

Introducción

ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, inflamatoria y desmielinizante del sistema nervioso central (SNC), siendo la principal causa de discapacidad en adultos jóvenes después de los traumatismos. La mayoría de los pacientes con EM son diagnosticados entre los 20 y 40 años, observándose con mayor frecuencia en mujeres que en hombres (razón 2:1) y provocando una disfunción neurológica considerable después de 10-15 años de duración de la enfermedad (Weinshenker, 1998). Es una enfermedad extendida mundialmente pero su prevalencia varía con el área geográfica, en nuestro país es aproximadamente de 60-70 pacientes por cada 100000 habitantes (Fernández *et al.*, 1994; Bufill *et al.*, 1995).

1. Etiología

La causa de la EM es aún desconocida. Se han implicado factores ambientales, como la exposición a diferentes patógenos, y factores genéticos. La EM se considera una enfermedad mediada por el sistema inmunitario donde las células T CD4+ específicas frente antígenos de la mielina son las responsables de desencadenar la cascada inmunológica (Wekerle *et al.*, 1986; Stinissen *et al.*, 1997).

1.1. Factores genéticos

Estudios epidemiológicos y demográficos describen la importancia de los factores genéticos en la iniciación y/o perpetuación de la EM (Weinshecker y Rodriguez, 1994; Kurtzke, 1995; Ebers *et al.*, 1995; Sadovnick *et al.*, 1997; Chataway *et al.*, 2001). El riesgo absoluto de padecer la enfermedad un familiar de primer grado de un afecto de EM es entre 20 y 40 veces superior al de la población general. Además, aproximadamente en el 5% de los gemelos dizigóticos y en más del 25% de los monozigóticos ambos individuos están afectados (Risch, 1992; Sadovnick *et al.*, 1993, 1996; Ebers *et al.*, 1995).

En poblaciones de origen caucasiano, se han identificado diversos genes candidatos. Sin embargo, la asociación más fuerte y mejor caracterizada es la descrita para los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En este sentido, se ha demostrado que determinados alelos del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II, principalmente DRB1*1501, DRB5*0101, DQA1*0102, DQB1*0602 (Haines *et al.*, 1996; Sawcer *et al.*, 1996; Epplen *et al.*, 1997) confieren susceptibilidad para desarrollar la EM. También se ha observado que los diferentes

polimorfismos de HLA-DP podrían regular la perpetuación de la enfermedad (Yu *et al.*, 1998). Otros genes como los del receptor de la célula T (TCR) (Epplen *et al.*, 1997; Hockertz *et al.*, 1998), citocinas y sus receptores (Schrijver *et al.*, 1999; van Veen *et al.*, 2001; Owens *et al.*, 2001; de Jong *et al.*, 2002), receptores de la fracción constante de las inmunoglobulinas (FcR) (Myhr *et al.*, 1999), quimiocinas y sus receptores (Huang *et al.*, 2000; Arimilli *et al.*, 2000) o el gen de la apolipoproteína E (Apo-E) (Evangelou *et al.*, 1999) también se han implicado en el desarrollo y la progresión de la enfermedad.

1.2. Factores ambientales

En el 25% de los gemelos idénticos existe concordancia en el desarrollo de la EM lo que sugiere que otros factores adicionales como los ambientales contribuyen en gran medida en la susceptibilidad a la enfermedad (Ebers *et al.*, 1986; Sadovnick 1993; Sadovnick *et al.*, 1993; Mumford *et al.*, 1994). La prevalencia de EM varía con la latitud, mientras que en los países del norte de Europa, en Estados Unidos, Canadá y en el sureste de Australia la prevalencia es elevada, la enfermedad es relativamente rara en países de Asia como China y sólo se diagnostica, ocasionalmente, algún caso en la población nativa africana (Weinshencker y Rodriguez, 1994; Kurtzke, 1995; Wingerchuk y Weinshencker, 2000) (Figura 1). Aunque la razón de esta variación geográfica no está muy clara, probablemente, se pueda explicar, en parte, por la dotación genética característica de cada área geográfica.

La exposición a agentes infecciosos durante la infancia-adolescencia también se ha considerado como un factor de riesgo importante para el desarrollo de la enfermedad. Durante las últimas décadas, se ha postulado que diferentes agentes patógenos como los retrovirus, herpesvirus, coronavirus y bacterias como *Chlamydia pneumoniae*, podrían ser un factor etiológico importante en la patogenia de la EM (Rasmussen *et al.*, 1993; Monteyne *et al.*, 1998; Cermelli y Jacobson, 2000; Atkins *et al.*, 2000; Ascherio *et al.*, 2001; Levin *et al.*, 2003; Munger *et al.*, 2003; Villoslada *et al.*, 2003; Yeh *et al.*, 2004).



Figura 1: Distribución mundial de la EM. Las áreas en negro corresponden a zonas de prevalencia alta (≥ 30 casos por 100.000 habitantes), las áreas punteadas corresponden a zonas de prevalencia media (5-29 casos por 100.000 habitantes) y las áreas rayadas a zonas de prevalencia baja (< 5 casos por 100.000 habitantes). Las áreas en blanco son zonas de las que no se disponen de datos o no hay prevalencia de la enfermedad. (Tomado de Kurtzke JF, Wallin MT. Epidemiology. In Burks JS, Johnson KB (eds). Multiple sclerosis: diagnosis, medical management, and rehabilitation. Demos, New York 2000, pp. 49-71).

1.3. Otros factores moduladores

La afectación de las mujeres es el doble que la de los hombres, este hecho también ha sido descrito para otras enfermedades autoinmunes (Vyse y Todd, 1996; Whitacre, 2001) y se ha relacionado con diferencias en la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal entre sexos (Dowdell *et al.*, 1999; Morale *et al.*, 2001; Voskuhl y Palaszynski, 2001; Voskuhl, 2002). Se ha observado que durante el embarazo el número de brotes clínicos de la enfermedad está significativamente reducido, mientras que poco después del parto aumenta el riesgo de presentar un brote clínico (Confavreux *et al.*, 1999), lo que indicaría una influencia importante de las hormonas en la patogenia de esta enfermedad. Existen evidencias experimentales de que el estrés también tiene un impacto importante en el curso de la enfermedad (Mason, 1991; Morale *et al.*, 2001; Heneka *et al.*, 2001). Aunque, probablemente, la diferencia principal entre pacientes con EM y la población sana sea su potencial inmunológico. En este sentido, se ha postulado que los pacientes con EM tienen una inmunorregulación defectuosa que podría ser la responsable de la manifestación de la enfermedad (Huang *et al.*, 2001).

1.4. Antígenos candidatos

La mielina del SNC es una estructura compleja que contiene numerosos autoantígenos potenciales los cuales podrían inducir las respuestas autoinmunes características de la EM (Steinman, 1996; Voskuhl, 1998; Schmidt, 1999). A grosso modo, se pueden diferenciar dos fracciones en la mielina: la fracción lipídica (75%) y la fracción proteica (25%). De la fracción proteica derivan los principales antígenos candidatos y que han sido utilizados para inducir el modelo animal de la enfermedad, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Entre ellos cabe destacar la proteína mielínica básica (MBP), la proteína proteolipídica (PLP) y la glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos (MOG). También se ha dado importancia a estructuras no proteicas de la mielina como los gangliosidos, observándose en el suero y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM un aumento de anticuerpos anti-gangliosido en comparación con controles sanos (Trotter *et al.*, 1989; Acarín *et al.*, 1996; Sadatipour *et al.*, 1998). Se han descrito otros antígenos candidatos no relacionados con la mielina como la proteína astrogliol S100—(Kojima *et al.*, 1994) o la proteína de choque térmico —B-cristalina (van Noort *et al.*, 1995; Thoua *et al.*, 2000). Aunque existen antígenos candidatos y se les ha implicado en la patogenia de la EM no existen evidencias de que un único antígeno de los citados sea el responsable del desarrollo de la respuesta inmunitaria característica de la EM.

2. Aspectos clínicos

La EM es una enfermedad heterogénea donde se pueden diferenciar tres subgrupos clínicos principales. La mayoría de los pacientes desarrollan un curso clínico remitente-recurrente (RR) que se caracteriza por la aparición de episodios clínicos de empeoramiento de la enfermedad (exacerbaciones o brotes clínicos), que indican que un nuevo proceso inflamatorio está ocurriendo, separados por periodos de remisión parcial o total de los síntomas. Después de un periodo de tiempo variable, aproximadamente el 35-45% de estos pacientes, desarrollan una forma progresiva de la enfermedad denominada secundariamente progresiva (SP) (Lublin y Reingold, 1996). Existe un grupo pequeño de pacientes (10-15%) que desarrollan un curso progresivo de la enfermedad desde el inicio, sin la presencia de brotes clínicos, que recibe el nombre de primariamente progresiva (PP) (Figura 2). Algunos autores, definen una cuarta forma clínica, con un curso progresivo recurrente (PR), que se caracteriza por un inicio progresivo, con presencia de

brotos con o sin recuperación completa y donde los períodos entre brotes se caracterizan por una progresión continua.

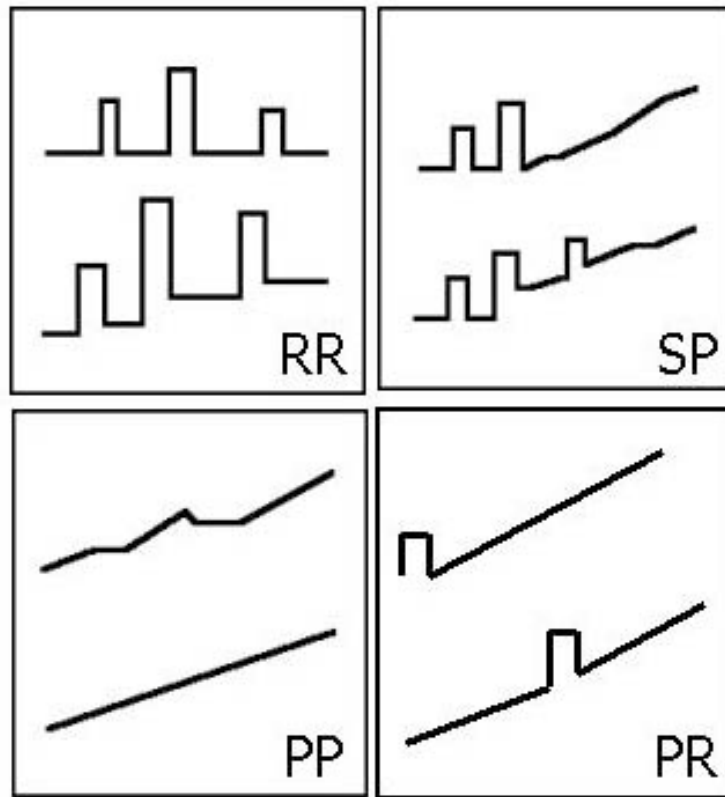


Figura 2: Cursos clínicos de la EM. Según la clasificación de Lublin y Reingold (1996) se pueden diferenciar subgrupos clínicos: remitente-recurrente (RR), secundariamente progresivo (SP), primariamente progresivo (PP) y progresivo recurrente (PR).

3. Anatomía patológica

La lesión característica de la EM se localiza predominantemente en la sustancia blanca del SNC con disposición perivenosa (Wekerle *et al.*, 1986; Raine, 1994), tanto en el cerebro como en la médula espinal (Figura 3). Se caracteriza por la infiltración de linfocitos y monocitos principalmente, con un grado variable de desmielinización, daño axonal, pérdida de oligodendrocitos y gliosis (Figura 4). Las células inmunitarias entran en el SNC a través de la barrera hematoencefálica (BHE) que en la EM ha perdido su impermeabilidad (Hickey, 1991a; 1991b; Cserr y Knopf, 1992; Hohlfeld, 1997) y/o vía plexo coroideo (Engelhardt *et al.*, 2001). Aunque siempre se ha considerado a la mielina, la sustancia blanca del SNC, la principal diana del proceso autoinmune, también se han encontrado lesiones en el cortex cerebral (Peterson *et al.*, 2001), hipotálamo (Huitinga *et al.*, 2001), nervio y tracto óptico (Evangelou *et al.*, 2001), y tronco cerebral (Bjartmar *et al.*, 2001). Es frecuente observar remielinización con preservación relativa de los axones

(Keirstead y Blakemore, 1999), y se piensa que, en parte, la remielinización que se produce tras el daño tisular podría ser responsable de la recuperación de los síntomas clínicos.

La EM es una enfermedad clínicamente heterogénea que varía dependiendo de la localización de las placas o las lesiones en el SNC. Hasta hace poco se pensaba que los síntomas clínicos observados eran debidos exclusivamente a la desmielinización ya que provoca la alteración de la conducción saltatoria típica de los axones miélinicos, enlenteciéndose la conducción nerviosa e incluso bloqueándose, lo que provocaría la aparición de los síntomas clínicos. Sin embargo, en los últimos años se ha implicado mucho más al daño y la pérdida axonal (Ferguson *et al.*, 1997; Trapp *et al.*, 1998; Bitsch *et al.*, 2000, Bjartmar y Trapp, 2001) ya que representan la principal característica patológica en estados avanzados de la EM crónica y correlacionan con el grado de discapacidad de la enfermedad (Matthews *et al.*, 1998; de Stefano *et al.*, 1998; 2001; Bjartmar y Trapp, 2001, Bjartmar *et al.*, 2001; Kalkers *et al.*, 2001; Brex *et al.*, 2002). Aunque el daño y la destrucción axonal también son característicos de fases tempranas de la enfermedad, y estarían relacionados con la intensidad del proceso inflamatorio en las lesiones activas desmielinizantes (Kornek *et al.*, 2000), no está claro que implicación tienen en la sintomatología aguda de la enfermedad.

4. Patogenia

La EM es una entidad clínica bien descrita desde hace más de un siglo (Charcot, 1868a; 1868b; 1877). Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, su etiología sigue siendo desconocida. El estudio de la patogenia de la EM tiene un gran interés en la búsqueda de la etiología de la enfermedad.

Como se ha descrito en apartados anteriores, históricamente se ha definido la EM como una enfermedad inflamatoria del SNC caracterizada por la presencia de áreas de desmielinización focales como resultado de la infiltración de linfocitos T activados y macrófagos a través de la BHE. Los mecanismos patogénicos que se suceden en la EM son: activación de linfocitos T reactivos frente a componentes de la mielina; infiltración focal de linfocitos T y macrófagos en la sustancia blanca del SNC; daño tisular (desmielinización, oligodendroglíopatía y daño axonal) y pérdida de la función neurológica.

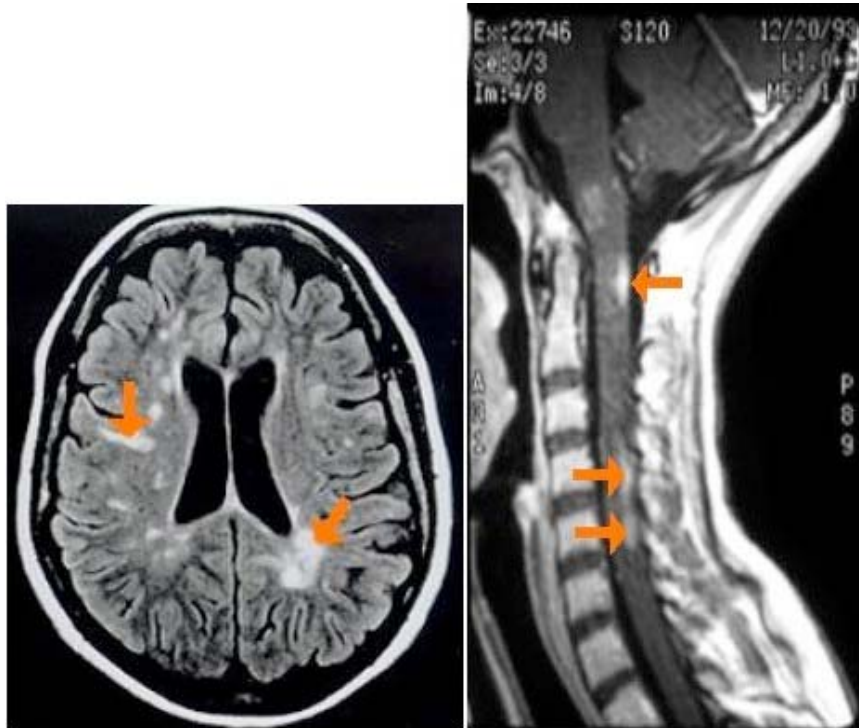


Figura 3: Imagen de resonancia magnética, ponderada en T2 y obtenida con una secuencia Fast-Flair, de un paciente con EM. La mayoría de los pacientes diagnosticados de EM muestran al menos una placa de morfología ovoidea (imagen izquierda, sección cerebral). Las lesiones medulares suelen tener más de 3 mm de diámetro pero con una extensión craneo-caudal inferior a dos cuerpos vertebrales (imagen derecha, sección medular). (Imágenes cedidas por el Dr. A. Rovira, Unidad de Resonancia Magnética-IDI, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona).

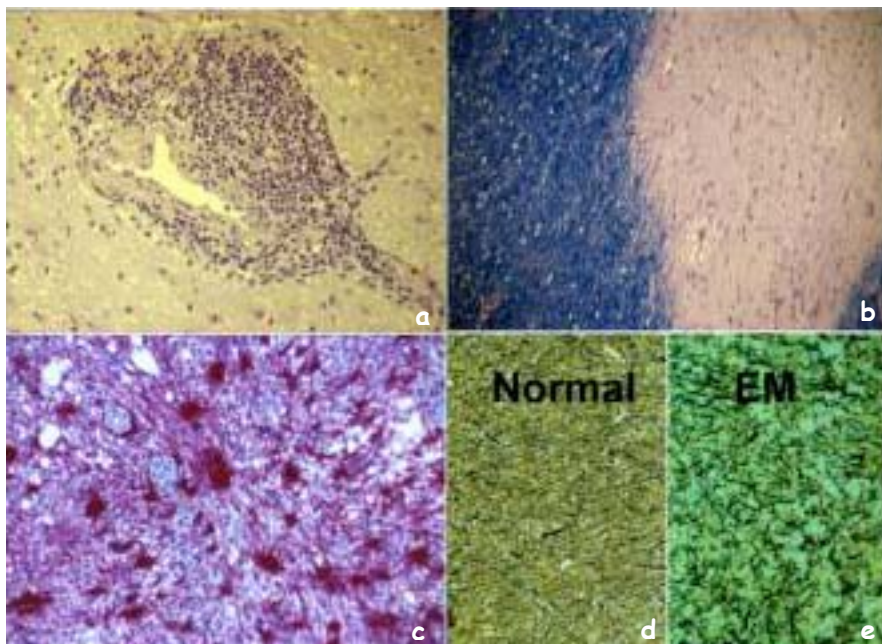


Figura 4: Histopatología de la lesión de EM. Las características histopatológicas principales de la lesión de EM son la infiltración de células inflamatorias, principalmente linfocitos y monocitos, con disposición perivascular (a), la desmielinización en grado variable (b), astrogliosis (c) y pérdida de oligodendrocitos (d,e). (Fotos cedidas por el Dr. W. Brück, Institut für Neuropathologie, Göttingen, Alemania).

4.1. Proceso inflamatorio

Activación de linfocitos T específicos frente antígenos de la mielina

Probablemente, la exposición a determinados factores ambientales, aunque hasta ahora desconocidos, induciría o mantendría células T autorreactivas que, tras un periodo de latencia de 10 a 20 años, serán activadas sistémica o localmente. Aunque no se conoce bien como se produce esta activación, se piensa que podría ocurrir por mecanismos de mimetismo molecular (epítomos compartidos por la mielina y los posibles antígenos infecciosos) (Fujinami y Oldstone, 1985; Liblau y Fontaine, 1998; Albert y Inman, 1999; Gran *et al.*, 1999) o por activación policlonal a través de superantígenos bacterianos o virales (Brocke *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1996). Las células T activadas producen citocinas como el interferón (IFN)—y el factor de necrosis tumoral (TNF)—que provocan la activación de las células endoteliales, las cuales aumentan la expresión de moléculas de adhesión (Dore-Duffy *et al.*, 1993) que mediarían la extravasación de las células inflamatorias al SNC. Se ha descrito un aumento de la concentración de molécula de adhesión intracelular (ICAM)-1 soluble durante el brote clínico de la enfermedad y se ha asociado a un aumento del número de lesiones determinadas por resonancia magnética (Hartung *et al.*, 1995; Giovannoni *et al.*, 1997; Rieckmann *et al.*, 1997; 1998).

Infiltración de células inflamatorias en el SNC

La adhesión de linfocitos y monocitos al endotelio tiene lugar en las vénulas, donde el flujo sanguíneo es menor. La adherencia y migración de los leucocitos está mediada por moléculas de adhesión expresadas tanto en la superficie de los leucocitos como de las células endoteliales. El primer contacto de los leucocitos con el endotelio está mediado por las selectinas: E-selectina, ICAM-1 y molécula de adhesión vascular (VCAM)-1. Las selectinas endoteliales establecen enlaces débiles con ligandos leucocitarios que hacen que los leucocitos rueden sobre la pared vascular. Este deslizamiento favorece el cambio conformacional y la activación de las integrinas leucocitarias como el antígeno asociado a la función linfocitaria (LFA)-1 y el antígeno muy tardío (VLA)-4, que se unirán a sus ligandos (ICAM-1 y VCAM-1) mediante enlaces estables. Esto permite que se produzca la extravasación de las células inmunitarias a través del endotelio (Butcher, 1991; Springer, 1994; Archelos *et al.*, 1999; Kanwar *et al.*, 2000a) (Figura 5). Ambos tipos de moléculas de adhesión han sido estudiadas ampliamente y se han diseñado

estrategias terapéuticas en base a las funciones y particularidades de estas moléculas (Yednock *et al.*, 1992; Huitinga *et al.*, 1993; Gordon *et al.*, 1995; Kent *et al.*, 1995; Archelos *et al.*, 1998; Kanwar *et al.*, 2000b; Stanislaus *et al.*, 2001; van der Laan *et al.*, 2002).

En la entrada de células inflamatorias en el SNC también participan otras moléculas como son las quimiocinas, citocinas que actúan como factores quimiotácticos hacia las zonas de inflamación para las células inflamatorias que expresan los receptores apropiados (Baggiolini, 1998; Hoffman y Karpus, 1998; Ransohoff, 1999; Sorensen *et al.*, 1999). Se ha descrito que durante el proceso inflamatorio en la EM, las quimiocinas hacen que la interacción entre los leucocitos y las células endoteliales pase de ser una unión de baja afinidad, mediada por las selectinas, a ser de alta afinidad, mediada por la integrinas (Luster, 1998; Murphy *et al.*, 2000; Zlotnik y Yoshie; 2000).

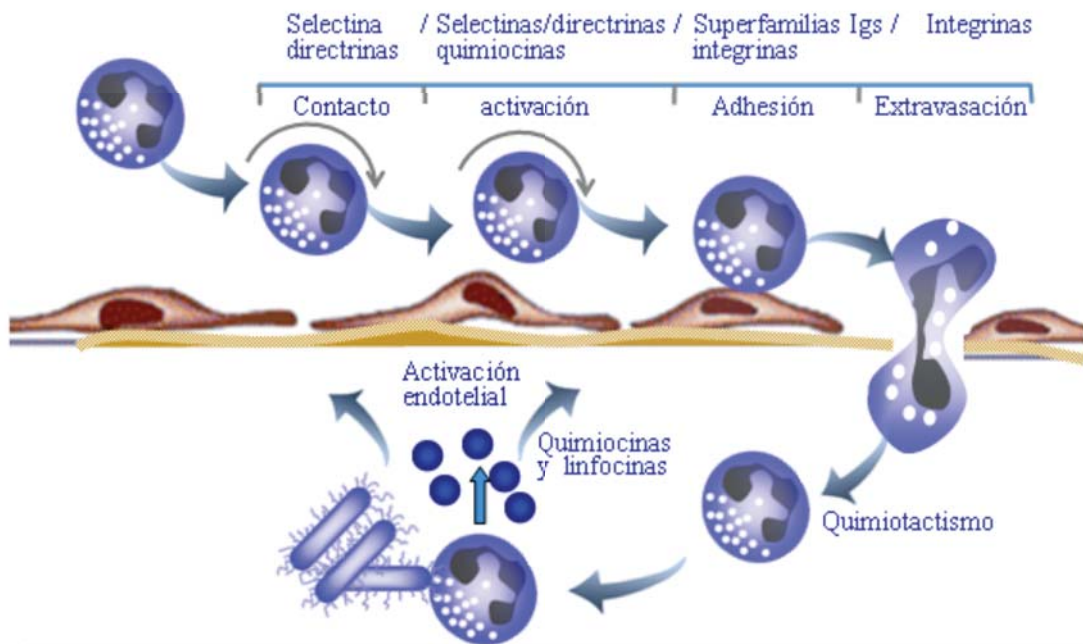


Figura 5: Proceso de extravasación leucocitaria al foco inflamatorio. El proceso de extravasación leucocitaria desde el torrente sanguíneo al foco inflamatorio consta de las siguientes etapas: 1) interacción inicial leucocito-endotelio; 2) rodamiento de leucocitos sobre el endotelio; 3) activación leucocitaria; 4) adhesión firme al endotelio; 5) migración transendotelial (Tomado del libro Inmunología-online de Jose Peña Martínez; www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia).

Otras moléculas importantes en la mediación de este proceso son las metaloproteasas (MMP). Estas proteínas son endopeptidasas y han sido implicadas a diferentes niveles en la patogenia de la EM. Se piensa que participan en la remodelación de la matriz extracelular favoreciendo la disrupción de la BHE, en la formación de las placas de desmielinización y en la pérdida axonal (Bever y Rosenberg, 1999; Kieseier *et al.*, 1999). Las MMP pueden ser sintetizadas por las

células endoteliales, linfocitos T, monocitos/macrófagos, astrocitos y microglía. Mediante inmunohistoquímica en tejido cerebral de pacientes con EM, se ha demostrado que en las lesiones activas hay un aumento de la expresión de MMP-1, -2, -3, -7, -9 en macrófagos (Maeda y Sobel, 1996; Cossins *et al.*, 1997). También se ha demostrado que los pacientes con EM tienen mayor concentración sérica de MMP-9 que controles (Lee *et al.*, 1999b; Trojano *et al.*, 1999; Waubant *et al.*, 1999), observándose un aumento de la concentración de MMP-9 durante el brote clínico de la enfermedad y una correlación con el número de lesiones que captan gadolinio (Waubant *et al.*, 1999).

Una vez en el SNC, los linfocitos T autorreactivos son activados por un antígeno, aun desconocido, iniciando una respuesta inflamatoria mediada por un espectro de citocinas y quimiocinas de tipo Th1 (Merril, 1992; Sorensen *et al.*, 1999). Históricamente se ha definido la EM, al igual que su modelo animal, la EAE, como una enfermedad mediada principalmente por células Th1 CD4+ aunque existen evidencias de que otros tipos celulares también contribuyen en la respuesta inflamatoria que se produce en la EM. En este sentido, se ha descrito que, en los infiltrados inflamatorios, el número de células T CD8+, restringidas por moléculas del MHC de clase I, es superior al número de linfocitos T CD4+ (Booss *et al.*, 1983; Babbe *et al.*, 2000), aunque algunos autores piensan que encontrar una población mayoritaria u otra depende del tiempo de evolución de la enfermedad. También se ha demostrado que el daño axonal se correlaciona mejor con el número de linfocitos T CD8+ y macrófagos que con el número de linfocitos T CD4+ (Kuhlmann *et al.*, 2002). Otro trabajo que apoya la importancia de los linfocitos T CD8+ en la patogenia de la enfermedad es el realizado en ratones deficientes en moléculas MHC-I a los que tras inducirles la EAE se observa que no se produce daño axonal (Rivera-Quinones *et al.*, 1998).

Las células Th2 también participan en el proceso autoinmune patogénico que se produce en la EM. Los pacientes con EM presentan anticuerpos anti-MOG y anti-MBP. Para la producción de estos anticuerpos es necesaria la cooperación de células Th2 (Lindert *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 2003). Estos anticuerpos se han podido asociar a la desmielinización que se observa en las lesiones de EM (Genain *et al.*, 1999). Estos datos justificarían que algunos tratamientos aplicados en la EM o en la EAE en los que se pretendía un desvío de la respuesta Th1 a Th2 hayan provocado empeoramiento de la enfermedad (Genain *et al.*, 1995; Coles *et al.*, 1999a; 1999b).

Los linfocitos TCD4⁺ reconocen al antígeno presentado por la célula presentadora de antígeno (APC) en el contexto de las moléculas del MHC-II y con las señales coestimuladoras apropiadas (sinapsis inmunológica) (Figura 6). Como ya se ha comentado repetidas veces, se desconoce el antígeno o los antígenos responsables de desencadenar la respuesta inmunitaria y si éstos son los mismos que la perpetúan. Se ha descrito que en la EM, como en otras enfermedades autoinmunes, posiblemente se de el fenómeno de amplificación epitópica, que consiste en que inicialmente los linfocitos T reconocen un determinante antigénico concreto, pero con la evolución de la respuesta inmunitaria, pueden aparecer nuevos epítomos antigénicos dianas de nuevas respuestas inmunitarias, lo que favorecería la perpetuación de la respuesta inmunitaria (Kumar, 1998; Tuohy *et al.*, 1998; Vanderlugt *et al.*, 1998; Goebels *et al.*, 2000).

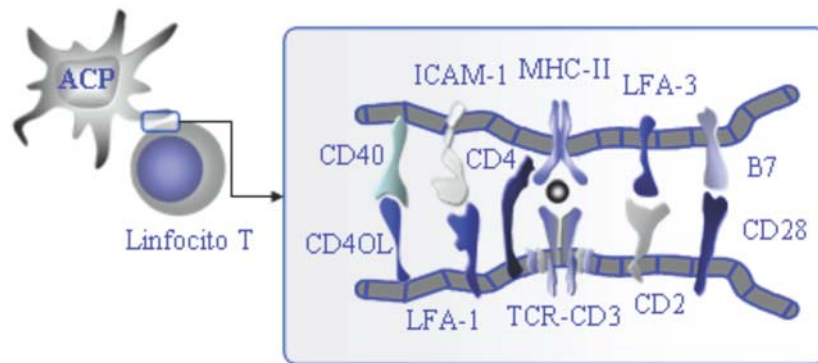


Figura 6: Moléculas que participan en la sinapsis inmunológica. Generalmente, la unión del antígeno presentado por la molécula de MHC con el TCR no es suficiente para generar una respuesta inmunológica eficaz. Para que esto suceda es necesaria la participación de una serie de moléculas denominadas moléculas accesorias o coestimuladoras, que contribuirán al desarrollo de una respuesta inmunitaria efectiva facilitando la interacción entre la APC y el linfocito T. (Tomado del libro Inmunología-online de Jose Peña Martínez; www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia).

Las moléculas coestimuladoras proporcionan la segunda señal necesaria para la activación de las células T vírgenes. Para ello han de entrar en contacto los receptores presentes en la superficie celular de los linfocitos con sus ligandos en la superficie celular de las APC (Bretscher, 1999; Alegre *et al.*, 2001). Algunas de estas moléculas pueden proporcionar señales de activación y otras de inhibición de la respuesta inmunitaria (Brunet *et al.*, 1987). Las moléculas coestimuladoras que se han implicado en la patogenia de la EM han sido los receptores CD28 y el antígeno citotóxico del linfocito (CTLA)-4 en la superficie de los linfocitos T y los ligandos CD80 y CD86 en las APC. Se ha descrito expresión diferencial de CD80 y CD86 entre pacientes con EM y controles en el SNC (Windhagen *et al.*, 1995) y en células mononucleadas de sangre periférica (Genc *et al.*, 1997; Mena y Rohowsky-

Kochan, 1999). Se ha observado que existen células T específicas frente a MBP tanto en pacientes como en controles sanos (Martin *et al.*, 1990; Mazzanti *et al.*, 1998; Windhagen *et al.*, 1998); sin embargo, únicamente en los pacientes con EM estas células tienen fenotipo de células activadas o memoria y pueden ser activadas en ausencia de la señal coestimuladora mediada por CD28-CD80/CD86 (Scholz *et al.*, 1998). A nivel genético, se han descrito diferentes polimorfismos para CTLA-4 y se han asociado con la susceptibilidad a la enfermedad aunque no con el curso o la gravedad de ésta (Ligers *et al.*, 1999; Masterman *et al.*, 2002; Kantarci *et al.*, 2003). Todos estos datos sugieren que la señalización mediada a través de esta vía de coestimulación tiene una función importante en la patogenia de la EM. En base a esto, se ha desarrollado un ensayo clínico de fase I (Repligen-RG2077) y otro multicéntrico (BMS-188667) en los que se testa la molécula CTLA4-Ig en la EM. Recientemente, se ha descrito que uno de los mecanismos de acción del tratamiento con IFN—podría ser la regulación de la señal coestimuladora mediada por CD28/CTLA-4 (Espejo *et al.*, 2004).

Los linfocitos T activados producen citocinas proinflamatorias como el IFN—, el TNF—y la linfoxina (LT)—y quimiocinas que inducen la proliferación clonal de los linfocitos T y que permiten un segundo reclutamiento de células inflamatorias desde la periferia, facilitado por un aumento de la permeabilidad de la BHE, y la activación de la microglía del SNC. Esta situación de inflamación permite que se activen los diferentes mecanismos efectores responsables de la lesión (Figura 7).

Remisión de la inflamación

En la EMRR la recuperación clínica se ha asociado con la remisión del proceso inflamatorio que se produce en el SNC. Históricamente, la remisión de la enfermedad se había asociado a cambios en el patrón de las citocinas expresadas durante el proceso inflamatorio, tanto a nivel sistémico como local en el SNC. Se ha descrito que la remisión de la inflamación en el SNC está asociada a un aumento de la producción de interleucina (IL)-10 y del factor de transformación del crecimiento (TGF)—. El TGF—lo producen los monocitos activados, entre otras células inmunitarias, posee una potente actividad inhibitoria de las células T, afectando su respuesta inmunitaria, el crecimiento celular y su diferenciación. Se considera que el TGF—tiene una función importante en la limitación de la inflamación autoinmune (Levings *et al.*, 2002).

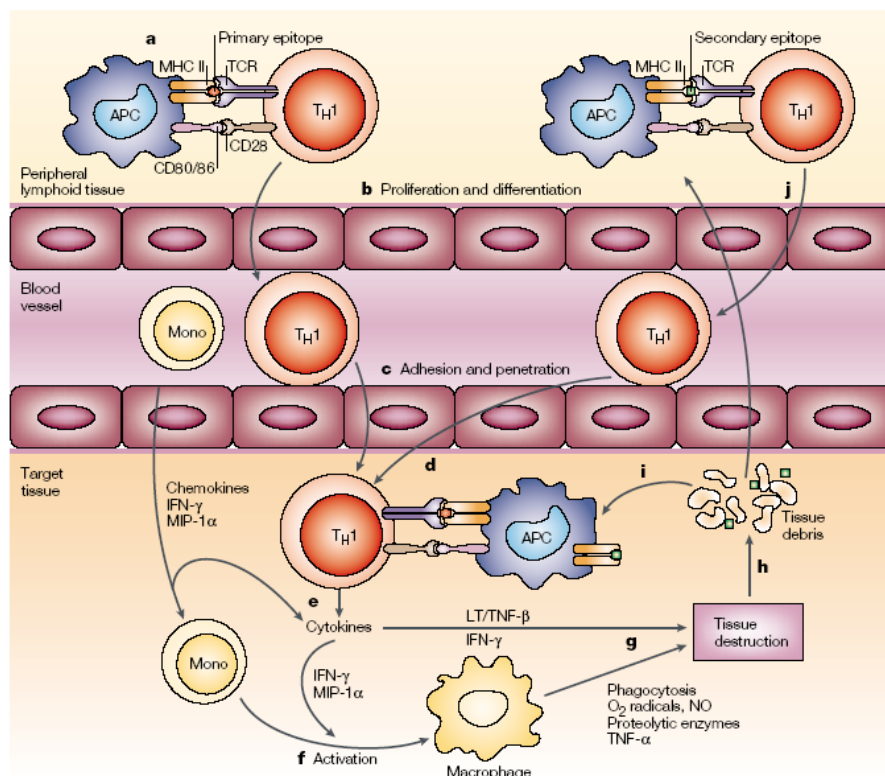


Figura 7: Esquema resumen del proceso patológico que sucede en la EM. La presentación del epítipo primario ocurre en periferia, en los ganglios linfáticos (a), provocando la activación y diferenciación de las células autorreactivas (b). Los linfocitos T activados migran al órgano diana, el SNC (c), donde vuelven a reconocer un antígeno que le será presentado por las APC (d). Tras la reestimulación, los linfocitos T autorreactivos producen una serie de citocinas y quimiocinas (e) que median el reclutamiento de fagocitos mononucleares de sangre periférica que se activarán al igual que las APC residentes (f). Las células activadas iniciarán la destrucción del tejido (g) mediante mecanismo fagocíticos y producción de $TNF-\alpha$, enzimas proteolíticas, óxido nítrico (NO) y radicales de oxígeno. Los restos tisulares son procesados y presentados por las APC residentes e infiltrantes (i) provocando la activación y diferenciación de una segunda remesa de linfocitos T (j) que iniciarán una nueva respuesta inmunológica. (Tomado de Vanderlugt y Miller. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2: 85-95).

En la EAE, se ha podido confirmar que la recuperación de los signos clínicos se asocia a la eliminación, por apoptosis, de los linfocitos T presentes en las lesiones (Penderet *al.*, 1991; Schmied *et al.*, 1993). Existen diferentes mecanismos inmunológicos por los que se puede inducir la apoptosis de las células inflamatorias: (1) la apoptosis de los linfocitos T puede producirse durante el proceso de presentación antigénica como un mecanismo de regulación de la respuesta inmunitaria (Boehme y Lenardo, 1993; Critchfield *et al.*, 1994; Ford *et al.*, 1996; Gold *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 1997); (2) en la EAE, se ha asociado con un aumento de los niveles de glucocorticoides (MacPhee *et al.*, 1989; Schmied *et al.*, 1993); (3) se ha observado que citocinas como el $TGF-\beta$, capaces de inducir apoptosis de células T *in vitro* (Weller *et al.*, 1994), se producen localmente en las

lesiones de EAE (Khoury *et al.*, 1992); (4) se ha considerado la señal mediada por Fas-FasL como una de las más importantes en la eliminación de los linfocitos T infiltrantes (Nagata y Golstein., 1995; Dowling *et al.*, 1996; D'Souza *et al.*, 1996).

Recientemente, se ha sugerido que otras poblaciones celulares podrían mediar la remisión clínica de la enfermedad por mecanismos diversos. En este sentido, se ha demostrado que en los pacientes con EM en remisión, existe un aumento de una población de células asesinas naturales [*natural killer*-(NK)] que expresan una elevada cantidad de Fas en su superficie y producen un patrón de citocinas antiinflamatorias, a las que denominan células NK2 y que podrían suprimir el potencial patogénico de las células T autorreactivas (Takahashi *et al.*, 2001; 2004). Otra población celular importante en la regulación de la respuesta inmunitaria es la de las células T CD4+CD25+ (T reguladoras). Estas células se caracterizan por la expresión de CD25^{high} y del factor de transcripción FOXP3 así como por inhibir la proliferación de las células T (Hori *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Se ha descrito que hay una disminución del número y la funcionalidad de estas células reguladoras en pacientes con EM (Viglietta *et al.*, 2004)

4.2. Mecanismos patogénicos de daño tisular

Desmielinización

En base a la expresión de proteínas de la mielina, la geografía y extensión de las placas, el patrón de daño a los oligodendrocitos y el depósito de complemento, se ha realizado una clasificación de los patrones de anatomopatológicos de las lesiones en la EM (Lucchinetti *et al.*, 2000). Los mecanismos patogénicos de desmielinización descritos son: desmielinización mediada por linfocitos T y, en grado variable, por anticuerpos y el sistema del complemento (patrón I y II), oligodendrogliopatía secundaria a la expresión anómala de proteínas de la mielina y con apoptosis de oligodendrocitos (patrón III) y oligodendrogliopatía primaria con pérdida gradual de oligodendrocitos combinada con desmielinización (patrón IV) (Lucchinetti *et al.*, 1996; Storch y Lassmann, 1997; Lassmann *et al.*, 1997; 2001) (Figura 8). Mientras que en los patrones I y II la diana principal del proceso de destrucción es la mielina y se considera un proceso autoinmunitario, en los patrones III y IV son los oligodendrocitos los que sufren la degeneración. En los últimos años, y en base a los datos sobre la heterogeneidad anatomopatológica de la lesión de EM, se ha sugerido que cada paciente con EM podría presentar diferentes mecanismos patogénicos de desmielinización, lo que podría explicar las diferencias clínicas y de respuesta al tratamiento que presentan estos pacientes.

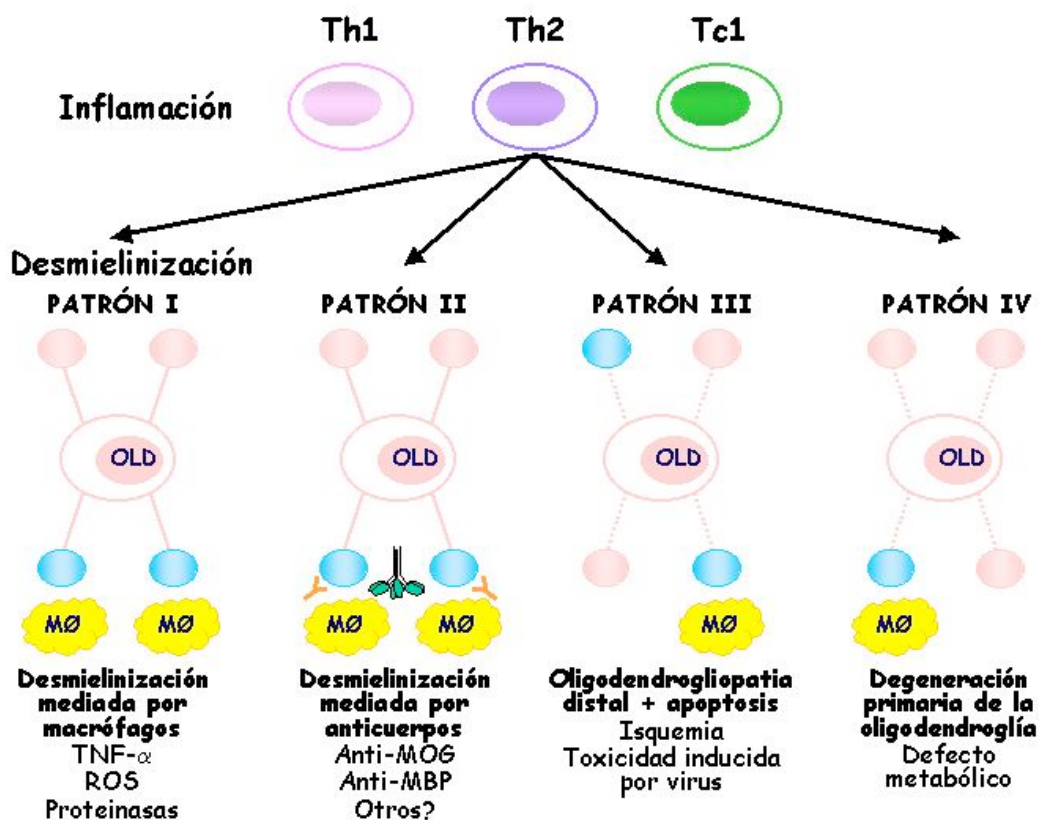


Figura 8: Patrones de desmielinización en la EM. La desmielinización que se produce en la lesión de EM puede estar inducida por los macrófagos (M \rightarrow) y/o sus productos tóxicos (patrón I); por anticuerpos desmielinizantes específicos y deposición de complemento (patrón II); mediante cambios degenerativos en procesos distales de los oligodendrocitos (OLD) periaxoniales, seguido de apoptosis de éstos (patrón III) o por degeneración primaria de los oligodendrocitos seguida por la destrucción de la mielina (patrón IV). (Modificado de Lassmann *et al.*, Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. Trends in Molecular Medicine 2001; 7: 115-121).

Th: células T colaboradoras (*helper*); Tc: células T citotóxicas; ROS: especies reactivas de oxígeno

Como ya se ha comentado, el desarrollo de la lesión de EM está mediado por una respuesta inmunitaria de tipo Th1. En las lesiones desmielinizantes activas se ha observado que hay producción de citocinas proinflamatorias como el IFN- γ , el TNF- α o la IL-2 por los leucocitos infiltrantes y por las células gliales residentes (Merrill, 1992). Los posibles mediadores de la destrucción de la mielina y los oligodendrocitos serían el TNF- α , ROS, anticuerpos contra epítomos expresados en la vaina de mielina y en los oligodendrocitos y el complemento (Sellebjerg *et al.*, 1998; Storch *et al.*, 1998; Reindl *et al.*, 1999; Probert *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2001; Mead *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2004).

Oligodendroglíopatía

Los oligodendrocitos podrían ser dañados como diana de la respuesta inmunitaria o, bien, como simples espectadores de ésta. Los mecanismos efectores moleculares implicados en el daño a los oligodendrocitos se pueden clasificar, a groso modo, en mecanismos independientes de receptor y mecanismos dependientes de receptor. Entre estos últimos, cabe destacar los mediados por los receptores de muerte celular programada o apoptosis (miembros de la superfamilia de receptores del TNF), el Fas, p55, p75, el receptor del ligando inducido por la apoptosis mediada por TNF (TRAILR)-2, etc. Se ha descrito una función dual de la apoptosis mediada por estos receptores en la EM (Zipp, 2000). Por un lado, la apoptosis estaría implicada en los procesos de daño tisular que se producen en el SNC como la muerte de oligodendrocitos y consecuentemente la desmielinización (Segal y Cross, 2000; Comi *et al.*, 2000a; Hemmer *et al.*, 2002; Barnett y Prineas, 2004) y, por otro lado, tendría una función presumiblemente inmunomoduladora mediante la muerte celular por apoptosis de las células T activadas. A este respecto, se ha descrito que en la EM podría producirse un aumento de la expresión de proteínas antiapoptóticas relacionadas con Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2*) en las células T provocando la desregulación de la respuesta inmunitaria (Pender, 1998; Wingerchuk *et al.*, 2001; Sharief *et al.*, 2002a; 2002b; 2003).

Daño axonal

La patología axonal en la EM está descrita en la literatura desde hace más de un siglo (Charcot, 1868a; 1868b). Los datos más recientes evidencian que la pérdida axonal constituye un aspecto clave en la patogenia de la EM y sugieren que la degeneración axonal es el principal determinante de la discapacidad neurológica progresiva de los pacientes con EM (Matthews *et al.*, 1998; Trapp, *et al.*, 1998).

Diversos estudios han demostrado que existe una correlación entre el daño axonal y el grado de inflamación en las lesiones activas desmielinizantes (Bitsch *et al.*, 2000; Kornek *et al.*, 2000). Otros autores, sin embargo, abogan por la independencia entre ambos procesos sugiriendo que estarían mediados por mecanismos patogénicos diferentes.

Como se ha comentado con anterioridad, se produce daño y destrucción axonal desde las fases iniciales de la lesión aguda. Se ha descrito que la pérdida axonal se inicia tempranamente en la EMRR, que continua durante el curso clínico de la enfermedad y que es la responsable de la discapacidad neurológica

permanente que ocurre en la EM (Arnold *et al.*, 1990; Ferguson *et al.*, 1997; Trapp *et al.*, 1998; Bjartmar *et al.*, 2000)

El daño axonal podría ser secundario a los defectos funcionales del axón como el bloqueo de la conducción, mediados por mecanismos de excitotoxicidad, mediadores inflamatorios tóxicos como el NO o por citotoxicidad (Figura 9). También se piensa que podría deberse a la respuesta fisiológica a una desmielinización permanente (Ferguson *et al.* 1997; Trapp *et al.*, 1998). Aunque el evento inicial que desencadena el daño axonal puede diferir en diferentes situaciones de daño cerebral, la secuencia de acontecimientos que conlleva la destrucción del axón es similar en todas ellas: la alteración de los canales iónicos provoca cambios en la homeostasis del calcio intraaxónico, provocando la activación de proteasas dependientes de calcio, se produce degradación local de los elementos del citoesqueleto, bloqueo del transporte axónico y, por último, la disrupción del axón (LoPachin y Lehning, 1997).

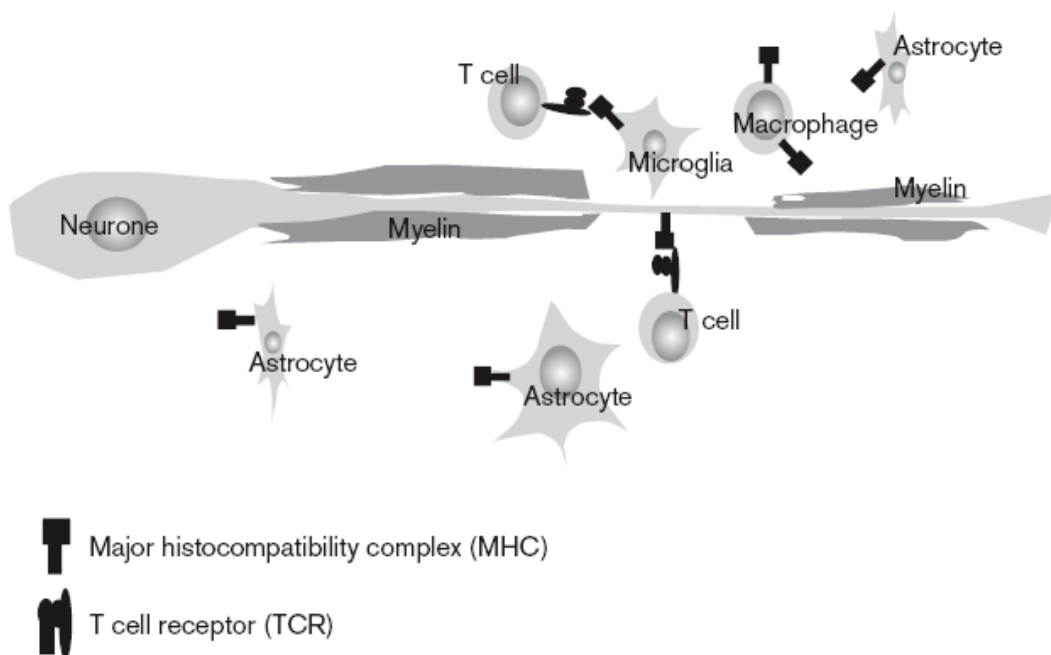


Figura 9: Daño axonal en axones desmielinizados. La microglía y los macrófagos son las principales células efectoras de la respuesta inmunitaria innata en el SNC implicadas en el daño axonal. Los axones desmielinizados son más susceptibles a los mediadores inflamatorios secretados por los macrófagos y la microglía activada, así como a los linfocitos T CD8+ citotóxicos. (Tomado de Neumann, Molecular mechanisms of axonal damage in inflammatory central nervous system diseases. *Curr Opin Neurol* 2003; 16: 267-273).

Se sabe que las reacciones inmunes son necesarias para la recuperación del tejido después de que éste haya sufrido un daño (Lotan y Schwartz, 1994). Cuando las neuronas u otras células del SNC son dañadas, se generan respuesta

inmunitarias con el objetivo de restaurar la integridad del tejido (Aloisi, 2001; Hickey, 2001). Sin embargo, aunque estas respuestas sean primariamente protectoras, también pueden dañar el tejido. Los oligodendrocitos y las neuronas, incluyendo sus neuritas y conexiones sinápticas pueden ser susceptibles al ataque inmune mediado por los linfocitos T, la microglía activada y los macrófagos (Neumann *et al.*, 2001; Martino *et al.*, 2002). A su vez, el daño producido podría potenciar la respuesta inmunitaria en las lesiones de EM potenciando el proceso neurodegenerativo (Neumann y Wekerle, 1998; Trapp *et al.*, 1998; Wekerle, 1998). Estos datos revelan la importancia de la búsqueda de tratamientos neuroprotectores para la EM. En esta tesis se estudia el posible potencial terapéutico de las metalotioneínas (MT) a este nivel en la EAE.

4.3. Remielinización

En la EM se produce remielinización espontánea, proceso por el cual los progenitores endógenos de los oligodendrocitos recubren de mielina nuevamente los axones desmielinizados. Muchos de estos axones recuperan su capacidad de conducir potenciales de acción (Smith *et al.*, 1979; Jeffery y Blakemore, 1997; Murray *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2002; Barkhof *et al.*, 2003; Bruck *et al.*, 2003). Las zonas donde se produce remielinización se denominan placas en sombra o placas sombreadas. Estudios recientes en biopsias de cerebros con EM han demostrado que la remielinización puede tener lugar precozmente e incluso simultáneamente con la desmielinización. Se piensa que una posible causa que justificaría el fallo de la remielinización es que las lesiones que han sido remielinizadas pueden volver a ser diana de nuevos procesos desmielinizantes (Prineas *et al.*, 1993).

En estudios *in vitro* se ha observado que en la regulación del desarrollo de los oligodendrocitos y la mielinización intervienen múltiples factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de los fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF)-1 y que algunos de ellos como el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y PDGF pueden inhibir la lesión oligodendrocítica mediada por TNF—(Raff *et al.*, 1988; McKinnon *et al.*, 1990; McMorris *et al.*, 1993). En el modelo de EAE inducido con el virus Theiler murino (TMEV), se ha observado que algunos anticuerpos específicos frente antígenos del SNC son capaces de promover la remielinización (Miller *et al.*, 1994; Asakura *et al.*, 1998).

El hecho de que algunas citocinas, factores de crecimiento y anticuerpos producidos durante el proceso inflamatorio agudo promuevan la remielinización

endógena pone en tela de juicio el efecto de los tratamientos antiinflamatorios sobre la reparación tisular. El reto terapéutico sería conseguir potenciar la remielinización endógena o desarrollar terapias celulares exógenas que permitan la remielinización de los axones dañados.

5. Tratamientos

No existe un tratamiento curativo de la EM (Vollmer, 1996; Hohlfeld, 1997). El brote agudo de la enfermedad se trata con dosis elevadas de prednisolona o metilprednisolona (Miller *et al.*, 2000). Como tratamiento crónico de la EM, de todas las estrategias terapéuticas aplicadas hasta ahora, parece ser que el tratamiento con IFN—es la más efectiva. El IFN—reduce la frecuencia y gravedad de los brotes clínicos en las formas RR y SP, así como el desarrollo de lesiones activas nuevas visualizadas mediante técnicas de resonancia magnética (Interferon Beta-1b Study Group, 1995; Jacobs *et al.*, 2000; PRIMIS, 2001; SPECTRIMS, 2001). Otro de los tratamientos establecidos para las formas RR es el acetato de glatirámico, que consiste en un copolímero sintético de cuatro aminoácidos con capacidad de modular la respuesta inmunitaria frente a MBP (Fridkis-Hareli *et al.*, 1994; Duda *et al.*, 2000a; 2000b). Se ha descrito que este compuesto tiene unos efectos clínicos similares a los del tratamiento con IFN—(Johnson *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1998; Gran *et al.*, 2000; Comi *et al.*, 2000b). Aproximadamente, entre un 10-40% de los pacientes con EMRR no responden a estos tratamientos. Estudios recientes han demostrado que los efectos inmunomoduladores del IFN—pueden diferir en pacientes con EMSP según el estadio de evolución de la enfermedad, siendo el tratamiento con IFN—menos eficaz en estadios más avanzados. En este sentido, se ha estudiado si el tratamiento precoz de la enfermedad mejora la respuesta de los pacientes al tratamiento con IFN—(Beck *et al.*, 2002; Coyle y Hartung, 2002; Soderstrom, 2003). De todos modos, como ya se ha comentado, estas diferencias en la respuesta al tratamiento podrían deberse a la existencia de diferentes patrones patogénicos de desmielinización (Lassmann *et al.*, 2001).

En los pacientes que siguen un curso progresivo de la enfermedad y/o que la evolución clínica es muy rápida se están aplicando drogas inmunosupresoras como el azatioprina (Kappos *et al.*, 1988; 1990; Yudkin *et al.*, 1991), ciclofosfamida (Mauch *et al.*, 1989; Comabella *et al.*, 1998) o mitoxantrona (Mauch *et al.*, 1992; Cursiefen *et al.*, 2000) para las que se ha descrito una reducción de la tasa de progresión de la enfermedad. Otras terapias adicionales han sido la utilización de

inmunoglobulinas intravenosas (Achiron *et al.*, 1998) y la plasmaféresis (Weinshenker *et al.*, 1999).

Los estudios realizados en el modelo animal de la enfermedad, la EAE, han permitido el mejor conocimiento de la patogenia de la enfermedad y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, como la administración de estriol (Sicotte *et al.*, 2002) o de estatinas (Neuhaus *et al.*, 2002; Youssef *et al.*, 2002) y la utilización de anticuerpos anti-VLA-4 (Natalizumab) (Tubridy *et al.*, 1999; Elices, 2003; Miller *et al.*, 2003). Se han realizado diferentes ensayos clínicos en fase II y III en los que Natalizumab ha demostrado ser un tratamiento muy eficaz en la EM, tanto reduciendo el número de lesiones inflamatorias en el SNC como el número de brotes clínicos (Miller *et al.*, 2003; Dalton *et al.*, 2004). Debido a los buenos resultados obtenidos con este tratamiento, la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó este tratamiento para su utilización en la EM. Sin embargo, a inicios del año 2005, y tras la muerte de dos pacientes por leucoencefalopatía multifocal progresiva, se ha interrumpido, de forma provisional, los ensayos clínicos en curso en Europa y el tratamiento abierto en Estados Unidos. Otro ensayo clínico en fase II, realizado en pacientes que no respondían al tratamiento con IFN—, consistía en la administración de anticuerpos monoclonales humanizados anti-CD25 (Daclizumab). Este tratamiento resultó ser bien tolerado y redujo un 78% la aparición de lesiones nuevas captantes de gadolinio, también se observó una mejoría en diversos parámetros clínicos (Bielekova *et al.*, 2004).

La reparación de la mielina y la neuprotección deberían ser los principales objetivos de las estrategias terapéuticas para la EM. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos aprobados tienen como diana la fase inflamatoria de la enfermedad. Estos tratamientos reducen la frecuencia de los brotes clínicos y la aparición de nuevas lesiones, pero los beneficios a largo plazo, en el sentido de evolución de la discapacidad y en el inicio de la fase progresiva de la enfermedad, no se han demostrado (Filippini *et al.*, 2003). Esto ha hecho que se piense en la utilización de nuevos abordajes terapéuticos, como la terapia génica y/o celular para intentar potenciar los mecanismos de neuroprotección y conseguir neuroregeneración del tejido dañado (Furlan *et al.*, 2003; Pluchino *et al.*, 2003). Otro tipo de estrategias terapéuticas en desarrollo es la utilización de moléculas antioxidantes o precursores de éstas como el ácido úrico, vitaminas, etc. (Spitsin *et al.*, 2001; Munger *et al.*, 2004) ya que se ha descrito que el estrés oxidativo, directa o indirectamente, puede causar daño axonal (Beckman, 1996a; 1996b; Dawson y Dawson, 1996). Quizás, en un futuro próximo, el tratamiento de la EM consista en la utilización de terapias

combinadas que actúen tanto a nivel del proceso inflamatorio como ejerciendo neuroprotección e incluso promoviendo la neuroregeneración.

ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL

La EAE es una enfermedad experimental órgano específica, autoinmune y desmielinizante del SNC que sirve como modelo de EM, ya que comparte con ésta características clínicas, patogénicas e histopatológicas (Lassmann y Wisniewski, 1979; Raine, 1983; Wekerle *et al.*, 1994).

1. Inducción de la EAE

La EAE se puede inducir en especies susceptibles, como roedores, lagomorfos y primates, mediante inmunización activa, es decir, mediante la inyección subcutánea o intradérmica de una suspensión de SNC, mielina o antígenos autólogos o heterólogos purificados de la misma, emulsificados en adyuvantes (Paterson, 1960; 1976). Otra forma de inducir la enfermedad es mediante inmunización pasiva, es decir, mediante la inyección intravenosa de células T específicas frente antígenos de la mielina, procedentes de los ganglios linfáticos o del bazo de animales inmunizados activamente, lo que demuestra la naturaleza autoinmune de la enfermedad (Pettinelli y McFarlin, 1981; Mokhtarion *et al.*, 1984; van der Veen *et al.*, 1989; Pender, 1995; Sun *et al.*, 2001). También se utiliza como modelo de EM el modelo de enfermedad desmielinizante que se obtiene tras la inoculación, en el SNC de especies susceptibles, de virus como el virus Theiler (Dal Canto y Lipton, 1975), virus Semliki Forest (Suckling *et al.*, 1978) o el coronavirus murino JHM (Weiner, 1973).

1.1. Susceptibilidad

Los experimentos iniciales en EAE se realizaron en monos (Rivers *et al.*, 1933; Rivers y Schwentker, 1935), pero posteriormente se extendió el uso de roedores, cobayas y conejos (Zamvil y Steinman, 1990; Weller, 1991). No todas las especies son igualmente susceptibles a la inducción de EAE. Los mecanismos responsables de estas diferencias se suelen atribuir a la dotación genética de la cepa y a los polimorfismos existentes en los antígenos del MHC-II y del TCR (Zamvil y Steinman, 1990; Dahlaman *et al.*, 1999; Roth *et al.*, 1999).

Las hormonas también se han considerado como factores importantes en la regulación de la susceptibilidad a la inducción de la enfermedad. Así, se ha descrito

que las ratas Lewis, cepa altamente susceptible a la inducción de la EAE, tienen una hipofunción del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal (Sternberg *et al.*, 1989, 1990); que son necesarios niveles elevados de corticosteroides para la remisión de la enfermedad (Mason *et al.*, 1990) o que el tratamiento con fármacos anti-glucocorticoides empeora la EAE (Bolton y Flower, 1989).

1.2. Antígenos

Inicialmente, se utilizó un homogenado de SNC para la inducción activa de la EAE (Kabat *et al.*, 1947). Con el avance de las técnicas de purificación de proteínas se extendió el uso de proteínas purificadas de la mielina como la MBP, la PLP, o la MOG principalmente (Gardinier *et al.*, 1992; Pender, 1995). Más recientemente, se ha descrito la inducción de EAE con otras proteínas relacionadas con mielina como la proteína mielínica básica asociada a los oligodendrocitos (MOBP) (Holz *et al.*, 2000; Kaye *et al.*, 2000; Maatta *et al.*, 1998), glicoproteína asociada a la mielina (MAG) (Morris-Downes *et al.*, 2002; Weerth *et al.*, 1999), glicoproteína específica de los oligodendrocitos (OSP) (Morris-Downes *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 1999) y 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa) (Morris-Downes *et al.*, 2002; Maatta *et al.*, 1998), presente en los oligodendrocitos. Se utilizan tanto las proteínas completas como péptidos encefalitogénicos de éstas. La utilización de péptidos ha permitido que los modelos sean más reproducibles y que especies que eran resistentes al inmunizarlas con la proteína completa sean susceptibles al inmunizarlas con determinados péptidos. También se ha descrito que mediante la transferencia de células específicas frente S100—, una proteína astrocitaria, se induce una enfermedad con mucha afectación del SNC pero con pocos signos clínicos que se ha denominado panencefalitis alérgica experimental (Kojima *et al.*, 1994).

La EAE es el resultado de la inmunización de una especie susceptible con un antígeno encefalitogénico determinado. Las posibles combinaciones tanto de especies como de antígenos dan lugar a un abanico de modelos diferentes de EAE.

2. Curso clínico

Tras la inmunización activa con antígenos de la mielina o transferencia de células T encefalitogénicas, se desarrolla la respuesta inmunitaria contra el antígeno presente en el SNC y los animales desarrollan los signos clínicos característicos de la EAE. La aparición de los signos clínicos suele ir precedida de un descenso del peso corporal que se mantiene hasta que el animal se estabiliza o se recupera de éstos.

Los signos clínicos consisten en el desarrollo de una parálisis ascendente, que se inicia con flacidez de la cola y progresa provocando paraparesia o paraplejia de los miembros posteriores y puede llegar a grados de tetraparesia o tetraplejia e incluso en algunos casos provocar la muerte del animal.

Basádonos en el curso clínico, se pueden distinguir diferentes tipos de EAE. El primero, la *EAE aguda* se caracteriza por la aparición de un único episodio clínico de la enfermedad. La especie de excepción para este modelo es la rata y concretamente las ratas Lewis y DA, que son cepas muy susceptibles, y el antígeno utilizado la MBP (Stepaniak *et al.*, 1997; Lenz *et al.*, 1999). El segundo, la *EAE crónica remitente-recurrente* en la que se pueden observar dos o más brotes clínicos de la enfermedad. Para este modelo, habitualmente, se trabaja con ratones SJL inmunizados con PLP, aunque también se ha descrito en ratas (Raine, 1985; Polman *et al.*, 1988). Un tercer tipo es la *EAE no remitente*, que sigue un curso progresivo sin brotes y que se ha descrito en ratones con dotación genética H-2^b y ratas inmunizados con MOG (Mendel *et al.*, 1995; Weissert *et al.*, 1998). Este mismo curso clínico se ha descrito para ratones con dotación genética H-2^u inmunizados con MBP (Acha-Orbea *et al.*, 1988; Wraith *et al.*, 1989).

3. Histopatología

Los diferentes modelos de EAE reproducen la mayoría de las características histopatológicas de la lesión de EM. En el SNC de los animales con EAE se observan infiltrados inflamatorios perivasculares y parenquimatosos constituidos principalmente por linfocitos y macrófagos que han atravesado la BHE (Lassmann *et al.*, 1980; Polman *et al.*, 1986; Pender, 1987). Posteriormente, se produce la activación de células residentes como la microglía y los astrocitos. En función de la especie y/o cepa animal y el antígeno utilizados, las lesiones inflamatorias pueden ir acompañadas o no de áreas de desmielinización. Mientras que el modelo agudo en rata Lewis inmunizada con MBP se caracteriza por la ausencia de desmielinización, tanto en el modelo de ratón SJL inmunizado con PLP como en el de ratones C57BL/6 inmunizados con MOG, ambos utilizados en esta tesis doctoral, se observa desmielinización siendo más prominente y extensa en el último.

No está claro cual es el componente de la lesión que provoca la aparición de los signos clínicos. Se ha descrito que la formación del edema puede ser una de las principales causas de los signos neuropatológicos que se desarrollan (Simmons *et al.*, 1982; Kerlero de Rosbo *et al.*, 1985). Otra causa podría ser los fallos en la conducción nerviosa que conlleva la desmielinización (Pender, 1987). En la EAE, al

igual que sucede en la EM, también se observa daño y pérdida axonal (Raine *et al.*, 1984; Raine y Cross, 1989; Kornek *et al.*, 2000) y se piensa que éste es el principal responsable de la discapacidad neurológica permanente (Wujek *et al.*, 2002).

4. Patogenia

El modelo de EAE ha permitido el estudio de las respuestas inmunitarias implicadas en la patogenia de la EM. Se ha estudiado la contribución de cada subpoblación celular del sistema inmunitario en el desarrollo de la enfermedad, así como los mecanismos implicados en la entrada de estas células en el SNC, qué células o mediadores solubles son responsables del proceso de desmielinización, etc.

Igual que sucede para la enfermedad humana, la EAE no se puede considerar una enfermedad exclusivamente Th1 (Figura 10), aunque mayoritariamente estaría mediada por estas células y por las citocinas que secretan, IFN- γ , TNF- α , LT- α e IL-2 (Constantinescu *et al.*, 1998). El IFN- γ y el TNF- α activan a los macrófagos y éstos tienen la capacidad de destruir la mielina y los oligodendrocitos, así como producir más citocinas, IL-12, IL-23 y TNF- α , y productos citotóxicos como el NO que también actuarán contra esas dianas. Se han implicado otras poblaciones celulares en la patogenia de la EAE. En este sentido, se ha descrito que los linfocitos Th2 participan en la inducción y propagación de la enfermedad (Lafaille *et al.*, 1997). También se ha observado que se puede inducir la EAE mediante la inmunización pasiva con células T CD8+ específicas frente MBP (Sun *et al.*, 2001) y que estas células son abundantes en las lesiones de EM (Kuhlmann *et al.*, 2002). Los linfocitos T CD8+ pueden causar apoptosis mediante la expresión de FasL que se unirá a su receptor Fas en la superficie de los oligodendrocitos. Estos linfocitos secretan enzimas como la perforina y la granzima que destruirán la célula diana.

Los linfocitos B activados producen autoanticuerpos frente antígenos de la mielina que se han podido detectar en suero y LCR de pacientes con EM (Berger *et al.*, 2003). En la EAE, se ha observado que la administración de anticuerpos anti-MOG exacerba la enfermedad (Linnington y Lassmann, 1987; Schluesener *et al.*, 1987; Raine *et al.* 1999).

El avance en las técnicas de manipulación genética ha potenciado el desarrollo de especies deficientes en un determinado gen (*knock-out*) o bien que lo sobreexpresen (*knock-in* o transgénicos), que han permitido estudiar la función de citocinas, quimiocinas, receptores, etc. en la patogenia de la EAE.

Además, el hecho de que el curso clínico sea muy predecible, sobretodo en aquellos modelos inducidos con péptidos sintéticos, facilita estos estudios y permite el ensayo de nuevas estrategias terapéuticas, ambas propiedades lo convierten en un modelo imprescindible para el avance en el conocimiento, prevención y terapéutica de la EM.

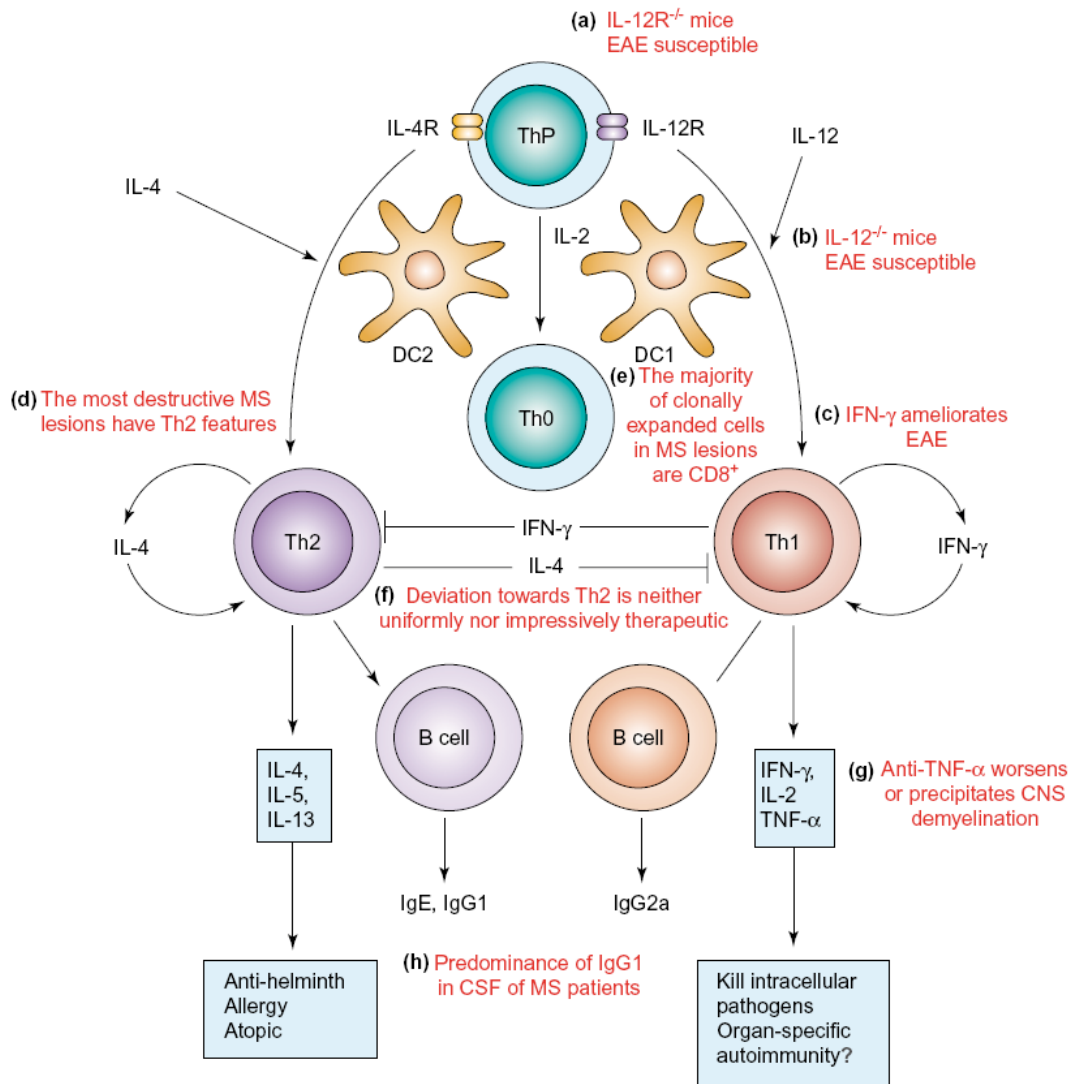


Figura 10: Mecanismos patogénicos implicados en la inducción y propagación de la desmielinización inflamatoria que se produce en la EAE y la EM. El texto en rojo hace referencia a los datos contradictorios de que la enfermedad inflamatoria sea puramente Th1. Abreviaciones: CNS, sistema nervioso central; CSF, líquido cefalorraquídeo; DC, célula dendrítica. (Tomado de Lassmann H, Ransohoff RM. The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical [correction of crucial] re-appraisal. Trends Immunol 2004; 25: 132-137. Erratum in: Trends Immunol 2004; 25: 275).

METALOTIONEINAS

Las MT son una familia de proteínas de bajo peso molecular (6-7 kDa), ricas en cisteína (Cys) y que unen metales. Están presentes en el citosol y en el núcleo de las células eucariotas, conservándose su secuencia y homología estructural a lo largo de la escala filogenética. En los mamíferos, las MT son polipéptidos de 61 ó 68 aminoácidos que contienen 20 residuos de Cys conservados, que son los que tienen capacidad de unir metales.

La existencia de las MT a lo largo de la escala filogenética da idea de su demanda biológica, mientras que la conservación de las Cys indica que éstas son, indudablemente, las responsables de las funciones de estas proteínas. En base a sus aspectos estructurales, las MT se han dividido en diversas familias (Binz y Kägi, 1999). Las MT de mamífero pertenecen a la familia 1, que comprende varias subfamilias, m1-m4. En ratón, cada subfamilia está compuesta por un único miembro (MT-I en la subfamilia m1, MT-II en la subfamilia m2, etc.), mientras que en los primates existe un claro polimorfismo genético. En humanos se han identificado 17 genes MT en el cromosoma 16, de los que al menos 10 son funcionales (Samson y Gedamu, 1998). En el ratón los genes MT residen en el cromosoma 8 y siguen un patrón de expresión similar al de los humanos (Quaife *et al.*, 1994).

Después de más de 40 años de investigación en el tema, se ha obtenido mucha información sobre las MT, sin embargo, aún no se les han asignado una función biológica definitiva. Se han considerado como posibles funciones la participación en la proliferación y apoptosis celular, homeostasis de metales esenciales, eliminación de radicales libres y detoxificación de metales.

1. Estructura

Estudios de la secuencia primaria muestran una proporción alta de secuencias Cys-Cys, Cys-x-Cys o Cys-x-y-Cys (donde x e y son cualquier otro aminoácido). Como se ha comentado anteriormente, en los mamíferos, hay 20 Cys invariables, que representan aproximadamente un 30% de los aminoácidos de la secuencia. Los aminoácidos aromáticos y la histidina están totalmente ausentes en la cadena polipeptídica (Kägi y Kojima, 1987).

En la estructura secundaria predominan los giros —con algunas hélices— y segmentos de láminas —(Braun *et al.*, 1986; Furey *et al.*, 1986). La unión de metales da lugar a la formación de dos dominios bien definidos, denominados

dominio —y dominio —. En cada dominio, los metales se localizan en un *cluster* o agrupación.

El dominio —se corresponde con el extremo N-terminal y comprende los aminoácidos 1-30. Contiene 3 átomos de metales bivalentes o hasta 7 átomos monovalentes. El dominio —se corresponde al extremo C-terminal y contiene los aminoácidos 31-61 de la cadena polipeptídica. Tiene 9 Cys y puede unir 4 átomos de metales bivalentes o 7 monovalentes (Figura 11). Las MT pueden unirse a diferentes metales como: Zn, Cu, Cd, Fe, Hg, Pb, Ag, Au, Ni, Co. El contenido metálico de las MT en un organismo vivo puede variar y pueden producirse sustituciones, dependiendo del organismo, del tejido y de la exposición a los metales.

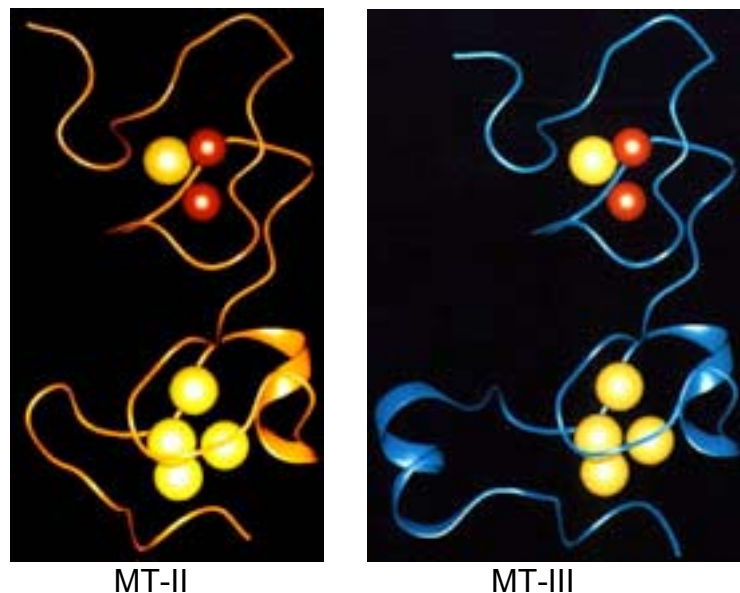


Figura 11: Modelos teóricos de la estructura terciaria de la MT-II y la MT-III. Las MT se organizan en dos dominios o *clusters* donde se localizan los metales (representados como esferas). En el dominio —(extremo C-terminal) pueden unirse 4 átomos de metales y en el dominio —(extremo N-terminal) 3 átomos.

2. Localización

Las isoformas I y II están presentes en la mayoría de los órganos de los mamíferos, expresándose de forma constitutiva sobretodo en el hígado, riñón, intestino, páncreas, estómago, corazón, músculo, pulmones, timo, gónadas, cerebro y placenta (Chen y Ganther, 1975; Waalkes, 1984; Heilmaier *et al.*, 1987). La MT-III es una isoforma que se expresa principalmente en el cerebro y que inicialmente se pensó que era un posible factor inhibitor de la supervivencia neuronal y se la denominó factor inhibitor del crecimiento (GIF) (Uchida *et al.*, 1991; Palmiter *et al.*, 1992; Tsuji *et al.*, 1992; Erickson *et al.*, 1994). La MT-IV está presente básicamente

en el epitelio estratificado queratinizado (Quaife *et al.*, 1994). Tanto la MT-III como la MT-IV también pueden estar expresadas en el deciduum maternal (Liang *et al.*, 1996).

En el cerebro, la MT-I y la MT-II están sintetizadas principalmente por los astrocitos aunque también las expresan la microglía (Blaauwgeers *et al.*, 1994; Vanguri, 1995). La MT-III la expresan tanto los astrocitos como las neuronas (Anezaki *et al.*, 1995; Belloso *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1996a; 1996b).

3. Regulación

Las MT son unas proteínas multirreguladas e inducidas por la interacción de muchos y muy diversos factores, por lo que únicamente en algunos casos se han podido identificar los mecanismos moleculares por los que un inductor puede actuar, como en el caso de algunos elementos reguladores del promotor.

Los inductores de las MT se han clasificado en inductores directos, cuando la inducción se produce tanto *in vivo* como *in vitro*, e inductores indirectos, cuando la inducción se produce *in vivo* pero no *in vitro*.

3.1. Metales

Los metales son los inductores más potentes y mejores estudiados de las MT. La administración *in vivo* de metales como el Cd, Zn, Cu, Hg, Mn, Co, Pb, Ni y Bi induce la síntesis de ARNm y de proteína de MT-I y MT-II en todas las especies eucariotas superiores. Los órganos más inducibles son el hígado, el riñón y el páncreas (Durnam y Palmiter, 1981).

En el cerebro, se ha observado que la administración periférica de metales *in vivo* no afecta prácticamente a los niveles de MT-I y MT-II (Durnam y Palmiter, 1981; Itoh *et al.*, 1983; Heilmaier y Summer, 1985). Esto se debe a la protección que ofrece la BHE. Sin embargo, cuando la administración se hace intraventricularmente, se observa inducción del ARNm y de los niveles protéicos (Gasul *et al.*, 1994; Hao *et al.*, 1994; Ebadi *et al.*, 1995). También se ha estudiado el efecto *in vitro* de los metales, sobre cultivos celulares de astrocitos y neuronas, observándose un efecto inductor sobre los niveles de MT-I y MT-II (Kikuchi *et al.*, 1993; Hidalgo, *et al.*, 1994; Kramer *et al.*, 1996a; 1996b). Este efecto se debe a la presencia de elementos de respuesta a metales (MRE) en el promotor de los genes de estas proteínas. La expresión de MT-I y MT-II, tanto basal como la inducida por metales pesados, así como la expresión de otros genes regulados por diferentes mecanismos de estrés, depende del factor de transcripción de respuesta a metales

(MTF)-1 que se une a los MRE y activa la expresión de los genes asociados a éstos (Radtke *et al.*, 1993; Heuchel *et al.*, 1994; Günes *et al.*, 1998).

3.2. Hormonas

Los glucocorticoides endógenos (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) y el sintético dexametasona son inductores directos de las MT, observándose su efecto tanto *in vivo* (Etzel *et al.*, 1979, Etzel y Cousind 1981; Hager y Palmiter, 1981) como *in vitro* (Failla y Cousins, 1978; Karin y Herschman 1979; 1980, Karin *et al.*, 1984a). De hecho, existen elementos de respuesta a los glucocorticoides (GRE) en el promotor de los genes de MT (Karin *et al.*, 1984b; Kelly *et al.*, 1997).

El efecto de los glucocorticoides es variable y depende de la especie, por ejemplo, en el ratón la regulación de MT-I y MT-II es coordinada (Yagle y Palmiter, 1985) mientras que su efecto varia para las isoformas humanas (Karin *et al.*, 1984a; Richards *et al.*, 1984). Además, el efecto de los glucocorticoides es discreto ya que muchas veces son necesarias dosis farmacológicas para observar inducción de las MT (Bracken y Klaassen, 1987; Lehman-McKeeman *et al.*, 1988; Klaassen y Liu, 1991).

En el cerebro los estudios realizados *in vivo* con glucocorticoides administrados periféricamente, muestran una inducción de MT-I y MT-II en las diferentes áreas cerebrales, tanto a nivel de ARNm como de proteína (Gasull *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1995). Se ha descrito que los glucocorticoides tienen la función de regular los niveles basales de MT-I y MT-II, ya que en ratas adrenalectomizadas los niveles de estas proteínas están muy disminuidos y son revertidos tras el tratamiento con corticosterona (Gasull *et al.*, 1994; Hidalgo *et al.*, 1997a). *In vitro*, en cultivos de astrocitos y neuronas de rata y ratón, también se ha observado el efecto inductor de los glucocorticoides sobre la expresión de MT-I y MT-II (Hidalgo *et al.*, 1994; Kramer *et al.*, 1996a; 1996b).

Respecto a las otras dos isoformas sólo hay estudios del efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de MT-III. Tras la administración de dexametasona u hormona adrenocorticotrópica (ACTH) *in vivo* no se ha observado inducción de la expresión de la MT-III (Palmiter *et al.*, 1992; Belloso *et al.*, 1996). Sin embargo, en algunas áreas cerebrales como el hipocampo, se ha observado disminución (Zheng *et al.*, 1995). *In vitro*, los glucocorticoides inducen la expresión de MT-III en cultivos de células gliales de rata y, parcialmente, en células de ratón (Belloso *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1996a). Por el contrario, en cultivos neuronales se ha observado disminución de los niveles de ARNm de MT-III, tanto en los

derivados de rata como de ratón (Belloso *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1996b). Esto sugiere que la regulación por glucocorticoides de la MT-III depende del tipo celular.

Existen otras hormonas que tienen un efecto inductor *in vivo* sobre las MT. Entre ellas cabe destacar las hormonas sexuales, como los estrógenos y la progesterona, que pueden utilizar los mismos elementos reguladores que los glucocorticoides (GRE) (Slater *et al.*, 1988).

3.3. Citocinas

Las citocinas son mediadores de las respuestas inmunológicas e inflamatorias y también intervienen en una serie de fenómenos no inmunológicos como el crecimiento y la diferenciación celular.

Interleucina-1

Existen dos isoformas de la IL-1, la IL-1 α y la IL-1 β . Aunque están codificadas en dos genes diferentes, reconocen el mismo receptor de membrana. Ambas isoformas son sintetizadas principalmente por monocitos/macrófagos, aunque también por células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, linfocitos B y T, células de músculo liso, astrocitos, microglía y otros. Existe un tercer miembro de la IL-1, el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1Ra), que tiene como característica bloquear la actividad biológica de la IL-1 α y la IL-1 β , limitando sus acciones.

La IL-1 es una citocina proinflamatoria. Es un buen inductor de la MT-I y MT-II en el hígado (Disilvestro y Cousins, 1984; Cousins y Leinart, 1988; De *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991). También se ha demostrado la inducción de MT-I y MT-II en cerebro tras la inyección intracerebroventricular de IL-1 (Hernández y Hidalgo, 1998), aunque se desconoce si es mediante un efecto directo sobre el gen, ya que no se conocen secuencias *cis* para la IL-1, o bien mediado por otras moléculas inducidas por la IL-1 como el factor nuclear proteína activadora (AP)-1 (Dinarello, 1991) o la IL-6 (de Simoni *et al.*, 1990; Romero *et al.*, 1993; Norris *et al.*, 1994).

Interleucina-6

La IL-6 es una glicoproteína que la sintetizan diversos tipos celulares como fibroblastos, células endoteliales, monocitos/macrófagos, linfocitos B y T, hepatocitos, células endometriales, microglía, astrocitos y neuronas.

La IL-6 actúa a través de un receptor de membrana específico expresado en muchas células, incluidas las del SNC. Sin embargo, no lo expresan los linfocitos B activados ni los linfocitos T (Kishimoto, 1989; Arai *et al.*, 1990; Heinrich *et al.*, 1990; van Snick, 1990; Plata-Salaman, 1991).

En el hígado, la IL-6 es un inductor directo de la MT-I y MT-II, ya que las induce tanto *in vivo* (De *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991; Itoh *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1995; 1996) como *in vitro* (Schroder y Cousins, 1990; Coyle *et al.*, 1993).

En el cerebro, existen varios estudios *in vitro* que muestran la acción de la IL-6 sobre la expresión de MT-I y MT-II. En líneas celulares gliales y neuronales la IL-6 aumenta la síntesis de estas proteínas (Bauer *et al.*, 1993; Sawada *et al.*, 1994). En cultivos primarios de astrocitos de rata y ratón no se observan cambios importantes (Hidalgo *et al.*, 1994; Kramer *et al.*, 1996a), pero si se observa un pequeño efecto en cultivos primarios de neuronas de ratón en presencia de dexametasona y Zn (Kramer *et al.*, 1996b). Igual que sucede para la IL-1, no existen estudios que analicen la función de la IL-6 en la regulación de la MT-III *in vitro*.

In vivo, se han realizado estudios sobre la expresión de MT en ratones que sobreexpresan IL-6 (GFAP-IL6) en las células gliales, bajo el promotor del gen de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) y que desarrollan una enfermedad neurodegenerativa crónica progresiva (Campbell *et al.*, 1993; Hernandez *et al.*, 1997). Estos trabajos sugieren que la MT-I y MT-II podrían actuar como proteínas de fase aguda en el cerebro, sugiriendo una función protectora de estas proteínas. También se ha observado un aumento de la expresión de MT-I y MT-II tras la inyección intracerebroventricular de IL-6 en rata (Hernandez y Hidalgo, 1998). Respecto a la isoforma III, en ratones GFAP-IL6, se ha descrito un mecanismo diferencial de regulación de las isoformas I y II respecto a la MT-III (Hernandez *et al.*, 1997), igual que sucede para otros inductores de MT-I y MT-II que en la mayoría de los casos no afectan o incluso disminuyen la expresión de MT-III (Palmiter *et al.*, 1992; Dalton *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1995).

En referencia a los mecanismos de acción de la IL-6 en la regulación de estas proteínas, se han descrito secuencias *cis* para el elemento de respuesta al factor nuclear de la IL-6 (NF-IL6) y secuencias asociadas a genes implicados en la respuesta de fase aguda. La unión de IL-6 a su receptor implica la fosforilación de proteínas Jak quinasas que mediaran la fosforilación, dimerización y translocación nuclear de proteínas STAT (*signal transducer and activator of transcription*). Concretamente, para la IL-6 se ha descrito que STAT3 tiene una función principal (Lutticken *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 1994; Minami *et al.*, 1996) y que activaría la expresión de diversos genes que codifican para proteínas de fase aguda (Wegenka *et al.*, 1993; 1994; Akira *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996), por lo que se piensa que la regulación de MT-I durante la inflamación, probablemente esté

mediada por las mismas cascadas de transducción que regulan la expresión de los genes que codifican para las proteínas de fase aguda (Lee *et al.*, 1999a).

Existe cierta controversia respecto a la posibilidad de que citocinas como la IL-1 y la IL-6, liberadas en periferia, puedan entrar en el cerebro. En este sentido, se han identificado mecanismos de transporte activo para ambas citocinas en el cerebro (Banks *et al.*, 1991; Luheshi *et al.*, 1994). Existen otras hipótesis para la entrada de estas citocinas en el cerebro, a través de la zona de la BHE que es menos impermeable, es decir, el órgano vascular de la lámina terminal (Blatteis, 1990), o bien, a través de la activación de los nervios sensoriales periféricos (Dantzer, 1994; Luheshi y Rothwell, 1996).

Factor de necrosis tumoral

El TNF es una citocina pleiotrópica. Son tres los genes que conforman el grupo de los TNF, el TNF α , TNF β (también demonimado LT α) y LT β .

La molécula activa del TNF α es un trímero y está producida por los macrófagos de muchos tejidos, entre ellos la microglía del cerebro. Los linfocitos T y las células NK también producen TNF α . El TNF α lo producen los linfocitos aunque también los leucocitos en general, así como los astrocitos y la microglía. Los TNF ejercen sus funciones a través de los mismos receptores. Existen dos receptores de TNF, el TNFR1 y TNFR2 (Le y Vilcek, 1987; Beutler y Cerami, 1988; Plata-Salaman, 1991; Rink y Kirchner, 1996).

Se ha descrito que el TNF α es un inductor de las MT hepáticas *in vivo* (De *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991; Sato *et al.*, 1992) e *in vitro*, en cultivos de fibroblastos humanos (Sciavolino y Vilcek, 1995) y en cultivo primario de hepatocitos aunque requiere la presencia de Zn (Coyle *et al.*, 1993).

La regulación de la expresión de MT-I y MT-II en el SNC por el TNF α se ha estudiado en ratones que sobreexpresan TNF α bajo el promotor del gen de la GFAP y que desarrollan un desorden neurológico crónico progresivo con neurodenegeración, desmielinización y parálisis. En estos ratones se ha observado que hay un aumento muy significativo de MT-I y MT-II en los ratones sintomáticos, sin embargo, aquellos ratones que aún sobreexpresando el TNF α eran no sintomáticos no tuvieron inducción de estas proteínas. Estos resultados indicarían que la expresión de MT-I y MT-II en el SNC estaría regulada por la respuesta inflamatoria y el daño tisular asociado más que por un efecto directo del TNF α (Carrasco *et al.*, 2000a).

Interferón

Los IFN son una familia de proteínas que tienen como característica principal la capacidad de interferir en la replicación viral. Existen dos clases de IFN, los de tipo I, donde se incluyen el IFN—y el IFN—, y los de tipo II, el IFN—.

El IFN—lo producen los leucocitos y el IFN—los fibroblastos. Ambos IFN compiten por un mismo receptor para ejercer sus funciones. El IFN—está producido por los linfocitos T y su receptor es diferente al de los anteriores. Los IFN de tipo I se podrían considerar la primera línea de defensa en la resistencia del huésped frente a una infección vírica, mientras que el IFN—estaría producido por los linfocitos que han sido sensibilizados por el antígeno viral y su función principal es activar diferentes mecanismos de la respuesta inmunitaria frente al antígeno vírico, como la activación de las células inmunitarias, expresión de MHC y receptores de alta afinidad para las inmunoglobulinas (Pestka *et al.*, 1987; Plata-Salaman, 1991; Williams *et al.*, 1993), más que la función antiviral en si misma.

Los IFN también son inductores directos de las MT. Se ha descrito que la administración de IFN—aumenta la síntesis de las MT hepáticas (De *et al.*, 1990), al igual que sucede con la administración de factores inductores del IFN—(Bell *et al.*, 1987). Como inductores directos también tienen efecto *in vitro*, donde se ha observado que el IFN—induce la síntesis de ARNm de MT-II en cultivo de fibroblastos humanos (Sciavolino y Vilcek, 1995), al igual que sucede con el IFN—en líneas celulares de macrófagos (Farber, 1992) y en cultivos primarios de células gliales de rata (Vanguri, 1995). También se ha observado un aumento de la expresión de ARNm de MT-I y MT-II en células CHO tratadas con IFN—(Morris y Huang, 1987). Se ha descrito que el efecto regulador de los IFN sobre la expresión de las MT es bifásico, es decir, inhibidor a dosis bajas e inductor a dosis altas (Hernandez *et al.*, 1996). En ratones que sobreexpresan IFN—bajo el promotor del gen de la GFAP y que desarrollan una enfermedad neurodegenerativa con características similares a la EM, se ha observado un aumento significativo de la expresión de MT-I y MT-II, pero igual que sucedía para los ratones que sobreexpresaban TNF—, la regulación de la expresión de estas proteínas se debe principalmente al daño tisular que se produce más que a un efecto directo de la citocina (Giralt *et al.*, 2001).

En uno de los trabajos presentados en esta tesis se analiza la función del IFN—sobre la expresión de MT en el SNC de ratones con EAE.

3.4. Estrés oxidativo

La transcripción de MT-I y MT-II está inducida por el estrés oxidativo. Esta inducción está mediada por los MRE (Palmiter, 1987; Dalton *et al.*, 1994) y tiene como factor de transcripción MTF-1 (Dalton *et al.*, 1996). También, se ha descrito que en los promotores de los genes de muchas proteínas con actividad antioxidante, incluidas la MT-I y MT-II, existen otras secuencias de respuesta al estrés oxidativo, denominadas ARE (*antioxidant response element*), que activan la transcripción de estas proteínas en respuesta al peróxido de hidrógeno (Favreau y Pickett, 1993; Jaiswal, 1994). MT-I y MT-II se acumulan en situaciones donde se produce estrés oxidativo (Shiraga *et al.*, 1993), además el hecho de que el peróxido de hidrógeno tenga un efecto directo sobre el promotor del gen de las MT (Samson *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2004) implica definitivamente que estas proteínas se inducen durante el estrés oxidativo y que tienen una función antioxidante.

3.5. Otros inductores

Existen muchos más factores, de muy diversas naturalezas, inductores de las MT. Entre ellos cabe destacar las endotoxinas bacterianas, como el LPS, que activan a los macrófagos y éstos desencadenan la respuesta inflamatoria produciendo citocinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6 o TNF—que son las responsables de la inducción de las MT. Se ha descrito que tras inyectar lipopolisacárido (LPS) en rata y ratón, se observa un aumento de la expresión tanto del ARNm (Searle *et al.*, 1984; De *et al.*, 1990; Palmiter *et al.*, 1992; Choudhuri *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1995) como de la proteína de MT (Hernandez *et al.*, 1997; Hernandez y Hidalgo, 1998) en el cerebro de estos animales.

La proteína quinasa C (Nebes *et al.*, 1988), el AMPc (Imbra y Karin, 1987), agentes alquilantes (Kotsonis y Klaassen, 1979), etanol (Waalkes *et al.*, 1984), ácido kaínico (Dalton *et al.*, 1995), peróxido de hidrógeno (Chan *et al.*, 2004), etc. también son inductores de las MT. Podemos aventurar que en realidad la mayoría de estos factores inducen la MT porque son agentes estresantes, inflamatorios y/o inductores de estrés oxidativo.

4. **Funciones**

Las MT se han implicado en funciones diversas sin que ninguna de ellas sea más remarcable que el resto por su singularidad. A la MT-I y MT-II, con distribución ubicua, se las ha implicado en la homeostasis del Cu y del Zn, detoxificación de metales pesados, como reservorio de Cys y como antioxidantes. En cambio, las

funciones de MT-III y MT-IV son presumiblemente específicas del tejido donde se expresan.

4.1. MT-I y MT-II

Homeostasis del Zn y del Cu

El Zn y el Cu son elementos traza esenciales para el organismo. Es de gran importancia que exista un sistema regulador de su almacenamiento, transporte y distribución intracelular en el organismo ya que la mayoría de las veces la liberación de éstos, por parte de las células, provoca toxicidad celular.

En etapas fetales y en neonatos se han observado niveles elevados de MT-I y MT-II en el hígado (Waalkes y Klaassen, 1984; Webb, 1987), atribuyéndoles a estas proteínas la función de reservorio de Zn y Cu, necesarios en los procesos de división y diferenciación celular que suceden en estas etapas de crecimiento rápido de los tejidos.

En el intestino, la MT-I y MT-II se han implicado en el control de la absorción intestinal de Zn y el Cu, existiendo una relación inversa entre la eficiencia de absorción del metal y la unión del metal a las MT intestinales (Menard *et al.*, 1981; Cousins, 1985). También se ha descrito que las MT intestinales están reguladas por la presencia de Zn y Cu en la dieta (Richards y Cousins, 1977; Hall *et al.*, 1979).

Otra función de la MT-I y MT-II estaría relacionada con la necesidad que tienen muchos enzimas de Zn y Cu como cofactores de su actividad y en la que las MT actuarían como dadores de estos metales (Petering y Fowler, 1986).

Destoxificación de metales

Una de las principales funciones de las MT es la relacionada con la toxicidad por metales pesados. Esta función deriva directamente de la estructura de estas proteínas, debido a la alta conservación de los elementos reguladores de metales que hay en la secuencia génica de las MT.

La MT-I y MT-II actúan como agentes detoxificantes de metales tóxicos como el Cd, Hg, Au y Bi (Compere y Palmiter, 1981; Karin *et al.*, 1984a). Se ha demostrado que los ratones deficientes en MT-I y MT-II expuestos a dosis tóxicas de Cd mueren a causa de necrosis hepática (Masters *et al.*, 1994a).

Reservorio de Cys

Se piensa que las MT podrían actuar como reservorio de Cys debido a la alta proporción de estos aminoácidos en la cadena peptídica de las MT (aproximadamente un 30%) (Kägi y Kojima, 1987). Se ha observado que la

administración de cys o de glutatión (GSH), la reserva de cys no protéicas más importante de las células, en animales aumenta los niveles de MT-I y MT-II en el hígado (Hidalgo *et al.*, 1990; Giralt *et al.*, 1993). El mecanismo a través del cual se produce esta regulación no es conocido.

Antioxidante

Las MT están inducidas por agentes muy diversos que provocan estrés oxidativo a las células.

En las células hay diferentes tipos de moléculas antioxidantes como las vitaminas, el GSH y diversos enzimas: catalasas, peroxidasas, etc. (Slater, 1984; Camhi *et al.*, 1995). Se ha descrito que la MT-I y MT-II actúan como secuestradores (*scavengers*) de radicales hidroxilo (Thornalley y Vasak, 1985; Abel y de Ruiter, 1989) y que funcionalmente podrían sustituir la función de la superóxido dismutasa en la protección contra el estrés oxidativo (Tamai *et al.*, 1993). La MT-I y MT-II también se han implicado en otras funciones antioxidantes como la inhibición de la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Thomas *et al.*, 1986) o evitando la degradación del ADN inducida por radicales hidroxilo (Abel y de Ruiter, 1989; Chubatsu y Meneghini, 1993). En los trabajos presentados en esta tesis se estudia la función antioxidante de la MT-I y MT-II en la EAE.

4.2. MT-III

La MT-III se descubrió en 1991 como un factor que inhibía el crecimiento neuronal, por lo que inicialmente se la denominó GIF (Uchida *et al.*, 1991). Se sabe que la región N-terminal es la responsable de esta función. Debido a la inserción de un aminoácido en la posición 5 y a la sustitución de otros dos en las posiciones 7 y 9, la proteína adquiere una disposición espacial diferente que le confiere su función biológica, sin que esté determinado el mecanismo a través del cual se produce (Sewell *et al.*, 1995; Uchida y Ihara, 1995). Uchida y col. (1991) observaron que la expresión de MT-III estaba disminuida en la enfermedad de Alzheimer, aunque estos resultados no se han podido confirmar en trabajos posteriores (Palmiter *et al.*, 1992; Carrasco *et al.*, 1999).

La MT-III se localiza abundantemente en los somas neuronales, en el hipocampo, cortex cerebral, bulbo olfatorio y en las células de Purkinge en el cerebelo (Yanagitani *et al.*, 1999). A nivel de ARNm, MT-III se ha detectado en las vesículas sinápticas de las neuronas que contienen Zn (neuronas Zn-érgicas) localizadas en el hipocampo (Masters *et al.*, 1994b), donde su función podría ser facilitar el transporte de Zn hasta la vesícula sináptica o incluso se ha sugerido que

podría estar implicada en funciones superiores como el aprendizaje y la memoria. En cuanto a la expresión de MT-III en otras poblaciones celulares del SNC existe gran controversia. Algunos autores han descrito expresión de MT-III únicamente en astrocitos y no en neuronas u otras poblaciones celulares, haciendo el análisis mediante hibridación *in situ* o Northern blot (Uchida *et al.*, 1991; Kobayashi *et al.*, 1993; Uchida, 1993). Otros, sin embargo, analizando el ARNm han observado que la expresión de éste es mucho más consistente con la población neuronal que con la glial, produciéndose un aumento de MT-III en astrocitos en respuesta al daño tisular (Masters *et al.*, 1994b; Anezaki *et al.*, 1995; Acarin *et al.*, 1999; Carrasco *et al.*, 2000a; Gong y Elliott, 2000; Kim *et al.*, 2003). Por último, a nivel de proteína también se han descrito diferentes localizaciones sin llegar a un consenso entre si la expresión es principalmente en astrocitos (Uchida *et al.*, 1991; Hozumi *et al.*, 1996; Acarin *et al.*, 1999 Carrasco *et al.*, 1999; 2000a) o en neuronas (Kojima *et al.*, 1999; Velázquez *et al.*, 1999; Yanagitani *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003). Probablemente, estos resultados controvertidos se deban al anticuerpo utilizado en los diferentes análisis, aunque no se descarta una hipótesis más biológica que sería una posible secreción de MT-III por parte de las neuronas y la posterior captación de la misma por los astrocitos.

Se produce modificación de la expresión de MT-III en diferentes modelos experimentales de daño cerebral como modelos traumáticos (Yuguchi *et al.*, 1995; Hozumi *et al.*, 1995; 1996; Yamada *et al.*, 1996), de excitotoxicidad por N-metil-D-aspartato (NMDA) (Hidalgo *et al.*, 1997b; Acarin *et al.*, 1999) o de isquemia cerebral (Inuzuka *et al.*, 1996; Yuguchi *et al.*, 1997; Yanagitani *et al.*, 1999). Generalmente, se observa un aumento de la expresión de MT-III tras el daño cerebral y se piensa que probablemente esté relacionado con la reacción astrogliar y donde la MT-III participaría en la reparación tisular del daño producido en el cerebro y protegería a las neuronas de la toxicidad provocada por los radicales oxidantes (Hozumi *et al.*, 1998). También se ha descrito que la expresión de MT-III está alterada (aumentada o disminuida) en diferentes enfermedades neurológicas humanas como el síndrome de Down (Arai *et al.*, 1997), Creutzfeld-Jakob (Kawashima *et al.*, 2000), la enfermedad de Parkinson, la meningitis y la esclerosis lateral amiotrófica (Uchida, 1994).

Se han utilizado ratones modificados genéticamente, que sobreexpresan MT-III bajo el promotor del gen de la GFAP o bien deficientes en MT-III (Erickson *et al.*, 1995; 1997) para estudiar las posibles funciones biológicas de MT-III. Los resultados obtenidos sugieren que MT-III tiene una función neuroprotectora,

además estos resultados están apoyados por otros obtenidos de estudios *in vitro* donde se ha observado que MT-III protege a las neuronas de la neurotoxicidad inducida por glutamato, probablemente actuando contra el NO (Montoliu *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002). En uno de los trabajos presentados en esta tesis se estudia la expresión de MT-III en la EAE y su regulación por el IFN—.

4.3. MT-IV

La MT-IV es la isoforma menos estudiada. Quaife y col. la descubrieron en 1994. Se expresa en el epitelio escamoso estratificado y está presente en la piel, la lengua y el estómago (Quaife *et al.*, 1994). Se sabe que la MT-IV puede unir Zn y Cu y que podría estar implicada en la diferenciación de los queratinocitos, ya que algunos estudios demuestran que el Zn acelera la unión de la queratina. También se ha implicado en mecanismos de protección contra la toxicidad por metales. Se ha observado que hay un aumento de la expresión de MT-IV en las paredes estomacales de ratones expuestos a niveles altos de Zn en el agua de bebida.

En el único estudio que hay sobre la MT-IV se observó que había expresión de las 4 isoformas de las MT en el tejido decidua de ratón, que los 4 genes se expresaban de forma coordinada y que la MT-IV podría participar en el metabolismo de los metales durante el embarazo (Liang *et al.*, 1996).