucocitos (Test t de Student no pareado de los datos transformados [Ln]). **(C)** Los animales del grupo AdIL-1β_{iv} tuvieron expresión IL-6, mientras que no se pudo detectar su expresión en los animales inyectados con el adenovector control. *** $p \leq 0{,}001$. N = 5-8/grupo.

Otro de los órganos que nos pareció interesante evaluar fue el bazo, órgano involucrado con las respuestas inmunológicas, y que interviene en la síntesis de citoquinas frente a diversos procesos inflamatorios periféricos. En este caso también nos resultó imposible encontrar un gen *housekeeping* cuya expresión no se viera modificada por el tratamiento. Nuevamente el resultado fue el mismo cuando se relativizó la expresión de las citoquinas con cuatro de los genes *housekeeping.* Sin embargo, los resultados normalizados con el gen TBP, demostraron que no existe una diferencia significativa en la expresión de IL-1β ni TNF-α, tal como se observa en la figura II.2.4.

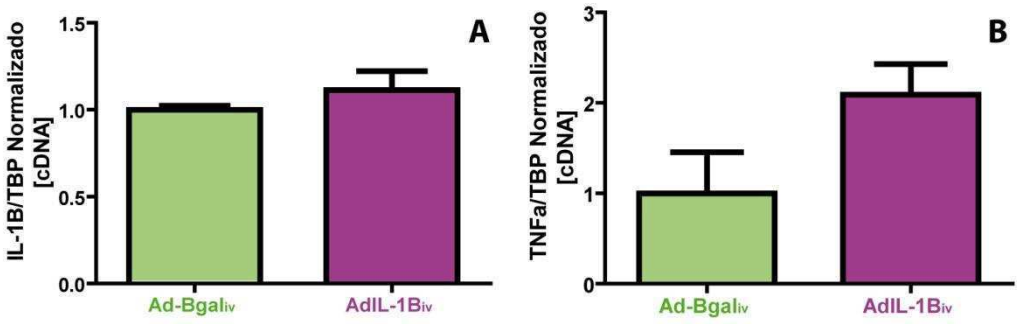


Figura II.2.4. Efecto del estímulo periférico sobre la expresión de citoquinas en bazo. (A). No se observó diferencia significativa en la expresión de IL-1β en los animales inyectados por vía endovenosa con el AdIL-1β (Test t de Student no pareado con corrección de Welch). **(B)** Tampoco se vio un aumento en la expresión de TNF-α en los leucocitos (Test de Mann Whitney). N = 5-8/grupo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta sección se puede concluir que efectivamente la expresión crónica de IL-1β en la periferia produjo un aumento de la expresión de algunas citoquinas en varios de los tejidos analizados. Estos cambios podrían estar involucrados en el efecto observado a nivel del SNC.

II.2.B Vía hipotalámica

Numerosos trabajos han demostrado que estímulos pro-inflamatorios sistémicos inducen la expresión de citoquinas y otras moléculas inflamatorias en el hipotálamo (ver introducción) Al analizar la expresión de algunas citoquinas luego del estímulos pro-inflamatorio periférico, observamos que el AdIL-1β inyectado en forma endovenosa produjo un aumento en la expresión de esa misma citoquina en el hipotálamo (Figura II.2.5; $p \leq 0,05$). Por otro lado, no se observó aumento alguno en la expresión de TNF-α ($p = 0,79$), ni IL-6 ($p = 0,35$).

Este resultado indicaría que efectivamente se produjo un aumento en la expresión del mARN de IL-1β en el hipotálamo como resultado de la inyección endovenosa con el AdIL-1β, y que este fenómeno podría estar relacionado con la exacerbación de la lesión central.

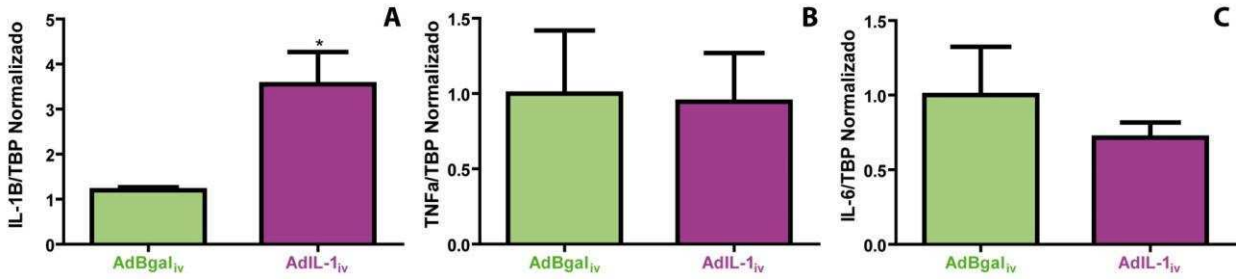


Figura II.2.5. Efecto del estímulo periférico sobre la expresión de citoquinas en el hipotálamo. (A). Se observó una diferencia significativa en la expresión de IL-1β en los animales inyectados por vía endovenosa con el AdIL-1β (Test t de Student no pareado con corrección de Welch). **(B)** No se observaron diferencias en la expresión TNF-α en el hipotálamo (Test de Mann Whitney). **(C)** Tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión de IL-6 (Test t de Student no pareado. * $p \leq 0,05$. N = 5-8/grupo.

II.2.C ¿Cómo ingresa la señal desde la periferia al SNC? Integridad de la BHE.

Como se ha explicado anteriormente existen diferentes vías por las cuales señales de la periferia ingresan al SNC. El siguiente paso fue tratar de dilucidar la manera en la cual ingresa la señal periférica al SNC. La BHE es una de las principales vías de entradas de señales periféricas, por ello evaluamos el estado de la BHE al día 30, momento en el cual se realizó la inyección del estímulo periférico. Para ello utilizamos nuevamente de la técnica de Hanker-Yates.

Como se observa en la figura II.2.6, la BHE se encuentra dañada al momento de la inyección del adenovector en la vena de la cola (día 30, diseño experimental 3), por lo tanto la BHE se encuentra permeable al momento de la inyección del adenovector y las señales, o incluso el adenovector, podrían ingresar al SNC a través de esta vía. Por otro lado, quisimos averiguar en qué momento la BHE recuperaba por completo su integridad. Para ello, analizamos ratas sacrificadas 37 o 42 días después de una única inyección del AdIL-1β en el CE. Las ratas de inyección única 37 días todavía presentaban cierto grado de daño de la BHE (datos no mostrados), pero el grupo de animales perfundidos 42 dpi mostraron que a ese tiempo la BHE se encontraba completamente restaurada.

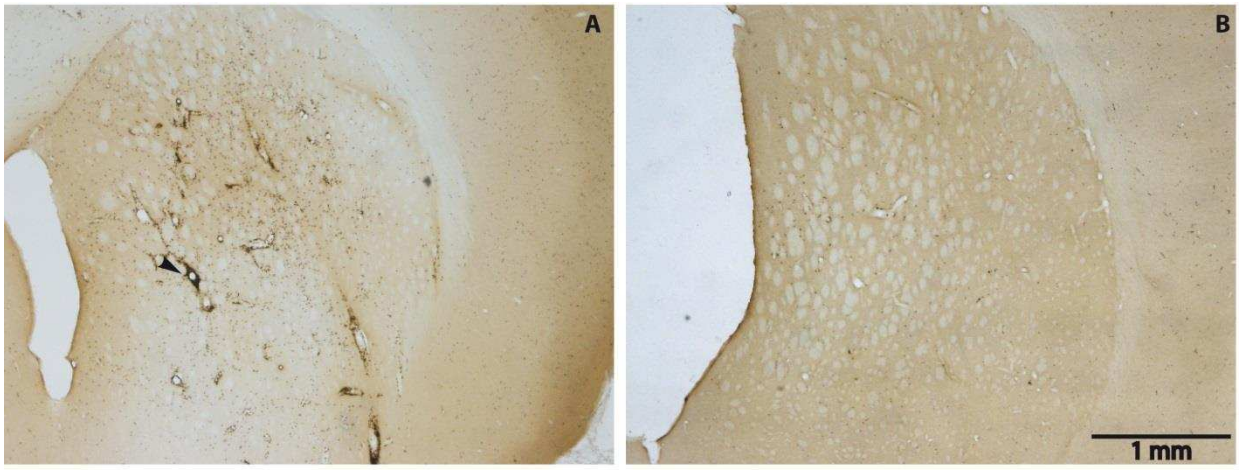


Figura II.2.6. Fotografías representativas de cortes expuestos a la técnica de Hanker-Yates para estudiar la integridad de la BHE. La enzima HRP inyectada en forma endovenosa sólo es capaz de ingresas al sistema nervioso cuando la BHE se encuentra dañada. **(A)** Los animales del grupo inyección única 30 días presentaron daño en la BHE. **(B)** La integridad de la BHE se halla completamente restaurada al día 42. Barra = 1 mm.

II.3 La inflamación periférica exacerba la lesión central, aun con la BHE intacta

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el diseño experimental 3, y considerando que al momento de la inyección del estímulo periférico la BHE se encontraba abierta (como se describió en la sección anterior), decidimos poner a prueba la hipótesis con un nuevo diseño experimental en el cual la BHE esta restaurada al momento de la inyección del estímulo periférico (Figura II.3.1). Para ello inyectamos el adenovector por vía endovenosa al día 42, cuando la BHE se encontraba completamente recuperada **(diseño experimental 4)**.

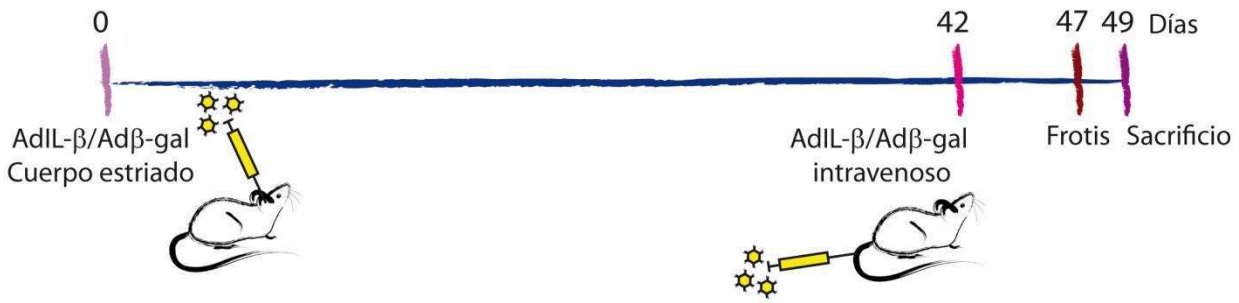


Figura II.3.1. Protocolo de inyección para el diseño experimental 4. Ratas *Wistar* macho de entre 8-10 semanas de edad fueron inyectadas con los adenovectores en el CE al día 0. Al día 42 los animales fueron inyectados con el AdIL-1β o el adenovector control en forma endovenosa. Como control del estímulo periférico se tomaron muestras de sangre al día 47. Los animales fueron perfundidos 49 días luego de la inyección central, y sus cerebros procesados para análisis posteriores.

II.3.A Respuesta inflamatoria el estímulo pro-inflamatorio periférico

En el diseño experimental propuesto se observó una exacerbación de la respuesta inflamatoria en el CE (Figura II.3.2B). En estos animales también se confirmó la efectividad de la inyección endovenosa con el AdIL-1β iv había sido efectiva (Figura II.3.2 A). Se observó un aumento significativo en el VI del grupo AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} (VI = 33,41 ± 1,51) cuando se lo comparó con el resto de los grupos (VI = 3,06 ± 1,18 para AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$, VI = 0,39 ± 0,07 para Adβ-gal/AdIL-1β_{iv}) ($p \leq 0,01$). Es decir que el estímulo pro-inflamatorio periférico producía una exacerbación de la lesión central, incluso cuando era aplicado con la BHE intacta.

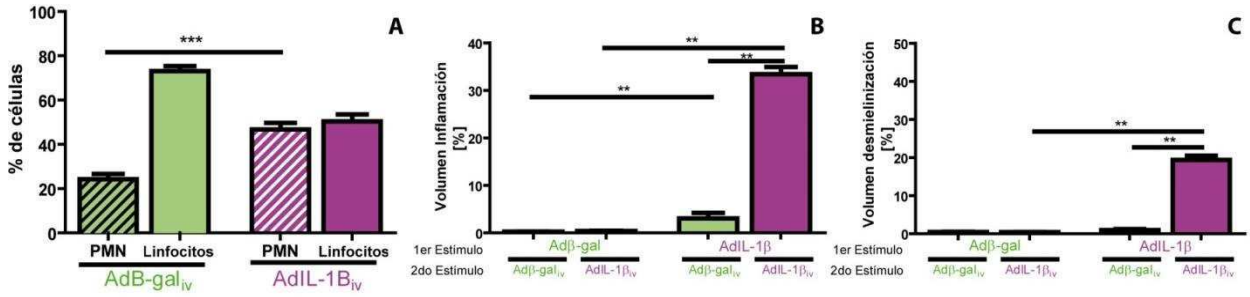


Figura II.3.2. El estímulo pro-inflamatorio periférico aplicado con la BHE intacta también exacerbó la lesión central. (A) La expresión periférica a largo término de IL-1β indujo un aumento del porcentaje de neutrófilos PMN 5 días después de la inyección iv (Test t de Student no pareado). **(B)** Análisis de la inflamación en los cortes teñidos con violeta de cresilo. Al medir el VI se observó una exacerbación del volumen de inflamación en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} (ANOVA de dos factores no paramétrico de los datos ranqueados; Análisis de la varianza por contrastes como test *post-hoc*). **(C)** El análisis de los VD se realizó a partir de los cortes seriados teñidos con Red Oil O. Para la desmielinización también se observó una diferencia significativa para el grupo AdIL-1β/AdIL-1β_{iv}, que presentó una mayor desmielinización (ANOVA de dos factores no paramétrico de los datos ranqueados; Análisis de la varianza por contrastes como test *post-hoc*). ***$p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$. N = 5-6/grupo.

En los grupos de animales donde se utilizó el adenovector control como estímulo central, no se observó una respuesta inflamatoria. Teniendo en cuenta estos resultados, muchos de los análisis posteriores fueron realizados solamente para los grupos que recibieron el AdIL-1β como estímulo central.

Al realizar un análisis más detallado de la respuesta inflamatoria en los dos grupos de mayor relevancia observamos que los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ casi no presentaron una respuesta inflamatoria. No se observó vasodilatación, desorganización del parénquima nervioso, ni edema en el CE como se muestra en las fotografías representativas, (Figura II.3.3 A). Se pudieron observar algunas células marginadas en el lumen de algunos vasos sanguíneos, o así también algunas células inflamatorias ubicadas en la periferia de los mismos. Se encontraron pocos leucocitos en el parénquima nervioso. En este caso, el componente celular principal se identificó como macrófagos/microglia tipo 4 (flechas blancas, Figura II.3.3 B), aunque también se evidencian algunos neutrófilos PMN.

Los animales que recibieron el AdIL-1β en ambas oportunidades tuvieron una respuesta inflamatoria importante que ocupó gran parte del CE e incluso también parte de las zonas adyacentes. Se observa un abundante infiltrado inflamatorio, con zonas edematizadas, además de una importante vasodilatación (Figura II.3.3 C). El componente celular principal del infiltrado inflamatorio son los neutrófilos PMN (puntas de flecha negras, Figura II.3.3 D), que se encuentran tanto en los vasos (marginados y perivasculares), como en el edema y en el parénquima nervioso.

En todos los casos, el hemisferio contralateral a las inyecciones mantiene su morfología normal, sin evidenciar signos de inflamación o desorganización del parénquima.

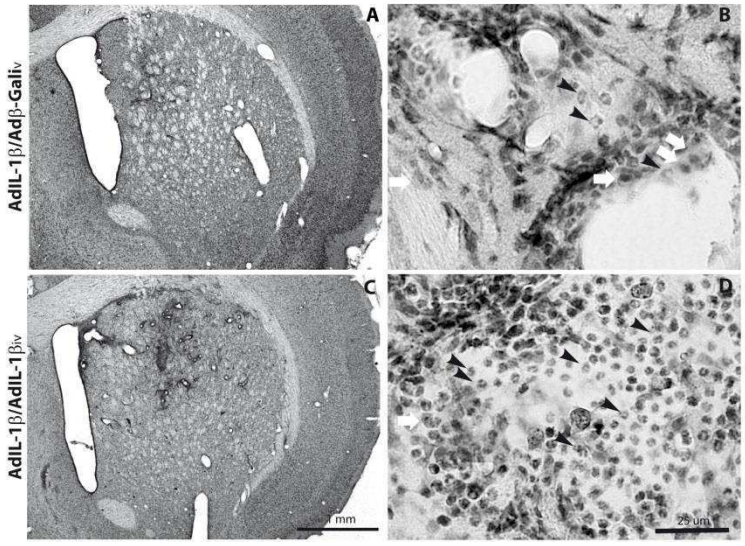


Figura II.3.3. Fotografías representativas de cortes teñidos con violeta de cresilo. (A) Los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ presentan escaso infiltrado inflamatorio, **(B)** En un detalle de la fotografía anterior se observa que las células que componen el infiltrado tienen en su mayoría morfología de macrófagos (flechas blancas), aunque también se ven algunos neutrófilos PMN (puntas de flecha negras). **(C)** El grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ tiene una importante respuesta inflamatoria, con una gran desorganización del parénquima nervioso, zonas de edema, y vasodilatación. **(D)** A mayor aumento se evidencia que el componente celular principal del infiltrado son los neutrófilos PMN. Barra (A y C) = 1 mm. Barra (B y D) = 25 μm.

En la siguiente tabla se sintetizan los resultados obtenidos en cuanto a la caracterización de la inflamación en el CE, para los animales de los grupos de mayor relevancia del diseño experimental 4.

	Inflamación	Edema	Tipos celulares	Vasodilatación
AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$	+	No	+ PMN ++ Macrófagos	+
AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$	+++	Si	+++ PMN ++ Macrófagos	+++

II.3.B Dinámica de la desmielinización

Con el objetivo de analizar el efecto del estímulo pro-inflamatorio periférico sobre la desmielinización, realizamos el análisis de los cortes teñidos con Red Oil-O. Cualitativamente se observa una exacerbación de la desmielinización en los animales del grupo AdIL-β/AdIL-1β$_{iv}$,

mientras que los animales que recibieron el Adβ-gal iv casi no presentaron signos de desmielinización (Figura II.3.4), sólo se observó una tinción más leve en algunos cortes.

La cuantificación del volumen de desmielinización verificó el resultado descripto anteriormente: los animales AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ tuvieron un VD mucho mayor (VD = 19,38 ± 1,1) que los otros grupos, los cuales prácticamente no presentaron signos de desmielinización ($p < 0.05$ para AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ contra AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ o Adβ-gal/AdIL-1β$_{iv}$) (Figura II.3.2 B).

No se observan alteraciones de la mielina en los estriados contralaterales de ninguno de los grupos analizados.

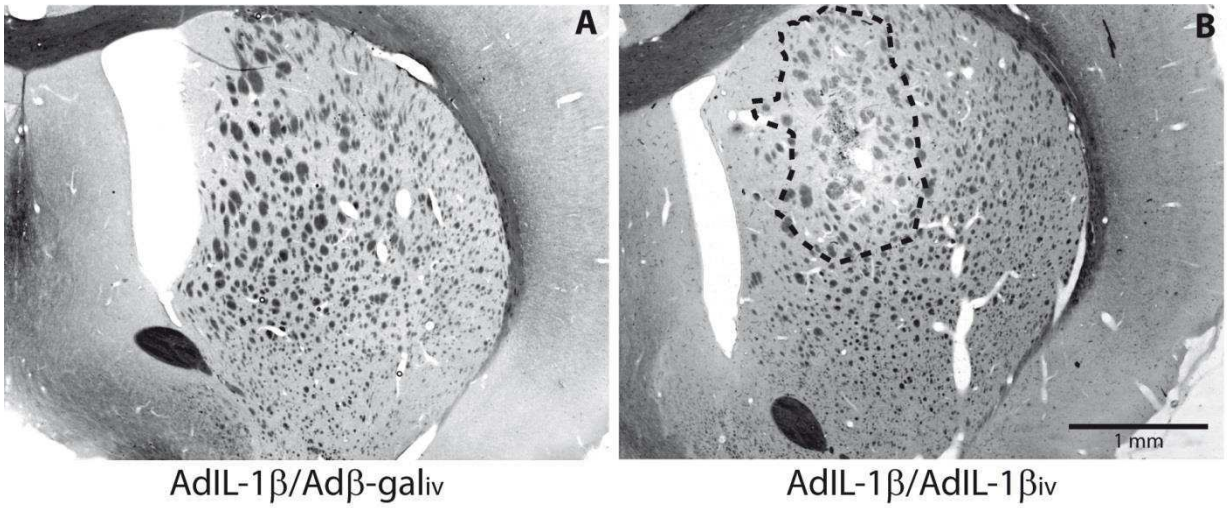


Figura II.3.4. Fotografías representativas de cortes teñidos con Red Oil O de los grupos más relevantes. (A) Los animales del AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ no presentaron signos de desmielinización. **(B)** El grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ tiene una extensa área de desmielinización, que se observa en la fotografía como la zona marcada con una línea punteada. Barra = 1 mm.

II.3.C Daño axonal luego de la exacerbación periférica

A continuación quisimos evaluar el efecto de la expresión crónica de IL-1β en la periferia con la BHE cerrada, sobre la integridad axonal. Para ello utilizamos el anticuerpo contra el precursor de la proteína β amiloide (APP).

Se observaron axones APP + tanto en cortes de los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ (Figura II.3.5 A) como en los del grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ (Figura II.3.5 B). En ambos grupos experimentales se pudieron reconocer los clásicos aspectos morfológicos de axones en degeneración: pequeños engrosamientos (puntas de flecha blancas), grandes estructuras del tipo esferoidales de las terminaciones axónicas (puntas de flecha negras), y fibras con varicosidades (cuentas de rosario) (flechas negras) (detalle Figura II.3.5 A y B). Sin embargo, a pesar de que ambos grupos presentaban similitudes en cuanto a la morfología de los axones en degeneración, los animales que recibieron el AdIL-1β en ambas oportunidades tenían más axones positivos para el marcador APP (Figura II.3.5 B).

No se observaron axones APP + en ninguno de los CE contralaterales a la inyección, confirmando que la marca observada en los CE ipsilaterales resultaba específica para la degeneración axonal.

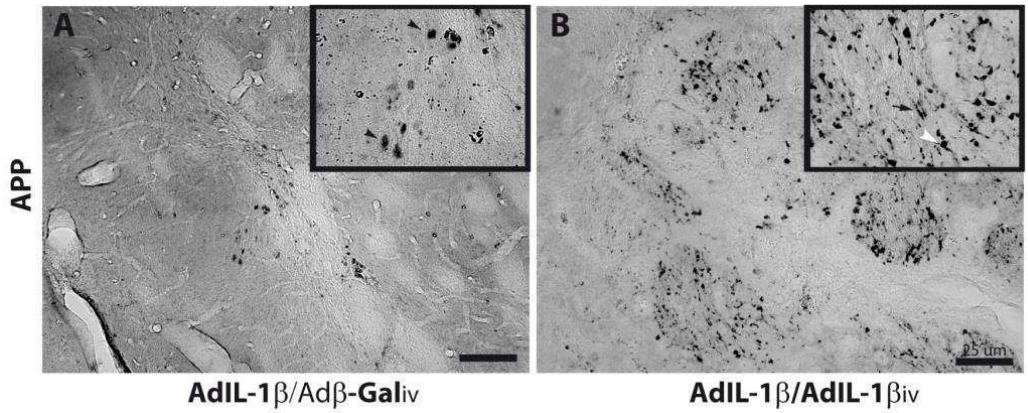


Figura II.3.5. Análisis de la integridad axonal con el marcador APP. (A) Se identificó daño axonal en los animales AdIL-1βl/Adβ-gal$_{iv}$. **(B)** En las secciones del grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ se observaron mayor número de axones APP +. En los detalles de las fotografías se pueden identificar las diferentes morfologías de los axones en degeneración: pequeños engrosamientos (puntas de flecha blancas), grandes estructuras del tipo esferoidales de las terminaciones axónicas (puntas de flecha negras), y fibras con varicosidades (cuentas de rosario) (flechas negras). N = 3-4/grupo. Barra: 25μm.

II.3.D Efecto del AdIL-1β$_{iv}$ sobre la activación glial

Como vimos en las secciones anteriores, los eventos inflamatorios dentro del SNC muchas veces involucran una activación de las células gliales. Para estudiar la participación de la micro y astroglia en este modelo de exacerbación de una lesión central a partir de un estímulo pro-inflamatorio periférico utilizamos como marcadores el GFAP y el MHCII.

Un análisis cualitativo de la expresión de GFAP y de la morfología astroglial observamos una leve activación de la astroglia en los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$, que se evidenció como un sutil aumento de la expresión de GFAP, y la presencia de algunas células astrogliales con procesos engrosados (Figura II.3.6 A). Por otro lado, los animales AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ presentaron una astrocitosis más intensa y evidente, la cual abarcó una proporción mayor del CE (mayor número de cortes), y presentó más células con características típicas de la astroglia activada (Figura II.3.6 B). Estos resultados indican que el grado de astrocitosis sigue el curso de lo descripto para la inflamación y la desmielinización.

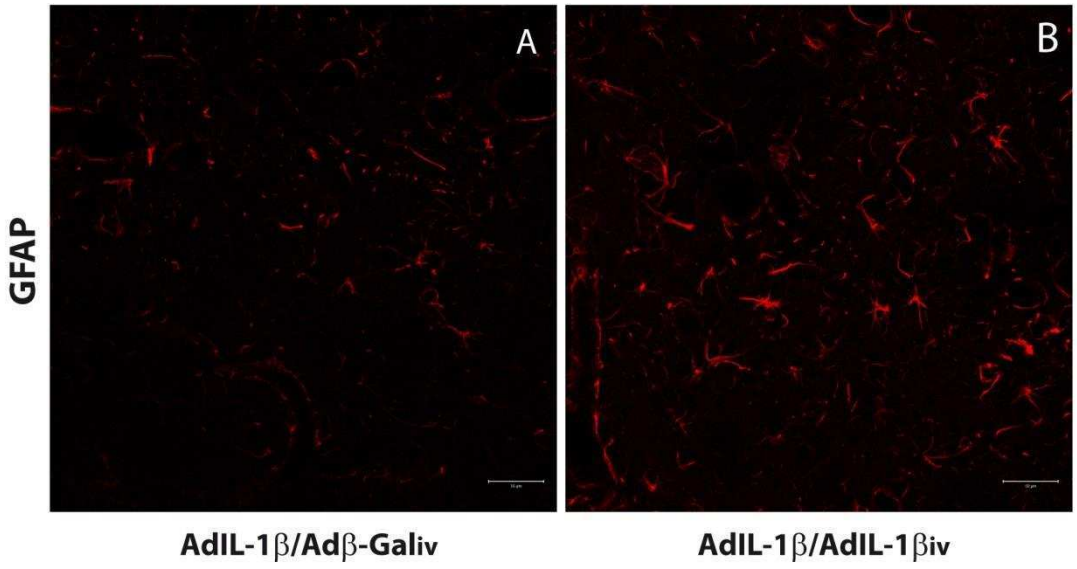


Figura II.3.6. Análisis de la activación astroglial con el marcador GFAP. Fotografías representativas de los grupos de mayor relevancia. (A) En los animales inyectados con el estímulo pro-inflamatorio únicamente en el CE se observó una escasa activación de las células astrogliales. **(B)** Los animales que recibieron el estímulo pro-inflamatorio en ambas oportunidades presentaron aún más activación astroglial, observada como una marca GFAP más conspicua y mayor número de células con morfología activada. Barra = 50 μm.

La activación de la microglia en respuesta a un estímulo periférico cuando la BHE estaña intacta, se estudió con el anticuerpo MHCII. Los estriados de los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ casi no presentan células MHCII + (Figura II.3.7 A), sin embargo, se observaron muchas células positivas para este marcador en los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ (Figura II.3.7 B). La cuantificación del número de células MHCII + a lo largo del CE ipsilateral a la lesión central, demostró que los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ presentaban un número significativamente mayor (1653,00 ± 143,4) que el observado en los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ (250,2 ± 126,8; p ≤ 0,001) (Figura II.3.7 B).

Es decir que la respuesta inmunológica microglial siguió un patrón similar al observado en el resto de los parámetros analizados como respuesta al estímulo pro-inflamatorio periférico.

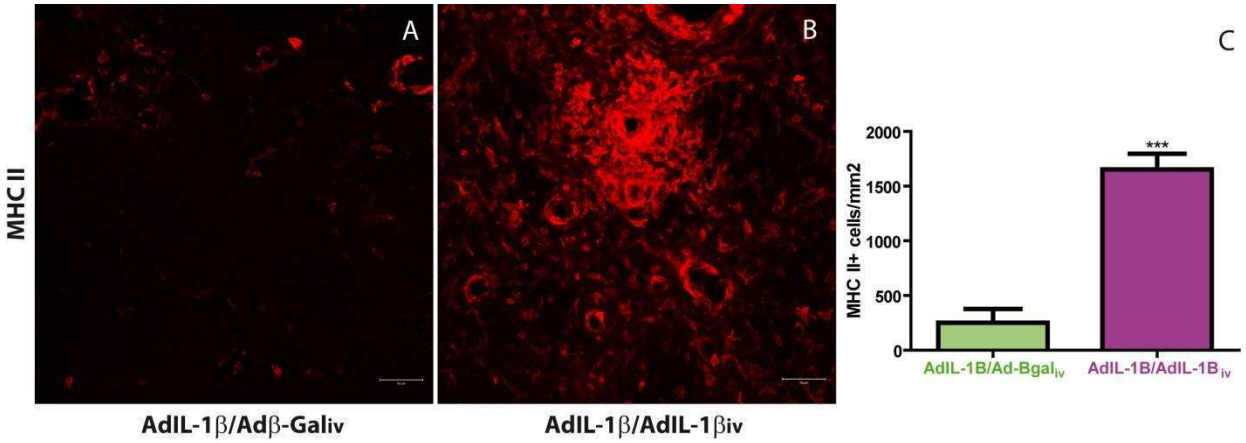


Figura II.3.7. Análisis de la respuesta de los macrófagos/microglia tipo 4. (A) Fotografía representativa de los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$. Se observaron algunas células MHCII+. **(B)** Los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ presentaron mayor cantidad de células positivas para el marcador analizado. **(C).** El análisis cuantitativo demostró que el grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ contenía aproximadamente siete veces más células MHCII+, que los animales del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$. Test t de Student no pareado *** $p < 0.001$. N = 5-7/grupo. Barra = 50 μm.

No se observó activación de la astro o microglia en los CE contralaterales a la inyección, ni en los animales del grupo Adβ-gal/Adβ-gal (excepto por una pequeña cicatriz en el sitio de inyección).

II.3.E Efecto del estímulo periférico con la BHE cerrada sobre la expresión de citoquinas y quemoquinas en el CE

Como realizamos previamente en la sección II.1.F, realizamos un análisis de la expresión de algunas citoquinas y quemoquinas en el CE ipsilateral a la inyección central utilizando la técnica de qRT-PCR en tiempo real. El experimento se realizó siguiendo el protocolo detallado en la figura II.3.1. Como describimos anteriormente el efecto del AdIL-1β periférico se verificó mediante el recuento leucocitario al día 5 después de la inyección endovenosa (Figura II.3.8 A).

Para evaluar el rol de IL-1β en la exacerbación de la lesión central a partir de la expresión crónica de esta misma citoquina en la periferia cuando la BHE se encontraba cerrada, investigamos la expresión de su mensajero (Figura II.3.8 B). Observamos que había un aumento significativo del mARN de IL-1β en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} (833,3 ± 239,7) con respecto al observado tanto para el grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ (1,62 ± 0,46; $p \leq 0,001$) como para el grupo Adβ-gal/AdIL-1β_{iv} (25,87 ± 6,13; $p \leq 0,001$). Este resultado demuestra que la lesión secundaria generada por la expresión crónica de IL-1β en la periferia, involucra la re-expresión de esa misma citoquina dentro de la injuria.

Al estudiar la expresión de TNF-α (Figura II.3.8 C) demostramos que su expresión esta aumentada en los animales AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} (18,44 ± 4,97), con respecto a los del grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ (1,44 ± 0,41; $p \leq 0,001$) y Adβ-gal/AdIL-1β_{iv} (1,77 ± 0,49; $p \leq 0,001$). Por lo tanto, esta citoquina también jugaría un papel en la exacerbación de la lesión central.

Finalmente, analizamos el receptor de quemoquinas CXCR2. La expresión del mensajero de CXCR2 fue significativamente mayor (50,17 ± 12,1) en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} que la observada en los grupos AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ (2,91 ± 1,55; $p \leq 0,001$) y Adβ-gal/AdIL-1β_{iv} (2,18 ± 0,47; $p \leq 0,001$). Este resultado indica que, para el presente diseño experimental dónde el estímulo periférico se aplica con la BHE cerrada, también existe una relación entre este receptor y la exacerbación de la lesión central.

Ninguna de las moléculas estudiadas presentó un aumento en su expresión para el grupo de animales inyectados en ambas oportunidades con el adenovector control.

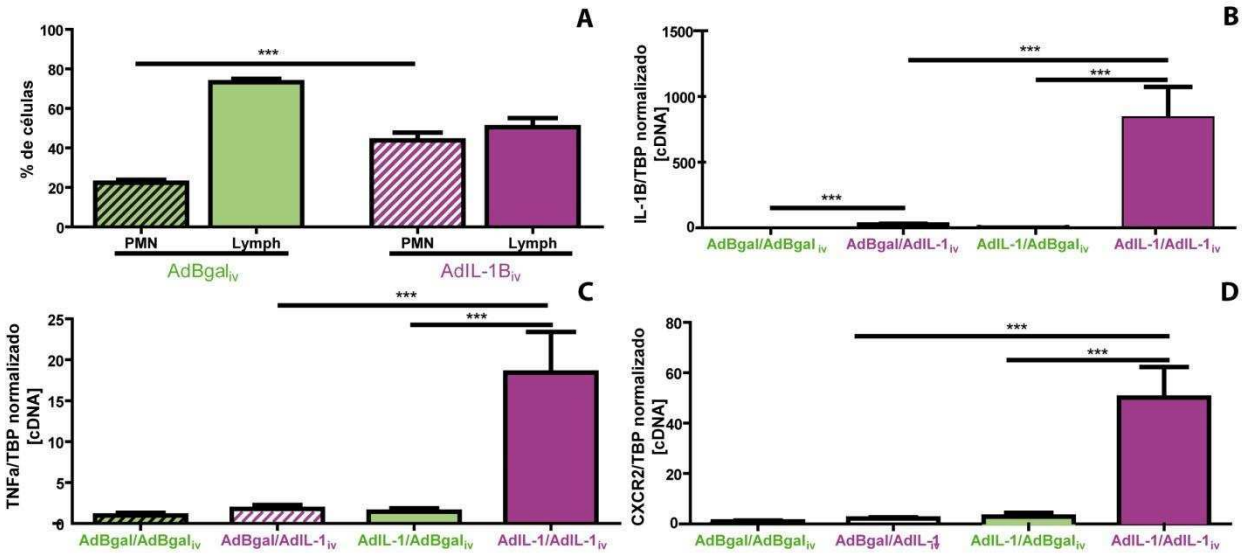


Figura II.3.8. El AdIL-1β periférico inyectado con la BHE cerrada induce un aumento en la expresión de algunas citoquinas y quemoquinas. (A) El recuento leucocitario de los frotis realizado al día 5 comprueba la efectividad del estímulo pro-inflamatorio periférico. Test t de Student no pareado. **(B)** Al analizar la expresión de IL-1β se observó que hay un aumento significativo de la citoquina en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ con respecto a la cantidad expresada en el grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ y al grupo Adβ-gal/AdIL-1β$_{iv}$ (ANOVA de dos factores de los datos transformados [Ln]; Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*). **(C)** Al examinar lo ocurrido para la expresión de TNF se observó un aumento de aproximadamente 3 veces para el grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ con respecto al AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ (ANOVA de dos factores de los datos transformados [Ln]; Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*). **(D)** La expresión de CXCR2 también tuvo un aumento significativamente mayor en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ (ANOVA de dos factores de los datos transformados [Ln]; Test de comparaciones múltiples Bonferroni *post-hoc*). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. N = 6/grupo.

En conclusión, la estimulación periférica exacerba la lesión central aun cuando la BHE está intacta. Esta exacerbación secundaria implicó una re-activación de la inflamación, la desmielinización, el daño axonal, la activación glial y la expresión de IL-1β. Además, también se observó un aumento en la expresión de otras moléculas relacionadas con la inflamación como TNF-α y CXCR2.

Discusión y Conclusiones

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En la presente tesis hemos estudiado el rol de estímulos inflamatorios secundarios sobre eventos primarios de neuroinflamación y desmielinización en el SNC. En particular, analizamos el rol de la expresión crónica de la citoquina IL-1β en este contexto. Estos resultados permitieron generar un modelo original para el estudio de eventos repetidos de neuroinflamación, a modo de lo que ocurre en la EM con recaídas y remisiones. Este modelo podría ser de gran utilidad para la comunidad científica a la hora de lograr una mejor comprensión de los mecanismos específicos involucrados en la generación y regulación de procesos asociados a situaciones patológicas. La expresión crónica de una única citoquina como estrategia permite comprender el potencial de la misma en la etiología de diferentes características distintivas de enfermedades asociadas a la neuroinflamación, como la EM. Por lo tanto, hemos desarrollado un modelo simple, que a pesar de no reproducir las características más complejas de la EM con recaídas y remisiones, contribuye a generar conocimiento acerca del rol de ciertos componentes moleculares (IL-1β, TNFα, IL-6, CXCR2) y celulares (neutrófilos, microglia/macrófagos, astrocitos).

1. Capítulo I: Estudio del efecto de un segundo estímulo pro-inflamatorio desmielinizante central sobre una lesión desmielinizante pre-existente

En el primer capítulo de la tesis se estudió el efecto de un segundo estímulo pro-inflamatorio crónico central sobre una lesión inflamatoria desmielinizante pre-existente en el cuerpo estriado de ratas adultas. Considerando que en la EM los sucesivos eventos de desmielinización conllevan a un remielinización deficiente y pérdida de funciones (Patrikios et al., 2006; Prineas et al., 1993), nuestra hipótesis inicial fue que la segunda inyección central con el AdIL-1β produciría un evento secundario exacerbado de neuroinflamación y, por lo tanto, podría afectar el proceso de remielinización.

Contrariamente a lo expuesto en la hipótesis, en los resultados obtenidos en este primer capítulo no observamos exacerbación de la neuroinflamación con ninguno de los diseños experimentales utilizados. De hecho comprobamos que si la re-exposición a IL-1β se producía durante el periodo de recuperación de la lesión primaria, se evidenciaba una lesión atenuada. Sin embargo, esta disminución en la respuesta inflamatoria no se observó cuando el segundo estímulo se aplicó una vez que la lesión primaria se hubo recuperado por completo.

1.1. Un segundo estímulo inflamatorio genera una lesión secundaria atenuada si es administrado cuando la lesión primaria está activa

Los animales re-inyectados durante el estadio 2 (30 días) de recuperación de la lesión primaria, mostraron una lesión secundaria con menos infiltrado inflamatorio y una expresión disminuida del RNAm de IL-1β comparada con los animales Adβ-gal/AdIL-1β.

La respuesta inflamatoria disminuida en el grupo AdIL-1β/AdIL-1β del diseño experimental 1 podría ser explicada por un fenómeno de taquifilaxis, en cual el tejido se desensibiliza frente a la estimulación repetida con la misma citoquina. La taquifilaxis refleja cierta reticencia del tejido a responder a un determinado estímulo cuando se lo administra

en forma repetida. Este fenómeno suele estar asociado a una desensibilización a las moléculas involucradas, y se ha observado frente a estímulos repetidos con factores pro-inflamatorios como el LPS (Cybulsky et al., 1988; Ulich et al., 1990), la histamina (Colditz, 1985), citoquinas (Janik et al., 1997; Ling et al., 1997; van Riemsdijk et al., 2001), o incluso combinaciones de los mismos. Resulta importante destacar que la variación observada para el mensajero de IL-1β se reflejó en una menor cantidad de la proteína IL-1β de rata (medido por ELISA, datos no mostrados).

Se ha observado además, que la taquifilaxis relacionada a la actividad biológica de IL-1, induce un disminución o retraso en la infiltración de neutrófilos PMN (Cybulsky et al., 1988), lo cual también ocurrió en nuestro modelo: solamente los animales que recibieron el AdIL-1β en ambas oportunidades presentaron menos neutrófilos PMN en el infiltrado inflamatorio, y esto refuerza la idea de una posible desensibilización a la acción de esta citoquina.

Aunque en la mayoría de los trabajos mencionados el fenómeno de desensibilización se observa dentro de un marco temporal de horas, debe tenerse en cuenta que en esos estudios los estímulos administrados produjeron respuestas inflamatorias agudas. En nuestro caso la expresión crónica de IL-1β podría generar una taquifilaxis con una dinámica alterada, e incluso podría involucrar mecanismos diferentes.

- **Posible rol de los receptores de IL-1**

Para que se produzca una desensibilización a IL-1β es necesario modificar una o varias de las moléculas o cascadas asociadas a la respuesta biológica de esta citoquina. Teniendo en cuenta el mecanismo de acción de IL-1β, en la sección I.4 de la presente tesis nos propusimos investigar la participación de variaciones diferenciales en la expresión de los receptores de IL-1 o IL-1ra. Varios trabajos han evidenciado variaciones en la expresión de estas moléculas en el SNC luego de estímulos inflamatorios. Se ha observado que la inyección intravenosa de IL-1β induce una disminución en la expresión de IL-1RI en células perivasculares del cerebro (Ericsson et al., 1995), mientras que una inyección ip (Turrin et al., 2001) o central de LPS (Stern et al., 2000) aumenta la expresión de este receptor en el

parénquima cerebral. Por otro lado, se observó un aumento en la expresión del IL-1RII como consecuencia de una inyección sistémica con kaianato (Nishiyori et al., 1997), o luego de una lesión isquémica (Wang et al., 1997).

Como primera aproximación decidimos comparar los niveles de expresión de IL-1RI, IL-1RII, e IL-1ra entre los grupos de inyección única 30 y 50 días, ya que la respuesta disminuida solo se observó cuando el segundo estímulo se realizaba al día 30. Aunque esperábamos encontrar una menor expresión de IL-1RI o un aumento de IL-1RII/IL-1ra, no pudimos observar diferencias significativas en los mensajeros de ninguna de las tres moléculas. Sin embargo, este resultado no nos permite descartar un posible rol de la disponibilidad de los receptores en la taquifilaxis observada, ya que la regulación de los mismos también se puede dar a nivel de traducción proteica, y a nivel de su localización (receptores de membrana o receptores solubles) (Dinarello, 1996). Más aun, sería relevante estudiar la expresión de estas moléculas en los diferentes tipos celulares del cerebro, ya que trabajos sobre la regulación de los receptores de IL-1 fuera del SNC han demostrado que se trata de una regulación dependiente del tipo celular y de la presencia o ausencia de determinados factores (p.e. IL-1 aumenta la expresión de IL-1RI en presencia de PGE2, pero la disminuye en células que no expresan este factor) (Takii et al., 1992; Takii et al., 1994).

A continuación, investigamos la expresión de los RNAm de IL-1RI, IL-1RII, e IL-1ra en los cuatro grupos del diseño experimental 1, con el objeto de analizar el rol de estas moléculas en los animales AdIL-1β/AdIL-1β. En estos animales pudimos observar que la inyección con el AdIL-1β aumentó la expresión de las tres moléculas luego de 20 días solamente en el grupo Adβ-gal/AdIL-1β. La variación en la expresión de los receptores como respuesta a un estímulo local agudo con IL-1β en el cuerpo estriado de ratas adultas fue estudiada por el grupo de Daniel Anthony, en la Universidad de Oxford. Este grupo observó un aumento en la expresión de IL-1β (2-24 horas), IL-1RI (2 horas) y de IL-1RII (8 horas post-inyección de IL-1). El aumento proteico de IL-1β fue observado con cierto desfasaje temporal (8-24 horas), y coincidió con un aumento en la expresión de (CINC-1), un gen *target* de IL-1β, cuya función es ser quemoatractante de neutrófilos (Docagne et al., 2005). Nuestros resultados demuestran que un estímulo crónico con IL-1β también es capaz de inducir un aumento en la expresión de los receptores de IL-1 y de IL-1ra. Sin embargo, nos sorprendió observar que tanto de las moléculas que activan la vía de IL-1β (IL-1RI), como

aquellas que la regulan negativamente (IL-1RII, e IL-1ra) se veían aumentadas. En este sentido es importante tener en cuenta que realizamos el análisis en el día 21 luego de la segunda inyección, es decir en el pico de la lesión. Esto podría explicar porque tanto los componentes que intervienen en la estimulación como aquellos que regulan negativamente la respuesta a IL-1 estén aumentados en el grupo Adβ-gal/AdIL-1β, representando el punto de inflexión de la lesión donde la desmielinización y la inflamación comienzan a dar lugar a los procesos de remielinización y de resolución de la inflamación.

Con respecto al grupo que recibió el AdIL-1β en ambas oportunidades, encontramos que las tres moléculas analizadas presentaron una expresión más baja cuando se la comparó con la expresión en el grupo Adβ-gal/AdIL-1β. Es decir que, tanto las moléculas que activan la vía de IL-1 como aquellas que la regulan en forma negativa han disminuido su expresión. Por otro lado, al comparar el grupo AdIL-1β/AdIL-1β con el grupo AdIL-1β/Adβ-gal, podemos observar que mientras no hay diferencia en la expresión del IL-1RII y el IL-1ra, la segunda inyección con el AdIL-1β indujo una disminución significativa en la expresión del IL-1RI comparada con la expresión de ese receptor luego de la inyección con el vector control. Este resultado podría indicar que la disminución en la expresión de IL-1RI luego del segundo estímulo pro-inflamatorio podría estar involucrada en la menor respuesta inflamatoria.

Adicionalmente, la disponibilidad de los receptores de IL-1 puede ser regulada en forma traduccional y de localización de los mismos. Finalmente, también resulta importante destacar que hemos analizado la expresión de estas moléculas en el estriado ipsilateral a las inyecciones, sin tener en cuenta el patrón de expresión de los diferentes tipos celulares. La acción de IL-1 en el cerebro puede ser mediada por la microglia, los astrocitos, las neuronas, o las células endoteliales (Parnet et al., 2002). Se ha reportado que el IL-1RI endotelial es el encargado de mediar el reclutamiento de neutrófilos a través de la BHE (Ching et al., 2005; Li et al., 2011), por lo tanto si la disminución del IL-1RI, pero no la de IL-1RII, se diera más bien a nivel de este tipo celular, eso podría explicar la disminución en el reclutamiento de neutrófilos PMN. Se requerirá un análisis más detallado de la expresión y localización de estas moléculas para poder comprender mejor los mecanismos detrás de la disminución en la respuesta inflamatoria.

Los resultados obtenidos a partir de la presente tesis no nos permiten descartar la participación de otras citoquinas o moléculas en la taquifilaxis observada. Aunque hemos

expresado únicamente IL-1β, y sabemos que su expresión crónica no induce la expresión de TNFα en el cuerpo estriado (Ferrari et al., 2004), no hemos medido otras proteínas y mediadores.

- **Participación de otros factores celulares y moleculares en la respuesta disminuida**

La disminución en la respuesta inflamatoria ante una segunda expresión crónica de IL-1β podría ser explicada por el fenómeno de taquifilaxis descripto anteriormente. Sin embargo, también existen otros factores que podrían estar involucrados, como la presencia de microglia activada, o de factores de neuroprotección.

La activación de la microglia ha sido asociada a múltiples procesos patológicos, se trata de células altamente versátiles que han sido asociadas a procesos protectores como la reparación y remodelación del tejido nervioso (London et al., 2013). En nuestro modelo experimental, la lesión remanente en el estriado al día 30 todavía presentaba algunos macrófagos/microglia tipo 4 (MHC-II+), las cuales podrían estar involucradas en la respuesta disminuida frente al segundo estímulo. Si bien todavía hay cierta controversia acerca de una clasificación pro o anti-inflamatoria de la microglia (análogo a los macrófagos periféricos M1 o M2) (Boche et al., 2013), se ha demostrado que la microglia activada y fagocítica podría tener un rol beneficioso en la regeneración de tejidos en un modelo de daño traumático en la medula espinal (Kigerl et al., 2009), al igual que en modelos de desmielinización por toxinas (Kotter et al., 2001; Kotter et al., 2005).

Otra evidencia que apoya la hipótesis del rol de la microglia activada en la respuesta secundaria disminuida frente al segundo estímulo pro-inflamatorio surge a partir de la tesis de licenciatura que realicé en el laboratorio. Para ello utilizamos un modelo de estímulos inflamatorios repetidos donde el primer estímulo era LPS o Poli I:C, mientras que el segundo estímulo era el AdIL-1β (Murta, 2007). A pesar del carácter agudo de los primeros estímulos, también pudimos observar que los animales que recibían el estímulo pro-inflamatorio en ambas oportunidades presentaban una segunda respuesta inflamatoria menor. Los estímulos primarios descritos previamente presentan mecanismos diferentes, ya que el LPS induce la expresión proteica de IL-1β (lo cual podría generar un episodio de taquifilaxis),

mientras que Poli I:C no (mediciones realizadas por ELISA, datos no mostrados). Sin embargo, en ambos casos la microglia se encontraba activada al momento de realizar la segunda inyección con el AdIL-1β.

Como conclusión podemos decir que aunque la taquifilaxis podría jugar un rol en la respuesta inflamatoria atenuada en los animales con estímulos inflamatorios repetidos, existen otros factores, como la microglia, que podrían estar colaborando y resultaría interesante diseñar experimentos a futuro en los cuales se pueda discriminar mejor el aporte de cada uno de estos componentes.

Resulta importante destacar que el resto de los efectos descriptos en este modelo (desmielinización, daño axonal, activación glial) siguieron el mismo patrón que el observado para la expresión de IL-1β y el infiltrado de neutrófilos PMN, lo cual podría implicar un rol importante de estos componentes como disparadores de los fenómenos de desmielinización, daño axonal y activación glial. Considerando que tanto la expresión de IL-1 como la presencia de neutrófilos comienzan desde el día 2 luego de un única inyección con el AdIL-1β (Ferrari et al., 2004), sería interesante poder dilucidar cuál de ellos (o ambos) resulta indispensable para el desarrollo del resto de los efectos descriptos.

1.2. El grupo AdIL-1β/AdIL-1β también presentó una disminución en el volumen de la desmielinización

La desmielinización es una de las características principales de la patología de EM y sus modelos experimentales. En el diseño experimental 1 los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β presentaron menor volumen de desmielinización. Varios factores podrían explicar este resultado. En primer lugar, es posible que el menor reclutamiento de neutrófilos PMN en el grupo AdIL-1β/AdIl-1β generara una lesión desmielinizante menor. Varios autores demostraron que los neutrófilos PMN están involucrados en los estadios tempranos de la generación de lesiones desmielinizantes en varios modelos experimentales de EM y de desmielinización, tales como EAE (Carlson et al., 2008; Soulika et al., 2009), cuprizona (Liu et al., 2010), y en nuestro modelo de desmielinización por inflamación

crónica con el AdIL-1β (Ferrari et al., 2004). Más aun, se ha observado que los pacientes con EM presentan mayor cantidad de neutrófilos PMN cebados en sangre (Naegele et al., 2011).

Otra factor que podría estar involucrado en la desmielinización atenuada es la presencia de un evento inflamatorio previo, el cual podría tener un efecto beneficioso sobre la segunda lesión mediante la secreción de moléculas mielinizantes ya sea por la microglia, los astrocitos o las células del linaje oligodendroglial (Cannella et al., 2000; Du and Dreyfus, 2002; Seo et al., 2013; Watzlawik et al., 2010). Más aun, se ha descrito que la presencia de IL-1β en la lesión podría estimular la mielinización y/o la regeneración nerviosa (Temporin et al., 2008). Se ha observado que luego de un evento desmielinizante en animales IL-1$\beta^{-/-}$, hubo un retraso en la remielinización asociado a la falta de producción de IGF-1 por los macrófagos/microglia tipo 4 y astrocitos (Mason et al., 2001). También se observó que una inyección previa de IL-1β atenuó los efectos neurológicos de la patología en un modelo de EAE, demostrando un efecto positivo de IL-1β en este modelo (Huitinga et al., 2000).

Además de los factores descritos previamente, la microglia activada presente en la lesión primaria podría ser otro factor que estaría colaborando con una menor desmielinización en las lesiones secundarias de los animales que recibieron dos veces el AdIL-1β. Aunque se ha comprobado que los macrófagos/microglia fagocítica están involucrados en el proceso de desmielinización, también se los ha asociado como un factor indispensable en la remielinización en un modelo de desmielinización por lisolecitina, ya que participan en la eliminación del debris y la producción de factores tróficos (Kotter et al., 2001; Kotter et al., 2005). Sin embargo, se ha demostrado una mayor desmielinización asociada a la presencia de microglia MHCII+ (Hiremath et al., 2008), lo cual concuerda con nuestros resultados en los cuales hemos demostrado que los animales que recibieron el doble estímulo pro-inflamatorio presentaron menor cantidad de células MHCII+. Por lo tanto, a pesar de que la microglia activada podría tener un efecto facilitador de la remielinización, la microglia que expresa MHC-II estaría involucrada en el proceso de desmielinización.

1.3. Un segundo evento pro-inflamatorio no afecta la inflamación, desmielinización y activación microglial cuando la lesión primaria está totalmente recuperada

A la luz de los resultados obtenidos para el diseño experimental 1, nos preguntamos si la disminución en la respuesta inflamatoria para el segundo estímulo con el AdIL-1β podría estar asociada al momento elegido para administrar este segundo estímulo. Para contestar esta pregunta utilizamos el diseño experimental 2 en el cual realizamos la segunda inyección intracerebral durante el estadio 3 (50 días) de la primera lesión, es decir cuando la primera lesión se encontraba completamente recuperada en lugar de en proceso de recuperación.

En este modelo experimental observamos que no había diferencias significativas en la respuesta inflamatoria y glial entre los grupos AdIL-1β/AdIL-1β y Adβ-gal/AdIL-1β, lo cual implicaría que el efecto de un segundo estímulo pro-inflamatorio depende del estado en el cual se encuentra la primera lesión. Por el contrario, en las lesiones de EM regresiva secundaria los eventos previos de inflamación y desmielinización producen cierta predisposición a generar lesiones de mayor tamaño (Bramow et al., 2010). Estas diferencias podrían ser explicadas, en parte, por la particularidad de nuestro modelo que no involucra una respuesta del sistema inmune adaptativo ((Ferrari et al., 2004); presente tesis), y por el hecho de que hubo una sola lesión previa. De ser así, nuestros resultados indicarían que un evento inflamatorio previo que involucró un importante infiltrado de neutrófilos PMN y macrófagos, desmielinización, y activación glial no son suficientes para aumentar la vulnerabilidad del tejido afectado frente a un segundo evento inflamatorio.

Existen algunos trabajos en bibliografía que apoyan la hipótesis de que es necesario la participación del sistema inmune adquirido para observar lesiones exacerbadas frentes repetidos eventos de desmielinización. En un modelo de eventos repetidos de desmielinización/remielinización mediante la inyección de bromuro de etidio (que no implica participación del sistema inmune adquirido) en el pedúnculo caudal del cerebelo de ratas adultas, no se observaron diferencias significativas en el proceso de remielinización, incluso luego de 3 eventos de desmielinización (Penderis et al., 2003). Por otro lado, en un

modelo de EAE se observó que eventos de desmielinización repetida generaron una desmielinización que persistió en el tiempo (Linington et al., 1992), mientras que en otro modelo de EAE con recaídas inducidas por IL-12 se observó una variación en la calidad del infiltrado inflamatorio y degeneración axonal solamente en las últimas recaídas (Ahmed et al., 2001). Es importante destacar que existe una gran diferencia entre los modelos de desmielinización química y los de EAE: solamente los últimos incluyen la participación del sistema inmune adquirido, y por otro lado las lesiones químicas permiten separar temporalmente el proceso de desmielinización del de remielinización.

Teniendo en cuenta todos estos resultados resulta factible concluir que los efectos observados luego de sucesivos eventos de desmielinización dependerán de si la lesión se realiza en presencia o ausencia de un proceso desmielinizante o remielinizante (con todos los factores moleculares y celulares que estos procesos involucran), y de las características generales del tejido en cuanto a infiltrado inflamatorio y activación glial. Este tipo de hipótesis se han comprobado al estudiar el rol de los OPCs en las fallas de remielinización: varios trabajos demostraron que suelen estar relacionadas con una incapacidad de los OPCs de diferenciarse a oligodendrocitos maduros, debido a las señales provistas por el microambiente (Chang et al., 2002; Penderis et al., 2003; Wolswijk, 1998; Woodruff et al., 2004).

Por otro lado resulta interesante comparar los resultados obtenidos para el diseño experimental 1 y 2. Aunque en el diseño experimental 2 no se observó una exacerbación de la respuesta secundaria, tampoco hubo una respuesta disminuida como la que se obtuvo con el diseño experimental 1. Siguiendo con la hipótesis discutida en la sección 1.1, es posible que el efecto de la taquifilaxis sólo se produzca dentro de una ventana temporal específica, y que cuando el tejido haya recuperado su condición homeostática, no resulte necesario activar el mecanismo protector que impide una respuesta exagerada frente a un segundo estímulo pro-inflamatorio.

En cuanto a la posible participación de la regulación diferencial de los receptores de IL-1 en este fenómeno, el modelo de injuria aguda con IL-1β demostró que el aumento en la expresión de IL-1RII (8 horas) y la consecuente disminución en la expresión de un gen *target* (24 horas), son momentáneos y reversibles (Docagne et al., 2005). Aunque nosotros no encontramos una diferencia en la expresión de los receptores (entre los días 30 y 50), como

mencionamos anteriormente esto no resulta suficiente para descartar una diferencia en la capacidad de activar la vía de IL-1 debido a posibles vías alternativas en la regulación de los receptores.

Por otro lado, diferencias en el microambiente entre el día 30 y el día 50 podrían explicar el fenómeno de una respuesta atenuada cuando la lesión primaria estaba activa. Aunque durante el estadio 2 la lesión presentó poco infiltrado inflamatorio y desmielinización, todavía se podían observar algunas células MHCII+, macrófagos/microglia tipo 4 y escasos neutrófilos PMN (Ferrari et al., 2004; Murta, 2007), y mayor número de células olig2+ (Figura I.1.2). El hecho de que el tejido se encontrara aún en proceso de remielinización podría implicar la presencia de factores de crecimiento (Du and Dreyfus, 2002). De hecho, se ha observado que células del linaje oligodendroglial son capaces de producir el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), la neurotrofina (NT) -3 (Dai et al., 2003), la NT-4/5, el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Byravan et al., 1994), y el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) (Wilkins et al., 2001), entre otros.

Adicionalmente, el diseño experimental 1 presento una dinámica similar en todos los parámetros estudiados (el grupo AdIL-β/AdIL-1β presentó una menor lesión en todos los parámetros analizados), mientras que los animales que recibieron los dos estímulos pro-inflamatorios en el diseño experimental 2 sólo se observó una leve disminución en la desmielinización y el daño axonal. Resulta interesante analizar estos resultados ya que el daño axonal es una de la características más salientes de la EM, y ha sido fuertemente asociada a la progresión de la patología (Trapp et al., 1998; Waxman, 1998). Varios trabajos han asociado la presencia de mielina a la protección de los axones, ya sea mediante el suministro de soporte y protección física, como también por la secreción de factores tróficos por parte de los oligodendrocitos (Franklin and Kotter, 2008; Lappe-Siefke et al., 2003). Más aun, se ha observado daño axonal en placas inactivas de pacientes con EM, lo cual sugiere que una desmielinización crónica aumenta la vulnerabilidad de los axones (Kornek et al., 2000). Además, el daño axonal se ha asociado a procesos de destrucción de la mielina, aun en ausencia de infiltrado de linfocitos T o B (Peterson and Fujinami, 2007).

En contraposición, se ha sugerido que el daño axonal estaría asociado a episodios de inflamación, y no a desmielinización activa (Bitsch et al., 2000; Haines et al., 2011). Finalmente, en algunos modelos virales se ha observado que el daño axonal induce

apoptosis de los oligodendrocitos, seguido de desmielinización, implicando que la degeneración axonal podría ser el evento primario de la patología (Tsunoda and Fujinami, 2002; Tsunoda et al., 2003). Estos resultados antagónicos apuntan una vez a más a ejemplificar la heterogeneidad de las lesiones en la EM, y la importancia del estudio de las mismas en múltiples modelos. Los resultados de la presente tesis indicarían que existe una relación entre el daño axonal y la desmielinización, más allá de la acción del sistema inmune adquirido.

Conclusiones capítulo I

Como conclusión general del primer capítulo de la presente tesis podemos remarcar que no se observó una exacerbación en la lesión inflamatoria desmielinizante con ninguno de los diseños experimentales utilizados, como se planteó en la hipótesis inicial. Hemos observado que el microambiente creado por la lesión primaria condiciona la respuesta a un segundo estimulo. Además, el momento y el contexto en el que sucede la lesión secundaria son de suma importancia, ya que un segundo estímulo pro-inflamatorio aplicado cuando la primera lesión aún se encontraba en proceso de remielinización produjo una respuesta menor en la lesión secundaria. Esta respuesta estaría asociada a un fenómeno de taquifilaxis mediada, al menos en parte, por una disminución en la expresión del IL-1RI.

2. Capítulo II: Efectos de un estímulo pro-inflamatorio periférico sobre una lesión desmielinizante pre-existente

En el segundo capítulo de la tesis investigamos el rol de eventos de inflamación en la periferia sobre la lesión central. Se ha documentado que infecciones o procesos inflamatorios sistémicos pueden exacerbar el daño dentro del SNC en muchas enfermedades neurodegenerativas, incluso la EM en la cual se los considera factores de riesgo para las recaídas (Buljevac et al., 2002; Cunningham et al., 2005b; Dantzer et al., 2008; Godoy et al., 2008; Murta and Ferrari, 2013; Perry et al., 2007; Perry et al., 2003; Vallieres et al., 2006). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestra hipótesis fue que la expresión crónica de IL-1β en la periferia podría exacerbar la lesión desmielinizante central.

Los resultados del segundo capítulo de la tesis demostraron que la expresión crónica de IL-1β en la periferia cuando la lesión central estaba en recuperación (30 días) produjo una re-activación de la lesión central. Este recrudecimiento se caracterizó por un importante infiltrado inflamatorio, desmielinización, aumento de la permeabilidad de la BHE, daño axonal, activación glail, y aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. Más aún, también se observó exacerbación de la lesión central cuando el AdIL-1β_{iv} se inyecto con la lesión central recuperada (42 días) y la BHE intacta.

2.1. La expresión crónica de IL-1β en la periferia al día 30 exacerbó la lesión primaria central

- **Exacerbación de la inflamación y desmielinización**

Los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} fueron los únicos que presentaron una importante vasodilatación acompañada por un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por neutrófilos PMN (aunque también se observaron macrófagos) y desmielinización. Además se observó un aumento en la expresión de dos importantes citoquinas inflamatorias en la zona de la lesión: IL-1β y TNFα. Se ha establecido que frente a

estímulos inflamatorios periféricos agudos o crónicos, se produce un aumento en la expresión de citoquinas en el SNC (Combrinck et al., 2002; Dantzer and Kelley, 2007; Fung et al., 2012; Pitossi et al., 1997). Más aun, se ha observado que eventos de inflamación sistémica y el aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en el cerebro, pueden exacerbar los daños al SNC en modelos de enfermedad del prión (Cunningham et al., 2005b), EP (Pott Godoy et al., 2008), isquemia cerebral (McColl et al., 2007), y EA (Sly et al., 2001), entre otros. Los eventos de inflamación periférica también han sido asociados a un deterioro en pacientes con EA, EP y EM (Buljevac et al., 2002; Perry et al., 2003).

Considerando los antecedentes previos del laboratorio, donde una única expresión crónica de IL-1β en el cuerpo estriado indujo un importante infiltrado de neutrófilos PMN y desmielinización (Ferrari et al., 2004), no resultó sorprendente observar que el aumento de IL-1β y el infiltrado de neutrófilos PMN, productor del AdIL-1β iv, haya generado desmielinización reversible (confirmamos que 50 días después del estímulo periférico la mayoría de los axones se encontraban remielinizados). Resultados de otros grupos también demostraron que los neutrófilos PMN están involucrados en la generación de lesiones desmielinizantes durante los estadios tempranos, tanto en el modelo de EAE (Carlson et al., 2008), como en el de desmielinización por cuprizona (Liu et al., 2010). Más aun, estos trabajos han demostrado la importancia de la presencia de neutrófilos CXCR2+ en la ruptura de BHE, la movilización de leucocitos hacia el SNC y la desmielinización (Carlson et al., 2008; Liu et al., 2010). Los resultados obtenidos en esta tesis también han demostrado un aumento en la expresión de CXCR2 en los estriados ipsilaterales a la lesión primaria en los animales AdIL-1β/AdIL-1β_{iv}.

Por otro lado, el aumento de la expresión de TNFα observado para el grupo AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} también podría ser considerado como un componente en la exacerbación de la desmielinización. El aumento de TNFα ha sido observado en varios modelos de desmielinización, y ha sido demostrado que es una molécula citotóxica para oligodendrocitos: la sobre-expresión de TNF en astrocitos induce desmielinización espontanea (Probert et al., 1995), y el pre-tratamiento con un anticuerpo específico anti-TNF inhibe el desarrollo de EAE (Baker et al., 1994). Por el contrario, los tratamientos anti-TNF no han sido efectivos en pacientes con EM (1999), y existen trabajos que apuntan a un rol más bien protector de esta citoquina (Arnett et al., 2001).

Resulta interesante comparar estos resultados con los obtenidos para el capítulo I, donde la segunda inyección del AdIL-1β durante el estadio 2 (30 días) produjo una lesión atenuada (con menos IL-1β y menos neutrófilos PMN). Considerando que en ambas oportunidades el segundo estímulo se aplicó cuando la lesión primaria se encontraba aun activa, **podemos concluir** que el efecto de una lesión secundaria depende no solamente del estadio en el que se encuentra la lesión primaria (discusión capítulo I), sino también de la procedencia del estímulo secundario (central o sistémico). Por lo tanto, la exacerbación con el AdIL-1β iv, debe involucrar mecanismos alternativos responsables del recrudecimiento de la lesión secundaria.

Existen evidencias en la bibliografía que apoyan la idea de que la respuesta del SNC a una determinada citoquina depende de la ruta de administración del estímulo. En un trabajo donde se utilizaron ratones transgénicos condicionales (activables por la administración de doxiciclina) que presentaban una disminución en la expresión de IL-1RI en las células endoteliales (eIL-1RI) (Ching et al., 2007), se observó que si se aplicaba una inyección icv o iv de IL-1β se perdía la activación de la neuronas hipotalámicas, el aumento de cox-2 en las células endoteliales, el reclutamiento de leucocitos y los efectos comportamentales estudiados (fiebre y *sickness* behavior) solamente en los ratones transgénicos tratados con doxiciclina. Sin embargo, cuando la inyección de IL-1β fue administrada ip se suprimió la fiebre y la expresión de cox-2, pero no la activación de neuronas hipotalámicas en los ratones eIL-1RI-Dox. Los resultados del trabajo de Ching y colaboradores concuerdan con lo observado por otros grupos (Ek et al., 1998; Goehler et al., 1999), y apuntan a la hipótesis de que los estímulos por-inflamatorios en la cavidad peritoneal producen ciertas respuesta a nivel central por medio de la vía neuronal vagal. Resulta interesante recalcar que mientras que algunos trabajos asocian esta vía a la respuesta asociada a la enfermedad más que a la activación del eje HPA o la inducción de fiebre (Konsman et al., 2000; Luheshi et al., 2000), otros han visto que el grado de participación de las vías humorales o nerviosas pueden estar asociados a la magnitud (dosis) del estímulo (Hansen et al., 2001).

En este sentido, aunque no hemos realizado ningún test de comportamientos asociado a la enfermedad, ni hemos evaluado la temperatura corporal de los animales inyectados con el AdIL-1β iv, tampoco hemos observado que presenten signos típicos de

enfermedad (alteración del pelaje, disminución de la actividad motora espontánea) como cuando son inyectados con LPS ip. Sin embargo no hay que perder de vista el hecho de que en nuestro modelo el estímulo pro-inflamatorio periférico es crónico. La activación crónica del sistema inmune ha sido asociada a desregulaciones en el funcionamiento del eje HPA en pacientes y modelos de lupus, diabetes, artritis reumatoidea, EM, estrés crónico, entre otros (Beauquis et al., 2008; del Rey and Besedovsky, 2000; Harbuz et al., 2003; Ysrraelit et al., 2008). Considerando que IL-1 es un importante activador del eje HPA (Dunn, 2000), y que las desregulaciones del eje han sido asociadas a respuestas inmunes alteradas, sería interesante abarcar estos temas en experimentos futuros, y lograr una mejor comprensión de los factores involucrados en la re-activación de la lesión central en el presente modelo.

- **La exacerbación de la lesión central indujo activación glial, daño axonal, y recrudecimiento de la ruptura de la BHE**

La exacerbación de la lesión central en los animales inyectados con el AdIL-1β en la periferia, incluyó la activación de la microglia, marcada con el anticuerpo MHCII. Como explicamos en la sección 1.1 de la presente discusión, la presencia de MHCII se asoció a una mayor desmielinización en un modelo de cuprizona debido a la activación y proliferación de la microglia (Espel et al., 1996; Fast et al., 1989; Hiremath et al., 2008). Por otro lado, el rol de la microglia activada en la exacerbación de respuestas inflamatorias dentro del SNC ha sido estudiado en varios trabajos. En un modelo de animales envejecidos, los cuales presentan una mayor proporción de microglia MCHII+, se produjo una neuroinflamación exacerbada frente a un estímulo inflamatorio periférico, y esta exacerbación fue mediada por la producción de IL-1 (Henry et al., 2009). Resultados similares se observaron en un modelo de enfermedad priónica (Cunningham et al., 2005b) y de EP (Pott Godoy et al., 2010). Sin embargo, los resultados de la exacerbación con el AdIL-1β iv no nos permiten distinguir cual fue el evento primario en el cuerpo estriado: el aumento en la expresión de IL-1β, o el aumento de los macrófagos/microglia tipo 4 MHC+. Un análisis temporal más detallado del desarrollo de la lesión en el cuerpo estriado podría esclarecer esta cuestión.

En cuanto a la activación de la astroglia, los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β$_{iv}$ presentaron mayor activación de los astrocitos, comparada con los animales que recibieron el adenovector control. El grupo AdIL-1β/Adβ-gal$_{iv}$ presentó cierto grado de activación glial, lo cual podría estar indicando cierto efecto del vector viral *per se*. Aun así también se observa un efecto específico debido exclusivamente a la expresión crónica de IL-1β en la periferia. El rol de los astrocitos en las respuestas inflamatorias dentro del SNC es protagónico, ya que se ha demostrado que es la principal fuente de mediadores de la respuesta inmune innata, incluyendo IL-1β, IL-6, IL-8/CXCL8, CXCL1, entre otras (Ransohoff and Brown, 2012). Por otro lado, la cicatriz formada por astrocitos activados en lesiones del SNC, se ha asociado a un impedimento en la regeneración axonal y la remielinización (Bannerman et al., 2007). Sin embargo, nosotros no observamos fallas en la remielinización cuando analizamos la lesión 50 días después del estímulo periférico.

Otro factor muy importante al momento de analizar los efectos de la exacerbación periférica fue el daño axonal. Al analizar el daño axonal, se pudo observar que el grupo inyectado con el AdIL-1β presentaba una mayor proporción de axones en neurodegeneración en comparación con los animales que recibieron el adenovector control. Cabe aclarar que el grupo control también presenta una pequeña cantidad de axones en degeneración, lo cual podría ser explicado por cierto efecto inespecífico del vector viral, o por la lesión primaria (los axones pueden no haberse regenerado aun, o presentar daño permanente). El daño axonal es un factor determinante en la progresión de la EM (Trapp et al., 1998; Waxman, 1998). Trabajos recientes indican que el daño axonal podría estar asociado a la respuesta inmune innata mediante la acción de la microglia (Henderson et al., 2009; Soulika et al., 2009). Más aun, en un modelo de EAE se observó un aumento en el daño axonal luego de un estímulo sistémico con LPS, independientemente de la infiltración leucocitaria o de la ruptura de la BHE (Moreno et al., 2011). La relación entre la activación de la microglia y la degeneración axonal ha sido demostrada también en la presente tesis que ya el número de axones en degeneración tiene una relación directa con el incremento de la microglia activada

Finalmente, el estímulo periférico pro-inflamatorio indujo exacerbación en la ruptura de la BHE. La ruptura de la BHE y la inflamación parecen juegan un papel importante en muchas enfermedades neurodegenerativas, ya que al verse comprometida la unidad

vascular, se facilita la migración de leucocitos (Stolp and Dziegielewska, 2009). Tanto IL-1β como TNFα han sido asociadas con un aumento en la permeabilidad de la BHE (Argaw et al., 2006; Ferrari et al., 2004; Tsuge et al., 2010). Por otro lado, la entrada de leucocitos al SNC es considerada uno de los primeros eventos en la EM, e induce la ruptura de la BHE en varios modelos (Easton, 2013; Ferrari et al., 2004; Larochelle et al., 2011). Nuestro modelo demuestra que la exacerbación de la lesión está asociada a un aumento en la permeabilidad de la BHE cuando la señal proviene de la periferia.

2.2. Efectos del estímulo periférico sobre órganos fuera del SNC

A la luz de los resultados expuestos anteriormente, decidimos estudiar los posibles mecanismos por los cuales la inyección periférica de AdIL-1β podría haber inducido la exacerbación de la lesión central. Para ello estudiamos la expresión de citoquinas inflamatorias en órganos periféricos como: hígado, bazo, y en leucocitos aislados de la sangre.

La expresión crónica de IL-1β en la periferia induce una variación en la fórmula leucocitaria ya que aumentó el número relativo de neutrófilos PMN con respecto a los linfocitos en sangre periférica. Este resultado no nos sorprendió ya que se ha observado que la IL-1β, o algunas moléculas estimuladas por esta citoquina, son capaces de aumentar la vida media de los neutrófilos PMN y de estimular su salida desde la médula ósea (Colotta et al., 1992; Easton, 2013; Veenstra and Ransohoff, 2012).

El aumento de citoquinas en la periferia como respuesta a estímulos pro-inflamatorios ha sido estudiado ampliamente. Al analizar la expresión de citoquinas en el hígado observamos que 5 días después de la inyección iv con el AdIL-1β había un aumento significativo de IL-1β e IL-6, pero no de TNFα. En un estudio detallado acerca de los efectos de diferentes estímulos periféricos sobre la expresión de citoquinas se observó que inyecciones ip de LPS inducían la expresión hepática de IL-1β y TNFα, mientras que inyecciones periféricas de la proteína IL-1β no (Skelly et al., 2013). Las respuestas inflamatorias en el cerebro son reguladas por la expresión de diferentes proteínas y citoquinas en el hígado (respuesta de fase aguda), y se ha comprobado que tanto TNFα

como CXCL-1 son importantes moléculas reguladoras en la cascada hepática luego de un daño en el SNC (Campbell et al., 2008a; Campbell et al., 2008b; Jiang et al., 2008). En nuestro modelo hemos observado un aumento en la expresión de IL-1β e IL-6, pero no de TNFα, lo cual indicaría una posible participación del hígado en la exacerbación de la lesión central. Estos resultados muestran algunas diferencias con las observadas en otros trabajos (Campbell et al., 2007; Jiang et al., 2008; Skelly et al., 2013), las cuales podrían ser explicadas por las distintas vías de administración, como así también por el hecho de estar comparando eventos agudos de inflamación periférica con eventos crónicos.

Al analizar la expresión de citoquinas en los leucocitos, observamos que la expresión crónica de IL-1β en la periferia produjo un aumento de IL-1β, TNFα, e IL-6 en la población leucocitaria 5 días post-inyección. En la EM con recaídas y remisiones se ha observado un aumento en la producción de IL-1β, TNFα, e IL-6 en células mononucleares de la sangre, pero solamente durante los periodos de recaídas (Ysrraelit et al., 2008). Además el aumento en la expresión de citoquinas inflamatorias por parte de los leucocitos es un signo de activación de los mismos, y se ha observado que los leucocitos activados ingresan más fácilmente al SNC, activan las células de la microvasculatura cerebral, y alteran la integridad de la BHE (Grammas et al., 2011; Greter et al., 2005).

En el caso del bazo, no se observó aumento en la expresión de las citoquinas IL-1β o TNFα. Estos resultados difieren de lo observado en el modelo de EAE en el cual la inyección ip de LPS aumenta la expresión de IL-1β, TNFα, e IL-6 luego de 6 horas post-inyección (Moreno et al., 2011). Nuevamente, la mayoría de los estudios publicados han utilizado estímulos inflamatorios agudos, lo cual podría explicar las diferencias observadas con respecto a nuestros resultados. Por lo tanto, según lo observado en nuestro modelo, no parecería haber un aporte de citoquinas originadas en el bazo a la exacerbación de la lesión central.

2.3. Efectos del estímulo periférico sobre el hipotálamo

Al analizar la expresión de citoquinas en el hipotálamo, solo observamos un aumento en la expresión hipotalámica de IL-1β en los animales que habían recibido el estímulo pro-

inflamatorio periférico. En el trabajo de Skelly y colaboradores, la inyección ip tanto de LPS como de la proteína IL-1β (alta dosis) produjeron un aumento en la expresión hipotalámica de IL-1β y TNFα, mientras que el aumento de IL-6 se observó únicamente en los animales inyectados con LPS (Skelly et al., 2013). En este estudio, sólo una dosis alta de IL-1β (50 μg/kg) produjo un aumento hipotalámico de IL-1β así como también una variación en la temperatura corporal. El aumento de IL-1 en la periferia ha sido considerado como uno de los eventos más importantes en la inducción de comportamientos asociados a la enfermedad (Dantzer, 2006), ya sea a través de la vía nerviosa como de la vía humoral. Como se discutió previamente en la sección 2.1, resultaría muy interesante medir tanto comportamientos asociados a la enfermedad, como variaciones en la temperatura corporal y en el eje HPA en el modelo propuesto.

2.4. El evento de inflamación sistémica induce una exacerbación de la lesión central en el SNC, aun cuando la BHE está intacta

Aunque con los resultados analizados hasta el momento no podemos discernir si la vía de comunicación para la exacerbación de la lesión central es la humoral o la nerviosa (o ambas), quisimos descartar la vía de pasaje directo del adenovector, o de moléculas y células inducidas por la expresión crónica de IL-1β a través de la BHE abierta. Para ello, inyectamos el estímulo periférico (AdIL-1β iv) cuando la BHE se encontraba completamente recuperada (día 42). Sorprendentemente, con este nuevo diseño experimental observamos que los animales del grupo AdIL-1β/AdIL-1β_{iv} presentaron un recrudecimiento de la lesión primaria en donde se evidenciaba mayor infiltrado inflamatorio, desmielinización, activación glia, y daño axonal, a pesar de que la BHE se encontraba intacta. Es decir que la exacerbación mediante la expresión crónica de IL-1β en la periferia no se produce mediante el ingreso directo del vector al cerebro, ni por el pasaje de moléculas o células a través de una BHE permeable. Se ha descripto que diferentes componentes de la respuesta inflamatoria pueden contribuir a la patología de EM independientemente de la integridad de la BHE (Buljevac et al., 2002; Lindquist et al., 2011). La EM con recaídas y remisiones difiere de la forma progresiva de la enfermedad en cuanto a la integridad de la BHE:

mientras que la EM progresiva presenta una BHE más bien intacta y un proceso inflamatorio asociado al SNC, en la EM con recaídas y remisiones cada episodio está asociado a la ruptura de la BHE y la generación de nuevas lesiones (Bradl and Lassmann, 2009).

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en este capítulo, podríamos postular varías vías mediante las cuales la señal del estímulo periférico podría estar produciendo la exacerbación de la lesión central, resumidas en la figura II.1. Con respecto a la vía humoral, se ha descripto que la células endoteliales cerebrales poseen receptores para IL-1β, TNFα e IL-6 (Rizzo and Leaver, 2010; Van Dam et al., 1996), con lo cual el aumento en la producción de estás citoquinas por parte de los leucocitos podría ser responsable de la exacerbación de la lesión central. Se ha observado que el efecto central de inyecciones iv con IL-1β pude ser bloqueado cuando no está presente el IL-1RI en las células endoteliales (Ching et al., 2007). Por otro lado se ha demostrado que existen transportadores específicos de estas citoquinas, y en particular se ha observado que para IL-1 este mecanismo de transporte podría ser la principal vía mediante la cual esta citoquina se encuentra en el cerebro (Banks et al., 1995; Banks et al., 1991). Finalmente también es probable que algunas citoquinas ingresen a través de las fenestras presentes en los OCV, y de allí transmitan la señal a la zona en cuestión, particularmente en el caso del aumento de IL-1β a nivel del hipotálamo. Aunque tampoco es posible descartar la vía nerviosa de comunicación periferia-SNC, su participación en la transmisión de la señal de IL-1β en la periferia ha sido asociada a administraciones ip (Ching et al., 2007; Luheshi et al., 2000). Se requerirán experimentos de inhibición de la vía nerviosa vagal para poder discernir si esta vía está involucrada en la transmisión de las señales periféricas al SNC.

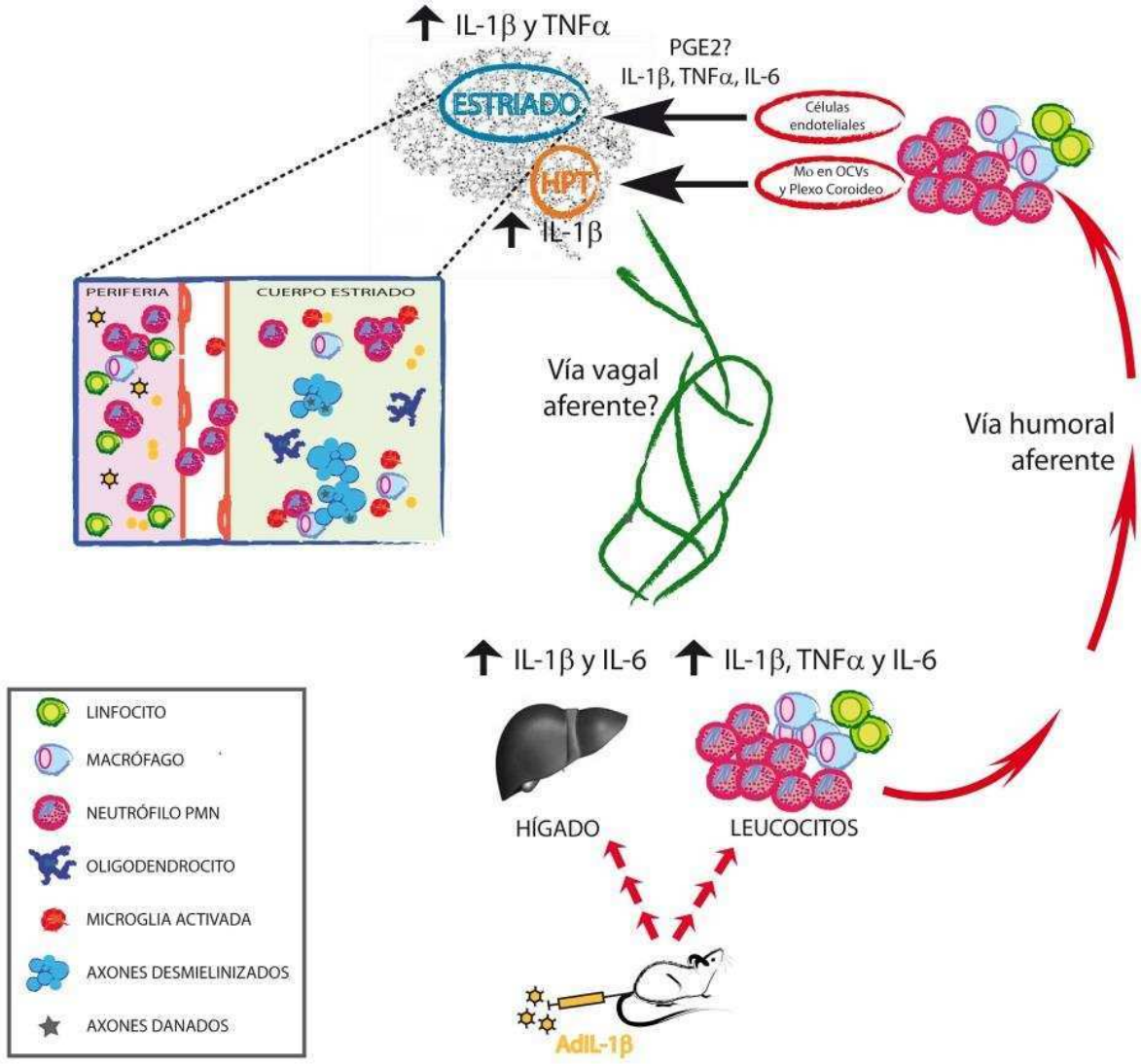


Figura II.1. Esquema del modelo de exacerbación periférica. La inyección del AdIL-1β iv induce una alteración de la fórmula leucocitaria (aumentan los neutrófilos PMN), y un aumento en la expresión de citoquinas inflamatorias en el hígado y en leucocitos de la sangre. Aunque no descartamos una trasmisión de la señal periférica mediante la vía nerviosa, creemos que sería trasmitida principalmente a través de la vía humoral. El aumento en la producción de citoquinas por los leucocitos podría transmitirse al cerebro a través del hipotálamo (dónde se observa un aumento de IL-1β), a través de las células endoteliales, o mediante transportadores específicos. En el cuerpo estriado el estímulo pro-inflamatorio periférico, aplicado con la BHE abierta o cerrada, produce una exacerbación de la lesión central en la cual se observa aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, inflamación, desmielinización, daño axonal, y activación de la glia.

Conclusiones capítulo II

Como conclusión general del capítulo II de la presente tesis podemos resaltar que hemos logrado generar un modelo de exacerbación de una lesión desmielinizante central a partir de un estímulo pro-inflamatorio periférico. Este modelo sería útil para investigar el rol de la expresión crónica de IL-1β en la periferia sobre varias de las características más salientes de las recaídas en la EM como por ejemplo la desmielinización, el daño axonal, la activación de la microglia, y la perdida de la integridad de la BHE. Como se mencionó a lo largo de la tesis, la EM es una patología muy compleja y heterogénea, lo cual dificulta la comprensión del rol de cada uno de los factores involucrados. El presente modelo proporciona un marco de estudio más simple para estudiar el rol de una única citoquina específica, y en particular las vías de comunicación que podrían estar involucradas en un contexto de un estímulo sistémico crónico.

3. Conclusiones finales

Hace más de 50 años que se ha identificado que los procesos inflamatorios dentro del SNC presentan importantes diferencias con lo que se observa en la periferia. Aunque se ha estudiado el rol de los componentes del sistema inmune en procesos fisiológicos dentro del SNC, se ha puesto especial atención en comprender su participación en enfermedades neurodegenerativas (Ransohoff and Brown, 2012).

La EM es una enfermedad crónica inflamatoria neurodegenerativa del SNC. A diferencia de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, la EM comienza durante la adultez temprana y al día de hoy comprende una de las principales causas de discapacidad en la población caucásica (Noseworthy et al., 2000). Aunque la etiología de la enfermedad aún no se comprende del todo, la mayoría de los estudios indican una participación central del sistema inmunológico en cuanto a su sintomatología, progresión, y neuropatología (Zipp and Aktas, 2006). La mayoría de los pacientes presentan una patología con recaídas y remisiones, y múltiples trabajos han documentado que existen importantes diferencias (en cuanto a las lesiones, los tratamientos, la sintomatología, etc.) con respecto a la EM progresiva (Bradl and Lassmann, 2009; Lazzarini). En los últimos años se han asociado eventos de inflamación en la periferia, con la aparición de recaídas o la progresión de la enfermedad (Murta and Ferrari, 2013). Debido a la complejidad y heterogeneidad de la enfermedad, resulta valioso contar con múltiples y variados modelos de estudio para lograr una mejor comprensión de los mecanismos asociados a la EM.

En la presente tesis nos propusimos estudiar el efecto de estímulos inflamatorios repetidos dentro del SNC, en un modelo original que comprende la expresión de una única citoquina en forma crónica. El modelo elegido resultaría útil en el estudio de aspectos específicos de la EM que no se ven en otro modelos, como por ejemplo el rol del infiltrado de neutrófilos en la ruptura de la BHE (Anthony et al., 1997; Ferrari et al., 2004; Schnell et al., 1999), o el efecto de IL-1β crónico sobre la desmielinización y neurodegeneración. Además, en la segunda parte de la tesis abordamos el interrogante de cuál podría ser el efecto de la expresión crónica de esta citoquina en la periferia sobre una lesión dentro del SNC.

Una de las conclusiones generales más importantes que se desprende del trabajo realizado para esta tesis es que el efecto de un estímulo inflamatorio secundario va a depender del estado en el que se encuentre la lesión original. En las lesiones de EM regresiva secundaria los eventos previos de inflamación y desmielinización producen cierta predisposición a generar lesiones de mayor tamaño (Bramow et al., 2010). Al contrario de lo esperado, en nuestros experimentos observamos que si se aplicaba el segundo estímulo central durante el periodo de recuperación de la lesión original, la respuesta inflamatoria estaba disminuida. Este resultado podría deberse al fenómeno de taquifilaxis, a la presencia de factores (moleculares o celulares) protectores en la lesión, o a la ausencia componentes del sistema inmune adquirido. Aunque experimentos adicionales serán necesarios para poder discernir las causas de la respuesta secundaria atenuada, este resultado confirma que la naturaleza de la lesión al momento de la aparición de un segundo evento inflamatorio es definitoria, y aporta conocimientos acerca del rol especifico de IL-1β en lesiones repetidas desmielinizantes del SNC.

Por otro lado, observamos que el efecto del estímulo secundario puede ser opuesto de acuerdo a la procedencia del mismo. Esta conclusión se desprende al comparar los resultados obtenidos en el capítulo I con los que se obtuvieron a partir del segundo capítulo. En ambos casos el segundo estímulo fue aplicado durante el estadio de recuperación de la lesión original. Sin embargo, se observó una respuesta disminuida para el AdIL-1β central, y una exacerbación cuando el vector se inyectó iv. A partir de esta comparación podemos concluir que en el caso de la exacerbación con el AdIL-1β iv, deben existir mecanismos alternativos responsables de la generación de la lesión secundaria, los cuales podrían considerarse como un importante blanco para el desarrollo de drogas para tratar la EM con recaídas y remisiones.

Quedan aún varias preguntas por contestar, especialmente aquellas sobre el mecanismo a través del cual se produce la exacerbación con el estímulo periférico. Sin embargo, resultó interesante observar que la expresión crónica de la IL-1β arrojó resultados diferentes que los observados para estímulos inflamatorios periféricos agudos en cuanto a la expresión de citoquinas inflamatorias en órganos periféricos (Skelly et al., 2013). Otro factor determinante en la ruta de comunicación periferia-SNC es el método de aplicación del estímulo periférico (iv o ip) (Ching et al., 2007; Ek et al., 1998; Goehler et al., 1999; Konsman

et al., 1999). En este sentido, nuestro modelo sería muy útil para estudiar los mecanismos a través de los cuales estímulos crónicos en la periferia afectan al SNC. Existen numerosas patologías que generan una desregulación crónica del sistema inmune periférico (obesidad, diabetes, artritis reumatoidea, etc), y que en los últimos años han sido asociadas a desregulaciones dentro del SNC (Fung et al., 2012; Lampa et al., 2012).

Como conclusión final podemos decir que hemos generado un modelo de estudio para investigar el efecto de estímulos secundarios sobre una lesión desmielinizante central, que se centra en el rol de IL-1β. Este modelo permitiría estudiar los efectos de diferentes drogas diseñadas para específicamente para actuar sobre la vía de IL-1 en la exacerbación de lesiones centrales, similares a las recaídas de los pacientes con EM. Más aun, nuestro modelo presenta muchas de las características neuropatológicas de la EM, con lo cual se podrían estudiar efectos específicos a nivel del tipo celular presente en el infiltrado, la desmielinización, la remielinización, el daño axonal, y la activación glial, y la variación en la expresión de citoquinas. Además se podrá ahondar en el efecto de estímulos que provienen desde la periferia, y cuáles son los mecanismos involucrados en la comunicación con el SNC en un contexto de inflamación crónica. La mayoría de los tratamientos actuales para EM, y otras patologías asociadas a neuroinflamación, involucran anti-inflamatorios no específicos. Conocer los detalles de los mecanismos involucrados en eventos de neuroinflamación, y disecar la participación de los distintos actores celulares y moleculares a lo largo de las diferentes etapas de la patología, ayudará a generar terapias más específicas y efectivas.

Lic. Verónica Murta — Tesista

Dra. Carina Ferrari — Director de Tesis

BIBLIOGRAFÍA

1999. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. Neurology 53, 457-465.

Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., Begley, D.J., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. Neurobiol Dis 37, 13-25.

Aggelakis, K., Zacharaki, F., Dardiotis, E., Xiromerisiou, G., Tsimourtou, V., Ralli, S., Gkaraveli, M., Bourpoulas, D., Rodopoulou, P., Papadimitriou, A., Hadjigeorgiou, G., 2010. Interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in Greek multiple sclerosis (MS) patients with bout-onset MS. Neurol Sci 31, 253-257.

Ahmed, Z., Gveric, D., Pryce, G., Baker, D., Leonard, J.P., Cuzner, M.L., Diemel, L.T., 2001. Myelin/axonal pathology in interleukin-12 induced serial relapses of experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. Am J Pathol 158, 2127-2138.

Alvarez, J.I., Teale, J.M., 2007a. Differential changes in junctional complex proteins suggest the ependymal lining as the main source of leukocyte infiltration into ventricles in murine neurocysticercosis. J Neuroimmunol 187, 102-113.

Alvarez, J.I., Teale, J.M., 2007b. Evidence for differential changes of junctional complex proteins in murine neurocysticercosis dependent upon CNS vasculature. Brain Res 1169, 98-111.

An, Y., Chen, Q., Quan, N., 2011. Interleukin-1 exerts distinct actions on different cell types of the brain in vitro. J Inflamm Res 2011, 11-20.

Andersson, P.B., Perry, V.H., Gordon, S., 1992a. The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues. Neuroscience 48, 169-186.

Andersson, P.B., Perry, V.H., Gordon, S., 1992b. Intracerebral injection of proinflammatory cytokines or leukocyte chemotaxins induces minimal myelomonocytic cell recruitment to the parenchyma of the central nervous system. J Exp Med 176, 255-259.

Anthony, D.C., Couch, Y., Losey, P., Evans, M.C., 2012. The systemic response to brain injury and disease. Brain Behav Immun 26, 534-540.

Anthony, D.C., Ferguson, B., Matyzak, M.K., Miller, K.M., Esiri, M.M., Perry, V.H., 1997. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. Neuropathol Appl Neurobiol 23, 406-415.

Argaw, A.T., Zhang, Y., Snyder, B.J., Zhao, M.L., Kopp, N., Lee, S.C., Raine, C.S., Brosnan, C.F., John, G.R., 2006. IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. J Immunol 177, 5574-5584.

Arnett, H.A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G.K., Ting, J.P., 2001. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. Nat Neurosci 4, 1116-1122.

Aubert, A., Vega, C., Dantzer, R., Goodall, G., 1995. Pyrogens specifically disrupt the acquisition of a task involving cognitive processing in the rat. Brain Behav Immun 9, 129-148.

Baker, D., Butler, D., Scallon, B.J., O'Neill, J.K., Turk, J.L., Feldmann, M., 1994. Control of established experimental allergic encephalomyelitis by inhibition of tumor necrosis factor (TNF) activity within the central nervous system using monoclonal antibodies and TNF receptor-immunoglobulin fusion proteins. Eur J Immunol 24, 2040-2048.

Bakshi, P., Margenthaler, E., Reed, J., Crawford, F., Mullan, M., 2011. Depletion of CXCR2 inhibits gamma-secretase activity and amyloid-beta production in a murine model of Alzheimer's disease. Cytokine 53, 163-169.

Balasingam, V., Tejada-Berges, T., Wright, E., Bouckova, R., Yong, V.W., 1994. Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. J Neurosci 14, 846-856.

Banisadr, G., Rostene, W., Kitabgi, P., Parsadaniantz, S.M., 2005. Chemokines and brain functions. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 4, 387-399.

Banks, W.A., Kastin, A.J., Broadwell, R.D., 1995. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. Neuroimmunomodulation 2, 241-248.

Banks, W.A., Ortiz, L., Plotkin, S.R., Kastin, A.J., 1991. Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. J Pharmacol Exp Ther 259, 988-996.

Bannerman, P., Hahn, A., Soulika, A., Gallo, V., Pleasure, D., 2007. Astrogliosis in EAE spinal cord: derivation from radial glia, and relationships to oligodendroglia. Glia 55, 57-64.

Baranzini, S.E., Jeong, M.C., Butunoi, C., Murray, R.S., Bernard, C.C., Oksenberg, J.R., 1999. B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. J Immunol 163, 5133-5144.

Barnett, M.H., Prineas, J.W., 2004. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. Ann Neurol 55, 458-468.

Beauquis, J., Homo-Delarche, F., Revsin, Y., De Nicola, A.F., Saravia, F., 2008. Brain alterations in autoimmune and pharmacological models of diabetes mellitus: focus on hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis disturbances. Neuroimmunomodulation 15, 61-67.

Berkenbosch, F., van Oers, J., del Rey, A., Tilders, F., Besedovsky, H., 1987. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. Science 238, 524-526.

Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E., Dinarello, C.A., 1986. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. Science 233, 652-654.

Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T., Bruck, W., 2000. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. Brain 123 (Pt 6), 1174-1183.

Blakemore, W.F., Franklin, R.J., 2008. Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. Curr Top Microbiol Immunol 318, 193-212.

Boche, D., Perry, V.H., Nicoll, J.A., 2013. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. Neuropathol Appl Neurobiol 39, 3-18.

Borzani, I., Tola, M.R., Caniatti, L., Collins, A., De Santis, G., Luiselli, D., Mamolini, E., Scapoli, C., 2010. The interleukin-1 cluster gene region is associated with multiple sclerosis in an Italian Caucasian population. Eur J Neurol 17, 930-938.

Boutin, H., Kimber, I., Rothwell, N.J., Pinteaux, E., 2003. The expanding interleukin-1 family and its receptors: do alternative IL-1 receptor/signaling pathways exist in the brain? Mol Neurobiol 27, 239-248.

Bradl, M., Lassmann, H., 2009. Progressive multiple sclerosis. Semin Immunopathol 31, 455-465.

Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W.H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E.J., Bethea, J.R., 2005. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. J Exp Med 202, 145-156.

Bramow, S., Frischer, J.M., Lassmann, H., Koch-Henriksen, N., Lucchinetti, C.F., Sorensen, P.S., Laursen, H., 2010. Demyelination versus remyelination in progressive multiple sclerosis. Brain 133, 2983-2998.

Brenneman, D.E., Schultzberg, M., Bartfai, T., Gozes, I., 1992. Cytokine regulation of neuronal survival. J Neurochem 58, 454-460.

Brightman, M.W., Klatzo, I., Olsson, Y., Reese, T.S., 1970. The blood-brain barrier to proteins under normal and pathological conditions. J Neurol Sci 10, 215-239.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 303, 1532-1535.

Brosnan, C.F., Cannella, B., Battistini, L., Raine, C.S., 1995. Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. Neurology 45, S16-21.

Bruck, W., Stadelmann, C., 2005. The spectrum of multiple sclerosis: new lessons from pathology. Curr Opin Neurol 18, 221-224.

Brunello, A.G., Weissenberger, J., Kappeler, A., Vallan, C., Peters, M., Rose-John, S., Weis, J., 2000. Astrocytic alterations in interleukin-6/Soluble interleukin-6 receptor alpha double-transgenic mice. Am J Pathol 157, 1485-1493.

Buenafe, A.C., Bourdette, D.N., 2007. Lipopolysaccharide pretreatment modulates the disease course in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol 182, 32-40.

Buljevac, D., Flach, H.Z., Hop, W.C., Hijdra, D., Laman, J.D., Savelkoul, H.F., van Der Meche, F.G., van Doorn, P.A., Hintzen, R.Q., 2002. Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. Brain 125, 952-960.

Buljevac, D., Hop, W.C., Reedeker, W., Janssens, A.C., van der Meche, F.G., van Doorn, P.A., Hintzen, R.Q., 2003. Self reported stressful life events and exacerbations in multiple sclerosis: prospective study. BMJ 327, 646.

Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostenfeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., Sofroniew, M.V., 1999. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. Neuron 23, 297-308.

Butovsky, O., Landa, G., Kunis, G., Ziv, Y., Avidan, H., Greenberg, N., Schwartz, A., Smirnov, I., Pollack, A., Jung, S., Schwartz, M., 2006a. Induction and blockage of oligodendrogenesis by differently activated microglia in an animal model of multiple sclerosis. J Clin Invest 116, 905-915.

Butovsky, O., Talpalar, A.E., Ben-Yaakov, K., Schwartz, M., 2005. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. Mol Cell Neurosci 29, 381-393.

Butovsky, O., Ziv, Y., Schwartz, A., Landa, G., Talpalar, A.E., Pluchino, S., Martino, G., Schwartz, M., 2006b. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. Mol Cell Neurosci 31, 149-160.

Byravan, S., Foster, L.M., Phan, T., Verity, A.N., Campagnoni, A.T., 1994. Murine oligodendroglial cells express nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 8812-8816.

Byrne, J.H., Roberts, J.L., 2004. From molecules to networks: An introduction to cellular and molecular Neuroscience. Elsevier Science, San Diego.

Callewaere, C., Banisadr, G., Rostene, W., Parsadaniantz, S.M., 2007. Chemokines and chemokine receptors in the brain: implication in neuroendocrine regulation. J Mol Endocrinol 38, 355-363.

Campbell, I.L., Abraham, C.R., Masliah, E., Kemper, P., Inglis, J.D., Oldstone, M.B., Mucke, L., 1993. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 10061-10065.

Campbell, S.J., Anthony, D.C., Oakley, F., Carlsen, H., Elsharkawy, A.M., Blomhoff, R., Mann, D.A., 2008a. Hepatic nuclear factor kappa B regulates neutrophil recruitment to the injured brain. J Neuropathol Exp Neurol 67, 223-230.

Campbell, S.J., Hughes, P.M., Iredale, J.P., Wilcockson, D.C., Waters, S., Docagne, F., Perry, V.H., Anthony, D.C., 2003. CINC-1 is an acute-phase protein induced by focal brain injury causing leukocyte mobilization and liver injury. FASEB J 17, 1168-1170.

Campbell, S.J., Jiang, Y., Davis, A.E., Farrands, R., Holbrook, J., Leppert, D., Anthony, D.C., 2007. Immunomodulatory effects of etanercept in a model of brain injury act through attenuation of the acute-phase response. J Neurochem 103, 2245-2255.

Campbell, S.J., Meier, U., Mardiguian, S., Jiang, Y., Littleton, E.T., Bristow, A., Relton, J., Connor, T.J., Anthony, D.C., 2010. Sickness behaviour is induced by a peripheral CXC-chemokine also expressed in multiple sclerosis and EAE. Brain Behav Immun 24, 738-746.

Campbell, S.J., Perry, V.H., Pitossi, F.J., Butchart, A.G., Chertoff, M., Waters, S., Dempster, R., Anthony, D.C., 2005. Central nervous system injury triggers hepatic CC and CXC chemokine expression that is associated with leukocyte mobilization and recruitment to both the central nervous system and the liver. Am J Pathol 166, 1487-1497.

Campbell, S.J., Zahid, I., Losey, P., Law, S., Jiang, Y., Bilgen, M., van Rooijen, N., Morsali, D., Davis, A.E., Anthony, D.C., 2008b. Liver Kupffer cells control the magnitude of the inflammatory response in the injured brain and spinal cord. Neuropharmacology 55, 780-787.

Cannella, B., Pitt, D., Capello, E., Raine, C.S., 2000. Insulin-like growth factor-1 fails to enhance central nervous system myelin repair during autoimmune demyelination. Am J Pathol 157, 933-943.

Carlson, T., Kroenke, M., Rao, P., Lane, T.E., Segal, B., 2008. The Th17-ELR+ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. J Exp Med 205, 811-823.

Codarri, L., Fontana, A., Becher, B., 2010. Cytokine networks in multiple sclerosis: lost in translation. Curr Opin Neurol 23, 205-211.

Colditz, I.G., 1985. Kinetics of tachyphylaxis to mediators of acute inflammation. Immunology 55, 149-156.

Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S., Mantovani, A., 1992. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. Blood 80, 2012-2020.

Combrinck, M.I., Perry, V.H., Cunningham, C., 2002. Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. Neuroscience 112, 7-11.

Compston, A., Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. Lancet 372, 1502-1517.

Condliffe, A.M., Chilvers, E.R., Haslett, C., Dransfield, I., 1996. Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function. Immunology 89, 105-111.

Condliffe, A.M., Kitchen, E., Chilvers, E.R., 1998. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. Clin Sci (Lond) 94, 461-471.

Correale, J., Farez, M.F., 2011a. The impact of environmental infections (parasites) on MS activity. Mult Scler 17, 1162-1169.

Correale, J., Farez, M.F., 2011b. The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis. J Neuroimmunol 233, 6-11.

Crestani, F., Seguy, F., Dantzer, R., 1991. Behavioural effects of peripherally injected interleukin-1: role of prostaglandins. Brain Res 542, 330-335.

Cunningham, C., Campion, S., Lunnon, K., Murray, C.L., Woods, J.F., Deacon, R.M., Rawlins, J.N., Perry, V.H., 2009. Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. Biol Psychiatry 65, 304-312.

Cunningham, C., Campion, S., Teeling, J., Felton, L., Perry, V.H., 2007. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). Brain Behav Immun 21, 490-502.

Cunningham, C., Wilcockson, D.C., Boche, D., Perry, V.H., 2005a. Comparison of inflammatory and acute-phase responses in the brain and peripheral organs of the ME7 model of prion disease. J Virol 79, 5174-5184.

Cunningham, C., Wilcockson, D.C., Campion, S., Lunnon, K., Perry, V.H., 2005b. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. J Neurosci 25, 9275-9284.

Cybulsky, M.I., McComb, D.J., Movat, H.Z., 1988. Neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. Mediator roles of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha 1. J Immunol 140, 3144-3149.

Chang, A., Tourtellotte, W.W., Rudick, R., Trapp, B.D., 2002. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. N Engl J Med 346, 165-173.

Chari, D.M., Zhao, C., Kotter, M.R., Blakemore, W.F., Franklin, R.J., 2006. Corticosteroids delay remyelination of experimental demyelination in the rodent central nervous system. J Neurosci Res 83, 594-605.

Chertoff, M., Di Paolo, N., Schoeneberg, A., Depino, A., Ferrari, C., Wurst, W., Pfizenmaier, K., Eisel, U., Pitossi, F., 2011. Neuroprotective and neurodegenerative effects of the

chronic expression of tumor necrosis factor alpha in the nigrostriatal dopaminergic circuit of adult mice. Exp Neurol 227, 237-251.

Ching, S., He, L., Lai, W., Quan, N., 2005. IL-1 type I receptor plays a key role in mediating the recruitment of leukocytes into the central nervous system. Brain Behav Immun 19, 127-137.

Ching, S., Zhang, H., Belevych, N., He, L., Lai, W., Pu, X.A., Jaeger, L.B., Chen, Q., Quan, N., 2007. Endothelial-specific knockdown of interleukin-1 (IL-1) type 1 receptor differentially alters CNS responses to IL-1 depending on its route of administration. J Neurosci 27, 10476-10486.

Dai, X., Lercher, L.D., Clinton, P.M., Du, Y., Livingston, D.L., Vieira, C., Yang, L., Shen, M.M., Dreyfus, C.F., 2003. The trophic role of oligodendrocytes in the basal forebrain. J Neurosci 23, 5846-5853.

Dantzer, R., 2006. Cytokine, sickness behavior, and depression. Neurol Clin 24, 441-460.

Dantzer, R., Kelley, K.W., 2007. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. Brain Behav Immun 21, 153-160.

Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley, K.W., 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nat Rev Neurosci 9, 46-56.

Davis, C.N., Mann, E., Behrens, M.M., Gaidarova, S., Rebek, M., Rebek, J., Jr., Bartfai, T., 2006. MyD88-dependent and -independent signaling by IL-1 in neurons probed by bifunctional Toll/IL-1 receptor domain/BB-loop mimetics. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 2953-2958.

del Rey, A., Besedovsky, H.O., 2000. The cytokine-HPA axis circuit contributes to prevent or moderate autoimmune processes. Z Rheumatol 59 Suppl 2, II/31-35.

Depino, A., Ferrari, C., Pott Godoy, M.C., Tarelli, R., Pitossi, F.J., 2005. Differential effects of interleukin-1beta on neurotoxicity, cytokine induction and glial reaction in specific brain regions. J Neuroimmunol 168, 96-110.

Diem, R., Hobom, M., Grotsch, P., Kramer, B., Bahr, M., 2003. Interleukin-1 beta protects neurons via the interleukin-1 (IL-1) receptor-mediated Akt pathway and by IL-1 receptor-independent decrease of transmembrane currents in vivo. Mol Cell Neurosci 22, 487-500.

Dinarello, C.A., 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood 87, 2095-2147.

Dincic, E., Zivkovic, M., Stankovic, A., Obradovic, D., Alavantic, D., Kostic, V., Raicevic, R., 2006. Association of polymorphisms in CTLA-4, IL-1ra and IL-1beta genes with multiple sclerosis in Serbian population. J Neuroimmunol 177, 146-150.

Docagne, F., Campbell, S.J., Bristow, A.F., Poole, S., Vigues, S., Guaza, C., Perry, V.H., Anthony, D.C., 2005. Differential regulation of type I and type II interleukin-1 receptors in focal brain inflammation. Eur J Neurosci 21, 1205-1214.

Dong, Y., Benveniste, E.N., 2001. Immune function of astrocytes. Glia 36, 180-190.

Dovi, J.V., He, L.K., DiPietro, L.A., 2003. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. J Leukoc Biol 73, 448-455.

Du, Y., Dreyfus, C.F., 2002. Oligodendrocytes as providers of growth factors. J Neurosci Res 68, 647-654.

Dujmovic, I., Mangano, K., Pekmezovic, T., Quattrocchi, C., Mesaros, S., Stojsavljevic, N., Nicoletti, F., Drulovic, J., 2009. The analysis of IL-1 beta and its naturally occurring inhibitors in multiple sclerosis: The elevation of IL-1 receptor antagonist and IL-1 receptor type II after steroid therapy. J Neuroimmunol 207, 101-106.

Dunn, A.J., 1992. The role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in the neurochemical and neuroendocrine responses to endotoxin. Brain Res Bull 29, 807-812.

Dunn, A.J., 2000. Cytokine activation of the HPA axis. Ann N Y Acad Sci 917, 608-617.

Easton, A.S., 2013. Neutrophils and stroke - Can neutrophils mitigate disease in the central nervous system? Int Immunopharmacol.

Ebers, G.C., Kukay, K., Bulman, D.E., Sadovnick, A.D., Rice, G., Anderson, C., Armstrong, H., Cousin, K., Bell, R.B., Hader, W., Paty, D.W., Hashimoto, S., Oger, J., Duquette, P., Warren, S., Gray, T., O'Connor, P., Nath, A., Auty, A., Metz, L., Francis, G., Paulseth, J.E., Murray, T.J., Pryse-Phillips, W., Nelson, R., Freedman, M., Brunet, D., Bouchard, J.P., Hinds, D., Risch, N., 1996. A full genome search in multiple sclerosis. Nat Genet 13, 472-476.

Edwards, L.J., Sharrack, B., Ismail, A., Tumani, H., Constantinescu, C.S., 2011. Central inflammation versus peripheral regulation in multiple sclerosis. J Neurol 258, 1518-1527.

Eikelenboom, P., Bate, C., Van Gool, W.A., Hoozemans, J.J., Rozemuller, J.M., Veerhuis, R., Williams, A., 2002. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. Glia 40, 232-239.

Ek, M., Kurosawa, M., Lundeberg, T., Ericsson, A., 1998. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. J Neurosci 18, 9471-9479.

Eming, S.A., Krieg, T., Davidson, J.M., 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. J Invest Dermatol 127, 514-525.

Engelhardt, B., Coisne, C., 2011. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. Fluids Barriers CNS 8, 4.

Ericsson, A., Liu, C., Hart, R.P., Sawchenko, P.E., 1995. Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. J Comp Neurol 361, 681-698.

Espel, E., Garcia-Sanz, J.A., Aubert, V., Menoud, V., Sperisen, P., Fernandez, N., Spertini, F., 1996. Transcriptional and translational control of TNF-alpha gene expression in human monocytes by major histocompatibility complex class II ligands. Eur J Immunol 26, 2417-2424.

Evans, R.J., Bray, J., Childs, J.D., Vigers, G.P., Brandhuber, B.J., Skalicky, J.J., Thompson, R.C., Eisenberg, S.P., 1995. Mapping receptor binding sites in interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 beta by site-directed mutagenesis. Identification of a single site in IL-1ra and two sites in IL-1 beta. J Biol Chem 270, 11477-11483.

Farina, C., Aloisi, F., Meinl, E., 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. Trends Immunol.

Fast, D.J., Schlievert, P.M., Nelson, R.D., 1989. Toxic shock syndrome-associated staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins are potent inducers of tumor necrosis factor production. Infect Immun 57, 291-294.

Faulkner, J.R., Herrmann, J.E., Woo, M.J., Tansey, K.E., Doan, N.B., Sofroniew, M.V., 2004. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. J Neurosci 24, 2143-2155.

Ferrari, C.C., Depino, A.M., Prada, F., Muraro, N., Campbell, S., Podhajcer, O., Perry, V.H., Anthony, D.C., Pitossi, F.J., 2004. Reversible Demyelination, Blood-Brain Barrier Breakdown, and Pronounced Neutrophil Recruitment Induced by Chronic IL-1 Expression in the Brain. Am J Pathol 165, 1827-1837.

Ferrari, C.C., Pott Godoy, M.C., Tarelli, R., Chertoff, M., Depino, A.M., Pitossi, F.J., 2006. Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra. Neurobiol Dis 24, 183-193.

Feuerstein, G., Wang, X., Barone, F.C., 1998. Cytokines in brain ischemia--the role of TNF alpha. Cell Mol Neurobiol 18, 695-701.

Fil, D., Borysiewicz, E., Konat, G.W., 2011. A broad upregulation of cerebral chemokine genes by peripherally-generated inflammatory mediators. Metab Brain Dis 26, 49-59.

Frank, M.G., Miguel, Z.D., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2010. Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to E. coli lipopolysaccharide. Brain Behav Immun 24, 19-30.

Franklin, R.J., Kotter, M.R., 2008. The biology of CNS remyelination: the key to therapeutic advances. J Neurol 255 Suppl 1, 19-25.

Frei, K., Siepl, C., Groscurth, P., Bodmer, S., Schwerdel, C., Fontana, A., 1987. Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. Eur J Immunol 17, 1271-1278.

Friese, M.A., Montalban, X., Willcox, N., Bell, J.I., Martin, R., Fugger, L., 2006. The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. Brain 129, 1940-1952.

Frohman, E.M., Racke, M.K., Raine, C.S., 2006. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. N Engl J Med 354, 942-955.

Fung, A., Vizcaychipi, M., Lloyd, D., Wan, Y., Ma, D., 2012. Central nervous system inflammation in disease related conditions: mechanistic prospects. Brain Res 1446, 144-155.

Furlan, R., Bergami, A., Brambilla, E., Butti, E., De Simoni, M.G., Campagnoli, M., Marconi, P., Comi, G., Martino, G., 2007. HSV-1-mediated IL-1 receptor antagonist gene therapy ameliorates MOG(35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. Gene Ther 14, 93-98.

Galea, I., Bechmann, I., Perry, V.H., 2007. What is immune privilege (not)? Trends Immunol 28, 12-18.

Gao, Z., Tsirka, S.E., 2011. Animal Models of MS Reveal Multiple Roles of Microglia in Disease Pathogenesis. Neurol Res Int 2011, 383087.

Garcia-Marin, V., Garcia-Lopez, P., Freire, M., 2007. Cajal's contributions to the study of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis 12, 161-174.

Glabinski, A.R., Tani, M., Strieter, R.M., Tuohy, V.K., Ransohoff, R.M., 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, 617-630.

Godbout, J.P., Chen, J., Abraham, J., Richwine, A.F., Berg, B.M., Kelley, K.W., Johnson, R.W., 2005. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. FASEB J 19, 1329-1331.

Godoy, M.C., Tarelli, R., Ferrari, C.C., Sarchi, M.I., Pitossi, F.J., 2008. Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. Brain 131, 1880-1894.

Goehler, L.E., Gaykema, R.P., Nguyen, K.T., Lee, J.E., Tilders, F.J., Maier, S.F., Watkins, L.R., 1999. Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? J Neurosci 19, 2799-2806.

Golde, T.E., Streit, W.J., Chakrabarty, P., 2013. Alzheimer's disease risk alleles in TREM2 illuminate innate immunity in Alzheimer's disease. Alzheimers Res Ther 5, 24.

Gordon, S., 2003. Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol 3, 23-35.

Gordon, S., Taylor, P.R., 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol 5, 953-964.

Gosselin, D., Rivest, S., 2007. Role of IL-1 and TNF in the brain: twenty years of progress on a Dr. Jekyll/Mr. Hyde duality of the innate immune system. Brain Behav Immun 21, 281-289.

Graeber, M.B., Lopez-Redondo, F., Ikoma, E., Ishikawa, M., Imai, Y., Nakajima, K., Kreutzberg, G.W., Kohsaka, S., 1998. The microglia/macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. Brain Res 813, 241-253.

Grammas, P., Martinez, J., Miller, B., 2011. Cerebral microvascular endothelium and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Expert Rev Mol Med 13, e19.

Greter, M., Heppner, F.L., Lemos, M.P., Odermatt, B.M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R.J., Becher, B., 2005. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. Nat Med 11, 328-334.

Griffin, É.W., Anthony, D.C., Connor, T.J., 2011. Immunomodulatory effects of the beta2-adrenoceptor agonist clenbuterol in an acute brain injury model. PNIRS, Chicago, USA.

Grigoriadis, N., Hadjigeorgiou, G.M., 2006. Virus-mediated autoimmunity in Multiple Sclerosis. J Autoimmune Dis 3, 1.

Haak, S., Croxford, A.L., Kreymborg, K., Heppner, F.L., Pouly, S., Becher, B., Waisman, A., 2009. IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. J Clin Invest 119, 61-69.

Hafler, D.A., Slavik, J.M., Anderson, D.E., O'Connor, K.C., De Jager, P., Baecher-Allan, C., 2005. Multiple sclerosis. Immunol Rev 204, 208-231.

Haines, J.D., Inglese, M., Casaccia, P., 2011. Axonal damage in multiple sclerosis. Mt Sinai J Med 78, 231-243.

Haines, J.L., Ter-Minassian, M., Bazyk, A., Gusella, J.F., Kim, D.J., Terwedow, H., Pericak-Vance, M.A., Rimmler, J.B., Haynes, C.S., Roses, A.D., Lee, A., Shaner, B., Menold, M., Seboun, E., Fitoussi, R.P., Gartioux, C., Reyes, C., Ribierre, F., Gyapay, G., Weissenbach, J., Hauser, S.L., Goodkin, D.E., Lincoln, R., Usuku, K., Oksenberg, J.R., et al., 1996. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatability complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. Nat Genet 13, 469-471.

Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C., 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. Blood 92, 3007-3017.

Hansen, M.K., O'Connor, K.A., Goehler, L.E., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2001. The contribution of the vagus nerve in interleukin-1beta-induced fever is dependent on dose. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 280, R929-934.

Harbuz, M.S., Chover-Gonzalez, A.J., Jessop, D.S., 2003. Hypothalamo-pituitary-adrenal axis and chronic immune activation. Ann N Y Acad Sci 992, 99-106.

Hatten, M.E., Liem, R.K., Shelanski, M.L., Mason, C.A., 1991. Astroglia in CNS injury. Glia 4, 233-243.

Hauser, S.L., Doolittle, T.H., Lincoln, R., Brown, R.H., Dinarello, C.A., 1990. Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients: frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6. Neurology 40, 1735-1739.

Henderson, A.P., Barnett, M.H., Parratt, J.D., Prineas, J.W., 2009. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. Ann Neurol 66, 739-753.

Henry, C.J., Huang, Y., Wynne, A.M., Godbout, J.P., 2009. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. Brain Behav Immun 23, 309-317.

Hiremath, M.M., Chen, V.S., Suzuki, K., Ting, J.P., Matsushima, G.K., 2008. MHC class II exacerbates demyelination in vivo independently of T cells. J Neuroimmunol 203, 23-32.

Hirt, B., 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. J Mol Biol 26, 365-369.

Hofstetter, H.H., Ibrahim, S.M., Koczan, D., Kruse, N., Weishaupt, A., Toyka, K.V., Gold, R., 2005. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. Cell Immunol 237, 123-130.

Holmes, C., Cunningham, C., Zotova, E., Woolford, J., Dean, C., Kerr, S., Culliford, D., Perry, V.H., 2009. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. Neurology 73, 768-774.

Hopkins, S.J., Rothwell, N.J., 1995. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. Trends Neurosci 18, 83-88.

Huitinga, I., Schmidt, E.D., van der Cammen, M.J., Binnekade, R., Tilders, F.J., 2000. Priming with interleukin-1beta suppresses experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. J Neuroendocrinol 12, 1186-1193.

Jacobs, C.A., Baker, P.E., Roux, E.R., Picha, K.S., Toivola, B., Waugh, S., Kennedy, M.K., 1991. Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated by IL-1 alpha and suppressed by soluble IL-1 receptor. J Immunol 146, 2983-2989.

Janik, J.E., Curti, B.D., Considine, R.V., Rager, H.C., Powers, G.C., Alvord, W.G., Smith, J.W., 2nd, Gause, B.L., Kopp, W.C., 1997. Interleukin 1 alpha increases serum leptin concentrations in humans. J Clin Endocrinol Metab 82, 3084-3086.

Jiang, Y., Deacon, R., Anthony, D.C., Campbell, S.J., 2008. Inhibition of peripheral TNF can block the malaise associated with CNS inflammatory diseases. Neurobiol Dis 32, 125-132.

Kent, S., Bluthe, R.M., Dantzer, R., Hardwick, A.J., Kelley, K.W., Rothwell, N.J., Vannice, J.L., 1992. Different receptor mechanisms mediate the pyrogenic and behavioral effects of interleukin 1. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 9117-9120.

Kieseier, B.C., Hemmer, B., Hartung, H.P., 2005. Multiple sclerosis--novel insights and new therapeutic strategies. Curr Opin Neurol 18, 211-220.

Kigerl, K.A., Gensel, J.C., Ankeny, D.P., Alexander, J.K., Donnelly, D.J., Popovich, P.G., 2009. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. J Neurosci 29, 13435-13444.

Kim, K.S., Wass, C.A., Cross, A.S., Opal, S.M., 1992. Modulation of blood-brain barrier permeability by tumor necrosis factor and antibody to tumor necrosis factor in the rat. Lymphokine Cytokine Res 11, 293-298.

Kolb, M., Margetts, P.J., Anthony, D.C., Pitossi, F., Gauldie, J., 2001. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. J Clin Invest 107, 1529-1536.

Konsman, J.P., Kelley, K., Dantzer, R., 1999. Temporal and spatial relationships between lipopolysaccharide-induced expression of Fos, interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in rat brain. Neuroscience 89, 535-548.

Konsman, J.P., Luheshi, G.N., Bluthe, R.M., Dantzer, R., 2000. The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis. Eur J Neurosci 12, 4434-4446.

Kornek, B., Storch, M.K., Weissert, R., Wallstroem, E., Stefferl, A., Olsson, T., Linington, C., Schmidbauer, M., Lassmann, H., 2000. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. Am J Pathol 157, 267-276.

Kossmann, T., Hans, V.H., Imhof, H.G., Stocker, R., Grob, P., Trentz, O., Morganti-Kossmann, C., 1995. Intrathecal and serum interleukin-6 and the acute-phase response in patients with severe traumatic brain injuries. Shock 4, 311-317.

Kotter, M.R., Setzu, A., Sim, F.J., Van Rooijen, N., Franklin, R.J., 2001. Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination. Glia 35, 204-212.

Kotter, M.R., Zhao, C., van Rooijen, N., Franklin, R.J., 2005. Macrophage-depletion induced impairment of experimental CNS remyelination is associated with a reduced oligodendrocyte progenitor cell response and altered growth factor expression. Neurobiol Dis 18, 166-175.

Kreutzberg, G.W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19, 312-318.

Krieger, M., Brunner, T., Bischoff, S.C., von Tscharner, V., Walz, A., Moser, B., Baggiolini, M., Dahinden, C.A., 1992. Activation of human basophils through the IL-8 receptor. J Immunol 149, 2662-2667.

Kruger, P.G., Bo, L., Myhr, K.M., Karlsen, A.E., Taule, A., Nyland, H.I., Mork, S., 1990. Mast cells and multiple sclerosis: a light and electron microscopic study of mast cells in multiple sclerosis emphasizing staining procedures. Acta Neurol Scand 81, 31-36.

Kuijpers, T.W., Van Lier, R.A., Hamann, D., de Boer, M., Thung, L.Y., Weening, R.S., Verhoeven, A.J., Roos, D., 1997. Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins. J Clin Invest 100, 1725-1733.

Kutzelnigg, A., Lucchinetti, C.F., Stadelmann, C., Bruck, W., Rauschka, H., Bergmann, M., Schmidbauer, M., Parisi, J.E., Lassmann, H., 2005. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. Brain 128, 2705-2712.

Lampa, J., Westman, M., Kadetoff, D., Agreus, A.N., Le Maitre, E., Gillis-Haegerstrand, C., Andersson, M., Khademi, M., Corr, M., Christianson, C.A., Delaney, A., Yaksh, T.L., Kosek, E., Svensson, C.I., 2012. Peripheral inflammatory disease associated with centrally activated IL-1 system in humans and mice. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 12728-12733.

Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P.E., Griffiths, I.R., Nave, K.A., 2003. Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. Nat Genet 33, 366-374.

Larochelle, C., Alvarez, J.I., Prat, A., 2011. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? FEBS Lett 585, 3770-3780.

Lazzarini, R.A., Myelin biology and disorders. Elsiver academic press, San Diego.

Lee, M., Schwab, C., McGeer, P.L., 2011. Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. Glia 59, 152-165.

Lehrer, R.I., Ganz, T., 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. Curr Opin Immunol 11, 23-27.

Leibovich, S.J., Ross, R., 1975. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. Am J Pathol 78, 71-100.

Leonard, J.P., Waldburger, K.E., Goldman, S.J., 1995. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. J Exp Med 181, 381-386.

Li, Q., Powell, N., Zhang, H., Belevych, N., Ching, S., Chen, Q., Sheridan, J., Whitacre, C., Quan, N., 2011. Endothelial IL-1R1 is a critical mediator of EAE pathogenesis. Brain Behav Immun 25, 160-167.

Li, X.L., Lv, J., Xi, N.N., Wang, T., Shang, X.F., Xu, H.Q., Han, Z., O'Byrne, K.T., Li, X.F., Zheng, R.Y., 2010. Neonatal endotoxin exposure suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis through regulating the immune cells responsivity in the central nervous system of adult rats. Biochem Biophys Res Commun 398, 302-308.

Lindquist, S., Hassinger, S., Lindquist, J.A., Sailer, M., 2011. The balance of pro-inflammatory and trophic factors in multiple sclerosis patients: effects of acute relapse and immunomodulatory treatment. Mult Scler 17, 851-866.

Ling, P.R., Schwartz, J.H., Bistrian, B.R., 1997. Mechanisms of host wasting induced by administration of cytokines in rats. Am J Physiol 272, E333-339.

Linington, C., Engelhardt, B., Kapocs, G., Lassman, H., 1992. Induction of persistently demyelinated lesions in the rat following the repeated adoptive transfer of encephalitogenic T cells and demyelinating antibody. J Neuroimmunol 40, 219-224.

Lippert, U., Zachmann, K., Henz, B.M., Neumann, C., 2004. Human T lymphocytes and mast cells differentially express and regulate extra- and intracellular CXCR1 and CXCR2. Exp Dermatol 13, 520-525.

Lipton, S.A., 1997. Janus faces of NF-kappa B: neurodestruction versus neuroprotection. Nat Med 3, 20-22.

Liu, L., Belkadi, A., Darnall, L., Hu, T., Drescher, C., Cotleur, A.C., Padovani-Claudio, D., He, T., Choi, K., Lane, T.E., Miller, R.H., Ransohoff, R.M., 2010. CXCR2-positive neutrophils are essential for cuprizone-induced demyelination: relevance to multiple sclerosis. Nat Neurosci 13, 319-326.

Loddick, S., Rothwell, N., 2002. Cytokines and neurodegeneration. In: Loddick, S., Rothwell, N. (Eds.), Immune an Inflammatory Responses in the Nervous System. Oxford University Press, Oxford, pp. 90-105.

Loddick, S.A., Wong, M.L., Bongiorno, P.B., Gold, P.W., Licinio, J., Rothwell, N.J., 1997. Endogenous interleukin-1 receptor antagonist is neuroprotective. Biochem Biophys Res Commun 234, 211-215.

London, A., Cohen, M., Schwartz, M., 2013. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. Front Cell Neurosci 7, 34.

Loscher, C.E., Mills, K.H., Lynch, M.A., 2003. Interleukin-1 receptor antagonist exerts agonist activity in the hippocampus independent of the interleukin-1 type I receptor. J Neuroimmunol 137, 117-124.

Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. Ann Neurol 47, 707-717.

Lucchinetti, C.F., Bruck, W., Lassmann, H., 2004. Evidence for pathogenic heterogeneity in multiple sclerosis. Ann Neurol 56, 308.

Luger, T.A., Schwarz, T., 1990. Evidence for an epidermal cytokine network. J Invest Dermatol 95, 100S-104S.

Luheshi, G.N., Bluthe, R.M., Rushforth, D., Mulcahy, N., Konsman, J.P., Goldbach, M., Dantzer, R., 2000. Vagotomy attenuates the behavioural but not the pyrogenic effects of interleukin-1 in rats. Auton Neurosci 85, 127-132.

Maimone, D., Gregory, S., Arnason, B.G., Reder, A.T., 1991. Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. J Neuroimmunol 32, 67-74.

Martin, D., Near, S.L., 1995. Protective effect of the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on experimental allergic encephalomyelitis in rats. J Neuroimmunol 61, 241-245.

Mason, J.L., Suzuki, K., Chaplin, D.D., Matsushima, G.K., 2001. Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. J Neurosci 21, 7046-7052.

Matarese, G., Carrieri, P.B., Montella, S., De Rosa, V., La Cava, A., 2010. Leptin as a metabolic link to multiple sclerosis. Nat Rev Neurol 6, 455-461.

Matsuki, T., Nakae, S., Sudo, K., Horai, R., Iwakura, Y., 2006. Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1R antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. Int Immunol 18, 399-407.

Matute, C., Perez-Cerda, F., 2005. Multiple sclerosis: novel perspectives on newly forming lesions. Trends Neurosci 28, 173-175.

McColl, B.W., Rothwell, N.J., Allan, S.M., 2007. Systemic inflammatory stimulus potentiates the acute phase and CXC chemokine responses to experimental stroke and exacerbates brain damage via interleukin-1- and neutrophil-dependent mechanisms. J Neurosci 27, 4403-4412.

McQuaid, S., Cunnea, P., McMahon, J., Fitzgerald, U., 2009. The effects of blood-brain barrier disruption on glial cell function in multiple sclerosis. Biochem Soc Trans 37, 329-331.

Megyeri, P., Abraham, C.S., Temesvari, P., Kovacs, J., Vas, T., Speer, C.P., 1992. Recombinant human tumor necrosis factor alpha constricts pial arterioles and increases blood-brain barrier permeability in newborn piglets. Neurosci Lett 148, 137-140.

Moreno, B., Jukes, J.P., Vergara-Irigaray, N., Errea, O., Villoslada, P., Perry, V.H., Newman, T.A., 2011. Systemic inflammation induces axon injury during brain inflammation. Ann Neurol 70, 932-942.

Mosher, B., Dean, R., Harkema, J., Remick, D., Palma, J., Crockett, E., 2001. Inhibition of Kupffer cells reduced CXC chemokine production and liver injury. J Surg Res 99, 201-210.

Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol 8, 958-969.

Moynagh, P.N., 2005. The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. J Anat 207, 265-269.

Muldoon, L.L., Alvarez, J.I., Begley, D.J., Boado, R.J., Del Zoppo, G.J., Doolittle, N.D., Engelhardt, B., Hallenbeck, J.M., Lonser, R.R., Ohlfest, J.R., Prat, A., Scarpa, M., Smeyne, R.J., Drewes, L.R., Neuwelt, E.A., 2013. Immunologic privilege in the central nervous system and the blood-brain barrier. J Cereb Blood Flow Metab 33, 13-21.

Murphy, J.B., Sturm, E., 1923. Conditions Determining the Transplantability of Tissues in the Brain. J Exp Med 38, 183-197.

Murta, V., 2007. Efecto de estímulos pro-inflamatorios repetidos sobre la inflamación y desmielinización. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, p. 111.

Murta, V., Ferrari, C.C., 2013. Influence of Peripheral inflammation on the progression of multiple sclerosis: evidence from the clinic and experimental animal models. Mol Cell Neurosci 53, 6-13.

Naegele, M., Tillack, K., Reinhardt, S., Schippling, S., Martin, R., Sospedra, M., 2011. Neutrophils in multiple sclerosis are characterized by a primed phenotype. J Neuroimmunol.

Nathan, C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nat Rev Immunol 6, 173-182.

Neumann, H., Misgeld, T., Matsumuro, K., Wekerle, H., 1998. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 5779-5784.

Neuwelt, E.A., Clark, W.K., 1978. Unique aspects of central nervous system immunology. Neurosurgery 3, 419-430.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science 308, 1314-1318.

Nishiyori, A., Minami, M., Takami, S., Satoh, M., 1997. Type 2 interleukin-1 receptor mRNA is induced by kainic acid in the rat brain. Brain Res Mol Brain Res 50, 237-245.

Nogai, A., Siffrin, V., Bonhagen, K., Pfueller, C.F., Hohnstein, T., Volkmer-Engert, R., Bruck, W., Stadelmann, C., Kamradt, T., 2005. Lipopolysaccharide injection induces relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis in nontransgenic mice via bystander activation of autoreactive CD4+ cells. J Immunol 175, 959-966.

Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G., 2000. Multiple sclerosis. N Engl J Med 343, 938-952.

O'Connor, J.C., Satpathy, A., Hartman, M.E., Horvath, E.M., Kelley, K.W., Dantzer, R., Johnson, R.W., Freund, G.G., 2005. IL-1beta-mediated innate immunity is amplified in the db/db mouse model of type 2 diabetes. J Immunol 174, 4991-4997.

O'Neill, L.A., 1995. Towards an understanding of the signal transduction pathways for interleukin 1. Biochim Biophys Acta 1266, 31-44.

Ott, L., McClain, C.J., Gillespie, M., Young, B., 1994. Cytokines and metabolic dysfunction after severe head injury. J Neurotrauma 11, 447-472.

Ottani, A., Giuliani, D., Mioni, C., Galantucci, M., Minutoli, L., Bitto, A., Altavilla, D., Zaffe, D., Botticelli, A.R., Squadrito, F., Guarini, S., 2009. Vagus nerve mediates the protective effects of melanocortins against cerebral and systemic damage after ischemic stroke. J Cereb Blood Flow Metab 29, 512-523.

Palma, J.P., Park, S.H., Kim, B.S., 1996. Treatment with lipopolysaccharide enhances the pathogenicity of a low-pathogenic variant of Theiler's murine encephalomyelitis virus. J Neurosci Res 45, 776-785.

Panitch, H.S., 1994. Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis. Ann Neurol 36 Suppl, S25-28.

Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Haley, A.S., Johnson, K.P., 1987. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. Lancet 1, 893-895.

Pardridge, W.M., 2007. Blood-brain barrier delivery. Drug Discov Today 12, 54-61.

Parnet, P., Kelley, K.W., Bluthe, R.M., Dantzer, R., 2002. Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior. J Neuroimmunol 125, 5-14.

Patrikios, P., Stadelmann, C., Kutzelnigg, A., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P.S., Bruck, W., Lucchinetti, C., Lassmann, H., 2006. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. Brain 129, 3165-3172.

Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L., Lunardi, C., Annunziato, F., Romagnani, S., Cassatella, M.A., 2010. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. Blood 115, 335-343.

Penderis, J., Shields, S.A., Franklin, R.J., 2003. Impaired remyelination and depletion of oligodendrocyte progenitors does not occur following repeated episodes of focal demyelination in the rat central nervous system. Brain 126, 1382-1391.

Perry, V.H., 2004. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. Brain Behav Immun 18, 407-413.

Perry, V.H., Bell, M.D., Brown, H.C., Matyszak, M.K., 1995. Inflammation in the nervous system. Curr Opin Neurobiol 5, 636-641.

Perry, V.H., Cunningham, C., Holmes, C., 2007. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. Nat Rev Immunol 7, 161-167.

Perry, V.H., Newman, T.A., Cunningham, C., 2003. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. Nat Rev Neurosci 4, 103-112.

Perry, V.H., Teeling, J., 2013. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. Semin Immunopathol.

Peterson, L.K., Fujinami, R.S., 2007. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. J Neuroimmunol 184, 37-44.

Pitossi, F., del Rey, A., Kabiersch, A., Besedovsky, H., 1997. Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. J Neurosci Res 48, 287-298.

Playfair, J.H.L., Chain, B.M., 1979. Immunology at a glance. Blackwell Science Publishing London.

Pober, J.S., Sessa, W.C., 2007. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. Nat Rev Immunol 7, 803-815.

Pocock, J.M., Kettenmann, H., 2007. Neurotransmitter receptors on microglia. Trends Neurosci 30, 527-535.

Pott Godoy, M.C., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J., 2010. Nigral neurodegeneration triggered by striatal AdIL-1 administration can be exacerbated by systemic IL-1 expression. J Neuroimmunol 222, 29-39.

Pott Godoy, M.C., Tarelli, R., Ferrari, C.C., Sarchi, M.I., Pitossi, F.J., 2008. Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. Brain 131, 1880-1894.

Prineas, J.W., Barnard, R.O., Revesz, T., Kwon, E.E., Sharer, L., Cho, E.S., 1993. Multiple sclerosis. Pathology of recurrent lesions. Brain 116 (Pt 3), 681-693.

Probert, L., Akassoglou, K., Pasparakis, M., Kontogeorgos, G., Kollias, G., 1995. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 11294-11298.

Qian, J., Zhu, L., Li, Q., Belevych, N., Chen, Q., Zhao, F., Herness, S., Quan, N., 2012. Interleukin-1R3 mediates interleukin-1-induced potassium current increase through fast activation of Akt kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 12189-12194.

Quagliarello, V.J., Wispelwey, B., Long, W.J., Jr., Scheld, W.M., 1991. Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. J Clin Invest 87, 1360-1366.

Quan, N., Herkenham, M., 2002. Connecting cytokines and brain: a review of current issues. Histol Histopathol 17, 273-288.

Raman, D., Baugher, P.J., Thu, Y.M., Richmond, A., 2007. Role of chemokines in tumor growth. Cancer Lett 256, 137-165.

Ramon y Cajal, S., Recuerdos de mi vida. Instituto Cervantes.

Ransohoff, R.M., Brown, M.A., 2012. Innate immunity in the central nervous system. J Clin Invest 122, 1164-1171.

Ransohoff, R.M., Kivisakk, P., Kidd, G., 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. Nat Rev Immunol 3, 569-581.

Ransohoff, R.M., Liu, L., Cardona, A.E., 2007. Chemokines and chemokine receptors: multipurpose players in neuroinflammation. Int Rev Neurobiol 82, 187-204.

Reese, T.S., Karnovsky, M.J., 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. J Cell Biol 34, 207-217.

Relton, J.K., Rothwell, N.J., 1992. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. Brain Res Bull 29, 243-246.

Rezaie, P., Male, D., 2002. Mesoglia & microglia--a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. J Hist Neurosci 11, 325-374.

Rio-Hortega del, P., 1919. El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglia en estado normal. II. Intervención de la microglia en los procesos patológicos (células en bastoncito y cuerpos granulo-adiposos). III. Naturaleza probable de la microglia. Bol. Soc. Esp. Biol., 69-129.

Rio-Hortega, P.d. (Ed.), 1932. Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System, New York.

Rivest, S., Lacroix, S., Vallieres, L., Nadeau, S., Zhang, J., Laflamme, N., 2000. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. Proc Soc Exp Biol Med 223, 22-38.

Rizzo, M.T., Leaver, H.A., 2010. Brain endothelial cell death: modes, signaling pathways, and relevance to neural development, homeostasis, and disease. Mol Neurobiol 42, 52-63.

Roitt, I.M., 1988. Essential immunology. Blackwell Scientific Publications, Victoria.

Romeo, H.E., Tio, D.L., Rahman, S.U., Chiappelli, F., Taylor, A.N., 2001. The glossopharyngeal nerve as a novel pathway in immune-to-brain communication: relevance to neuroimmune surveillance of the oral cavity. J Neuroimmunol 115, 91-100.

Rostene, W., Dansereau, M.A., Godefroy, D., Van Steenwinckel, J., Reaux-Le Goazigo, A., Melik-Parsadaniantz, S., Apartis, E., Hunot, S., Beaudet, N., Sarret, P., 2011. Neurochemokines: a menage a trois providing new insights on the functions of chemokines in the central nervous system. J Neurochem 118, 680-694.

Rothwell, N.J., 1991. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. Trends Pharmacol Sci 12, 430-436.

Rothwell, N.J., Luheshi, G.N., 2000. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. Trends Neurosci 23, 618-625.

Ruffolo, R.R.J., Poste, G., Matcalf, B.W. (Eds.), 1999. New horizons in therapeutics. Overseas Publishers Association, Amsterdam.

Ruggiero, V., 2011. Involvement of IL-1R/TLR Signalling in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. Curr Mol Med.

Sanchez-Alavez, M., Tabarean, I.V., Behrens, M.M., Bartfai, T., 2006. Ceramide mediates the rapid phase of febrile response to IL-1beta. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 2904-2908.

Sarial, S., Shokrgozar, M.A., Amirzargar, A., Shokri, F., Radfar, J., Zohrevand, P., Arjang, Z., Sahraian, M.A., Lotfi, J., 2008. IL-1, IL-1R and TNFalpha gene polymorphisms in Iranian patients with multiple sclerosis. Iran J Allergy Asthma Immunol 7, 37-40.

Sawcer, S., Jones, H.B., Feakes, R., Gray, J., Smaldon, N., Chataway, J., Robertson, N., Clayton, D., Goodfellow, P.N., Compston, A., 1996. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. Nat Genet 13, 464-468.

Scheirer, C.J., Ray, W.S., Hare, N., 1976. The analysis of ranked data derived from completely randomized factorial designs. Biometrics 32, 429-434.

Schiffenbauer, J., Johnson, H.M., Butfiloski, E.J., Wegrzyn, L., Soos, J.M., 1993. Staphylococcal enterotoxins can reactivate experimental allergic encephalomyelitis. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 8543-8546.

Schmitz, T., Chew, L.J., 2008. Cytokines and myelination in the central nervous system. ScientificWorldJournal 8, 1119-1147.

Schnell, L., Fearn, S., Schwab, M.E., Perry, V.H., Anthony, D.C., 1999. Cytokine-induced acute inflammation in the brain and spinal cord. J Neuropathol Exp Neurol 58, 245-254.

Secor, V.H., Secor, W.E., Gutekunst, C.A., Brown, M.A., 2000. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. J Exp Med 191, 813-822.

Segal, A.W., 2005. How neutrophils kill microbes. Annu Rev Immunol 23, 197-223.

Segal, B.M., Constantinescu, C.S., Raychaudhuri, A., Kim, L., Fidelus-Gort, R., Kasper, L.H., 2008. Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. Lancet Neurol 7, 796-804.

Semple, B.D., Bye, N., Ziebell, J.M., Morganti-Kossmann, M.C., 2010. Deficiency of the chemokine receptor CXCR2 attenuates neutrophil infiltration and cortical damage following closed head injury. Neurobiol Dis 40, 394-403.

Seo, J.H., Miyamoto, N., Hayakawa, K., Pham, L.D., Maki, T., Ayata, C., Kim, K.W., Lo, E.H., Arai, K., 2013. Oligodendrocyte precursors induce early blood-brain barrier opening after white matter injury. J Clin Invest 123, 782-786.

Serres, S., Anthony, D.C., Jiang, Y., Broom, K.A., Campbell, S.J., Tyler, D.J., van Kasteren, S.I., Davis, B.G., Sibson, N.R., 2009. Systemic inflammatory response reactivates immune-mediated lesions in rat brain. J Neurosci 29, 4820-4828.

Sharief, M.K., Hentges, R., 1991. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. N Engl J Med 325, 467-472.

Simpson, D.M., Ross, R., 1972. The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. J Clin Invest 51, 2009-2023.

Skelly, D.T., Hennessy, E., Dansereau, M.A., Cunningham, C., 2013. A Systematic Analysis of the Peripheral and CNS Effects of Systemic LPS, IL-1Beta, TNF-alpha and IL-6 Challenges in C57BL/6 Mice. PLoS One 8, e69123.

Slavin, A., Kelly-Modis, L., Labadia, M., Ryan, K., Brown, M.L., 2010. Pathogenic mechanisms and experimental models of multiple sclerosis. Autoimmunity 43, 504-513.

Sly, L.M., Krzesicki, R.F., Brashler, J.R., Buhl, A.E., McKinley, D.D., Carter, D.B., Chin, J.E., 2001. Endogenous brain cytokine mRNA and inflammatory responses to lipopolysaccharide are elevated in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Brain Res Bull 56, 581-588.

Smedley, H., Katrak, M., Sikora, K., Wheeler, T., 1983. Neurological effects of recombinant human interferon. Br Med J (Clin Res Ed) 286, 262-264.

Soulika, A.M., Lee, E., McCauley, E., Miers, L., Bannerman, P., Pleasure, D., 2009. Initiation and progression of axonopathy in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neurosci 29, 14965-14979.

Spriggs, D.R., Sherman, M.L., Frei, E., 3rd, Kufe, D.W., 1987. Clinical studies with tumour necrosis factor. Ciba Found Symp 131, 206-227.

Stanimirovic, D.B., Friedman, A., 2012. Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? J Cereb Blood Flow Metab 32, 1207-1221.

Steinman, L., 1999. Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy. Neuron 24, 511-514.

Stern, E.L., Quan, N., Proescholdt, M.G., Herkenham, M., 2000. Spatiotemporal induction patterns of cytokine and related immune signal molecule mRNAs in response to intrastriatal injection of lipopolysaccharide. J Neuroimmunol 109, 245-260.

Sternberg, E.M., 1997. Neural-immune interactions in health and disease. J Clin Invest 100, 2641-2647.

Stolp, H.B., Dziegielewska, K.M., 2009. Review: Role of developmental inflammation and blood-brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. Neuropathol Appl Neurobiol 35, 132-146.

Su, J.J., Osoegawa, M., Matsuoka, T., Minohara, M., Tanaka, M., Ishizu, T., Mihara, F., Taniwaki, T., Kira, J., 2006. Upregulation of vascular growth factors in multiple sclerosis: correlation with MRI findings. J Neurol Sci 243, 21-30.

Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K.H., Lavelle, E.C., 2006. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med 203, 1685-1691.

Takii, T., Akahoshi, T., Kato, K., Hayashi, H., Marunouchi, T., Onozaki, K., 1992. Interleukin-1 up-regulates transcription of its own receptor in a human fibroblast cell line TIG-1: role of endogenous PGE2 and cAMP. Eur J Immunol 22, 1221-1227.

Takii, T., Hayashi, H., Marunouchi, T., Onozaki, K., 1994. Interleukin-1 down-regulates type I interleukin 1 receptor mRNA expression in a human fibroblast cell line TIG-1 in the absence of prostaglandin E2 synthesis. Lymphokine Cytokine Res 13, 213-219.

Temporin, K., Tanaka, H., Kuroda, Y., Okada, K., Yachi, K., Moritomo, H., Murase, T., Yoshikawa, H., 2008. Interleukin-1 beta promotes sensory nerve regeneration after sciatic nerve injury. Neurosci Lett 440, 130-133.

Touzani, O., Boutin, H., LeFeuvre, R., Parker, L., Miller, A., Luheshi, G., Rothwell, N., 2002. Interleukin-1 influences ischemic brain damage in the mouse independently of the interleukin-1 type I receptor. J Neurosci 22, 38-43.

Trapp, B.D., Peterson, J., Ransohoff, R.M., Rudick, R., Mork, S., Bo, L., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. N Engl J Med 338, 278-285.

Tsai, H.H., Frost, E., To, V., Robinson, S., Ffrench-Constant, C., Geertman, R., Ransohoff, R.M., Miller, R.H., 2002. The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. Cell 110, 373-383.

Tsuge, M., Yasui, K., Ichiyawa, T., Saito, Y., Nagaoka, Y., Yashiro, M., Yamashita, N., Morishima, T., 2010. Increase of tumor necrosis factor-alpha in the blood induces early activation of matrix metalloproteinase-9 in the brain. Microbiol Immunol 54, 417-424.

Tsukada, N., Miyagi, K., Matsuda, M., Yanagisawa, N., Yone, K., 1991. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the CSF and sera of patients with multiple sclerosis. J Neurol Sci 104, 230-234.

Tsunoda, I., Fujinami, R.S., 2002. Inside-Out versus Outside-In models for virus induced demyelination: axonal damage triggering demyelination. Springer Semin Immunopathol 24, 105-125.

Tsunoda, I., Kuang, L.Q., Libbey, J.E., Fujinami, R.S., 2003. Axonal injury heralds virus-induced demyelination. Am J Pathol 162, 1259-1269.

Turrin, N.P., Gayle, D., Ilyin, S.E., Flynn, M.C., Langhans, W., Schwartz, G.J., Plata-Salaman, C.R., 2001. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide. Brain Res Bull 54, 443-453.

Ulich, T.R., Guo, K.Z., Irwin, B., Remick, D.G., Davatelis, G.N., 1990. Endotoxin-induced cytokine gene expression in vivo. II. Regulation of tumor necrosis factor and interleukin-1 alpha/beta expression and suppression. Am J Pathol 137, 1173-1185.

Vallieres, N., Berard, J.L., David, S., Lacroix, S., 2006. Systemic injections of lipopolysaccharide accelerates myelin phagocytosis during Wallerian degeneration in the injured mouse spinal cord. Glia 53, 103-113.

van Dam, A.M., Brouns, M., Louisse, S., Berkenbosch, F., 1992. Appearance of interleukin-1 in macrophages and in ramified microglia in the brain of endotoxin-treated rats: a pathway for the induction of non-specific symptoms of sickness? Brain Res 588, 291-296.

Van Dam, A.M., De Vries, H.E., Kuiper, J., Zijlstra, F.J., De Boer, A.G., Tilders, F.J., Berkenbosch, F., 1996. Interleukin-1 receptors on rat brain endothelial cells: a role in neuroimmune interaction? FASEB J 10, 351-356.

van Riemsdijk, I.C., Baan, C.C., Loonen, E.H., Knoop, C.J., Navarro Betonico, G., Niesters, H.G., Zietse, R., Weimar, W., 2001. T cells activate the tumor necrosis factor-alpha system during hemodialysis, resulting in tachyphylaxis. Kidney Int 59, 883-892.

Veenstra, M., Ransohoff, R.M., 2012. Chemokine receptor CXCR2: physiology regulator and neuroinflammation controller? J Neuroimmunol 246, 1-9.

Vitkovic, L., Konsman, J.P., Bockaert, J., Dantzer, R., Homburger, V., Jacque, C., 2000. Cytokine signals propagate through the brain. Mol Psychiatry 5, 604-615.

Wang, D.D., Bordey, A., 2008. The astrocyte odyssey. Prog Neurobiol 86, 342-367.

Wang, X., Barone, F.C., Aiyar, N.V., Feuerstein, G.Z., 1997. Interleukin-1 receptor and receptor antagonist gene expression after focal stroke in rats. Stroke 28, 155-161; discussion 161-152.

Watzlawik, J., Warrington, A.E., Rodriguez, M., 2010. Importance of oligodendrocyte protection, BBB breakdown and inflammation for remyelination. Expert Rev Neurother 10, 441-457.

Waxman, S.G., 1998. Demyelinating diseases--new pathological insights, new therapeutic targets. N Engl J Med 338, 323-325.

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.

Weinshenker, B.G., Bass, B., Rice, G.P., Noseworthy, J., Carriere, W., Baskerville, J., Ebers, G.C., 1989. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. Brain 112 (Pt 1), 133-146.

Wilcockson, D.C., Campbell, S.J., Anthony, D.C., Perry, V.H., 2002. The systemic and local acute phase response following acute brain injury. J Cereb Blood Flow Metab 22, 318-326.

Wilkins, A., Chandran, S., Compston, A., 2001. A role for oligodendrocyte-derived IGF-1 in trophic support of cortical neurons. Glia 36, 48-57.

Wilson, E.H., Weninger, W., Hunter, C.A., 2010. Trafficking of immune cells in the central nervous system. J Clin Invest 120, 1368-1379.

Willenborg, D.O., Fordham, S., Bernard, C.C., Cowden, W.B., Ramshaw, I.A., 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, 3223-3227.

Wolswijk, G., 1998. Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells. J Neurosci 18, 601-609.

Woodruff, R.H., Fruttiger, M., Richardson, W.D., Franklin, R.J., 2004. Platelet-derived growth factor regulates oligodendrocyte progenitor numbers in adult CNS and their response following CNS demyelination. Mol Cell Neurosci 25, 252-262.

Wootla, B., Denic, A., Keegan, B.M., Winters, J.L., Astapenko, D., Warrington, A.E., Bieber, A.J., Rodriguez, M., 2011. Evidence for the role of B cells and immunoglobulins in the pathogenesis of multiple sclerosis. Neurol Res Int 2011, 780712.

Xia, M., Hyman, B.T., 2002. GROalpha/KC, a chemokine receptor CXCR2 ligand, can be a potent trigger for neuronal ERK1/2 and PI-3 kinase pathways and for tau hyperphosphorylation-a role in Alzheimer's disease? J Neuroimmunol 122, 55-64.

Ysrraelit, M.C., Gaitan, M.I., Lopez, A.S., Correale, J., 2008. Impaired hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in patients with multiple sclerosis. Neurology 71, 1948-1954.

Zipp, F., Aktas, O., 2006. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. Trends Neurosci 29, 518-527.

……