

PROYECTO FINAL DE LIC. EN BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON UN
ESTEROIDE SINTÉTICO EN UN MODELO
NEUROINFLAMATORIO DE DESMIELINIZACIÓN, LA
ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE)**

Mancino, Dalila Noelia Jazmín – LU 1068998

Licenciatura en Biotecnología

Tutora:

**Garay, Laura Inés,
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)**

Co-Tutor:

**Prada, Federico,
Universidad Argentina de la Empresa (UADE)**

15, febrero, 2021



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Contenido

Agradecimientos.....	4
Resumen	5
<i>Abstract</i>	6
1. Introducción	7
1.1 Esclerosis múltiple.....	7
1.2 Modelo de EAE	11
1.3 Mielina.....	13
1.4 Mecanismos inmunopatogénicos de la EM/EAE	15
1.5 Inflamasoma	19
1.6 Vía de señalización de Akt	24
1.7 Acciones de los esteroides en la EAE.....	26
1.8 Tibolona.....	28
1.9 Historia del laboratorio	31
2. Hipótesis.....	33
3. Objetivos	34
4. Metodología.....	35
4.1 Inducción de EAE y tratamiento con Tibolona	35
4.1.1 Sacrificio	37
4.2 PCR en tiempo real.....	37
4.2.1 Extracción de ARN.....	38
4.2.2 RT.....	39
4.2.3 Curva de cebadores	40
4.2.4 Amplificación.....	41
4.2.5 Análisis de datos de la qPCR.....	41
4.3 <i>Western Blot</i>	42
4.3.1 Preparación de homogenatos	42
4.3.2 Medición de proteínas por el método de Bradford	43
4.3.3 Armado de geles.....	45
4.3.4 Electroforesis en gel y transferencia a membrana de PDVF	46


4.3.5 Inmunodetección	46
4.4 Análisis estadístico	48
5. Resultados	50
5.1 Acción de la TIB sobre la neuroinflamación en la médula espinal	50
5.1.1 CD11b	50
5.1.2 HMGB1	51
5.1.3 TLR4	52
5.1.4 NF-kB	54
5.2 Estudio del efecto de TIB sobre el inflamasoma	54
5.2.1 NLRP3	55
5.2.2 Caspasa-1	55
5.2.3 IL-1 β	56
5.2.4 IL-18	57
5.3 Estudio del efecto de TIB sobre la mielinización	58
5.3.1 Proteína básica de la mielina (MBP)	58
5.4 Estudio de genes relacionados al posible mecanismo de acción de TIB	59
5.4.1 ER α	59
5.4.2 ER β	60
5.4.3 AKT	61
5.4.4 mTOR	62
5.5 Efecto del tratamiento con TIB sobre el grado clínico de los animales	63
5.5.1 Grado clínico	63
5.5.2 Peso de los úteros	64
6. Discusión de resultados	66
6.1 Los ratones que recibieron TIB presentaron menor grado de inflamación en la médula espinal respecto a los ratones sin el tratamiento	66
6.2 El tratamiento con TIB atenuó la desmielinización en médula espinal de ratones EAE	69
6.3 La administración de TIB no alteró los niveles del ER α ni del ER β	70
6.4 Los animales tratados con TIB mostraron una menor activación sobre la vía de Akt ...	71
6.5 La TIB mejoró el grado clínico de los animales EAE sin comprometer al útero	73

Conclusiones 75

Bibliografía..... 76

Anexos..... 92

Agradecimientos


Quiero agradecer, en primer lugar, a mis viejos y hermanos por todo su apoyo y amor incondicional. Esto es por ellos: Estela, Daniel, Axel y Stef. Gracias a Debi y Sasha también. Los quiero mucho a todos 

En segundo lugar, a mis amigos de Luján por tantas risas y festejos a lo largo de toda la carrera y la vida, gracias por estar siempre.

A mis amigas de UADE, por hacer todo más lindo y ameno, fue hermoso encontrarlas en el camino y formar lo que somos hoy.

Gracias al Doc. De Nicola por abrirme las puertas de un laboratorio tan maravilloso. Gracias a mi directora Laura por enseñarme cada técnica, guiarme en cada paso y por todo su apoyo a lo largo de este trabajo. También quiero agradecer a las técnicas Pauli y Ani por estar siempre que necesité algo en este espacio.

Gracias a los profes de mi facultad por su capacidad en hacerte sumergir en el mundo de las bios con tanta pasión y curiosidad.

Gracias a toda la linda gente que me crucé en el camino por hacerme llegar a este momento, principalmente a ellos: Rossi, Negro, Clari, Sofí, Luci, Luli, Nati, Gaby, Iván, Male, Caro, Naiqui, Yuli, Fran. Los quiero 

Resumen

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurodegenerativa y autoinmune, caracterizada por la desmielinización y pérdida de axones y neuronas debido a un ataque inmunológico hacia el Sistema Nervioso Central (SNC). La Tibolona (TIB) es un esteroide sintético con efectos tejido-específicos, actualmente utilizado en la clínica para disminuir los síntomas del climaterio. Estudios previos han demostrado sus efectos antioxidantes y neuroprotectores en el SNC.

Este trabajo tuvo como objetivo analizar los efectos del tratamiento con TIB en animales con Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE), modelo común para la EM. Para este propósito, se estudió el grado clínico de los ratones con EAE, así como también la expresión transcripcional y proteica de genes relacionados a la inflamación y la mielina. También se estudiaron posibles vías de señalización en las que interviene la TIB en la médula espinal.

Se observó que la TIB administrada en dosis de 0,08 mg/kg s.c día de por medio desde la inducción de la enfermedad, logró reducir la reacción microglial, la activación del inflammasoma, la desmielinización en la médula espinal de ratones EAE. Además, mejoró el grado clínico de los animales y no produjo cambios en la expresión del receptor de estrógeno α , ni β (ER α , ER β), tampoco sobre el peso de los úteros. Como conclusión, la TIB ejerce una acción anti-inflamatoria y protectora hacia la mielina en la médula espinal de los ratones con EAE, sin comprometer al útero, lo que sugiere continuar con el estudio del esteroide como potencial terapéutico para la Esclerosis Múltiple.

Abstract

Multiple Sclerosis is a neurodegenerative and autoimmune disease characterized by demyelination and loss of axons and neurons because of an immunologic attack to the Central Nervous System. Tibolone is a synthetic steroid with tissue-specific effects, currently used to ameliorate climacteric symptoms. Previous studies have demonstrated its antioxidant and neuroprotective actions in the Central Nervous System.

The aim of the present work was to analyze the effects of the Tibolone treatment on animals with Experimental Autoimmune Encephalitis (EAE), a common animal model of MS. For this purpose, clinical outcome, transcriptional and protein expression of different inflammatory and myelin genes were assessed. Tibolone signalling pathways in spinal cord of animals were also investigated.

We found that administration of 0.08 mg/kg s.c of Tibolone every other day from the day of induction reduced microglia reaction, inflammasome activation and demyelination in spinal cord of EAE mice. Furthermore, Tibolone improved the clinical outcome and did not changed the expression of the estrogenic receptor α or β ($ER\alpha$, $ER\beta$), neither the uterus weight. As a conclusion, Tibolone exerts anti-inflammatory and myelin protective actions in the spinal cord of the EAE mice without uterine compromise, suggesting continuing with the steroid's study as a potential MS treatment.

1. Introducción

1.1 Esclerosis múltiple

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad que se desarrolla por un ataque inmunológico hacia el Sistema Nervioso Central (SNC), particularmente en dirección a la mielina que recubre los axones de la médula espinal y ciertas regiones del cerebro. La desmielinización de las neuronas se manifiesta en síntomas como cambios en la visión, temblores, debilidad muscular, cambios sensoriales, fatiga, deficiencia cognitiva, entre otros (Loma & Heyman, 2011). Actualmente, 2,5 millones de personas padecen EM en el mundo (Hassanpour *et al.*, 2020). Tanto factores genéticos como ambientales contribuyen a la susceptibilidad de esta enfermedad de carácter neurodegenerativo y autoinmune. Sin embargo, lo que gatilla el reclutamiento de células del sistema inmunitario que producen la inflamación focalizada, es desconocido. Por el momento, sólo se ha demostrado la influencia de genes localizados en los cromosomas 6 y 17, que forman parte del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Sawcer *et al.*, 1996). Por otra parte, factores ambientales, como el tabaquismo, el déficit de vitamina D y las infecciones virales se han relacionado con la aparición de la EM (Gholamzad *et al.*, 2019).

La sensibilidad a numerosas enfermedades autoinmunes difiere entre ambos sexos, afectando más a mujeres que a hombres en un relación 3:1 (Compston & Coles, 2008). El hecho de que el sexo femenino sea más susceptible es contemplado hace tiempo, pero las causas permanecen sin aclararse del todo. Los factores propuestos para explicarlo han sido las diferencias hormonales entre los sexos y la existencia de reacciones inmunitarias diferenciales, tanto en el ser humano como en el ratón (Desai & Brinton, 2019; Kindt, Goldsby, Osborne 2007; Moldovan *et al.*, 2008). Estudios realizados de inmunización en ambas especies han sugerido que las hembras producen títulos más altos de anticuerpos que los machos. En general, las hembras tienden a generar inmunorreacciones más intensas. En el ser humano, las mujeres tienden a tener concentraciones séricas más altas de IgM y poseer un número más elevados de células T ayudantes o positivas para el grupo de diferenciación 4 (CD4⁺, del inglés: *positive for Cluster of Differentiation 4*). Mientras que, en los ratones, las hembras tienden a desarrollar reacciones de los linfocitos T CD4⁺ tipo 1 (Th1, del inglés: *T Helper cell 1*) más frecuentemente que los machos (Kindt, Goldsby, Osborne 2007). En un estudio se evaluaron las secreciones de

células Th1 y Th2 en pacientes con EM y, ante diferentes antígenos de mielina, los resultados demostraron una desviación en la respuesta inmunitaria según el sexo (Moldovan *et al.*, 2008). Las mujeres con EM mostraron una respuesta con altos niveles de IFN γ , sugiriendo una mayor actuación por parte de células Th1; mientras que los hombres con EM presentaron una respuesta que tendía más a la secreción de IL-5, insinuando una predominancia de respuesta Th2 (Moldovan *et al.*, 2008). Es sabido que las células Th2 son secretoras de citoquinas IL-5 o IL-4 y que están asociadas con la inhibición de células Th1 (Bettelli *et al.*, 1998) (Cua *et al.*, 1999) (Racke *et al.*, 1994), en tanto que el IFN- γ es activador de macrófagos y por ende del sistema inmunitario innato. En cuanto a las diferencias hormonales, las mujeres experimentan dos grandes fluctuaciones en sus niveles a lo largo de su vida: en la pubertad y en la menopausia, tres, en el caso de un embarazo. En estudios se ha visto la reducción de recaídas durante el embarazo, siendo este protector para la enfermedad, dados los altos niveles de hormonas sexuales circulantes (Finkelsztejn *et al.*, 2011; Runmarker & Andersen, 1995). Estas transiciones endócrinas tienen un gran impacto sobre el sistema inmunitario dadas las interacciones entre las hormonas y el sistema inmunitario adaptativo e innato, así como también con citoquinas pro y anti-inflamatorias, modulando la susceptibilidad de la mujer a las enfermedades autoinmunes (Desai & Brinton, 2019). Asimismo, el embarazo es caracterizado como un evento con cambios inmunomodulatorios donde se altera el balance Th1/Th2, generalmente inclinado hacia una mayor predominancia de la respuesta Th2 (Nahum *et al.*, 2004; Wegmann *et al.*, 1993).

Por otra parte, si bien no se han descrito la totalidad de los factores que pueden desencadenar la enfermedad, el diagnóstico temprano de la misma es vital para su tratamiento y pronóstico. La patología se presenta en cuatro formas clínicas que incluyen: EM Recurrente-Remitente (EMRR), EM Progresiva Secundaria (EMPS), EM Progresiva Primaria (EMPP) y EM Progresiva Recurrente (EMPR) (Hassanpour *et al.*, 2020). Una EM temprana es posible de diagnosticar cuando se presentan episodios aislados de déficit neurológico, conocidos como recaídas. La mayoría de los pacientes que desarrollan EM comienzan con un episodio aislado que incluye al nervio óptico, médula espinal o tronco encefálico; luego, el ataque se resuelve en el tiempo. Gran parte de los pacientes que han experimentado un episodio y tienen un diagnóstico de resonancia magnética anormal, con el tiempo volverán a tener una recaída, lo cual es indicador del comienzo de la enfermedad (Thompson *et al.*, 2018). Cuando se presenta

una recaída, parece no haber progreso de la enfermedad porque hay recuperación parcial o total pasado el episodio (Kipp *et al.*, 2014). En estas recaídas hay desmielinización focal en la materia blanca, lo cual impacta en la integridad de la neurona. (Ferguson *et al.*, 1997) (Kornek *et al.*, 2000). Pacientes que experimentaron al menos dos recaídas se las clasifica como enfermos con EMRR. Sin embargo, pacientes con este diagnóstico que luego presentan discapacidad progresiva con o sin más recaídas, se los diagnostica con EMPS. Por otro lado, los pacientes que presentan un progreso continuo y gradual del deterioro neurológico desde el comienzo de la enfermedad son diagnosticados con EMPP. En este caso, no se distingue exacerbación o remisión de los síntomas. Existe otra clasificación de EM que es poco común, en donde el daño neurológico se presenta en forma progresiva desde el comienzo de la enfermedad y con desarrollo de exacerbaciones, se la clasifica como EMPR, en donde puede haber o no recuperación entre los periodos agudos (Lublin & Reingold, 1996) (ver Tabla I).

TABLA I. Resumen de los diagnósticos posibles de la EM.

Diagnóstico	Descripción
EMRR	Al menos dos recaídas (con recuperación parcial o total del episodio)
EMPS	Al menos dos recaídas y luego discapacidad progresiva con o sin más recaídas
EMPP	Daño neurológico progresivo desde el comienzo de la enfermedad
EMPR	Daño neurológico progresivo desde el comienzo de la enfermedad y con recaídas

Aproximadamente, el 85% de pacientes presentan un diagnóstico de EMRR, mientras el 15% restante de EMPP. Por otro lado, dos tercios del primer grupo suelen empeorar hacia un diagnóstico de EMSP (Gitto 2017).

Recuperarse de una recaída puede ser posible por la remielinización junto a la resolución del edema. No obstante, un daño completamente transversal del axón no puede ser reparado, aunque un daño axonal sutil si es reversible (Nikic *et al.*, 2011). De todas formas, en los últimos años se ha llegado a un consenso general señalando que desde el comienzo de la enfermedad ya tienen lugar eventos neurodegenerativos, los cuales van progresando conforme avanza la enfermedad.

En la clínica, los tratamientos para la EM se encasillan en tres categorías: tratamiento de las exacerbaciones, ralentización del progreso de la enfermedad con terapias modificadoras (DMTs, del inglés, *disease-modifying therapies*) o modificación de los síntomas (Gitto 2017; Hart & Bainbridge, 2016). La inmunoterapia es la estrategia utilizada hoy en día para retrasar la recaída, lo negativo de esta alternativa es que es limitada para la EM de carácter progresivo, debido a que no hay un componente inflamatorio muy grande en la patología, por lo que tiene poco o ningún efecto (Khalaj *et al.*, 2016). El por qué la inflamación no es el principal responsable de la progresión de enfermedad es algo que aún queda sin responderse (Kipp *et al.*, 2014).

Actualmente, se encuentran aprobadas terapias inmunomoduladoras vía oral, infusión e inyección, en donde intervienen el interferón β -1b (Betaseron, Extavia), dalfampridina (Ampyra), interferón β -1a (Avonex, Rebif), alemtuzumab (Lemtrada), peginterferón β -1a (Plegridy), natalizumab (Tysabri), acetato de glatiramer (Copaxone), fingolimod (Gilenya), dimetil fumarato (Tecfidera) (Fig. 1); y corticoesteroides como metilprednisolona (Solu-Medrol, Depo- Medrol), dexametasona (Baycadron, Dexamethasone Intensol) y prednisona (Sterapred) (Khalaj *et al.*, 2016) (Lopez-Diego & Weiner, 2008)

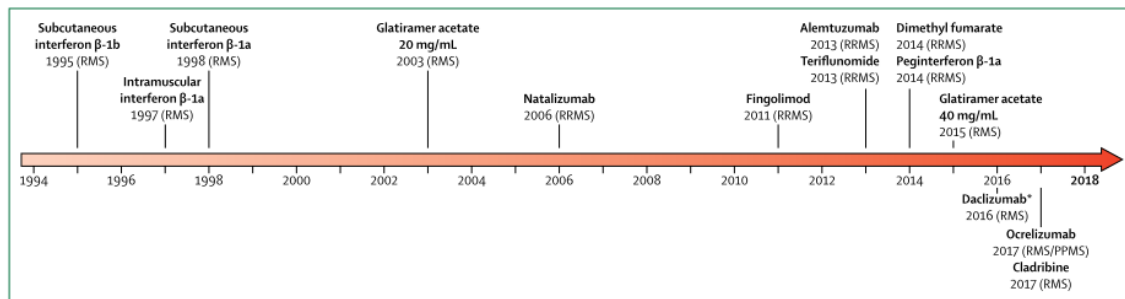


Figura 1. Tratamientos que alteran la enfermedad de EM en un diagnóstico de EMRR, junto al año de su descubrimiento o licencia (imagen extraída de Thompson *et al.*, 2018).

Las terapias de interferón (IFN) de tipo I han sido utilizadas como primer recurso para la EM durante años. Esta citoquina es producida por células inmunitarias especializadas como los macrófagos o células dendríticas en respuesta a estímulos extracelulares bacterianos o de otras moléculas (Meylan *et al.*, 2006). El IFN- β surgió como el primer fármaco capaz de proporcionar una mejoría clínica en la esclerosis múltiple (EM), ya que brinda períodos más prolongados de remisión y reduce la gravedad de las recaídas (Kindt, Goldsby, Osborne 2007). Por otra parte, los corticoides, utilizados durante las recaídas, son capaces de generar una

estabilización entre la barrera hematoencefálica (BHE), ya que estimulan la activación de vías anti-inflamatorias, facilitando así la apoptosis de células inmunes activadas, reparación de edema en tejidos y descompresión de axones (Kipp *et al.*, 2014).

Desde hace tiempo, el desafío más grande en la EM es desarrollar una medicación que incorpore neuroprotección y remielinización, para así poder prevenir los síntomas progresivos de la enfermedad (Thompson *et al.*, 2018), ya que las terapias actuales son parcialmente efectivas y se centran en la fase inflamatoria, cuando el componente neurodegenerativo es probablemente el que requiera más atención. (McFarland & Martin, 2007) (Wiendl, 2012). Por este motivo, se cree fervientemente que la reconstrucción de la mielina en EAE va a incrementar la preservación axonal (Zawadzka & Franklin, 2007). De aquí, el testeado de posibles agentes anti-inflamatorios y neuroprotectores ha ganado relevancia en la presente investigación.

1.2 Modelo de EAE

Para poder estudiar a nivel fisiológico la patogénesis de la EM, se emplean diversos modelos animales: la Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE), la desmielinización por gliotoxinas (cuprizona, lisolecitina, bromuro de etidio, etc) y el virus Theiler de la encefalomielitis murina (TMEV, del inglés: *Theiler's murine encephalomyelitis virus*). Brevemente, el modelo de EAE es el más versátil, ya que permite la reproducción de diferentes patrones de la enfermedad, y permite estudiar drogas de tratamiento. El modelo de desmielinización por ingesta de cuprizona es utilizado para desarrollar terapias para la protección de oligodendrocitos (OLs) y para la estimulación de la remielinización, principalmente (Palumbo & Pellegrini 2017). La diferencia más llamativa de este modelo con respecto al de EAE es la ruptura de la BHE que no es tenido en cuenta como algo relevante en el modelo de cuprizona (y resulta ser algo icónico), al igual que la desmielinización producida por los linfocitos T (Kipp *et al.*, 2014). Finalmente, la infección con TMEV permite estudiar mecanismos agudos o de la EMPP (Palumbo & Pellegrini 2017).

Volviendo sobre el modelo de EAE, resulta conveniente usarlo en caso de investigar vías neuroinflamatorias. Además, sirve para tratar la eficacia de tratamientos (Bittner *et al.*, 2012) principalmente en la forma clínica de EMRR (Palumbo & Pellegrini 2017). El mecanismo patogénico más aceptado postula que los linfocitos T reactivos contra mielina son activados en la periferia y migran al SNC cruzando la BHE. En cuanto llegan, estas células son

reactivadas por células presentadoras de antígeno locales, resultando en cascadas de inflamación en donde intervienen otros tipos celulares como monocitos y macrófagos; entonces, mecanismos de inmunidad innata (macrófagos infiltrantes), y microglía residente e inmunidad adaptativa destruyen mielina y axón por daño directo y producción de moléculas pro-inflamatorias incrementando la severidad de la enfermedad (Bittner *et al.*, 2014).

Para la inducción de EAE, se utilizan dos protocolos: una inmunización activa en la cual se inyectan péptidos derivados de mielina para generar una reacción contra la misma, o una inmunización pasiva con la administración de linfocitos T que actúan sobre antígenos de la mielina. Para el primer caso, existen diferentes opciones, a saber, la proteína básica de la mielina (MBP), la proteína proteolípídica (PLP), la glicoproteína de mielina de oligodendrocito (MOG). Sin embargo, las consecuencias de la inducción de EAE no son uniformes, sino que varían dependiendo del tipo de epítipo y animal utilizado. Entonces, según el protocolo de inducción, la cepa y el antígeno, el curso clínico de EAE que se desarrolle puede ser agudo, crónico progresivo o de remitente-recurrente (Bittner *et al.*, 2014). Particularmente, el procedimiento de inmunización con la cepa de ratón C57BL/6 y el péptido MOG 35-55 (Mendel *et al.*, 1995) resulta en un EAE monofásico con primeros síntomas a los 9-14 días post-inducción (dpi), con un máximo a los 3-5 días superado el comienzo de la enfermedad y, posteriormente, una lenta y parcial recuperación a los 10-20 días (Bittner *et al.*, 2014). La EAE típicamente correlaciona con la pérdida de peso, lo que se puede utilizar como indicador de inicio de la enfermedad (Bittner *et al.*, 2014).

Por otro lado, si el mismo péptido MOG es inyectado en otras cepas de ratón como NOD/Lt o SJL, causan una enfermedad que simula la EMRR, pero diferente severidad (Palumbo & Pellegrini 2017).

Concretamente, los ratones C57BL6/7 con péptido MOG desarrollan una parálisis comenzando por la cola, luego se afectan los miembros posteriores y por último los anteriores (Palumbo & Pellegrini 2017). La médula espinal y cerebro de estos animales presentan, entre otras alteraciones, desmielinización, inflamación con activación astrocítica y microglial junto con degeneración axonal y neuronal. Las lesiones son predominantes en la médula espinal, por lo que se presentan síntomas motores predominantemente (Bittner *et al.*, 2014). Numerosos estudios remarcan la similitud del curso clínico y la patología entre la EAE y la EM (Kornek *et al.*, 2000; Storch *et al.*, 1998).

En lo que concierne al protocolo de inducción, dada la baja inmunogenicidad de los péptidos utilizados, se utilizan fuertes adyuvantes como el Adyuvante de Freund's completo (CFA). El CFA activa fagocitos mononucleares induciendo la fagocitosis y la secreción de citoquinas. Estos acontecimientos prolongan la presencia de antígenos y hacen más eficiente el transporte de estos hacia el sistema linfático (Bittner *et al.*, 2014). A su vez, la inducción de la patología es facilitada por la inyección de toxina *Bordetella pertussis*, que permeabiliza la BHE (Hofstetter *et al.*, 2002).

Como se mencionaba en la sección anterior, los tratamientos actuales aprobados para la EM son inmunomoduladores o anti-inflamatorios, teniendo poco o ningún efecto sobre la EM progresiva; lo cual, a su vez se ve limitado porque no hay modelo animal capaz de reproducir este diagnóstico (Lassmann *et al.*, 2012).

1.3 Mielina

Antes de proseguir sobre las consecuencias de la reacción inmunológica en el SNC producida en la EM, se describirá la composición y función de la mielina.

La vaina de mielina es una estructura membranosa con una composición molecular única y uniforme en cuanto al espesor de sus capas (Aggarwal *et al.*, 2011). Su función principal radica en el aislamiento del axón y agrupamiento de los canales de sodio en los nódulos de Ranvier, con el fin de generar el potencial de acción y su propagación de nódulo a nódulo (Waxman, 2006). Esta conducción nerviosa saltatoria provee un procesamiento de la información más rápida en menor tiempo (Aggarwal *et al.*, 2011). En la EM y EAE, el daño generado en la sustancia blanca vuelve a las neuronas hiperexcitables, ya que se desencadena la pérdida de la velocidad de conducción y hasta el bloqueo, generando que los potenciales de acción ocurran de manera continua (Kipp *et al.*, 2014).

En cuanto a la composición de la vaina aisladora, la bicapa asimétrica de mielina puede ser desde 3 a 100 capas (Marcus & Jacobson, 2003) y está formada por la oposición de superficies externas con internas de diferentes constituciones, encontrándose del lado citoplasmático lípidos como p-inositol-4,5-bifosfato, plasmalógenos de etanolamina y p-serina, mientras que del lado extracelular se ubican lípidos como el colesterol, GalC y sGalC. En cuanto al componente proteico, las moléculas mayoritarias ubicadas a lo largo de toda la vaina son MBP, de carácter integral, y PLP, proteína transmembrana (ver Anexo A) (Aggarwal *et al.*,

2011). Concretamente, MBP cumple una función de barrera, regulando la entrada a las capas membranosas de proteínas con dominios citoplasmáticos largos (Aggarwal *et al.*, 2011).

Los componentes de la mielina deben ensamblarse en una estructura organizada de múltiples capas membranosas antes de la síntesis y transporte al sitio final. La disposición espacial de los elementos no está seteadada genéticamente, pero sí entra en juego la epigenética por medio de interacciones en diferentes productos génicos (Aggarwal *et al.*, 2011).

Con respecto a la cantidad de mielina presente en un organismo, esta es definida por el número de células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs, del inglés: *oligodendrocyte progenitor cells*), quienes luego de diferenciarse en OLs y recibir las señales necesarias sintetizarán grandes cantidades de membrana que se enrollará en los axones del SNC (Baumann & Pham-Dinh, 2001; Hartline & Colman, 2007; Sherman & Brophy, 2005; Simons & Trotter, 2007). En contraste al sistema nervioso periférico, donde la Neurogulina-1 dirige la mielinización sobre los axones por las células Schwann (Michailov *et al.*, 2004; Taveggia *et al.*, 2005), en el SNC el principal regulador positivo de la mielinización por parte de los OLs no ha sido identificado, aunque si lo han sido los predominantes inhibitorios: Jagged, PSA-NCAM (del inglés: *polysialic acid linked to neural cell adhesion molecule*) y LINGO-1 (del inglés: *leucine rich repeat and Ig domain containing 1*) (Piaton *et al.*, 2010; Taveggia *et al.*, 2010). Los factores intrínsecos que regulan en forma negativa o positiva la expresión de mielina son complejos, no obstante, han sido descritos un gran número de factores de transcripción que evitan la entrada de los OLs a su fase final de diferenciación, como lo son Sox5/6 (del inglés: *SRY-box transcription factor 5/6*), Hes5 (del inglés: *hes family bHLH transcription factor 5*) e Id2/4 (del inglés: *inhibitor of DNA binding 2*) (Emery, 2010). Varios de estos factores inhibitorios son controlados por miRNAs, desacetilasas de histonas y diferentes vías de señalización (Budde *et al.*, 2010; Dugas *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Liu & Casaccia, 2010; Shin *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010). Particularmente, la vía de Wnt/ β -catenin ha sido determinada como un regulador clave de la expresión de mielina y mielinización (Fancy *et al.*, 2009; Tawk *et al.*, 2011).

Por otra parte, los axones crónicamente desmielinizados traen como consecuencia una demanda de energía incrementada varias veces en comparación con los axones normales y, en cierto punto, las mitocondrias intraaxonales no pueden satisfacer la demanda energética debido a la acumulación de disfunción mitocondrial, desencadenando una cascada de eventos

deletéreos y llevando a más degeneración y pérdida axonal (Witte *et al.*, 2014). Tanto en la EM como en otras enfermedades y desórdenes del cerebro, la disfunción mitocondrial es un factor característico. El daño en esta organela genera la pérdida de su potencial de membrana, lo que conlleva a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: *Reactive Oxygen Species*) que participan en la desmielinización de neuronas (Van Horssen *et al.*, 2011). Además, el estrés oxidativo produce daño en lípidos, proteínas y ADN, que luego desencadena la vía de apoptosis mediada por caspasa de mitocondria (Wu *et al.*, 2009). En cuanto a otras organelas, el estrés del retículo endoplasmático también es un factor prominente en enfermedades neurodegenerativa y neuroinflamatorias (Andhavarapu *et al.*, 2019).

Volviendo concretamente sobre la mielina, los productores de esta vaina membranosa son los OLs. Estas células, junto a los astrocitos y la microglía, dan soporte al SNC. Particularmente, los astrocitos se encargan de preparar el microambiente para las neuronas, fagocitar, aislar sinapsis, envolver vasos sanguíneos y formar membranas en el cerebro. En cuanto a la síntesis de mielina, los OLs sufren dos etapas de diferenciación antes de convertirse en productores de la vaina; en primer lugar, los OPCs se transforman en OL premielinizadores y por último en OLs maduros. Sin embargo, la síntesis de los componentes mayoritarios de la mielina comienza en la etapa intermedia de diferenciación (Aggarwal *et al.*, 2011).

La transición de un OL inmaduro a uno maduro requiere de la vía de señalización del target de rapamicina de mamíferos (mTOR, del inglés: *mammalian target of rapamycin*) (Khalaj *et al.*, 2016). Los OPCs se generan en el embrión y ahí es donde se define el número inicial de OLs, ya que estos últimos son no proliferativos. En la remielinización producida en adultos, los OLs derivan de poblaciones adultas de OPCs y se activan por la presencia de desmielinización o muerte neuronal. Factores como los estrógenos, BDNF (del inglés: *Brain-derived Neurotrophic Factor*) o IGF-1 (*insulin like growth factor 1*) activan vías de señalización que permiten la diferenciación de OLs y la mielinización (Arevalo *et al.*, 2015; Bibollet-Bahena & Almazan, 2009; Meltser, *et al.*, 2008).

1.4 Mecanismos inmunopatogénicos de la EM/EAE

La desmielinización en la EM no es el único hecho icónico de la enfermedad, sino que también se destaca la elevada destrucción de oligodendrocitos y producción de gliosis reactiva, esto último refiriéndose a la proliferación de astrocitos y microglía como respuesta para la

restauración de la homeostasis del tejido neural. En lo que respecta a la microglía, se refiere a la única población de macrófagos residente en el SNC, además de que se los considera los principales involucrados en reacciones inmunes y enfermedades inflamatorias (Ransohoff & Brown, 2012). En condiciones de neuroinflamación o neurodegeneración hay activación de ella y, cuando la neuroinflamación no está regulada, se desatan enfermedades autoinmunes (Mammana *et al.*, 2018).

La neuroinflamación, específicamente, implica una respuesta coordinada entre la microglía y otras células del SNC, como los astrocitos, y también células inmunes periféricas infiltradas. En la EM, diferentes tipos de estímulos, incluyendo toxinas, infecciones, o estímulos no conocidos, generan la rápida activación del sistema inmunitario, dando lugar a una neuroinflamación aguda, caracterizada por microgliosis y liberación de mediadores inflamatorios (Glass *et al.*, 2010). Existen linfocitos T de la periferia que son activados por algún agente infeccioso o un superantígeno que muestra mimética con algún componente del SNC. Estas células activadas estimulan la expresión de moléculas como la integrina VLA-4 (o ITGB-1, del inglés: *integrin subunit beta 1*) y así son capaces de cruzar la BHE. Con la permeabilización de esta última y la liberación de quimiocinas, se atraen otras células inmunes, que incluyen a los linfocitos B y monocitos/macrófagos. Finalmente, las células T autorreactivas son reactivadas por células presentadoras de antígenos locales (Constantinescu *et al.*, 2011), generando así una reacción inflamatoria desmedida contra la mielina.

La composición del infiltrado inmunológico varía entre los pacientes y las distintas etapas de la enfermedad, sin embargo, en todos los casos se encuentran presentes los macrófagos y linfocitos T (Lucchinetti *et al.*, 2000). Asimismo, no sería inusual encontrarse con monocitos y células dendríticas invadiendo el SNC y co-activando el sistema inmunitario innato también (Mammana *et al.*, 2018).

La proliferación y supervivencia de células T está asociada a la intensidad de la EM (Hassanpour *et al.*, 2020). La respuesta Th1, que ocurre a través de la activación del macrófago, es un mecanismo esencial en la reacción inmune contra patógenos presentes en el compartimiento vacuolar del macrófago. Esta reacción favorece el desarrollo de una respuesta citotóxica por parte de esta célula y, a su vez, estimula la activación de células asesinas por naturaleza (NK, del inglés: *Natural Killer*) así como las células NK favorecen el perfil Th1 (Maghazachi, 2012).

Los macrófagos son el principal efector inmunológico en el SNC, se encargan de llevar adelante la respuesta inmune innata y adaptativa, tanto para defenderse como para reparar el sistema. En estadios tardíos de inflamación, los macrófagos contribuyen con la resolución de esta y prohíben que se vuelva prolongada, con el fin de evitar el daño en el tejido (Vergadi *et al.*, 2017). En presencia de una infección, ocurre la quimiotaxis y migración de estas células con la consecuente fagocitosis. El proceso completo estimula la liberación de diversas señales para activar a los macrófagos y poder eliminar los patógenos o debris celular. La microglía se encuentra activa desde periodos tempranos de edad, ya que contribuye con el desarrollo y la homeostasis del cerebro, participando en la muerte neuronal programada en el desarrollo (Askew *et al.*, 2017), la remoción de debris celular y en la regulación de la plasticidad neuronal sináptica (Shemer & Jung., 2015). Tanto la microglía como los astrocitos son células gliales importantes para la respuesta inmune y protección del SNC, de todas formas, la persistente activación de microglía/macrófagos acaba produciendo sustancias tóxicas dañinas para el sistema (Liu *et al.*, 2013). Un gran número de información ha demostrado que esta población ejerce tanto acción neuroprotectora como neurotóxica. Son productoras de citoquinas neurotóxicas como IL-1 β , TNF α , IL-6, superóxido, óxido nítrico, y aminoácidos excitatorios (Smith *et al.*, 2012), así como de factores neuroprotectores como neurotrofinas, BDNF, factor neurotrófico derivado de célula glial (GDNF, del inglés: *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*) y factor de crecimiento neural (NGF, del inglés: *Neural Growth Factor*) (Allen *et al.*, 2013). Profundizando un poco más sobre las funciones contradictorias de la microglía, las células en cuestión se activan y, según el estímulo, adquieren un determinado fenotipo: M1 o M2. Los macrófagos activados en forma clásica se convierten en M1, con un rol pro-inflamatorio, mientras que el fenotipo M2 se trata de uno anti-inflamatorio/inmunoregulatorio (Aryanpour *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017). Los macrófagos M1 liberan moléculas como IL-18, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), IL-6, óxido nítrico o especies reactivas de oxígeno (ROS) (Jana *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2013), mientras que los M2 factor de crecimiento transformante β (TGF- β), IGF1, IL-4 o IL-10 (Franco & Fernández-Suárez, 2015; Orihuela *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017). Existen diferentes señales que estimulan un fenotipo u otro, como lo son la IL-4, Ic o glucocorticoides combinados o no con TGF- β que promueven la polarización de M2, mientras que el IFN- γ o lipopolisacáridos (LPS) la de M1 (Murray *et al.*, 2014).

Luego de una lesión en el SNC, se provoca una extensa muerte neuronal, desmielinización y liberación de DAMPs (Mammana *et al.*, 2018). Durante el proceso inflamatorio, se producen distintas citoquinas como TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL6, e iNOS inducible, quienes pueden activar células microgliales y así incrementar la producción de estas citoquinas (Mammana *et al.*, 2018). Particularmente, el IFN- γ y TNF- α son citoquinas que desempeñan un papel central en el desarrollo de la inflamación crónica en la EM (McQualter & Bernard, 2007) (Trapp & Nave, 2008). Los linfocitos T CD4⁺ con capaces de diferenciarse en Th1 ya que los macrófagos liberan grandes cantidades de TNF- α . Con respecto al interferón, las células Th1, NK y linfocitos T citotóxicos (Tc) son productoras de ella (Schoenborn & Wilson, 2007). No solo ellos, sino que se han descrito un gran número de mediadores pro-inflamatorios que contribuyen con la inflamación y desmielinización en la patología de EM. En la EAE, se ha visto que el IFN- γ , IL-17 e IL-18 contribuyen con las exacerbaciones (Govindarajan *et al.*, 2020) (Jha *et al.*, 2010). Particularmente, la citoquina IL-17 es producida por células T CD4⁺ tipo 17 (Th17), es capaz de activar polimorfos nucleares y su alta expresión correlaciona con diversas dificultades neuronales, así como contribuye con la ruptura de la BHE y la infiltración de células inmunes al SNC (Huppert *et al.*, 2010; Waisman *et al.*, 2015).

En síntesis, células T CD4⁺, principalmente las efectoras Th1 y Th17, linfocitos T CD8⁺, células B, microglía, macrófagos y las citoquinas que secretan, están implicadas en la iniciación y mantenimiento de una respuesta inmune desmedida dirigida a antígenos de mielina, lo que desencadena la desmielinización característica de la EM (Høglund & Maghazachi, 2014).

Además, estudios recientes han demostrado que los OL son capaces de procesar y presentar antígeno vía MHC clase I y II. Asimismo, los OPC pueden presentar moléculas por MHC clase II y activar linfocitos T CD4⁺. Por estas razones, se cree que los OL y OPC no tienen un rol pasivo en la EM sino más bien que están activos en un rol inmunomodulatorio (Falcão *et al.*, 2018).

Mas allá de la desmielinización focal que produce la propia patología de EM, la ruptura de la BHE, la infiltración de células inmunitarias y los diversos síntomas que caracterizan a la enfermedad, en humanos, el envejecimiento del cerebro está asociado con activación crónica de microglía (Perry, 2010), acumulación de hierro en mielina y OLs (Hallgren & Sourander, 1958), un estado pro-oxidativo en el cerebro (Sahoo *et al.*, 2016), alteraciones mitocondriales y progresión del daño en la mielina y neurodegeneración (Trager & Tabrizi, 2013). Por otra

parte, en un cerebro sano, la microglía tiene una forma ramificada con extensas ramificaciones con las que se conecta con vasos sanguíneos, astrocitos y neuronas y además monitorea cambios en el ambiente (Nimmerjahn *et al.*, 2005); asimismo, expresa una variedad de marcadores de superficie que incluyen a CD11b y CD45 (Van Beek *et al.*, 2005). Una vez que se activa por estímulo pro-inflamatorio o estrés, la microglía desarrolla una forma amebode, caracterizada por alargamiento celular y aparición de vacuolas, lo cual está asociado a funciones pro-inflamatorias y de fagocitosis (Colonna & Butovsky, 2017; Ślusarczyk *et al.*, 2015).

1.5 Inflamasoma

El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa del organismo ante una infección o lesión tisular, donde interviene un gran número de factores que participan en una reacción inflamatoria. Existen sensores moleculares que reconocen motivos estructurales generales con alto grado de conservación, conocidos como PRR (del inglés, *Pattern Recognition Receptors*). En respuesta a la detección de una alta gama de patrones asociados a patógenos (PAMPs) y patrones asociados a daños (DAMPs) se ensambla el inflamasoma, formado por múltiples complejos proteicos que constan de un sensor, un adaptador y una procaspasa, por lo general. La activación del mismo constituye la mayor vía de inflamación (Kelley *et al.*, 2019) y existen distintos tipos, a saber, el inflamasoma de NLRP1 (*NLR - nucleotide-binding domain, leucine rich containing- family pyrin domain containing 1*), NLRC4, AIM2 (*Absent In Melanoma 2*), Pyrin o de NLRP3. La activación del inflamasoma de NLRP3 está relacionada con varias enfermedades autoinmunes e inflamatorias, además de que su activación contribuye a la progresión de la EM en humanos y de la EAE en modelos animales (Inoue & Shinohara, 2013).

NLRP3 es una proteína que proviene de la familia de receptores del tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*). Esta molécula es capaz de formar dos tipos de inflamasomas, donde se dice que uno es el canónico y otro el no canónico.

La activación del inflamasoma canónico de NLRP3 (normalmente conocido como inflamasoma de NLRP3) es crítica para la defensa ante infecciones virales, bacterianas y fúngicas. Esta estrategia consta de dos etapas (Gross *et al.*, 2009; Kannegant *et al.*, 2006). En primer lugar, los PAMPs o DAMPs son reconocidos por receptores de la familia TLR (*toll like receptor*), quienes al fosforilarse y activarse impulsan la vía de señalización del factor nuclear

κ B (NF- κ B). En el núcleo, NF- κ B promueve la transcripción de NLRP3 y las pro-interleuquinas (pro-IL) 1 β y 18, citoquinas que luego se traducen y permanecen en forma inactiva en el citoplasma. En segundo lugar, se activa la oligomerización de NLRP3 para luego ensamblarse junto a la proteína adaptadora ASC y a la procaspasa-1. Esto gatilla la transformación de la procaspasa-1 en caspasa activada, así como también la secreción de las citoquinas maduras IL-1 β e IL-18 (Shao *et al.*, 2015). El proceso ocurre en dos etapas porque la expresión basal de NLRP3 es muy baja y requiere de dos señales para estimular la activación del inflamasoma (He *et al.*, 2017). La “señal 1” activa la vía de señalización para la transcripción de NLRP3, mientras que la “señal 2” activa su oligomerización (Brown & Neher., 2010; Ślusarczyk *et al.*, 2018). La primera señal deriva de componentes microbiológicos o citoquinas endógenas, mientras que la segunda proviene de una variedad de estímulos. Se han descrito diferentes modelos para explicar cómo se gatilla la oligomerización de NLRP3, como son el ATP extracelular que induce el flujo de K⁺ (Ketelut-Carneiro *et al.*, 2015); los PAMPs y DAMPs que promueven la generación de ROS (Crane *et al.*, 2014); y estructuras fagocitadas en el ambiente que llevan a la ruptura de lisosomas y liberación de su contenido (Shao *et al.*, 2015). Además, otros factores pueden activar al inflamasoma de NLRP3, esto incluye daño mitocondrial o disfunción causado por sobrecarga de Ca²⁺ en la mitocondria (Iyer *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2014; Zhuang *et al.*, 2015), disrupción lisosomal (Hornung *et al.*, 2008; Sheedy *et al.*, 2013; Tseng *et al.*, 2013), disfunción autofágica (Cho *et al.*, 2014; Jabir *et al.*, 2015; Shao *et al.*, 2015) y la actividad de la TXNIP (proteína que interactúa con tiorredoxina) (Liu *et al.*, 2015) (Fig. 2).

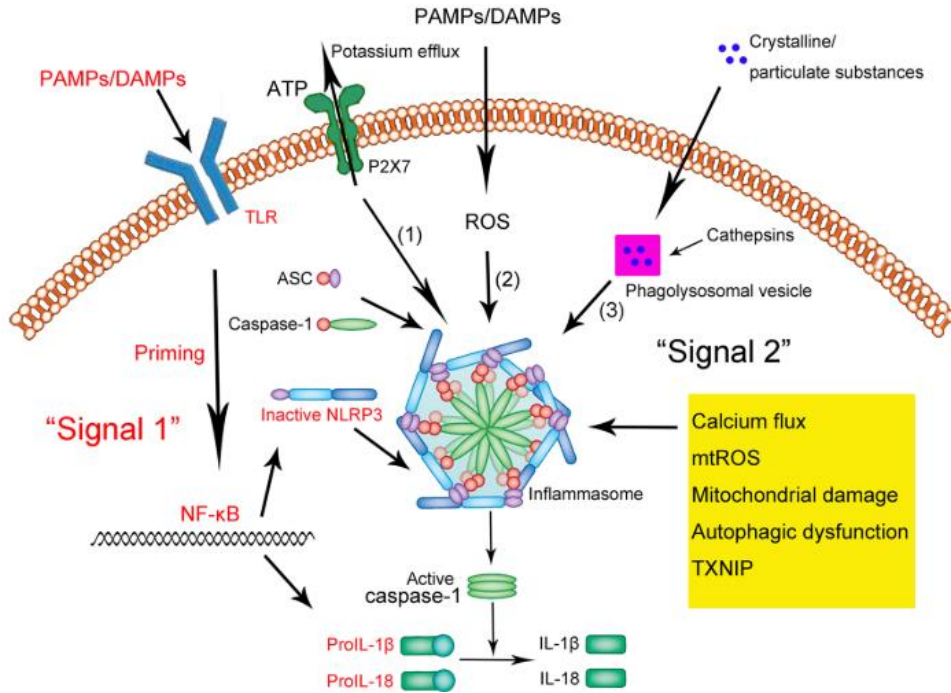


Figura 2. Ilustración esquemática de la activación del inflamasoma de NLRP3 desde sus activadores hasta las citoquinas liberadas (imagen extraída de Shao *et al.*, 2015).

En lo que respecta al inflamasoma no canónico, interviene la caspasa-11, quien dirige la activación de la caspasa-1 y del efector de la piroptosis, gasdermin. El clivaje de esta última desata la mencionada muerte celular, generada por poros en la membrana plasmática.

Por su parte, la microglía expresa múltiples tipos de PRRs, se identifican algunos como: TLRs, NLRs, CLR (de inglés: *C-type lectin receptors*) o RLRs (*Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors*). Las proteínas TLR son de carácter transmembrana, con un dominio externo para reconocer ligandos y uno interno tipo TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*). Los ligandos incluyen tanto DAMPs, como PAMPs. Los diferentes componentes de la familia TLR usan distintos adaptadores, lo que da lugar a diversas vías de señalización. La proteína TLR4, particularmente, reconoce mayoritariamente productos bacterianos como lipopolisacáridos (LPS). Este receptor es capaz de activar diferentes vías de señalización, siendo o no dependientes del adaptador MyD88. En el caso que sea dependiente, se activa la vía del factor de transcripción NF-κB y AP1, con la consiguiente liberación de citoquinas. En lo que refiere a la vía independiente, en cuanto el TLR4 es activado, el mismo es internalizado por endosoma, mientras que MyD88 y TIRAP se desprenden del dominio intracelular de TLR4 y se da lugar

la vía dependiente de TRIF, en donde se activa IRF3 para liberar IFN de tipo 1 y además se puede activar la vía de NF-kB (Yang *et al.*, 2020).

En relación a los mecanismos inmunopatogénicos por parte de la microglía, se ha visto que inhibiendo TLR/NF-kB se favorece la polarización de macrófagos desde el fenotipo M1 al M2 (Ye *et al.*, 2019).

En lo que concierne a otro tipo de receptores, la familia de los NLR puede unir sus ligandos no solo en la membrana celular, como es el caso del TLR4, sino también desde el citosol. Por su parte, NLRP3 es un receptor citosólico capaz de detectar tanto daños exógenos como endógenos, así como ATP (adenosín trifosfato), MSU (cristales de urato monosódico) y Nigericina (una toxina bacteriana) (Ahn *et al.*, 2018). Su activación trae como consecuencia el ensamblaje del inflamasoma, con el fin de clivar a la procaspasa-1. Este último se trata de un precursor enzimático inactivo capaz de activarse por corte proteolítico. La forma inactiva de la enzima, procaspasa, abarca dos subunidades de 10 y 20 kDa (llamadas p10 y p20, respectivamente), junto a un dominio de activación y reclutamiento caspasa (CARD). Cuando es clivada, estos elementos pasan a formar parte de la enzima activa formándose un tetrámero con dos subunidades p20 y dos subunidades p10. En lo que respecta al dominio de muerte CARD, este es capaz de interaccionar con otras proteínas que contienen el mismo CARD, tales como ASC (del inglés: *Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a CARD*) o NLRP3 (Fig. 3) (Shao *et al.*, 2015).

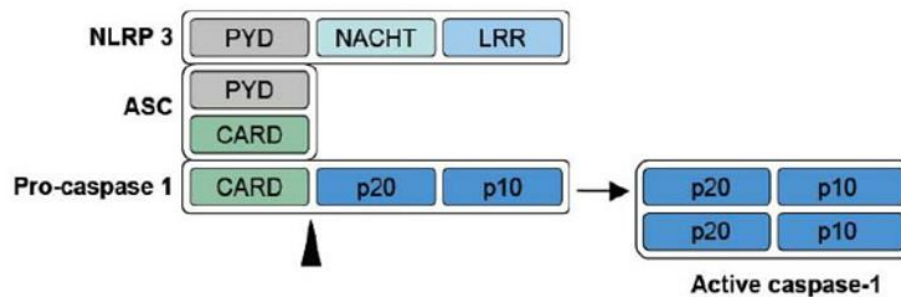


Figura 3. Esquema del ensamblado de NLRP3, ASC y la procaspasa-1 para activar a esta última y formar un tetrámero de subunidades p20 y p10.

En cuanto a la expresión del inflamasoma, la vía canónica se activa en macrófagos y células dendríticas, principalmente, mientras que la vía no canónica en células macrófagos o no macrófagos (Jorgensen & Miao, 2015; Schroder K, Tschopp., 2010; Shi *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015). Además, NLRP3 está fuertemente expresado en neuronas bajo condiciones

fisiológicas, aunque en situaciones patológicas puede expresarse en los macrófagos, monocitos y células dendríticas (Guarda *et al.*, 2011; Lammerding *et al.*, 2016). Las consecuencias de su activación son el inicio de la respuesta inmune innata por la proliferación de macrófagos, microglía y astrocitos, así como también de la respuesta inmune adaptativa, ya que ocurre la activación de linfocitos T vírgenes, los cuales se diferencian en respuesta Th1 o Th17, que lleva a la muerte neuronal (Freeman & Ting, 2016). La liberación de IL-1 β es la mayor responsable de la estimulación de la respuesta inmune innata, mientras que esta junto a la IL-18 median la respuesta inmune adaptativa.

En cuanto a activadores del inflamasoma, las HMGB1 (del inglés, *high-mobility group box 1*), también conocidas como anfoterinas, son miembros de la familia de las proteínas no-histonas conocidas como HMG, que se encuentran localizadas en el núcleo de las células eucarióticas, participando en la regulación transcripcional. Se ha demostrado que las HMGB1 pueden ser liberadas al ambiente extracelular, donde actúan de diversas maneras. Una de las mejores caracterizadas es su papel como DAMP. Esta molécula es liberada en forma pasiva por células que mueren por necrosis o apoptosis inmunogénica, siendo reconocida por receptores TLR2 y 4, activando una respuesta inflamatoria tanto en enfermedades autoinmunes como en la injuria. Por otro lado, se ha visto que en un modelo de daño cerebral, DAMPs como SAA (*Serum amyloid A*), HSPs (*heat shock protein*) y HMGB1 contribuyen a la aceleración de la inflamación y neurotoxicidad mediada por microglía, a través de la señalización de TLR4 (Savage *et al.* 2012). Por este motivo, se cree que el inflamasoma no solo actúa para defenderse de patógenos bacterianos o virales, sino que también juega un rol en enfermedades neurodegenerativas (Freeman & Ting, 2016). Varios estudios en humanos y modelos experimentales sugieren la contribución de HMGB1 en el desarrollo de EM y EAE, respectivamente (Paudel *et al.*, 2019). Por lo tanto, el inflamasoma representa un potencial mediador crítico de la neuroinflamación y podría funcionar como blanco terapéutico. En ese sentido, se han utilizado interferones de tipo I (IFN α , IFN β) que inhiben la activación del inflamasoma de NLRP3 en enfermedades autoinmunitarias o anti-inflamatorias (Shao *et al.*, 2015).

1.6 Vía de señalización de Akt

Las fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) pertenece a una familia de kinasas lipídicas intracelulares que se divide en tres clases. La más conocida es la PI3K Clase I, que con su activación da lugar a la formación del segundo mensajero fosfatidilinositol-(3,4,5)-trisfosfato (PIP3) a partir de la fosforilación de fosfatidilinositol-(4,5)-bisfosfato (PIP2) (Festuccia *et al.*, 2014; Thorpe *et al.*, 2015; Vanhaesebroeck *et al.*, 2010). Niveles altos de PIP3 promueven el reclutamiento de Akt a la membrana plasmática, donde es fosforilado por 3-fosfoinositido dependiente de proteína kinasa 1 (PDK1) en su treonina o bien por el complejo mTORC2 en su serina (Nagai *et al.*, 2013; Pearce *et al.*, 2010). En lo que respecta a Akt, se refiere a una familia de proteínas serina/treonina kinasas que se subdivide en 3 clases también: Akt1, Akt2, y Akt3. Se encargan de controlar diversas funciones y moléculas que incluyen citoquinas inflamatorias, miRNAs, fagocitosis, autofagia y metabolismo celular. La fosforilación en la treonina o serina del Akt provoca su traslocación desde el citoplasma al núcleo (Vergadi *et al.*, 2017).

Dada la alta implicancia de la vía de PI3K/Akt en varias funciones celulares, numerosos estudios describen las consecuencias de su activación no solo como pro-inflamatorias, sino también como anti-inflamatorias. Por un lado, se ha visto la contribución de la activación de Akt en la expresión de genes para impulsar el fenotipo M2 (Gong *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2011; Rocher & Singla, 2013). Muchas veces se ha considerado la vía PI3K/Akt como crítica para restringir lo pro-inflamatorio y promover la respuesta anti-inflamatoria en macrófagos estimulados por TLR, ya que se la ha descrito como un regulador negativo de la activación de macrófagos inducida por TLR4 (Androulidaki *et al.*, 2009; Birkenkamp & Coffey, 2003; Fan *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2002; Vergadi *et al.*, 2014). Por ejemplo, estudios han advertido que Akt regula a let-7e, quien inhibe la expresión de TLR4, y además modula a miR-146a, supresor de TLR por medio de TRAF6 (acrónimo en inglés de *TNF Receptor Associated Factor 6*) (Androulidaki *et al.*, 2009; Vergadi *et al.*, 2014). Por el contrario, otros estudios realizados en EAE mostraron que la delección genética de la isoforma Akt3 resultaba en menor daño en el SNC, demostrando la importancia de Akt en la microglía y en células inmunes periféricas para el desarrollo de la enfermedad (Tsiperson *et al.*, 2013). Además, la vía de señalización de PI3K (fosfatidilinositol 3-kinasa)/Akt (o proteína kinasa B, PKB)/mTOR ha estado relacionada con la patogénesis de EAE desde que se ha descrito su participación en procesos celulares como proliferación, diferenciación, supervivencia y migración de células inmunes (da Silva *et al.*, 2020).

La diferenciación de células Th17 es controlada por una variedad de procesos intracelulares que incluyen vías en donde participan PI3K, Akt y mTOR (Nagai *et al.*, 2013). Estudios previos han demostrado una regulación positiva mediante la vía Akt de la diferenciación de células Th17 y los niveles de la citoquina IL-17 *in vivo* e *in vitro* por múltiples mecanismos (Nagai *et al.*, 2013), y una acción inhibitoria sobre la polarización de linfocito T en Treg y la producción de citoquinas anti-inflamatorias (da Silva *et al.*, 2020).

En paralelo a esto, cabe destacar que mTOR es capaz de formar dos complejos diferentes denominados mTORC1 y mTORC2. Esta molecula forma mTORC1 junto a mLST8 y Raptor, mientras que el segundo lo hace junto a mLST8 y Rictor (Nagai *et al.*, 2013). En lo que concierne a Akt, existen dos vías principales que lo relacionan con mTOR: una es la de PI3K–Akt fosforilado en la treonina308 (pThr308)–mTORC1 y la otra de mTORC2–Akt fosforilado en la serina 473 (pSer473)– FoxO1/3a (Fig. 4) (Nagai *et al.*, 2013). Respecto a la primera vía de señalización, mTORC1 es indirectamente activado por Akt(pThr308), quien inhibe a los reguladores negativos de este complejo: TSC1/2 y PRAS40. En células T CD4⁺, la inhibición de PI3K y/o mTORC1 acaba por incrementar la diferenciación de células Treg, indispensables para modular la excesiva respuesta inmune (Sauer *et al.*, 2008). El complejo mTORC1 regula positivamente la diferenciación de Th17 por múltiples mecanismos que incluyen la modulación de la expresión de HIF-1 α , fosforilación de STAT3, regulación negativa de Gfi1 y translocación nuclear de ROR γ t (Fig. 4) (Dang *et al.*, 2011; Delgoffe *et al.*, 2011; Kurebayashi *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2011). En lo que refiere a mTORC2, este fosforila a Akt en células T CD4⁺ estimuladas por la unión al TCR (receptor de célula T). (Nagai *et al.*, 2013). Esta vía ha sido muy bien caracterizada como regulador negativo de la diferenciación de Tregs en una forma PI3K dependiente y a traves de la inhibición de FoxO1/3a, sin embargo, su contribución a la diferenciación de Th17 todavía es controversial (Kurebayashi *et al.*, 2012; Nagai *et al.*, 2013).

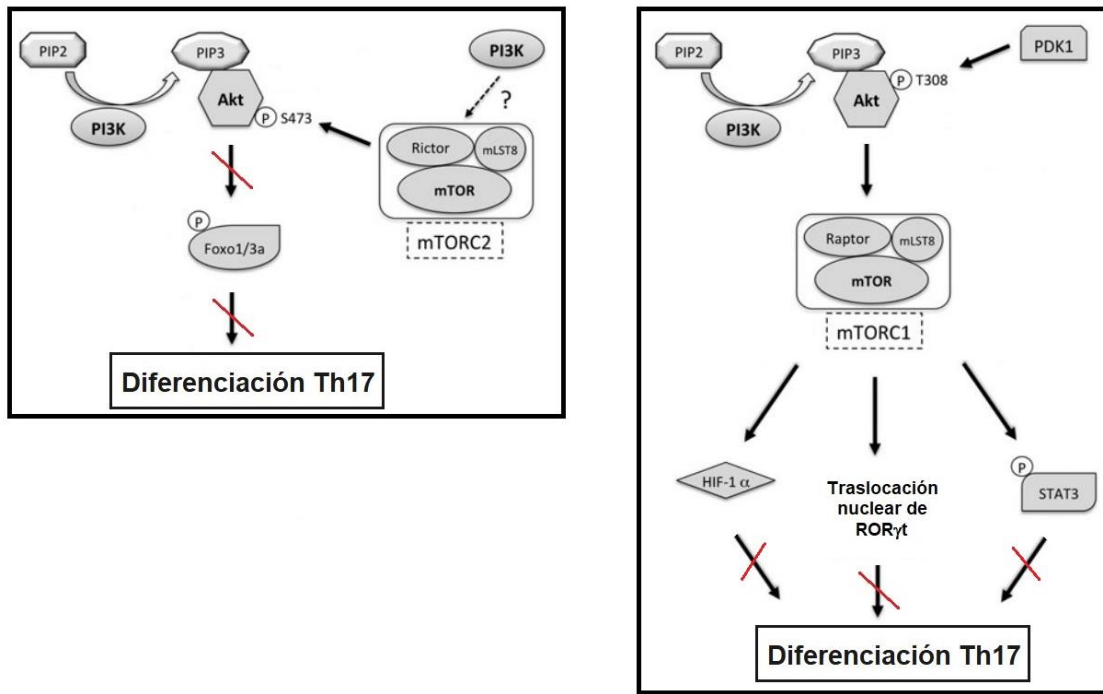


Figura 4. Esquema resumido de las vías de señalización de Akt (imagen modificada de Nagai *et al.*, 2013).

Por otra parte, la vía de Akt/mTOR está ampliamente relacionada a la autofagia, proceso destinado a la renovación celular y mantenimiento de la homeostasis, que se encarga específicamente de la inclusión de proteínas mal plegadas, tóxicas y/o de larga vida, así como también de organelas dañadas y agregados macromoleculares o proteicos (Ghavami, *et al.*, 2014). La célula coloca sus desechos en una doble membrana, denominada autofagosoma, en situaciones donde requiere energía, como procedimientos de diferenciación, crecimiento o proliferación. Particularmente, mTOR funciona como un sensor de nutrientes, estimulando o no la vía, de ser necesario. En lo que respecta a esta molécula, estudios previos han demostrado que la inhibición del complejo mTORC1 *in vitro* protege contra la senescencia, apoptosis y catabolismo de matriz extracelular por la inducción de la autofagia y activación de la vía Akt (Yurube *et al.*, 2020).

1.7 Acciones de los esteroides en la EAE

El modelo de EAE ha demostrado simular diversos mecanismos observados en la EM, como lo son: el inflamasoma, mecanismos inmunogénicos que incluyen la activación de la

microglía y diferenciación de linfocitos Th1 y 17, entre otros ya mencionados con anterioridad. El presente modelo animal resulta ser el más eficaz a la hora de probar tratamientos.

Por su parte, los esteroides han ganado relevancia en las neurociencias desde que se evidenciaron sus efectos protectores. Respecto a la patología de EM, se ha observado que, en el tercer trimestre de embarazo, momento en el cual se elevan los niveles de estrógenos y progesterona, las mujeres con esta patología padecen menor índice de recaídas y luego del parto sufren un rebrote de la enfermedad (Confavreux *et al.*, 1998). Esta observación da lugar a plantear la hipótesis de que el estriol, estrógeno principal durante el embarazo, o la progesterona, que aumenta durante el embarazo, pueden desempeñar un papel importante en la evolución de la enfermedad, lo cual ha llevado a evaluar la potencialidad de estas hormonas como tratamiento para la EM (Garay *et al.*, 2012).

En relación con otras enfermedades autoinmunes, en la EM hay una clara preponderancia del sexo femenino. El dimorfismo sexual mostrado en la patología sugiere una interacción entre el sistema inmunológico y las hormonas sexuales (Bove & Chitnis, 2013). En este sentido, las hormonas sexuales son capaces de regular la secreción de citoquinas por los linfocitos Th1 y Th2, así como también linfocitos Treg y células presentadoras de antígeno (Bove & Chitnis, 2014; Gilmore *et al.*, 1997). En este sentido, Javadian y colegas (Javadian *et al.*, 2014) encontraron que la administración de estrógenos incrementó significativamente los niveles de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-4 y disminuyó la expresión del TNF- α en células mononucleares de sangre periférica provenientes de pacientes con EMRR.

En la EAE, los estrógenos poseen un efecto bifásico sobre la inflamación que depende de la dosis. En los niveles más bajos, los compuestos estrogénicos, como el estradiol, promueven la inflamación mientras que, en niveles más altos inducen un cambio en la respuesta inmune, de un perfil pro-inflamatorio Th1 a un perfil anti-inflamatorio Th2, como ocurre durante el embarazo. Además, se ha reportado que los estrógenos pueden modular la respuesta neuroinflamatoria desviando a las células microgliales desde un fenotipo pro-inflamatorio M1 hacia un fenotipo anti-inflamatorio M2, así como también estimular a las células B reguladoras. Estas acciones contribuirían en gran medida a su efecto neuroprotector en el EAE (Benedek *et al.*, 2016; Prieto *et al.*, 2006; Simard & Gingras, 2001).

Respecto a la progesterona, trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado sus efectos neuroprotectores, promielinizantes y anti-inflamatorios en la EAE. En este sentido, la

administración de progesterona atenuó la severidad clínica, disminuyó la desmielinización, la neuroinflamación, y resultó ser protectora a nivel neuronal y axonal en la patología (Garay *et al.*, 2007; Garay *et al.*, 2009; Garay *et al.*, 2012).

Por otro lado, a nivel preclínico, los efectos neuroprotectores de los andrógenos se evidenciaron en diversos estudios en animales con EAE, donde se demostró un aumento de la actividad de la enfermedad en los estados de deficiencia de andrógenos como, por ejemplo, después de la castración (Palaszynski *et al.*, 2004). Además, el tratamiento con dihidrotestosterona (DHT) (que, a diferencia de la testosterona, no puede aromatizarse a estrógenos) en animales castrados mejoró los síntomas y disminuyó la actividad inflamatoria (Holland *et al.*, 2011). En línea con esta idea, la exposición *ex vivo* de células T encefalitógenas a testosterona ha mostrado cambiar el perfil de citoquinas desde un perfil pro-inflamatorio a uno anti-inflamatorio, así como también su potencial patogénico (Dalal *et al.*, 1997). Es importante mencionar que las células inmunes, las neuronas y las células de la macro y microglía están dotadas de receptores de esteroides clásicos y no clásicos (Ando *et al.*, 1989), a través de los cuales modulan la actividad inflamatoria y la degeneración en el SNC. Por lo tanto, los esteroides juegan un rol fundamental en la incidencia y curso de la enfermedad. Mayor conocimiento sobre la acción de estos resultará en potenciales beneficios terapéuticos.

1.8 Tibolona

La Tibolona (TIB) es un esteroide sintético, cuyo nombre genérico es ORG OG-14 y su nombre molecular (7 α ,17 α)-17-hidroxi-7-metil-19-norpregn-5. Posee acción estrogénica, progestínica y androgénica, por medio de la interacción sobre sus receptores (ER, PR y AR, respectivamente), aunque tiene menor afinidad por ellos que sus propios ligandos. La TIB es considerada un regulador selectivo de la actividad tisular estrogénica (STEAR) (Kloosterboer, 2001), ya que los efectos generados en los diferentes tejidos son producto de la presencia de sus metabolitos. El esteroide se absorbe y distribuye muy rápido luego de la ingesta oral, una vez en el organismo, se metaboliza rápidamente en el hígado e intestino delgado, convirtiéndose en 3 α -hidroxi-TIB y 3 β -hidroxi-TIB (o 3 α -OH-TIB y 3 β -OH-TIB). Hay un tercer compuesto que se forma directamente de la TIB o de la 3 β -OH-TIB, que es la isoforma Δ 4-TIB (o Δ 4-isómero) (Fig. 5). La 3 α -OH-TIB y 3 β -OH-TIB tienen alta afinidad al ER, mientras que el Δ 4-TIB tiene más afinidad con el AR y PR. Los efectos estrogénicos se producen sobre el hueso,

vagina, cerebro; los progestínicos sobre mama y endometrio, mientras que los androgénicos sobre el hígado.

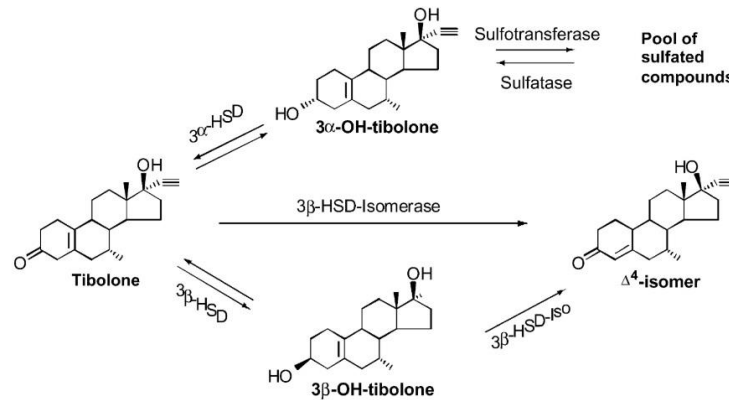


Figura 5. Metabolismo de la TIB. La TIB se convierte en los metabolitos hidroxilados por medio de la HSD (hidroxiesteroide deshidrogenasa); HSD-iso (hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa) es quien cataliza la conversión de TIB o bien 3β-OH-TIB a Δ4-isómero; el sistema de sulfotransferasa/sulfatasa actúa para inactivar/desactivar metabolitos por el agregado/quitado de un grupo sulfato (imagen extraída de Kloosterboer & Ederveen, 2002).

Los efectos biológicos y la acción tejido-específica de la TIB están mediados por la presencia de sus metabolitos en los tejidos, los cuales están determinados por el sistema sulfatasa-sulfotransferasa. En relación a esto, en circulación predominan los 3α y 3β OH derivados, por lo que los tejidos están expuestos más que nada a los metabolitos estrogénicos (Reed & Kloosterboer, 2004). La conjugación de los hidroximetabolitos a un grupo sulfato, por medio de la acción de la sulfotransferasa, genera su inactivación, con lo cual no pueden unirse al ER (Fig. 6). A su vez, la inhibición de la sulfatasa mantiene la condición de los compuestos estrogénicos inactivados, ya que se impide la transferencia del grupo sulfato de los metabolitos y su consecuente activación. Por otro lado, la enzima aldoketo reductasa (AKR1C) convierte a la 3 β-OH-TIB en TIB, y esta puede ser metabolizada para dar lugar al Δ4-metabolito (Fig. 6). En este sentido, el PR es activado por este último metabolito, el cual estimula a la sulfotransferasa, con lo que se refuerza esta vía. Tal es el caso en mama y endometrio, donde la sulfatasa está inactiva y por ello prevalecen los metabolitos sulfatados, los cuales no poseen actividad estrogénica. Estudios *in vitro* han mostrado que la sulfatasa de mama es fuertemente inhibida por TIB y sus metabolitos, no así la sulfatasa de hueso (Kloosterboer, 2011).

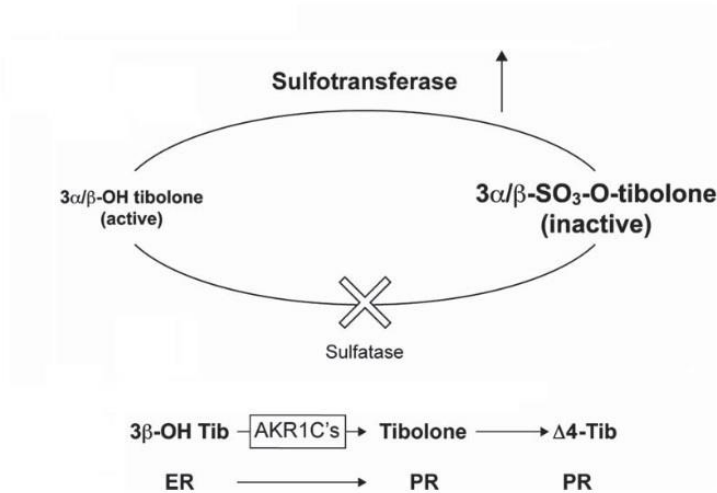


Figura 6. En la parte superior se representa la actividad del sistema sulfotransferasa-sulfatasa sobre los metabolitos hidroxilados, mientras que en la parte inferior se muestra la reacción catabolizada por AKR1C, que da lugar al cambio desde un metabolito con afinidad al ER a uno con afinidad al PR (imagen modificada de Kloosterboer, 2011).

Si bien los estrógenos son hormonas esteroideas con efecto neuroprotector, se ha cuestionado su uso dado el riesgo cancerígeno asociado (Markou *et al.*, 2005; Pinto-Almazán *et al.*, 2012). Interesantemente, los estrógenos ejercen su acción en varios tejidos y los efectos cancerígenos se reportan por el receptor estrogénico α y no por el β (Burns & Korach, 2012). Los receptores estrogénicos α y β (ER α y ER β) están localizados tanto en tejidos reproductivos, como no reproductivos, incluyendo células del sistema inmunitario, el cardiovascular, SNC y hueso (Cunningham & Gilkeson, 2016).

La TIB es actualmente utilizada en la clínica para la prevención de osteoporosis y alivio de síntomas del climaterio. Fue aprobada por primera vez en 1987 en Países Bajos, y está disponible en 91 países para aliviar la sintomatología de la menopausia y en 55 países para prevenir la osteoporosis también (Kloosterboer, 2011). El compuesto tiene un peso molecular de 312,45 g y la dosis diaria utilizada es de 2,5 mg.

Dentro de las ventajas que trae consigo, se ha encontrado que la TIB tiene efectos antioxidantes y neuroprotectoras en varios modelos animales. A saber, se observó: el aumento de la capacidad antioxidante en hipocampo y corteza cerebral en ratas adultas (Aguilar *et al.*, 2008), la reducción del volumen infartado en ratas OVX con isquemia cerebral focalizada (Vergouwen *et al.*, 2000), la mejora del déficit cognitivo y crecimiento de espinas dendríticas,

reducido por la OVX en ratas (Beltrán-Campos *et al.*, 2015), la reducción de la reacción glial luego de una lesión cerebral en ratas OVX (Crespo-Castrillo *et al.*, 2018) y el decrecimiento del daño neuronal en hipocampo, daño cognitivo y motor en un modelo de exposición crónica a ozono (Pinto-Almazán *et al.*, 2014). En modelos *in vitro* presentó protección frente al daño por privación de glucosa en astrocitos (Avila-Rodriguez *et al.*, 2016) y frente a la exposición a ácido palmítico en microglía (Hidalgo-Lanussa *et al.*, 2018). Además, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, se ha demostrado que disminuye los niveles de peroxidación de lípidos (Aguiar *et al.*, 2008), funciona como modulador endócrino y regulador de neurotransmisores (Espinosa-Raya *et al.*, 2012), reduce fragmentación nuclear y producción de ROS, preserva el potencial de membrana mitocondrial (Avila-Rodriguez *et al.*, 2016) y que reduce la inflamación en células neurales e interviene en la fosforilación de Tau (Pinto-Almazán *et al.*, 2017).

Dados los efectos neuroprotectores encontrados, se cree que podría ayudar a prevenir la neurodegeneración (Pinto-Almazán *et al.*, 2017).

1.9 Historia del laboratorio

El laboratorio de Bioquímica Neuroendócrina del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME), en Argentina, en los últimos años ha investigado la relación entre diversos esteroides y enfermedades que afectan al SNC. En ratones EAE se ha encontrado que la administración de progesterona mejora el grado clínico, atenúa la severidad de la enfermedad, reduce la inflamación en la fase aguda de la enfermedad (Garay *et al.*, 2007) así como también posee efectos protectores sobre los axones (incrementa la densidad y reduce el daño axonal) (Garay *et al.*, 2009). Además, se observó reducción de la reacción glial y aumento de la mielinización en médula espinal (Garay *et al.*, 2012). No solo se han visto efectos beneficiosos de esteroides en el modelo EAE, sino también sobre el modelo de desmielinización por cuprizona y en un modelo de neurodegeneración motora como es el ratón Wobbler (modelo de esclerosis lateral amiotrófica).

Más allá del tratamiento con esteroides exógenos, datos de la literatura y estudios del laboratorio han demostrado un rol importante de los esteroides sintetizados localmente, llamados neuroesteroides. Animales con EAE han presentado alteraciones de las enzimas esteroidogénicas, mientras que el tratamiento con progesterona ha mejorado estas alteraciones, sugiriendo que estimular la síntesis de neuroesteroides contribuye en forma auto/paracrina para

reforzar los efectos neuroprotectores y anti-inflamatorios de la progesterona exógena (De Nicola *et al.*, 2018). Más aún, en el modelo de cuprizona, se evaluó la relación de la neurosteroidogenesis y la desmielinización y se halló que están inversamente relacionadas en el hipocampo y neocorteza (Leicaj *et al.*, 2018).

2. Hipótesis

Teniendo en cuenta los efectos beneficiosos de los estrógenos y progesterona en la EM y su modelo animal, además de los efectos antioxidantes y neuroprotectores del tratamiento con TIB encontrados en diversos modelos animales, en este trabajo se hipotetizó que la administración de TIB a animales con EAE mejoraría las alteraciones neuropatológicas a nivel del SNC, lo cual se traduciría en una mejora en la manifestación clínica.

3. Objetivos

El presente Proyecto Final de Lic. en Biotecnología se propuso comprender los efectos del tratamiento con TIB en la EAE, modelo animal de la EM. Para ello se planteó analizar, específicamente en la médula espinal, si el tratamiento con TIB:

- a) ejerce un rol inmunomodulatorio,
- b) modula el inflamosoma,
- c) atenúa la desmielinización en médula espinal,
- d) modula la expresión de receptores de estrógenos, así como también afecta la vía de PI3K/AKT/mTOR,
- e) mejora el grado clínico de los animales con EAE.

4. Metodología

4.1 Inducción de EAE y tratamiento con Tivolona

Para la generación del modelo experimental, se utilizaron ratones C57BL6 hembra de 9-10 semanas de edad, provenientes de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales permanecieron enjaulados en racks ventilados de hasta 5 ratones, con acceso libre al agua y alimento, en un ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Tanto las jaulas, como el alimento y la bebida fueron autoclavados, mientras que la manipulación de animales fue realizada en todo momento bajo campana de flujo laminar, utilizando material estéril, de manera de mantener a los animales libres de patógenos. Todas las intervenciones se realizaron de acuerdo con la guía publicada por el NIH (*National Institutes of Health*) para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. El IByME fue aprobado y certificado por la OLAW (*Office of Laboratory Animal Welfare*, NIH, EE. UU.). El protocolo experimental que se detallará más adelante fue aprobado por el IACUC (*Institute's Animal Care and Use Committee*, EEUU) y el CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio) del IByME.

Para la realización del experimento, los animales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos (ver Tabla II).

TABLA II. Descripción de los cuatro grupos experimentales junto a su nombre y abreviatura.

Grupo	Abreviación	Descripción
Control + Vehículo	CTRL+VEH	Ratones que recibieron CFA + Toxina de Pertussis y fueron tratados solo con vehículo
Control + TIB	CTRL+TIB	Ratones que recibieron CFA + Toxina de Pertussis y fueron tratados con TIB.
EAE + Vehículo	EAE+VEH	Ratones inmunizados con el péptido MOG + CFA + Toxina de Pertussis y fueron tratados solo con vehículo
EAE + TIB	EAE+TIB	Ratones inmunizados con el péptido MOG + CFA + Toxina de Pertussis y fueron tratados con TIB.

Para la inducción de la EAE, los ratones fueron anestesiados con 100 ul de una mezcla de ketamina y xilacina (ver Anexo B) en forma intraperitoneal (ip). Luego se inyectaron, en ambos flancos traseros y en forma subcutánea, 100 ul de una emulsión conteniendo 200 ug de péptido MOG 35-55 (Universidad John Hopkins), cuya secuencia es MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, y 0,6 mg de *Mycobacterium tuberculosis* (Difco BD) en PBS y CFA (Sigma). El CFA es utilizado para permitir la continua liberación de los antígenos activos e incrementar la respuesta inmune. Los animales control recibieron el mismo tratamiento, pero sin el péptido MOG (Fig. 7). Todos los ratones recibieron una dosis de 400 ng de toxina *Bordetella pertussis* en PBS (Sigma) inmediatamente luego de la emulsión y otra dosis similar 48hs después. La toxina *pertussis* permeabiliza la BHE, facilitando la migración de linfocitos T a través de esta y, junto a *M. tuberculosis* son estimulantes del sistema inmunitario.

El tratamiento con TIB (Sigma Aldrich) se realizó mediante la inyección subcutánea de 0,08 mg/kg utilizando aceite de ricino como vehículo, fue administrada día de por medio hasta el día del sacrificio (Fig. 7). Se utilizó aceite como vehículo ya que permite una lenta liberación del compuesto.

Los animales fueron pesados y evaluados diariamente. Los grados clínicos se clasificaron en una escala del 1 al 5 acorde a la literatura (Sun *et al.*, 2003), a saber, grado 1: pérdida de la tonicidad de la cola, grado 2: dificultad al caminar, grado 3: parálisis parcial de miembros posteriores, grado 4: parálisis total de ambos miembros posteriores, grado 5: moribundo/muerto. Los ratones se sacrificaron al día 17 postinducción, momento en el que los animales experimentan una fase aguda de la enfermedad (Fig. 7).

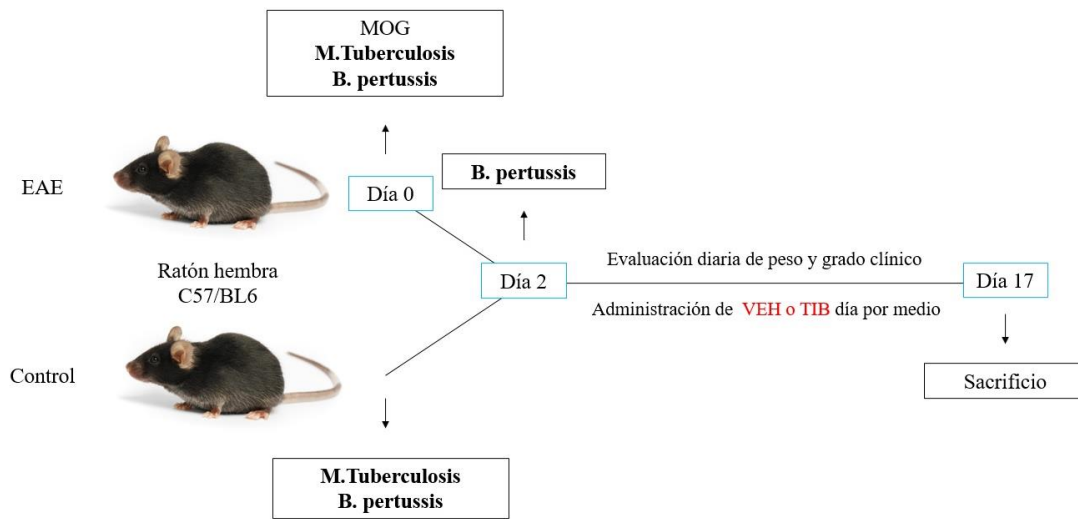


Figura 7. Esquema de la inducción de EAE.

Con respecto al ciclo menstrual, los animales lo pierden y la mayor parte del tiempo permanecen en la fase estrogénica del mismo (proestro-estro). El experimento se realizó con hembras intactas (no ovariectomizadas) de manera de simular la situación clínica en la cual se administraría a gente joven.

4.1.1 Sacrificio

Al día 17 postinducción, los animales fueron decapitados y las médulas espinales extraídas inmediatamente en frío en condiciones libres de ribonucleasas (ARNasas), con el fin de realizar el análisis de la expresión de mensajeros y de proteínas. Luego, se congelaron los tejidos a -70°C hasta su uso.

4.2 PCR en tiempo real

Para el estudio de la expresión de ARN mensajero (ARNm) de los tejidos se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real (en inglés: *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR). Las médulas cervicales congeladas pasaron por un proceso de extracción y purificación del ARN total, luego por uno de retrotranscripción (RT) para obtener el correspondiente ácido desoxirribonucleico (ADN) codificante y así poder amplificarlo y cuantificarlo mediante la qPCR. Como estándar interno se utilizó el gen de la ciclofilina B, dada la similitud de expresión entre las muestras. La cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros se realizó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ (Livak & Schmittgen, 2001)

y se expresó como veces de aumento respecto al control. A continuación, se detallan los pasos mencionados.

4.2.1 Extracción de ARN

Secciones de tejido de médula espinal cervical (20 mg aproximadamente) fueron homogeneizadas en frío con 700 μ l de reactivo Trizol (solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina con inhibidores de ARNasas) (Life Technologies-Invitrogen, CA, USA) a baja velocidad durante 2 minutos, utilizando un homogenizador Politron. Con las sales caotrópicas, como el isotiocianato de guanidina, se permite la ruptura de la membrana, mientras que el fenol es empleado para permitir la separación de fases pasos más adelante. Las muestras luego fueron transferidas a tubos de microcentrífuga (o comúnmente llamados Eppendorf) e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Luego de agregar 140 μ l de cloroformo (triclorometano) por cada muestra para separar el ARN del ADN y proteínas, las muestras fueron agitadas por inversión 20 veces y luego centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos a 4° C. A continuación, se tomó la fase acuosa, se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf, se le agregó la misma cantidad de alcohol isopropílico para precipitar el ARN en la fase acuosa y se homogenizó por inversión 20 veces suavemente. Se guardaron los tubos a -20° C hasta el día siguiente para optimizar la extracción de ARN precipitado. Posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos a 4° C. Sobre hielo, se extrajo la fase acuosa sin perturbar el precipitado (o pellet). Se lavó cada pellet cuidadosamente con 1 ml de etanol 70% para prevenir contaminaciones. Se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos a TA y luego se descartó el sobrenadante. Se evaporó el etanol a 50° C durante 5 minutos en agitación, utilizando un bloque térmico. Acabado el tiempo, se resuspendió cada pellet en agua estéril y luego se calentó a 50° C durante 5 minutos. Se calculó la concentración de las muestras mediante la medición de la densidad óptica (DO) utilizando el equipo Nanodrop 2000 (ThermoFisher, USA), y agua como blanco (para restarlo luego). Por último, se guardará el ARN a -70° C hasta el siguiente paso de retrotranscripción.

La información que devolvió el equipo fue en formato de Excel, en donde cada muestra presentó la concentración de ARN, la relación de las absorbancias 260/280, entre otros datos (Fig. 8).

A	B	C	D	E	F	G	H
Grupo	ID	[ARN]	Unidad	A260	A280	260/280	260/230
CV	1	2.0256	µg/µl	50.64	24.932	2.03	1.79
EAE V	2	1.8923	µg/µl	47.307	23.87	1.98	1.55
CT	3	2.1941	µg/µl	54.853	27.935	1.96	1.7
EAE T	4	1.8577	µg/µl	46.443	23.73	1.96	1.64

Figura 8. Ejemplo de datos que arrojó el Nanodrop (columnas A-H). Columna A: grupo experimental al que pertenece la muestra. Columna B: ratón del cual se extrajo la muestra. Columna C: concentración de ARN medida. Columna D: unidad de medida de la concentración de ARN. Columna E: absorbancia del ácido nucleico (medida a una longitud de onda de 260 nm). Columna F: absorbancia de proteínas contaminantes (medida a una longitud de onda de 280 nm). Columna G: cociente de las absorbancias de ácidos nucleicos y proteínas para determinar pureza. Columna H: cociente de las absorbancias de ácidos nucleicos y contaminantes como sales caotrópicas (estas últimas medidas a 230).

Una absorbancia 260/280 se consideró óptima entre 1,9 – 2,1 mientras que para la de 260/230 se consideró buena a a partir de 1,5.

4.2.2 RT

Para realizar la retrotranscripción, 2 µg de ARN contenidos en 6 µl fueron tratados con desoxirribonucleasas (ADNasas) (Promega) durante 30 minutos en un baño seco a 37° C para eliminar el ADN contaminante y luego la enzima fue inactivada por el agregado de *DNA stop solution* (Promega) incubado por 10 minutos en baño térmico a 70° C. A continuación, se incubó con oligonucleótidos al azar por 5 minutos a 70° C en termobloque. Posteriormente, se incorporó la polimerasa reversa M-MLV RT (del inglés, *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) (Promega), su buffer, desoxirribonucleótidos (dNTPs), agua y el inhibidor de ARNasas *RNAse out* (Invitrogen) en el orden y cantidad que figura en la Tabla III. Se incubó durante 1 hora a 37° C en baño térmico para permitir la síntesis y, finalmente, por 10 minutos a 70° C en termobloque para inactivar la retrotranscriptasa. Los tubos se almacenaron a -20° C hasta su uso.

TABLA III: contenido de la mezcla para la retrotranscripción junto a sus cantidades y en orden de agregado.

Componente	1 tubo
H ₂ O	17,25 ul
Buffer de M-MLV RT	5 ul
dNTPs (40 ng/ul)	1,25 ul
<i>RNAsa out</i>	0,5 ul
M-MLV RT	1 ul

4.2.3 Curva de cebadores

Previo a la cuantificación del ADN codificante, se realizaron curvas para conocer la eficiencia de cada uno de los cebadores en determinadas condiciones. Para ello, se hicieron diluciones seriadas de las muestras, empleando concentraciones de 10 pg, 100 pg, 1 ng, 10 ng y 100 ng. Luego de llevar a cabo la qPCR, se calcularon los Cts promedio de cada concentración, es decir, el número de ciclos necesario para ver una señal pasado el umbral de detección (donde se comenzó a amplificar), del inglés: *Cycle Threshold* (Ct). Estos datos fueron graficados en función del logaritmo de la concentración (Fig. 9). La pendiente de la recta obtenida se relaciona con la eficiencia a través de la siguiente ecuación (1):

$$Eficiencia = \left(10^{\frac{-1}{pendiente}} - 1 \right) * 100 \tag{1}$$

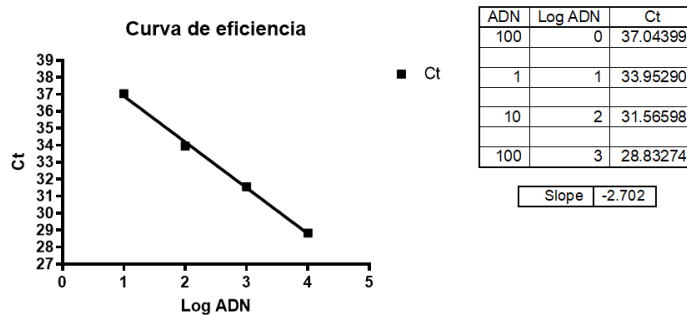


Figura 9. Ejemplo de tabla de datos de Ct junto al correspondiente gráfico.

La pendiente ideal es de -3,32 dando una eficiencia del 100%. Se consideró una eficiencia aceptable cuando los cebadores utilizados mostraron una entre 90 y 110%.

4.2.4 Amplificación

Para amplificar cada uno de los genes evaluados, se sembraron 5 ul conteniendo 20 ng de cada muestra por duplicado en una placa multiwell 96 junto a los cebadores y el reactivo SYBR Green (Bio-Rad) (ver Tabla IV), solución contenedora de dicho fluorocromo (N',N'-dimetil-N-[4-[(E)-(3-metil-1,3-benzotiazol-2-ilideno)metil]-1-fenilquinolin-1-ium-2-il]-N-propilpropano-1,3-diamina) necesaria para la cuantificación de ADN doble cadena, junto a la ADN-polimerasa y las sales necesarias para la síntesis.

TABLA IV: mezcla de componentes por cada gen analizado por qPCR.

Componente	1 tubo
H ₂ O	0,2 ul
Primer forward	0,5 ul
Primer reverse	0,5 ul
<i>SYBR green</i>	6,3 ul

Luego, sobre cada well se pipetearon 7,5 ul de la mezcla. Se le colocó un film a la placa y se la introdujo en el equipo de *Real Time Step-one Plus sequence Detection System* (Applied Biosystems, CA, USA). Los ciclos de amplificación consistieron en 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 0,15 segundos y 60°C por 1 minuto.

Los cebadores utilizados a una concentración 0.2 – 0.4µM se encuentran detallados en el Anexo C.

4.2.5 Análisis de datos de la qPCR

Los resultados obtenidos se exportaron a una planilla de Excel. Se recopiló la información obtenida del gen de interés junto a la de la ciclofilina de la misma dilución de muestra y, mediante el método $\Delta\Delta C_t$, se relacionó la expresión de la ciclofilina con el gen (Fig. 10). Todo el procesado se basó principalmente en el C_t obtenido por muestra. La siguiente fórmula describe el cálculo para obtener el valor de $\Delta\Delta C_t$ (2).

$$2^{\Delta\Delta} = 2^{-((C_{t_{gen}} - C_{t_{ciclofilina}}) - (C_{t_{promedio_{gen_{control}}} - C_{t_{promedio_{ciclofilina_{control}}}}))} \quad (2)$$

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Grupo	ID	Ct	Promedio Cr	DS Cr	Cal T	House	Cal House	Δ gen	Δ ciclo	$\Delta\Delta$	2- $\Delta\Delta$
CV	Gen-1	29.93	29.94	0.00	28.87	26.55	25.16	3.39	3.70	-0.32	1.25
	Gen-1	29.94									
EAEV	Gen-2	27.77	27.79	0.03		23.77		4.02		0.32	0.80
	Gen-2	27.81									
CT	Gen-3	30.04	30.05	0.01		27.50		2.55		-1.16	2.23
	Gen-3	30.06									
EAET	Gen-4	28.64	28.66	0.03		26.21		2.45		-1.25	2.38
	Gen-4	28.68									

Figura 10. Planilla de datos ilustrativa del procesado de datos del gen de interés, la ciclofilina y la utilización del método $\Delta\Delta$ Ct. Columna A: grupo experimental al que pertenece la muestra. Columna B: nombre del gen en cuestión y ratón al que pertenece. Columna C: Ct del gen. Columna D: promedio de los Ct del mismo gen y animal. Columna E: desvío estándar del promedio de los Ct. Columna F: promedio de los promedios de Ct de los animales controles (denominado Cal T). Columna G: Ct promedio del gen ciclofilina (denominado House). Columna H: promedio de los promedios de Ct de la ciclofilina de los controles (denominado Cal House). Columna I: el Δ gen se calculó: promedio Ct del gen – promedio Ct de ciclofilina (denominado Δ gen). Columna J: el Δ ciclo se calculó: Cal T – Cal House (denominado Δ ciclo). Columna K: el $\Delta\Delta$ se calculó: Δ gen – Δ ciclo. Columna L: el 2- $\Delta\Delta$ se calculó como lo indica su nombre, elevando el negativo del $\Delta\Delta$ al 2.

En todos los casos, el desvío estándar entre duplicados considerado como óptimo fue menor o igual a 0,01. Los datos de $2^{-\Delta\Delta}$ (Fig. 10) (2) fueron los utilizados para las pruebas estadísticas.

4.3 Western Blot

Para el análisis de la expresión proteica de las muestras, se llevó a cabo la técnica de *Western Blot* (WB). Se obtuvieron homogenatos sonicando médulas lumbares en Buffer de lisis conteniendo inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasas y glicerolfostato. Para conocer la cantidad de proteína presente en la muestra, se realizó una curva patrón con albumina sérica bovina (BSA). Posteriormente, se separaron proteínas en geles de SDS–PAGE y fueron transferidas a membranas de PVDF (Bio-Rad). Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios específicos y se revelaron en presencia de un sustrato quimiolumincente. A continuación, se detallan los pasos mencionados.

4.3.1 Preparación de homogenatos

Para comenzar con la técnica de inmunodetección de WB, se sacaron las muestras de -70° C y se descongelaron en hielo. Por cada médula lumbar, se colocaron 700 ul de Buffer de lisis conteniendo inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasas y glicerolfostato (ver

Anexo D). Se incubó por 30 minutos en hielo. Luego se sonicaron las médulas a 4°C lavando la punta del instrumento con agua y etanol entre las muestras. Luego de una centrifugación a 9500 rpm durante 5 minutos a 4° C, el sobrenadante se transfirió a nuevo tubo Eppendorf en el cual se guardaron las muestras a -70° C hasta su uso.

4.3.2 Medición de proteínas por el método de Bradford

Para medir proteínas por el método de Bradford, se llevó a cabo una curva patrón a partir de una solución madre de 1 mg/ml de BSA en agua Roux Ocefa (RO) conteniendo 5 diluciones: 0,1 mg/ml, 0,080 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,05 mg/ml y 0,025 mg/ml. En una placa multiwell 96, se sembraron 50 ul de dilución (y agua RO, para el blanco) con 200 ul de reactivo de Bradford, por triplicado. A su vez, se tomaron 2 tubos de muestras y se ensayaron 3 diluciones (1/200, 1/300 y 1/400, por lo general) por triplicado también, con el fin de determinar la dilución óptima de las muestras a utilizar para la medición de proteínas. Luego de incubar en oscuridad por 10 minutos, se midieron las absorbancias con un lector de ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) a 620 nm, ya que, en presencia de proteínas, el reactivo de Bradford reacciona dando un color azul que absorbe a esa longitud de onda. Se exportaron los resultados en una planilla de Excel (Fig. 11).

A	B	C	D	E	F	G
Curva Patrón						
ug/ul	Fila/Columna	DO 1	DO 2	DO 3	Promedio DO	Prom - Bco
0	A/1-3	0.25	0.28	0.27	0.27	0.00
0.025	B/1-3	0.31	0.31	0.29	0.30	0.04
0.05	C/1-3	0.38	0.41	0.42	0.41	0.14
0.0625	D/1-3	0.38	0.44	0.44	0.42	0.15
0.08	E/1-3	0.41	0.49	0.46	0.45	0.18
0.1	F/1-3	0.47	0.52	0.57	0.52	0.25
Muestras						
Muestra-Dil	Fila/Columna	DO 1	DO 2	DO 3	Promedio DO	Prom - Bco
5-1/400	G/1-3	0.42	0.43	0.43	0.43	0.16
5-1/300	H/1-3	0.47	0.53	0.52	0.51	0.24
5-1/200	A/4-6	0.54	0.51	0.52	0.52	0.26
6-1/400	B/4-6	0.41	0.38	0.39	0.40	0.13
6-1/300	C/4-6	0.42	0.42	0.43	0.42	0.16
6-1/200	D/4-6	0.49	0.49	0.48	0.49	0.22

Figura 11. Ejemplo de resultados obtenidos a partir del lector de ELISA (columnas C, D y E) junto a información agregada por el usuario. La parte superior de la figura corresponde a la curva patrón, mientras la inferior a las muestras. Columna A (curva patrón): descripción del contenido del pocillo, ya sea concentración de la dilución de BSA (ug/ul) o la del blanco (0 ug/ul). Columna A (muestras): el número de muestra (5 o 6 en el ejemplo) junto a

la dilución realizada (1/200, 1/300 o 1/400). Columna B: fila y columna de la placa multiwell a la que refiere la descripción de la columna A. Columnas C, D y E describen las DO obtenidas. Columna F: promedio de las DO. Columna G refiere a la resta entre el promedio de DO y el Blanco.

En función de los resultados obtenidos en la última columna de la Figura 11 (resta del promedio DO de las diluciones y la DO del blanco), se seleccionaron las diluciones óptimas de las muestras, siendo 1/400 las correspondientes del ejemplo, ya que se posicionaron en la mitad de la curva patrón (Fig. 12).

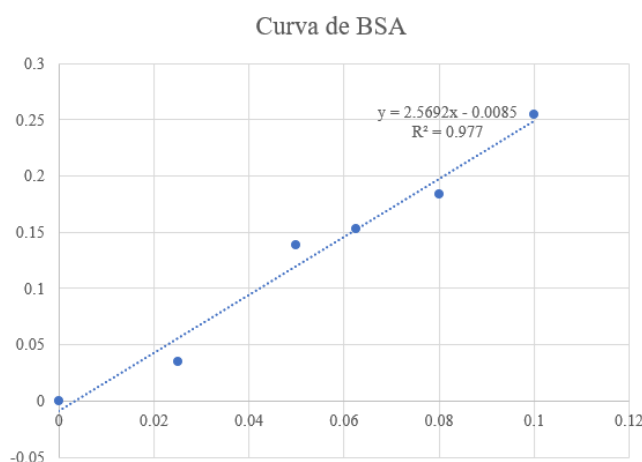


Figura 12. Curva patrón obtenida a partir de los datos de Fig. 11, junto a la ecuación de la recta, la línea de tendencia y el ajuste R².

A continuación, se sembraron por triplicado todas las muestras en cuestión con la dilución óptima mencionada, para luego obtener la absorbancia con el lector de ELISA. Con los datos exportados del Excel (Fig. 13) se calculó el promedio de las 3 mediciones de cada punto, restándosele el blanco. Luego, con la ecuación de la curva patrón se calculó la concentración de las muestras (Fig. 13). Se realizaron los cálculos para tomar 100 ug de muestra y llevarlo a volumen de 75 ul para luego añadirle 25 ul de *Sample buffer* (ver Anexo E) y obtener tubos con un volumen final de 100 ul. Se congelaron las muestras a -20° C hasta su uso.

A	B	C	D	E	F	G	H	I
Descripción	Muestra	DO 1	DO 2	DO 3	Promedio	DS	Prom - Bco	cc [ug/ul]
Blanco	-	0.10	0.04	0.04	0.06	0.03	0.00	
CV	1	0.49	0.49	0.48	0.49	0.00	0.43	0.17
EAEV	2	0.42	0.46	0.42	0.43	0.02	0.37	0.15
CT	3	0.48	0.48	0.47	0.48	0.00	0.42	0.16
EAET	4	0.44	0.43	0.42	0.43	0.01	0.37	0.15

Figura 13. Ejemplo de resultados de la absorbancia de muestras, junto a la concentración calculada. Columna A: descripción de lo que se sembró en los pocillos. Columna B: número de ratón del cual proviene la muestra. Columna C, D y E: DO de las diluciones sembradas. Columna F: promedio de las DO de una misma muestra. Columna G: desvío estándar entre las mediciones de DO. Columna H: el promedio de las DO de las muestras restado por la DO del blanco. Columna I: concentración calculada a partir de la ecuación de la recta de la curva patrón.

4.3.3 Armado de geles

Se prosiguió con el armado de geles de poliacrilamida para poder separar las proteínas de las muestras. En primer lugar, se armaron los soportes conteniendo los vidrios para dos geles. Se prepararon 10 ml de gel acrilamida al 15% (ver Tabla V).

TABLA V: componentes para la preparación del gel de separación.

Componente	Cantidad para 10 ml al 15%
H ₂ O RO	2,3 ml
Acrilamida 30%	5 ml
Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml
SDS 10%	100 ul
APS 10%	100 ul
TEMED	4 ul

El armado de los componentes se describe en el Anexo F.

El modo de preparación fue colocando los primeros cuatro componentes en el orden descripto, y luego de mezclarlos, se colocaron los últimos dos, se mezcló suavemente por inversión y rápidamente se colocaron 5 ml, aproximadamente, entre los dos pares de vidrios. Por encima, se puso agua para evitar que se seque, y se dejó incubando durante 45 minutos. Una vez que gelificó, se sacó el agua y se prosiguió con el gel de retención. El armado de este es similar al anterior, solo que cambian las proporciones y el buffer (ver Tabla VI).

TABLA VI: componentes para la preparación del gel de retención.

Componente	Cantidad para 10 ml al 5%
H ₂ O RO	2,7 ml
Acrilamida 30%	670 ul
Tris-HCl pH 6,8	500 ul
SDS 10%	40 ul

APS 10%	40 ul
TEMED	4 ul

Una vez colocado sobre el gel de separación, se acomodaron los peines y se dejó incubar durante 1 hora y 30 minutos para que gelifique. Pasado el tiempo, se sumergieron los geles con los vidrios en Buffer de corrida (ver Anexo G) y se guardó a 4° C hasta el día siguiente.

4.3.4 Electroforesis en gel y transferencia a membrana de PDVF

Se armó el sistema de corrida SDS-PAGE (acrónimo en inglés de *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) tomando la cuba electroforética y colocándole los vidrios junto a los geles embebidos en Buffer de corrida. Se sacaron los peines. Se prosiguió con la activación de las muestras, previamente descongeladas en hielo, hirviéndolas a 95° C durante 3-5 minutos en baño seco. Se sembró el marcador de peso molecular de Kaleidoscope (Bio-Rad) y a su derecha 20 ug de cada muestra en el orden correspondiente. Se dejó correr a 100 V hasta que el frente de corrida recorrió la mayor parte del gel, siendo 1,5 horas, aproximadamente.

A continuación, se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana de PDVF. Para ello, se colocó en una bandeja con Buffer de transferencia (ver Anexo H) un “casete” conteniendo una esponja, papel secante, el gel, la membrana de PDVF (fluoruro de polivinilideno) (Bio-Rad) previamente activada en metanol durante 30 segundos en agitación, papel secante, una esponja. Se colocaron los casetes en la cuba de transferencia conteniendo el buffer correspondiente. Se dejó trasferir durante 1,5 horas, aproximadamente a 4°C. Una vez terminada la transferencia, se les hizo una marca a las membranas para reconocer la cara y la orientación, se dejaron secar y se guardaron a 4° C hasta su uso.

4.3.5 Inmunodetección

Para la detección de las distintas proteínas se utilizó un protocolo general con pequeñas modificaciones según el anticuerpo utilizado. El procedimiento consistió en realizar lavados en PBS-T 0,1%, bloquear la membrana con leche al 5% diluida en TBS-T (ver Anexo I) por 30 minutos, colocar el anticuerpo primario diluido (hecho en ratón o conejo) en BSA al 2,5% en TBS-T y dejar hasta el día siguiente a 4° C. Luego, se realizaron lavados con TBS-T, se colocó el anticuerpo secundario (anti ratón o conejo, según el anticuerpo primario) conjugado con

peróxido de rábano (HRP) diluido en leche en TBS-T durante 1 hora. Las membranas se lavaron con TBS-T y finalmente con TBS (misma preparación que el TBS-T, pero sin detergente Tween). El proceso entero fue realizado en agitación. En todos los casos, el revelado se realizó por la técnica del ECL (*Electrogenerated chemiluminescence of luminol*), es decir, en presencia de un sustrato quimioluminiscente catalizado por la peroxidasa de rábano, dando como resultado un producto luminiscente cuantificable. Para llevarlo a cabo, se armaron los reactivos en dos recipientes separados (ver Tabla VII y VIII) y protegidos de la luz. Sobre las membranas se vertieron los mismos y se incubó en agitación durante 1 minuto.

TABLA VII: componentes de la solución 1 para el ECL.

Componente	Cantidad
H ₂ O RO	2,3 ml
Tris-HCl pH 8,8	166 ul
Luminol (44 ug/ul en DMSO)	25 ul
Cumárico (14,8 ug/ul en DMSO)	10 ul

TABLA VIII: componentes de la solución 2 para el ECL.

Componente	Cantidad
H ₂ O RO	2,3 ml
Tris-HCl pH 8,8	166 ul
H ₂ O ₂ (peróxido de hidrogeno)	3,5 ul

El armado de luminol (aminoftaloil hidrazida) y ácido p-cumárico (Sigma) se describe en el Anexo J.

Una vez que se vierten los reactivos sobre las membranas, la HRP conjugada al anticuerpo reacciona con el luminol y da un producto cuantificable. Para la detección de luminiscencia se colocaron las membranas en el equipo G:box (Syngene), que funcionaba en conjunto con el software GeneSnap, se empleó un filtro detector de 425 nm y se fotografiaron las membranas con diversos tiempos de exposición, de acuerdo con el gen.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se encuentran en el Anexo K.

Los datos de DO de las bandas fueron cuantificados y analizados estadísticamente con el programa Fiji (NIH).

En los casos donde se reutilizaron las membranas para ejecutar otras inmunodetecciones, se llevó a cabo el protocolo de *stripping* para despegar los anticuerpos previamente unidos. Para ello, luego de una permeabilización con metanol y 2 lavados con TBS-T durante 5 minutos, las membranas se incubaron en agitación con el Buffer de *stripping* (ver Anexo L) 2 veces durante 5 minutos. Finalmente, se hicieron 2 lavados de 10 minutos en TBS-T.

4.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos a partir de las mediciones de los distintos parámetros fueron analizados mediante la prueba paramétrica Análisis de la Varianza (ANOVA) de una vía (en los casos donde se cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de la muestra), o bien, la prueba no paramétrica Kruskal Wallis (para aquellos casos donde no se cumplieron los supuestos mencionados o la variable respuesta fuera de carácter ordinal, como fue el caso del estudio del grado clínico de los animales). Posterior a ambos análisis, se efectuaron comparaciones múltiples con las pruebas Newman-Keuls y Dunn's, respectivamente. Se consideraron significativas aquellas pruebas con $p\text{Valor} < 0,05$. Todos los análisis estadísticos fueron efectuados utilizando el programa estadístico PRISM (GraphPad Prism software, San Diego, CA, USA), a excepción de un caso para el estudio de la evolución del grado clínico, donde se utilizó el Infostat (FCA, Universidad Nacional de Córdoba).

Cuando el tamaño de muestra (n) es suficientemente grande, el teorema central del límite asegura una distribución aproximadamente normal (donde los promedios muestrales tienden a la media poblacional). Teniendo en cuenta el bajo número de animales utilizados en los grupos experimentales CTRL+VEH y CTRL+TIB (ver Tabla II) y habiendo analizado que el tratamiento con TIB en controles no modificó ninguno de los parámetros analizados respecto a los controles no tratados (datos no mostrados), ambos grupos fueron considerados como un único grupo. De esta manera se incrementó el tamaño de muestra (n) y se pudo obtener un análisis más robusto. Por ende, todos los análisis estadísticos mediante la comparación de variables de tres grupos experimentales: CTRL, EAE+VEH y EAE+TIB, tras haber probado la homogeneidad de los controles. Los análisis se llevaron a cabo mediante contraste de hipótesis, donde, en todos los casos, se planteó como hipótesis nula la homogeneidad de medias poblacionales de las variables respuesta (3) mientras que, como hipótesis alternativa y de

interés, la diferencia de al menos una de las medias poblacionales de los grupos experimentales, siendo en el mejor de los casos, diferencias entre EAE+VEH y EAE+TIB (4).

$$\mu_{CTROL} = \mu_{EAE+TIB} = \mu_{EAE+EAE} \quad (3)$$

Refiriéndose a μ como el promedio poblacional de cada grupo (desconocido).

$$\mu_{EAE+VEH} \neq \mu_{EAE+TIB} \quad (4)$$

A su vez, se esperaba que los grupos de EAE den diferente y los de controles iguales, también se deseaba que el grupo de EAE+TIB logre reestablecer sus parámetros para parecerse más a los controles (5).

$$\mu_{EAE+TIB} = \mu_{CTROL} \quad (5)$$

La transformación de los datos fue únicamente llevada a cabo en los casos de elevada variación de los datos dentro de algún grupo, con el fin de no eliminar muchos datos, objetivamente denominados como *outliers* por el programa estadístico. En dichos casos, se realizó una transformación de $Y = \text{LOG}$.

5. Resultados

Los resultados obtenidos del presente estudio se detallan a continuación, separados en secciones según los objetivos planteados para el trabajo. Corresponden al estudio de diversos parámetros ensayados por qPCR y WB, así como también el peso de los úteros y el grado clínico de los animales EAE.

5.1 Acción de la TIB sobre la neuroinflamación en la médula espinal

Como se mencionó anteriormente, numerosos estudios en EAE describen la participación activa de la microglía/macrófagos en la progresión de la enfermedad (ver Sección 1.4). Para el estudio del posible rol inmunomodulatorio de la TIB en la médula espinal de los animales con EAE, se evaluó la reactividad microglial mediante el marcador de superficie CD11b, el DAMP HMGB1, el receptor de membrana TLR4 y el factor de transcripción NF- κ B.

5.1.1 CD11b

Se evaluó la expresión de ARNm de CD11b, el cual es un marcador de macrófago/microglía activada. Los resultados mostraron que en los animales EAE hubo un incremento significativo del ARNm para CD11b en relación al grupo control (* $p < 0,05$), indicando una fuerte reactividad microglial. Por el contrario, en los animales EAE con TIB se observó una menor expresión de este marcador (* $p < 0,01$) respecto a los EAE+VEH, advirtiendo una atenuación de la microgliosis (Fig. 14).

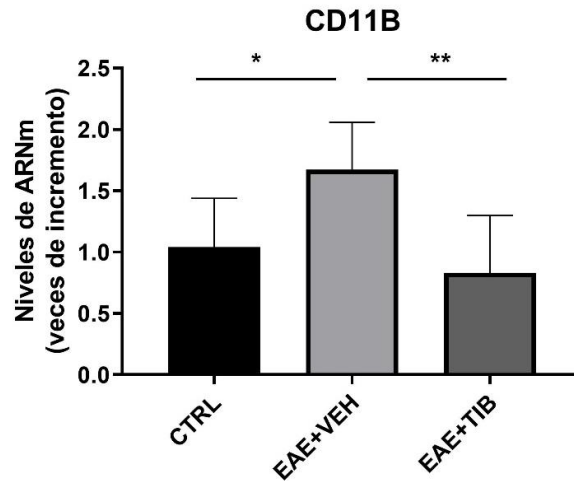


Figura 14. Resultados del ANOVA de los niveles de ARNm de CD11b. Unidad de medida del ARN expresada como veces de incremento. Se encontraron diferencias significativas en la expresión de ARNm entre los grupos CTRL y EAE+VEH (*p < 0,05) y entre EAE+VEH y EAE+TIB (**p < 0,01). n = 5, 5 y 9, respectivamente.

5.1.2 HMGB1

Dado que la proteína nuclear ubiquitinada HMGB1 está implicada en desencadenar la respuesta inflamatoria por parte de la microglía a través de la activación de TLR4, se evaluó por WB si la TIB lograba impactar en la expresión de dicho DAMP. La expresión proteica de HMGB1 mostró un aumento en los ratones EAE sin tratar con respecto a los controles (*p < 0,05). Sin embargo, a pesar de que la expresión de la proteína en general se ve disminuída en los EAE tratados con TIB, esta disminucón no es significativa respecto a los EAE sin el esteroide (Fig. 15) (Fig. 16).

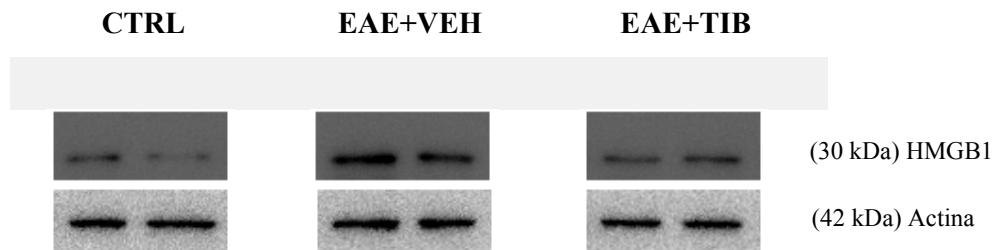


Figura 15. Perfil de expresión de HMGB1 obtenido por WB. Se muestran los resultados de 2 animales por grupo experimental. Las bandas superiores corresponden a HMGB1 (30 kDa) y las inferiores a la actina (42 kDa).

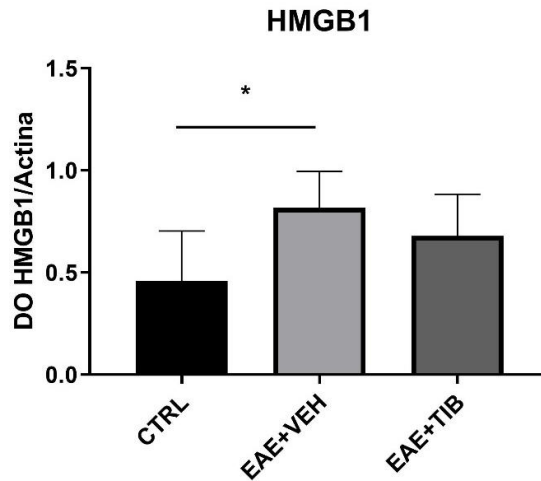


Figura 16. Resultados del ANOVA de los niveles proteicos de HMGB1. Se vieron diferencias significativas en la expresión de proteína entre CTRL y EAE+VEH (* $p < 0,05$), pero no con respecto a EAE+TIB. $n = 4, 10$ y 9 , respectivamente.

5.1.3 TLR4

Frente a que el receptor tipo Toll 4 es partícipe de vías pro-inflamatorias del sistema inmunitario innato, como el inflamasoma, e interactúa con la vía de señalización de NF- κ B, se propuso evaluar si la TIB lograba modificar los niveles transcripcionales y proteicos en los animales con EAE.

La expresión del ARNm observada por qPCR mostró niveles de ARNm para TLR4 aumentados en los animales con EAE respecto a los tratados (* $p < 0,05$) y a los controles (** $p < 0,01$) (Fig. 17).

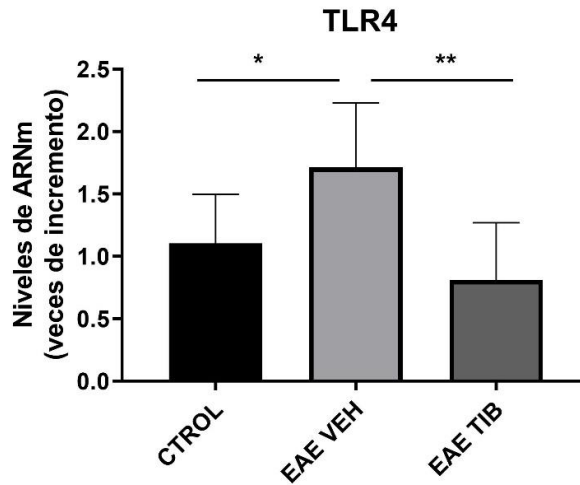


Figura 17. Resultados del ANOVA de los niveles de ARNm de TLR4. Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos CTRL y EAE+VEH (*p < 0,05) y entre EAE+VEH y EAE+TIB (**p < 0,01). n = 6, 9 y 5, respectivamente.

En lo que concierne a los niveles proteicos obtenidos por WB, con la administración de TIB no se observaron diferencias en los grupos experimentales (Fig. 18).

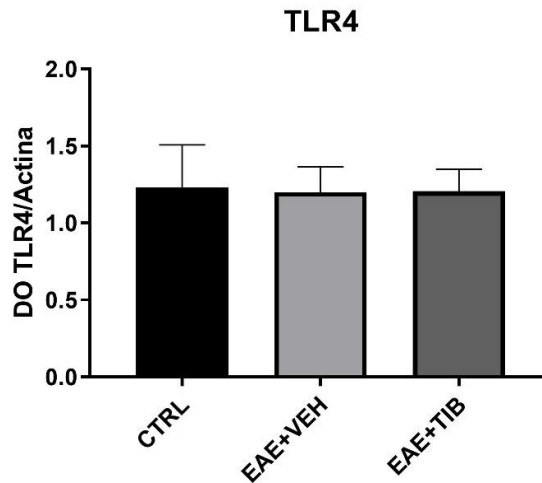


Figura 18. Resultados del ANOVA de los niveles de proteína de TLR4. Unidades de densidad óptica se utilizaron como medida de proteína. Los valores obtenidos fueron relativizados con los niveles de Actina. No se encontraron diferencias significativas de la expresión de proteínas entre CTRL, EAE+VEH o EAE+TIB. n = 4, 10 y 8, respectivamente.

5.1.4 NF-κB

Teniendo en cuenta que una de las principales vías efectoras de la activación del receptor TLR4 es la activación y translocación al núcleo de NF-κB (regulador de los genes de inflammasoma), se realizó un ensayo de qPCR para determinar los niveles de expresión del ARNm de este factor en los grupos experimentales. Los resultados estadísticos mostraron un importante aumento en los niveles transcripcionales de este factor en los animales EAE vs los animales controles, mientras que la administración de TIB reestableció los valores a los observados en los animales controles, indicando una atenuación de la vía pro-inflamatoria (Fig. 19).

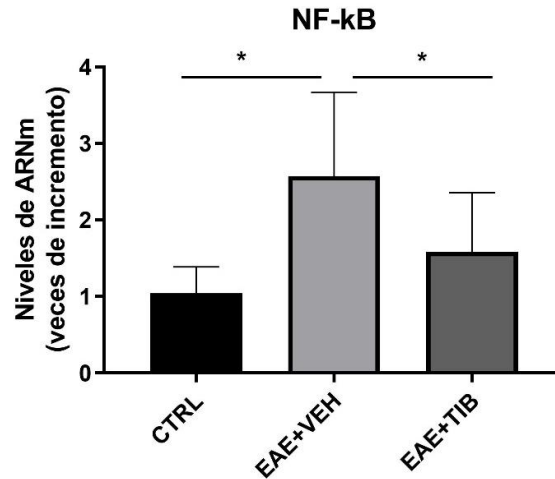


Figura 19. Resultados del ANOVA de los niveles de ARNm de NF-κB. Se demostraron diferencias significativas en la expresión de ARNm entre los grupos CTRL y EAE+VEH (*p < 0,05) y entre EAE+VEH y EAE+TIB (*p < 0,05). n = 5, 9 y 9, respectivamente.

5.2 Estudio del efecto de TIB sobre el inflammasoma

Con el propósito de analizar la posible acción moduladora de la TIB sobre el inflammasoma, se estudiaron los principales genes de proteínas involucradas en el proceso, a saber, NLRP3, la caspasa-1 y las citoquinas IL-1β e IL-18. Se utilizó la qPCR para conocer el estado transcripcional, y WB para el proteico. La literatura describe un aumento significativo de dichos componentes en los ratones con EAE respecto a los animales control.

5.2.1 NLRP3

Se analizó la expresión transcripcional del receptor citosólico NLRP3, actor distinguido del inflamasoma. NLRP3 forma parte del complejo multiproteico que activa a la caspasa-1 la cual libera a las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-18. Se encontró un marcado incremento en los EAE vs controles en coincidencia con la literatura. Por el contrario, los niveles de ARNm disminuyeron en los ratones enfermos tratados con TIB respecto a los del grupo EAE tratado con vehículo (*p < 0,01 y *p < 0,05, respectivamente) (Fig. 20).

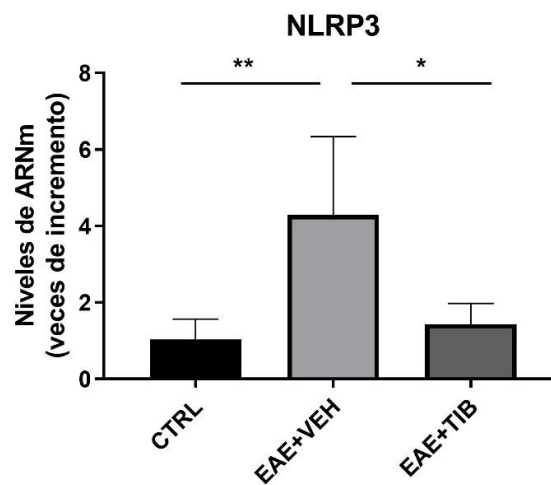


Figura 20. Resultados del Kruskal-Wallis de los niveles de ARNm de NLRP3. Se observaron diferencias significativas de la expresión de mensajeros entre los grupos CTRL y EAE+VEH (*p < 0,01) y entre EAE+VEH y EAE+TIB (*p < 0,05). n = 4, 7 y 8, respectivamente.

5.2.2 Caspasa-1

Se midió la expresión de caspasa-1 y procaspasa-1 (enzima sin cortar) por WB (Fig.21) y se calculó el cociente caspasa-1/procaspasa-1 con el propósito de conocer su estado de activación (Fig. 22). El análisis de los datos reveló una mayor activación en el grupo de EAE+VEH con respecto a los controles (***p < 0,001) y a los EAE+TIB (****p < 0,0001), lo que advierte sobre cambios a nivel de este zimógeno con el esteroide utilizado.

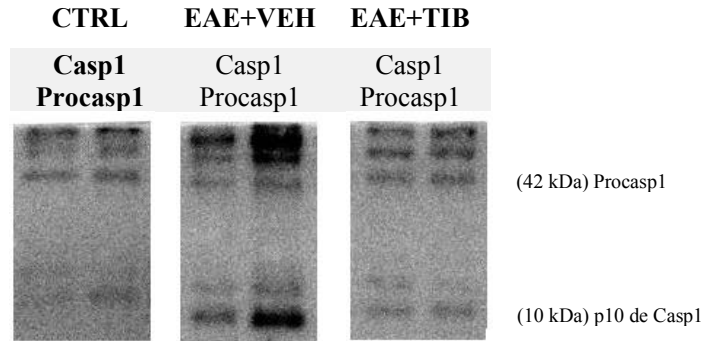


Figura 21. Resultados del WB de caspasa-1 (Casp1) y procaspasa-1 (Procasp1). Se muestran dos calles por grupo experimental. Las bandas superiores corresponden a tres isoformas de la Procaspasa-1, mientras que la inferior a la caspasa-1 clivada (y activa).

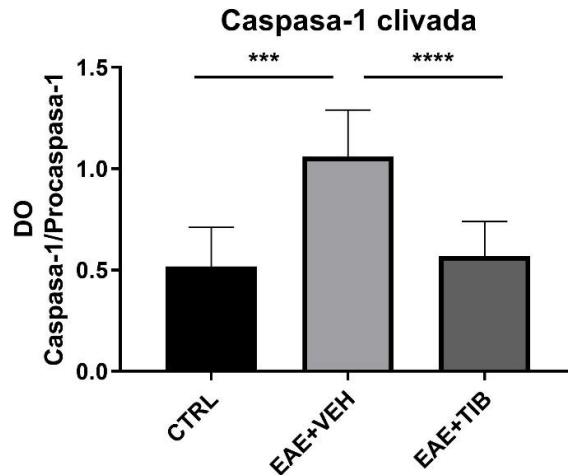


Figura 22. Resultados del ANOVA de los niveles de activación de la Caspasa-1. Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos CTRL y EAE+VEH (**p < 0,001) y entre EAE+VEH y EAE+TIB (****p < 0,0001). n = 5, 8 y 9, respectivamente.

5.2.3 IL-1β

Luego se midió la expresión transcripcional de la IL-1β, principal responsable de la estimulación de la respuesta inmune innata. Se observó un significativo aumento en los niveles de ARNm en los animales con EAE (*p < 0,05) respecto a los controles, efecto que se logró mitigar con la administración del esteroide (**p < 0,001) (Fig. 23),

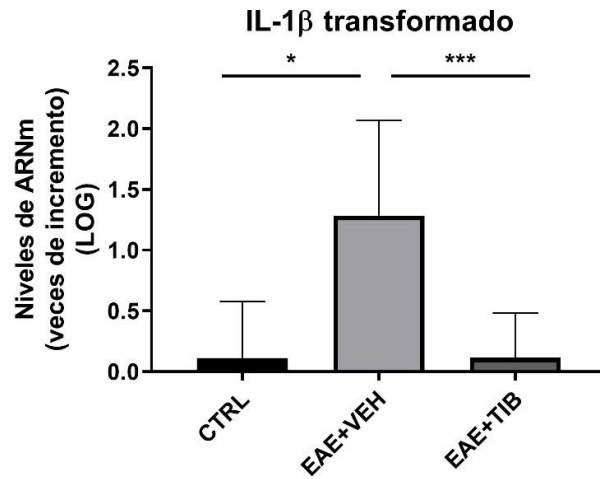


Figura 23. Resultados del ANOVA de los niveles de ARNm de IL-1β. Los datos sufrieron una transformación del tipo Y=LOG. Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos CTRL y EAE+VEH (*p < 0,05) y entre EAE+VEH y EAE+TIB (***p < 0,001). n = 4, 8 y 8, respectivamente.

5.2.4 IL-18

En lo que concierne a la IL-18, citoquina comúnmente estimulada en condiciones patogénicas de EAE, se evaluó su expresión transcripcional, donde no se mostraron diferencias significativas en los niveles de ARNm entre los grupos experimentales (Fig. 24).

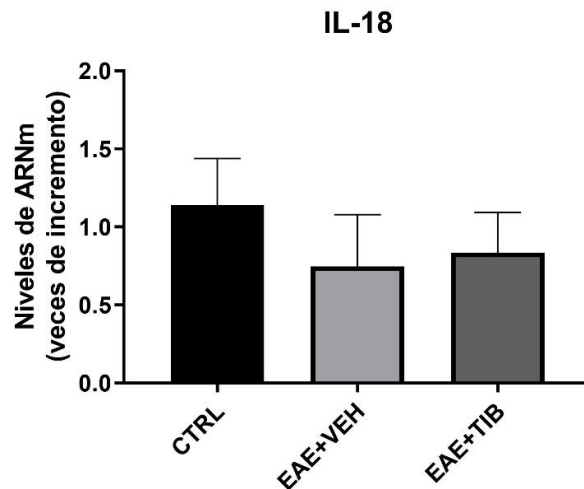


Figura 24. Resultados del ANOVA de los niveles de ARNm de IL-18. No se observaron diferencias significativas entre los grupos CTRL, EAE+VEH o EAE+TIB. n = 5, 8 y 9, respectivamente.

5.3 Estudio del efecto de TIB sobre la mielinización

5.3.1 Proteína básica de la mielina (MBP)

El grado de desmielinización desencadenado por la enfermedad es una medida bastante directa del daño. La MBP, una de las proteínas más abundantes de la mielina, fue medida en función de su expresión transcripcional y proteico. Con el propósito de evaluar si el tratamiento con TIB lograba tener un impacto sobre la desmielinización producida en la EAE. La cuantificación del ARNm mediante qPCR (Fig. 25) mostró una disminución de la expresión de MBP en los animales EAE sin tratamiento, respecto a los controles (*p < 0,05). Sin embargo, los animales que recibieron TIB mostraron un incremento significativo en la expresión del ARNm para MBP respecto a los animales no tratados, reestableciendo los valores en los animales controles (*p < 0,05).

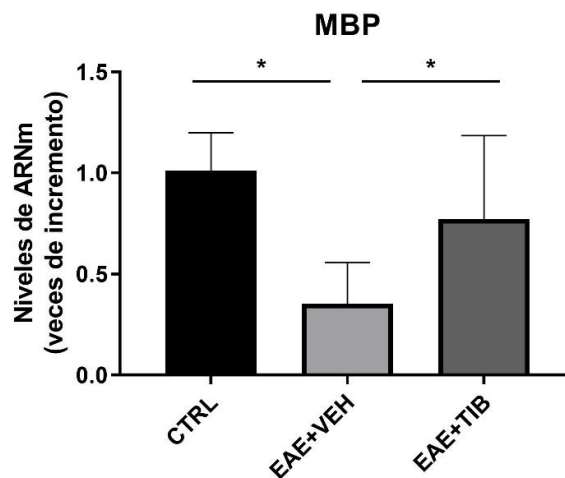


Figura 25. Resultados del ANOVA de los niveles de ARNm de MBP. Se vieron diferencias significativas en la expresión de ARNm entre EAE+VEH y EAE+TIB (*p < 0,05) y entre CTRL y EAE+VEH (*p < 0,05). n = 7, 8 y 4, respectivamente.

En lo que refiere a la composición proteica de MBP, se llevó a cabo un ensayo de WB (Fig. 26) (Fig. 27). Los datos estadísticos mostraron una disminución de la expresión proteica en los EAE+VEH vs CTRL, aunque no fue significativa. Sin embargo, si se observó una diferencia en el nivel de proteína MBP en el grupo de EAE+TIB respecto a los animales sin tratamiento (**p < 0,01).

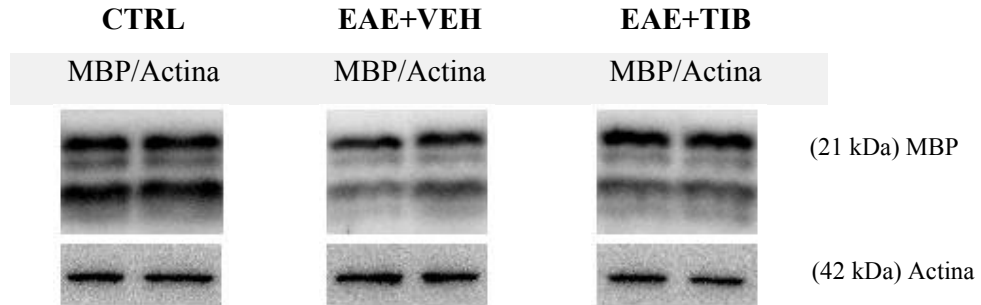


Figura 26. Perfil de expresión de MBP obtenido por WB. Se muestran los resultados de 2 animales por grupo. Las bandas superiores corresponden a las cuatro isoformas de MBP (21, 18, 17 y 14 kDa,) y las inferiores a la actina (42 kDa). En la figura se puede observar un perfil similar en los 3 grupos respecto a la actina, mientras que las isoformas de MBP se encontraron en mayor abundancia en el caso de los controles y EAE+TIB, entretanto en el grupo de EAE+VEH se cuantificaron menores cantidad de MBP.

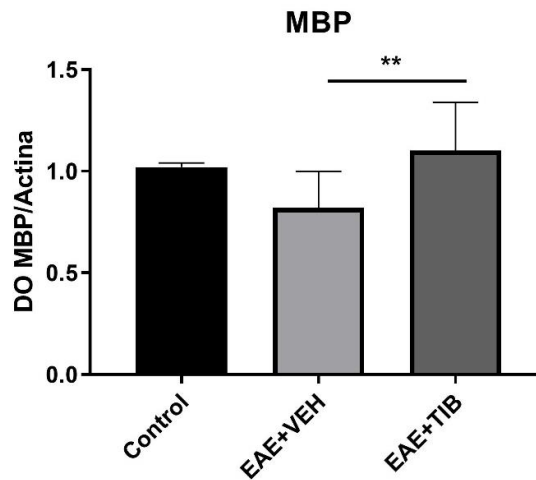


Figura 27. Resultados del Kruskal-Wallis de los niveles proteicos de MBP. Se vieron diferencias significativas en la expresión de proteína entre EAE+VEH y EAE+TIB (**p < 0,01) pero no respecto a los controles. n = 8, 7 y 3, respectivamente.

5.4 Estudio de genes relacionados al posible mecanismo de acción de TIB

5.4.1 ER α

Datos de la literatura describen que los metabolitos de TIB se unen con gran afinidad a los receptores clásicos de estrógenos (ER). Por ello, mediante qPCR se evaluó si se producían cambios en la expresión del ARNm del ER α en los distintos grupos experimentales. Los

resultados mostraron que no hubo cambios en el nivel de la expresión de ARNm para ER α en la médula espinal con el tratamiento de la TIB. (Fig. 28).

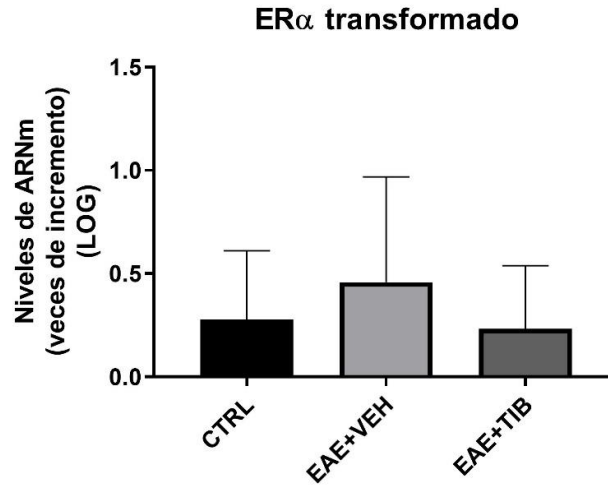


Figura 28. Resultados del ANOVA de los niveles de ARNm de ER α . Los datos sufrieron una transformación del tipo Y=LOG. No se observaron diferencias significativas entre los grupos CTRL, EAE+VEH o EAE+TIB. n = 5, 8 y 9, respectivamente.

5.4.2 ER β

Se estudió, además, si el tratamiento con la TIB generaba cambios en los niveles transcripcionales y proteicos del ER β .

El análisis realizado por PCR demostró que, a pesar de observarse una tendencia a incrementar los niveles en los animales enfermos tratados, no hay diferencias significativas entre los grupos experimentales (Fig. 29).

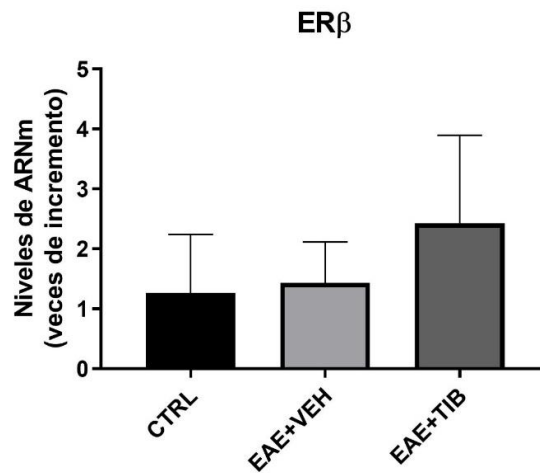


Figura 29. Resultados del ANOVA de los niveles de ARNm de RE α . No se observaron diferencias significativas entre los grupos CTRL, EAE+VEH o EAE+TIB. n = 4, 9 y 9, respectivamente.

En cuanto a los resultados de WB, tampoco mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales, indicando la ausencia de una regulación, tanto en los niveles transcripcionales, como en los proteicos de ER β por parte del esteroide (Fig. 30).

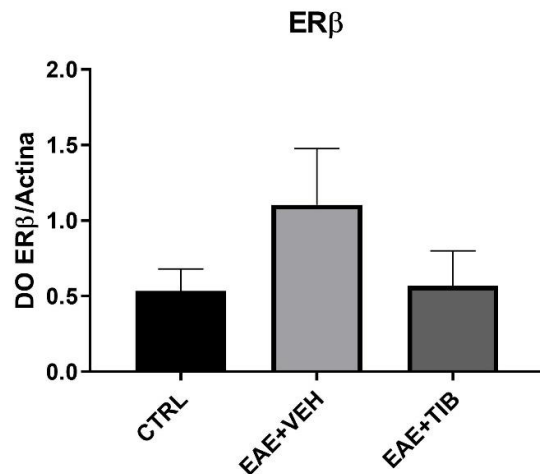


Figura 30. Resultados del ANOVA de los niveles de proteína ER β . No se observaron diferencias significativas entre los grupos CTRL, EAE+VEH o EAE+TIB. n = 3, 6 y 3, respectivamente.

5.4.3 AKT

Por otro lado, se estudió la activación de Akt, protagonista en múltiples vías de señalización celular. Para ello, se evaluó el cociente pAkt en relación AKT total, con el fin de conocer si el esteroide modulaba su fosforilación (y, por ende, activación). Los resultados

mostraron una mayor activación de la vía de Akt en los animales EAE respecto a los animales controles, mientras que disminuyó esta actividad en los animales con EAE con el tratamiento esteroideo (**p < 0,01 para ambos) (Fig. 31, 32).

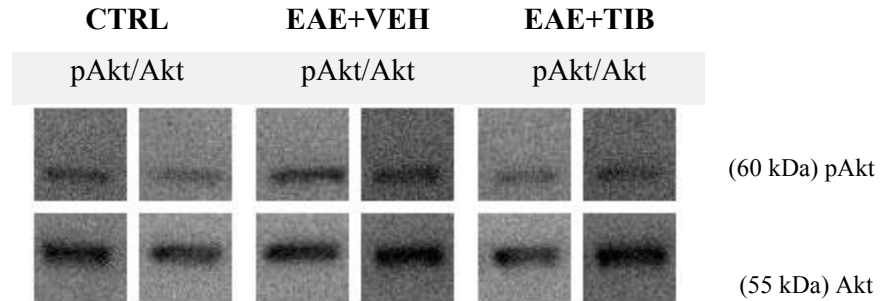


Figura 31. Perfil de activación del Akt en los diferentes grupos obtenido por WB. Por grupo se muestran dos animales, las bandas superiores corresponden al Akt fosforilado (pAkt) o activado, mientras las inferiores al Akt total.

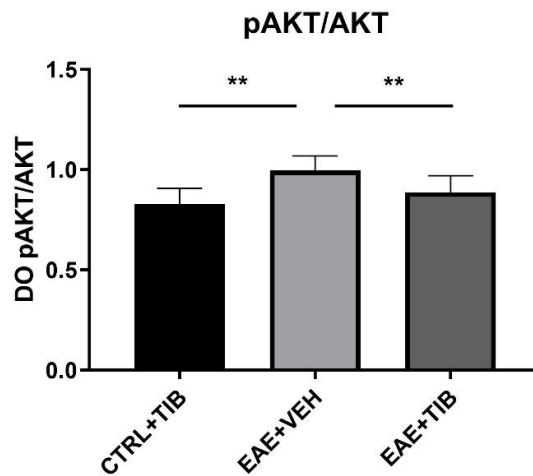


Figura 32. Resultados del ANOVA de los niveles de proteína de pAkt (Akt fosforilado o activado). Los valores obtenidos fueron relativizados con los niveles de Akt total. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos CTRL y EAE+VEH (**p < 0,01) y entre EAE+VEH y EAE+TIB (**p < 0,01). n = 5, 10 y 9, respectivamente.

5.4.4 mTOR

Con el propósito de analizar la vía de Akt/mTOR, se midió la expresión transcripcional de este último. No se hallaron diferencias significativas en los niveles de ARNm del sensor de nutrientes entre los grupos experimentales (Fig. 33).

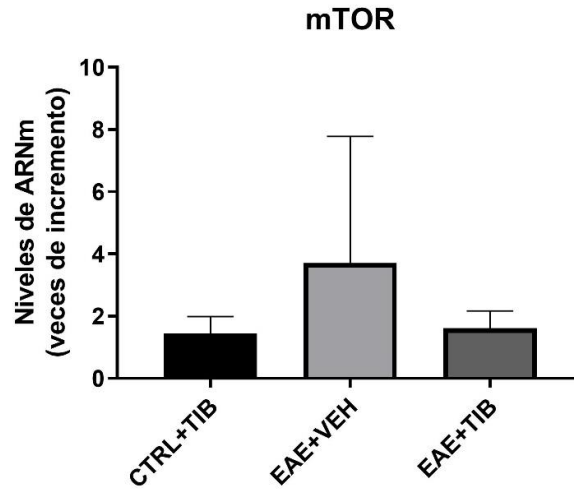


Figura 33. Resultados del Kruskal-Wallis de los niveles de ARNm de mTOR. No se observaron diferencias significativas entre los grupos CTRL, EAE+VEH o EAE+TIB. n = 4, 10 y 8, respectivamente.

5.5 Efecto del tratamiento con TIB sobre el grado clínico de los animales

5.5.1 Grado clínico

A partir de la inducción de la EAE, los ratones fueron pesados y evaluados diariamente en relación al grado clínico. Se asignó una clasificación que va de 0 a 5 conforme a la progresión de los síntomas, como se mencionó previamente (ver Sección 4.1). Para poder examinar el efecto del tratamiento con TIB, se graficó el grado clínico observado en función del tiempo (dpi) (Fig. 34).

Los animales del grupo CTRL no presentaron síntomas a lo largo del tiempo, de acuerdo con lo esperado. Por otro lado, los ratones del grupo EAE+TIB presentaron algunos síntomas leves, como una pérdida incipiente de la tonicidad de la cola, sin embargo, en ningún caso se alcanzó el grado clínico 1. Por el contrario, los animales del grupo EAE+VEH presentaron un incremento de los síntomas a partir del día 11 y, por lo tanto, el grado clínico fue aumentando en el tiempo. Los resultados del análisis estadístico mostraron una diferencia significativa entre el grupo EAE tratado con VEH vs EAE tratado con TIB y vs controles (**p < 0,01 para ambos) (Fig. 34).

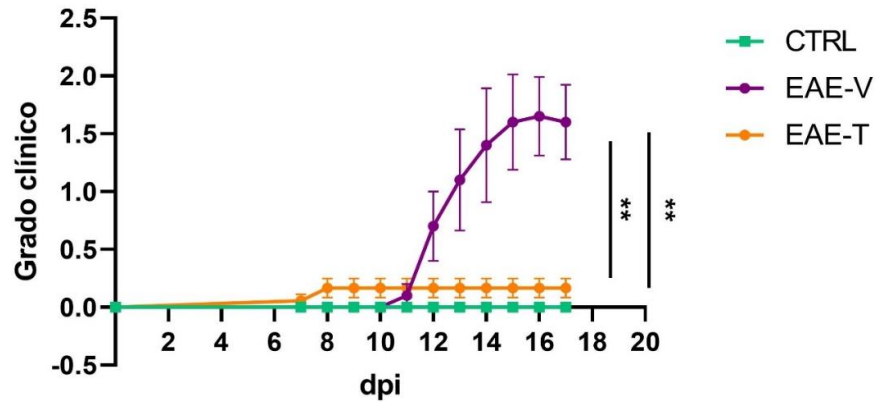


Figura 34. Evolución del grado clínico. Prueba de Kruskal-Wallis en el día 17 postinducción. El grado clínico en los ratones del grupo EAE+VEH mostró una diferencia significativa con los ratones tratados con TIB (**p < 0,01) y también con los controles (**p < 0,01). n = 10, 9 y 5, respectivamente.

5.5.2 Peso de los úteros

Dada la conocida interacción de la TIB con los receptores estrogénicos, los úteros fueron extraídos y pesados al momento del sacrificio de los animales con el fin de evaluar si el tratamiento, en las dosis administradas, producía un efecto de hiperplasia endometrial. En las mediciones realizadas, no se evidenciaron diferencias significativas en el peso de los úteros entre los grupos experimentales en, relación al peso corporal, indicando la ausencia de efecto estimulador sobre el endometrio de los ratones tratado con TIB (Fig. 35).

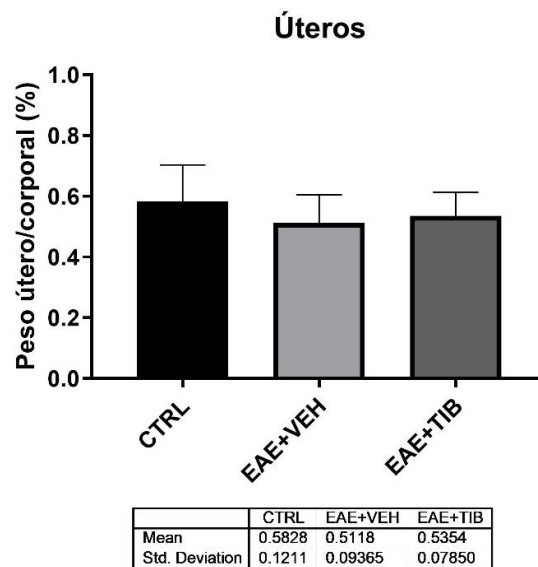


Figura 35. Resultados del ANOVA del peso de los úteros, en relación al peso corporal. No se vieron diferencias significativas entre los grupos CTRL, EAE+VEH y EAE+TIB. n = 5, 8 y 6, respectivamente.

6. Discusión de resultados

En el presente trabajo se evaluaron los efectos del tratamiento con TIB en lo que refiere al grado clínico, la reactividad microglial, la desmielinización y la inflamación en la médula espinal de animales EAE. Incluso, se llevaron a cabo estudios preliminares para entender más acerca de los receptores que intervienen y las posibles vías de señalización involucrada, como PI3K/Akt/mTOR, en los efectos del esteroide.

6.1 Los ratones que recibieron TIB presentaron menor grado de inflamación en la médula espinal respecto a los ratones sin el tratamiento

Los ratones con EAE del presente estudio fueron evaluados en una fase monofásica aguda de la enfermedad, lo que simula una recaída en la EM que posee un fuerte componente inmunológico. El infiltrado de células inmunes está representado, en gran parte, por linfocitos y monocitos en el parénquima de la médula espinal. Además, la fase aguda inflamatoria se acompaña de una activación de las células microgliales, tanto en sustancia blanca como gris. En este estudio se midió la reactividad macrofágica/microglial mediante el marcador CD11B, los resultados demostraron que con la TIB se logra atenuar la misma en la médula espinal, indicando una modulación de la respuesta inflamatoria.

La rápida activación del sistema inmunitario luego de una lesión en el SNC da lugar a una neuroinflamación aguda caracterizada además por la presencia de astrogliosis y liberación de mediadores inflamatorios. Estos sistemas se caracterizan por utilizar sensores moleculares para detectar el daño y los patógenos que amenazan a un organismo, y así, poder combatirlos desatando señales pro-inflamatorias. En particular, la microglía expresa múltiples tipos de receptores que al interactuar con los PAMPs y DAMPs desencadenan la activación del inflamasoma de NLRP3. Este proceso celular es un gran responsable de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias capaces de estimular la respuesta inmune innata y adaptativa. Es por ello, que está relacionado a distintas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, entre ellas, la EM.

El inflamasoma es expresado por neuronas, astrocitos y microglía en forma basal bajo condiciones fisiológicas. Esto apoya la idea de una defensa neurológica latente que está disponible para detectar temprano condiciones patológicas (Slowik *et al.*, 2018). Sin embargo,

en respuesta a una injuria neural permanente, el inflammasoma se sobreexpresa (Denes *et al.*, 2015; Lammerding *et al.*, 2016; Trendelenburg, 2014).

El receptor de membrana TLR4 es uno de los desencadenantes del inflammasoma de NLRP3. En lo que refiere a la administración de TIB, esta logró reducir los niveles de expresión transcripcional, que podrían ser explicados por un menor número de células microgliales y/o supresión directa de la expresión del gen TLR4. Los estudios de WB no reflejaron la misma tendencia a nivel proteico. Es posible que la TIB ejerza cambios en el estado de fosforilación, ya que el receptor necesita ser conjugado a un grupo fosfato para activarse (Chattopadhyay & Sen, 2014), sin embargo, el estudio del estado de fosforilación será materia de otro estudio a futuro. Trabajos previos han observado que la inhibición de la vía de TLR/NF-kB incrementa el fenotipo M2 de macrófagos (Ye *et al.*, 2019). Por ende, los efectos positivos de la TIB sobre ratones EAE podrían ser no solo por la disminución de la estimulación de la respuesta inmune innata y adaptativa por medio del inflammasoma, sino también por la estimulación del fenotipo M2 de macrófagos.

El receptor TLR4 es el principal activador de NF-kB, factor nuclear regulador de los genes del inflammasoma de NLRP3, aumentado en condiciones de patogénesis. Se vio que la administración de TIB logró disminuir no sólo la expresión de TLR4, sino también de NF-kB y NLRP3 (Fig. 36), reestableciendo los valores de los controles, sugiriendo la atenuación de la activación de los genes río debajo de TLR4, evitando el ensamblaje del inflammasoma.

Una vez desencadenada la vía de señalización para promover el inflammasoma, NLRP3 forma un ensamblado junto a la Caspasa-1 para luego activar por proteólisis las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-18. En el caso de la caspasa-1, se midió la cantidad de proteína clivada (o activa) sobre el total, para conocer su activación, la cual resultó disminuida fuertemente con la administración del esteroide (Fig. 36). Respecto a las interleuquinas, con la administración del tratamiento se logró reducir los niveles de ARNm de IL-1 β , principal responsable de la estimulación de la respuesta inmune innata, aunque no ocurrió lo mismo con la IL-18 (Fig. 36). En trabajos previos en EAE, se ha reportado un incremento agudo de producción de IL-18, previo al pico de enfermedad, que luego desciende rápidamente (McKenzie *et al.*, 2018). En nuestro trabajo lo evaluamos en el pico máxima de enfermedad, lo que podría explicar por qué no se evidenciaron cambios en EAE (y, por consiguiente, en el grupo EAE+TIB). Sin embargo, la IL-1 β está más estudiada que la IL-18 y, por lo general, se la describe como la principal

estimulante del sistema inmunitario. De todas formas, sería interesante determinar si la expresión de IL-18 sigue otra dinámica diferente a IL-1 β por lo que sería necesario determinarla en otro día postinducción, tanto en el grupo tratado como no tratado.

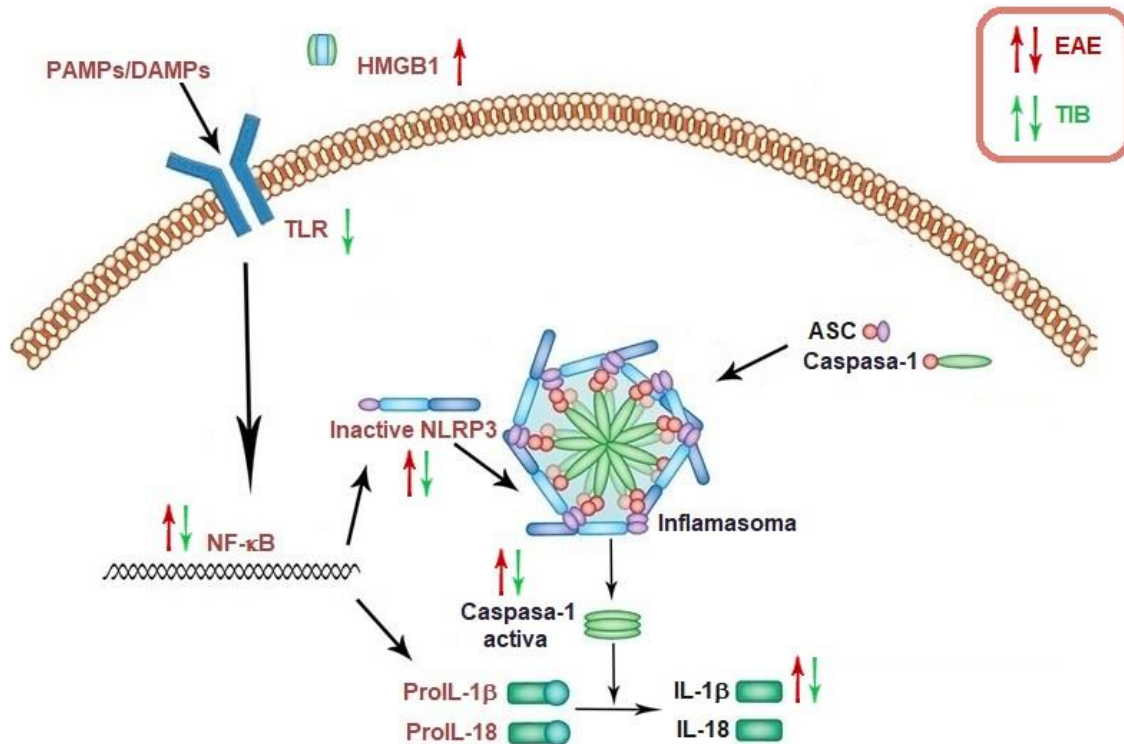


Figura 36. Imagen ilustrativa de los resultados obtenidos en relación al inflammasoma. En verde se muestran los efectos dados por la TIB, mientras que en rojo se denotan los efectos hallados en EAE (flechas hacia abajo indican la atenuación, mientras en dirección hacia arriba indican estimulación de la expresión) (imagen modificada de Shao *et al.*, 2015).

Estudios realizados por (Thakkar *et al.*, 2016) demostraron que el 17 β -oestradiol (E2) es capaz de inhibir la inducción del complejo NLRP3/ASC, procaspasa-1 y el clivaje de IL-1 β en un modelo de isquemia cerebral global de ratones OVX. En este estudio, se vio que el E2 disminuyó la expresión del receptor P2X7 tanto en microglía como neuronas, además de que se vio que el E2 regula negativamente la señalización vía DAMPs (Thakkar *et al.*, 2016). A su vez, también se reportó en ratones y ratas hembra ovariectomizadas que el E2 lograba revertir la expresión del TLR4 que se ve aumentada con la extirpación ovárica (Sarvari *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2016). Estos datos señalan que E2 previene la señalización necesaria para desencadenar el inflammasoma, mecanismo de inhibición desatado por medio de la reducción

de P2X7, receptor capaz de unirse a ATP extracelular y activar a NLRP3 (Gombault *et al.*, 2012; Thakkar *et al.*, 2016).

6.2 El tratamiento con TIB atenuó la desmielinización en médula espinal de ratones EAE

La EM y EAE son enfermedades crónicas inflamatorias y autoinmunes donde se produce una desmielinización axonal, causando la pérdida de la conducción nerviosa responsable de los síntomas, como discapacidad física y neurológica. Su severidad se relaciona con el porcentaje de desmielinización del SNC; por ello, analizar el proceso de pérdida de mielina es un indicador fuerte de la neurodegeneración promovida por la patología (da Silva *et al.*, 2020). La TIB fue administrada en dosis de 0,08 mg/kg día por medio y ha demostrado aumentar la expresión de mensajeros de MBP, principal componente de la mielina, atenuada en los ratones con EAE. El menor grado de desmielinización con el tratamiento con TIB puede ser explicada por la reducción en la reactividad macrofágica/microglial con menor activación del sistema inmunitario responsable del ataque inmunológico a la mielina. Sin embargo, no se descarta que el esteroide pueda actuar directamente sobre los OLs ejerciendo un efecto protector o estimulante de la diferenciación sobre los OPCs, estimulando la remielinización. En este sentido, resulta interesante investigar a futuro acciones de la TIB sobre precursores de oligodendrocitos y factores de transcripción involucrados en la maduración de los mismos.

Respecto a los niveles proteicos de MBP obtenidos en el ensayo por WB, no se hallaron diferencias significativas entre los controles y animales EAE. Sin embargo, sí aumentaron los niveles con la administración de TIB en los ratones EAE. Es sabido que la desmielinización en la médula espinal de ratones EAE es focalizada, fundamentalmente en los funículos dorsal y ventral en coincidencia con focos inflamatorios. Es probable que esta pérdida focal de mielina no llegue a detectarse por la técnica de WB analizando un segmento grande de la médula espinal. Para estudiar en más detalle el área de la médula espinal desmielinizada, sería conveniente estudiar los efectos de TIB acompañados de una inmunohistoquímica para MBP en cortes histológicos.

En el presente ensayo se evaluaron los efectos de la TIB en una fase monofásica aguda de la enfermedad, simulando un pico agudo de la forma clínica EMRR, el cual está caracterizado no solo por altos niveles de infiltrado celular, sino también por desmielinización

focalizada. Combatir el componente inmunológico en este estado resulta en un alargamiento del tiempo entre episodios. Dado que se presentó una reducción en el inflammasoma y la microgliosis con la administración de TIB, la proyección a ser utilizado en la clínica resulta auspiciosa, ya que se espera que aminore la inflamación. Además, el descenso del grado de desmielinización observada en los ratones con EAE resulta ser también una consecuencia muy positiva, dado que las exacerbaciones son producto de esta actividad focalizada.

Las formas clínicas progresivas de la EM no tienen un componente inmunológico tan fuerte como ocurre en la EMRR, por ello las terapias inmunomoduladoras que hay en el mercado hoy en día no son tan eficientes. La hipótesis de que la TIB posee la habilidad de remielinización, además de atenuar el componente inmunológico, está presente, no obstante, se requiere continuar con más investigaciones para corroborar dicha suposición (Fig. 37).

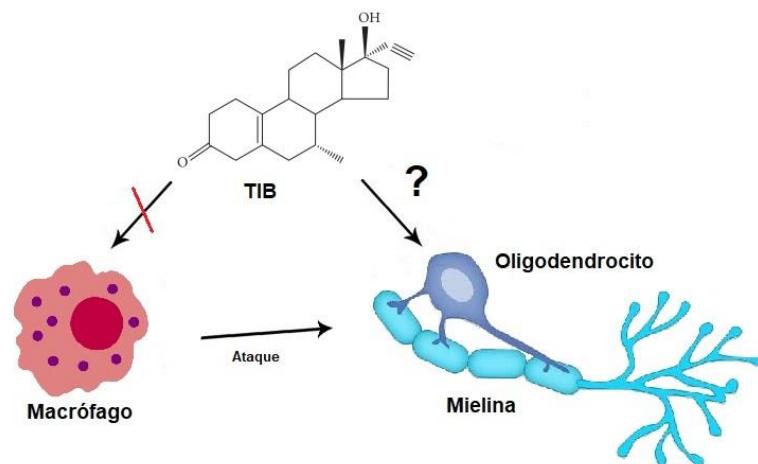


Figura 37. Ilustración sobre los efectos de la TIB que acaban con la mielinización axonal. Si bien los resultados mostraron una reducción en la microgliosis, lo que se espera que desencadene en una menor reacción contra la mielina que recubre los axones, por otro lado, la TIB podría tener un efecto directo sobre la producción de la mielina, que podría ser a través de los OLS.

6.3 La administración de TIB no alteró los niveles del ER α ni del ER β

Los efectos estrogénicos de la TIB están presentes en hueso, vagina y cerebro; mientras que los progestínicos en mama y endometrio (Verheul *et al.*, 2007). Los metabolitos 3 α -OH-TIB y 3 β -OH-TIB tienen más afinidad por el RE, mientras el Δ 4-TIB más con los receptores de progesterona y andrógenos. En el cerebro y plasma, el metabolito predominante es solo la 3 α -OH-TIB (Verheul *et al.*, 2007). Dada la predominancia de efectos estrogénicos, se decidió

evaluar si el tratamiento con TIB modulaba la expresión de los receptores. Sin embargo, no se mostraron diferencias significativas en ninguno de los grupos, tanto para ER α , como para el ER β . Estudios previos realizados en microglia y astrocitos describieron, a través del bloqueo de receptores, que la TIB actuaba fundamentalmente por medio del ER β para mantener la viabilidad celular, luego de ser sometidas a ácido palmítico y privación de glucosa, respectivamente. Sin embargo, el bloqueo del ER α no producía cambios en la viabilidad luego del ácido palmítico (Avila-Rodriguez *et al.*, 2016; Hidalgo-Lanussa *et al.*, 2018). En el mismo estudio se evidenció la capacidad de TIB de disminuir factores inflamatorios por medio del ER β , ya que se demostró que al bloquear este receptor, no se podía regular la expresión de enzimas antioxidantes. Más aún, se vio que el esteroide reduce el daño mitocondrial e inflamación regulando la expresión de Ngb1 y NF-kB en células microgliales. Además, varios estudios han demostrado que el ER β interviene en la preservación mitocondrial, así como también en la preservación de la masa de la organela, la cual se veía reducida en un 20% al tratar con ácido palmítico. (Acáz-Fonseca *et al.*, 2014; Acáz-Fonseca *et al.*, 2016; Arevalo *et al.*, 2015; Hidalgo-Lanussa *et al.*, 2018).

Por otra parte, estudios realizados en un modelo de isquemia general cerebral mostraron que al silenciar el ER β , la respuesta anti-inflamatoria generada por E2 sobre caspasa-1, ASC e IL-1 β se atenuaba en hipocampo (de Rivero Vaccari *et al.*, 2016), lo que apoya la idea de efectos protectores en cuanto al inflammasoma, a través de este receptor estrogénico. (Han *et al.*, 2015).

Los estudios mencionados sugieren la posibilidad de que la TIB ejerza su acción protectora por medio del ER β , más que por el α , en los animales EAE. De todas formas, más investigación es necesaria para corroborar la teoría.

Un gran número de estudios cuestionan el uso de estrógenos en humanos dado el alto riesgo de contraer un accidente cerebrovascular (ACV), cáncer de mama y endometrio. En relación a ello, la TIB ha demostrado no modificar los niveles de expresión de ARNm del ER α lo cual resulta importante ya que los efectos cancerígenos se reportan por el receptor α .

6.4 Los animales tratados con TIB mostraron una menor activación sobre la vía de Akt

La vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR actúa sobre varios procesos biológicos importantes, incluyendo al supervivencia, proliferación y migración de células inmunes (da

Silva *et al.*, 2020). Estudios previos describieron la estimulación de la respuesta linfocitaria Th17 mediante la regulación positiva de la vía de PI3K/Akt/mTOR, con la participación de Akt(pThr308)–mTORC1 o bien de mTORC2–Akt(pSer473). Más aún, la inhibición de la vía Akt/mTor promueve la polarización de linfocitos hacia un perfil Th regulatorio con liberación de citoquinas anti-inflamatorias como Il-10 (ver Sección 1.6).

En el presente trabajo, en el cual se evaluó la fosforilación en la Ser473, Akt se vió incrementado en animales con EAE en el período agudo de la enfermedad, en coincidencia, probablemente, con altos niveles de linfocitos Th17 y Th1, los cuales se conocen promueven el estado pro-inflamatorio en el EAE. La disminución de la activación de esta vía observada con el tratamiento de TIB no sólo podría estar inhibiendo la estimulación hacia un perfil Th17 pro-inflamatorio, sino que a su vez, podría favorecer la diferenciación de linfocitos hacia un perfil más tolerogénico.

Estudios anteriores han descripto que la vía PI3K/Akt puede ser un estimulador de NF- κ B y consecuentemente de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias. Los estudios en nuestros animales indican una elevación de los niveles de NF- κ B en los animales EAE y una disminución en los animales que recibieron TIB. Por lo tanto, la menor activación de la vía Akt con TIB de esta vía podría estar limitando la vía pro-inflamatoria dependiente de NF- κ B. En este sentido, es importante recordar que con TIB se suprimió la transcripción de IL-1 β , cuya expresión es inducida por este factor de transcripción.

En trabajos previos se demostró que la ausencia de Akt2 en macrófagos resulta en la atenuación de la quimocina que induce la polimerización de actina y su migración, por defectos en las vías de CSF-1 y MCP1 (Zhang *et al.*, 2009). La fagocitosis requiere de la organización de filamentos para poder envolver y degradar los cuerpos. Por lo tanto, la activación de Akt parece esencial para la fagocitosis, ya que la supresión de Akt2, aunque no de Akt1 ni Akt3, inhiben este proceso celular (Shiratsuchi & Basson, 2007). El hecho de que Akt afecte la migración y polimerización ha sido demostrado también en neutrófilos (Vergadi *et al.*, 2017). Por lo tanto, la atenuación en la vía de Akt por parte de la TIB, que coincide con el menor grado de activación de los macrófagos/microglía encargados de la fagocitosis, podría ser un indicador de menor actividad fagocítica.

Por otro lado, experimentos realizados en EAE han demostrado la importancia de la isoforma de Akt3 en microglía y células inmunes periféricas en la protección de la enfermedad,

ya que se vio que su delección resulta en un incremento en el daño del SNC. En el mismo orden de ideas, la remoción de cuerpos apoptosis libera señales que activan a Akt y suprimen vías donde interviene ERK1/2, al mismo tiempo que promueve la sobrevivencia de macrófagos (Vergadi *et al.*, 2017; Tsiperson *et al.*, 2013).

En este trabajo final, sólo se han realizado estudios preliminares sobre el efecto de TIB en la vía Akt. Es importante recalcar la complejidad de la vía PI3K/Akt/mTOR, la cual está finamente regulada en cada tipo celular involucrado en esta patología, sumado al hecho de que diferentes isoformas de Akt mostraron tener funciones diferentes y hasta antagónicas. A futuro quedará ahondar más en detalle posibles vías de activación río abajo e isoformas de Akt involucradas. De todas formas, dado que la mejora del grado clínico de los animales y la activación de la vía de Akt correlacionan negativamente, podría pensarse que la TIB ejerce una regulación beneficiosa, disminuyendo la diferenciación y activación de células inmunes claves en el desarrollo de esta enfermedad, como los linfocitos Th17 y las células monocucleares.

6.5 La TIB mejoró el grado clínico de los animales EAE sin comprometer al útero

La EM es una patología que da lugar a síntomas que afectan tanto la función motora como la cognitiva. El modelo de EAE se destaca por presentar signos y síntomas que podrían simular la clínica, entre ellos la pérdida de la función motora y de peso. Luego de evaluar a los animales durante 17 días desde la inducción de la enfermedad, los resultados mostraron que el tratamiento con TIB produce una mejora en relación con los síntomas, respecto a los animales sin tratamiento. Se observó que con la administración de TIB los ratones no superaron el grado 1 de enfermedad en ningún momento, mostrando, por lo tanto, un grado muy leve de enfermedad. Por el contrario, muchos de los animales con EAE sin la droga alcanzaron grados hasta 4, mostrando una parálisis tanto parcial, como total de los miembros posteriores.

En segundo lugar, a la hora de administrar estrógenos como tratamientos, resulta de suma importancia evaluar el efecto hipertrófico sobre el útero. En este sentido, se sabe que el estradiol, mediante la unión al ER α , tiene efecto proliferativo sobre el endometrio. Sin embargo, la TIB, quien tiene efectos estrogénicos, no mostró cambios en los pesos de los úteros de los animales con la dosis utilizada, lo cual puede ser explicado por el sistema de sulfatación/sulfatil transferasa que regula la acción tejido-específica de la TIB por la inactivación de los metabolitos estrogénicos 3 α -OH-TIB y 3 β -OH-TIB por sulfatación. En otras palabras, la

presencia de la sulfotransferasa en el endometrio da lugar a una mayor prevalencia de la acción progestínica y/o androgénica a través de la predominancia de $\Delta 4$ -metabolito.

Conclusiones

En este proyecto final se detallaron los estudios realizados en el modelo animal de Esclerosis Múltiple, la EAE, con el fin de estudiar los efectos del tratamiento con el esteroide sintético Tibolona. A nivel de la médula espinal, se observó que la administración de TIB en dosis de 0,08 mg/kg s.c día por medio logró disminuir la microgliosis, el inflammasoma, la desmielinización y la activación de Akt sin evidenciarse cambios a nivel de los receptores estrogénicos α y β . Además, mejoró el grado clínico de los animales sin estimular el crecimiento del endometrio.

Como conclusión, la TIB ejerce una acción anti-inflamatoria y protectora hacia la mielina en la médula espinal de los ratones con EAE sin comprometer al útero, lo que sugiere continuar con el estudio del esteroide como potencial terapéutico para la Esclerosis Múltiple.

Bibliografía

- Acaz-Fonseca, E., Avila-Rodriguez, M., Garcia-Segura, L.M., Barreto, G.E. (2016). *Regulation of astroglia by gonadal steroid hormones under physiological and pathological conditions*. Prog Neurobiol 144:5–26.
- Acaz-Fonseca, E., Sanchez-Gonzalez, R., Azcoitia, I., Arevalo, M.A., Garcia-Segura, L.M. (2014). *Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17beta-estradiol and selective estrogen receptor modulators*. Mol Cell Endocrinol 389(1–2):48–57.
- Aggarwal, S., Yurlova, L., Simons, M. (2011). *Central nervous system myelin: Structure, synthesis and assembly*. Trends in Cell Biology, 21(10), 585–593.
- Aguiar, R.B., Dickel, O.E., Cunha, R.W., Monserrat, J.M., Barros, D.M., Martinez, P.E. (2008). Estradiol valerate and tibolone: *Effects upon brain oxidative stress and blood biochemistry during aging in female rats*. Biogerontology, 9(5), 285–298.
- Ahn, H., Kim, J., Kang, S. G., Yoon, S. il, Ko, H. J., Kim, P. H., Hong, E. J., An, B. S., Lee, E., & Lee, G. S. (2018). *Mercury and arsenic attenuate canonical and non-canonical NLRP3 inflammasome activation*. Scientific Reports, 8(1), 1–12.
- Allen, S.J.; Watson, J.J.; Shoemark, D.K.; Barua, N.U.; Patel, N.K. (2013). *GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration*. Pharmacol. Ther. 2013, 138, 155–175.
- Andhavarapu, S., Mubariz, F., Arvas, M., Bever, C., & Makar, T. K. (2019). *Interplay between ER stress and autophagy: A possible mechanism in multiple sclerosis pathology*. Experimental and Molecular Pathology, 108(April), 183–190.
- Ando, D.G., Clayton, J., Kono, D., Urban, J.L., Sercarz, E.E. (1989). *Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype*. Cell Immunol 124:132–43.
- Androulidaki, A., Iliopoulos, D., Arranz, A., Doxaki, C., Schworer, S., Zacharioudaki, V., Margioris, A.N., Tsihchlis, P.N., Tsatsanis, C. (2009). *The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs*. Immunity 31: 220–231.
- Arevalo, M.A., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L.M. (2015). *The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors*. Nat. Rev. Neurosci. 16 (1) 17–29.
- Aryanpour, R., Pasbakhsh, P., Zibara, K., Namjoo, Z., Beigi Boroujeni, F., Shahbeigi, S., Kashani, I.R., Beyer, C., Zendejdel, A. (2017). *Progesterone therapy induces an M1 to M2 switch in microglia phenotype and suppresses NLRP3 inflammasome in a cuprizone-induced demyelination mouse model*. Int. Immunopharmacol., 51, 131–139.
- Askew, K., Li, K., Olmos-Alonso, A., Garcia-Moreno, F., Liang, Y., Richardson, P., Tipton, T., Chapman, M.A., Riecken, K., Beccari, S., Sierra, A., Molnár, Z., Cragg, M.S., Garaschuk, O., Perry, V.H.,

- Gomez-Nicola, D (2017). *Coupled proliferation and apoptosis maintain the rapid turnover of microglia in the adult brain*. Cell Rep. 2017, 18, 391–405.
- Avila-Rodriguez, M., Garcia-Segura, L. M., Hidalgo-Ianussa, O., Baez, E., Gonzalez, J., & Barreto, G. E. (2016). *Tibolone protects astrocytic cells from glucose deprivation through a mechanism involving estrogen receptor beta and the upregulation of neuroglobin expression*. Molecular and Cellular Endocrinology, 433, 35–46.
- Baumann, N. and Pham-Dinh, D. (2001). *Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system*. Physiol. Rev. 81, 871–927.
- Beltrán-Campos, V., Díaz-Ruiz, A., Padilla-Gómez, E., Aguilar Zavala, H., Ríos, C., Díaz Cintra, S. (2015). *Effect of tibolone on dendritic spine density in the rat hippocampus*. Neurologia. Sep;30(7):401-6.
- Benedek, G., Zhang, J., Bodhankar, S., Nguyen, H., Kent, G., Jordan, K., Manning, D., Vandembark, A.A., Offner, H. (2016). *Estrogen Induces Multiple Regulatory B Cell Subtypes and Promotes M2 Microglia and Neuroprotection During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. J Neuroimmunol. Apr 15;293:45-53.
- Bettelli, E., Das, M.P., Howard, E.D., Weiner, H.L., Sobel, R.A., Kuchroo, V.K. (1998). *IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice*. J Immunol. 161:3299-3306.
- Bibollet-Bahena, O., Almazan, G. (2009). *IGF-1-stimulated protein synthesis in oligodendrocyte progenitors requires PI3K/mTOR/Akt and MEK/ERK pathways*. J. Neurochem. 109 (5) 1440–1451.
- Birkenkamp, K.U., Coffey, P.J. (2003). *FOXO transcription factors as regulators of immune homeostasis: molecules to die for?* J. Immunol. 171: 1623– 1629.
- Bittner, S., Afzali, A. M., Wiendl, H., & Meuth, S. G. (2014). *Myelin Oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice*. Journal of Visualized Experiments, 86, 3–7.
- Bittner, S., Bauer, M.A., Ehling, P., Bobak, N., Breuer, J., Herrmann, A.M., Golfels, M., Wiendl, H., Budde, T., Meuth, S.G. (2012). *The TASK1 channel inhibitor A293 shows efficacy in a mouse model of multiple sclerosis*. Exp. Neurol. 238, 149-155.
- Bove, R., Chitnis, T. (2013). *Sexual disparities in the incidence and course of MS*. Clin Immunol; 142:201–210.
- Bove, R., Chitnis, T. (2014). *The role of gender and sex hormones in determining the onset and outcome of multiple sclerosis*. Mult Scler 2014; 20: 520–526.
- Budde, H., Schmitt, S., Fitzner, D., Opitz, L., Salinas-Riester, G., Simons, M. (2010). *Control of oligodendroglial cell number by the miR-17-92 cluster*. Development 137, 2127–2132.
- Burns, K.A., Korach, K.S. (2012). *Estrogen receptors and human disease: an update*. Arch. Toxicol. 86 (10) 1491–1504.

- Chattopadhyay, S., & Sen, G. C. (2014). *Tyrosine phosphorylation in Toll-like receptor signaling*. Cytokine and Growth Factor Reviews, 25(5), 533–541.
- Cho, M.H., Cho, K., Kang, H.J., Jeon, E.Y., Kim, H.S., Kwon, H.J., Kim, H.M., Kim, D.H., Yoon, S.Y. (2014). *Autophagy in microglia degrades extracellular beta-amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome*. Autophagy 10, 1761–1775.
- Colonna, M.; Butovsky, O. (2017). *Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration*. Annu. Rev. Immunol., 35, 441–468.
- Compston, A., & Coles, A. (2008). *Multiple sclerosis*. The Lancet, 372(9648), 1502–1517.
- Confavreux, C., Hutchinson, M., Hours, M.M., Cortinovis-Tourniaire, P., Moreau, T. (1998). *Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis*. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. N Engl J Med. 339(5):285-91.
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). *Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)*. British Journal of Pharmacology, 164(4), 1079–1106.
- Crane, D. D., Bauler, T. J., Wehrly, T. D., and Bosio, C. M. (2014). *Mitochondrial ROS potentiates indirect activation of the AIM2 inflammasome*. Front. Microbiol. 5:438.
- Crespo-Castrillo, A., Yanguas-Casás, N., Arevalo, M.A., Azcoitia, I., Barreto, G.E., Garcia-Segura, L.M. (2018). *The Synthetic Steroid Tibolone Decreases Reactive Gliosis and Neuronal Death in the Cerebral Cortex of Female Mice After a Stab Wound Injury*. Mol Neurobiol. Nov;55(11):8651-8667.
- Cua, D.J., Groux, H., Hinton, D.R., Stohlman, S.A., Coffman, R.L. (1999). *Transgenic Interleukin 10 Prevents Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. J Exp Med. Mar 15; 189(6): 1005–1010.
- Cunningham, M., Gilkeson, G. (2016). *Estrogen receptors in immunity and autoimmunity*. Clin. Rev. Allergy Immunol. 40 (1) 66–73.
- da Silva, L. C., Lima, I. V. de A., da Silva, M. C. M., Corrêa, T. A., de Souza, V. P., de Almeida, M. V., de Oliveira, A. C. P., & Ferreira, A. P. (2020). *A new lipophilic amino alcohol, chemically similar to compound FTY720, attenuates the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by PI3K/Akt pathway inhibition*. International Immunopharmacology, 88(June), 106919.
- Dalal, M., Kim, S., Voskuhl, R.R. (1997). *Testosterone Therapy Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Induces a T Helper 2 Bias in the Autoantigen-Specific T Lymphocyte Response*. J Immunol. Jul 1;159(1):3-6.
- Dang, E.V., J. Barbi, J., H.Y. Yang, H.Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H.R., Luo, W., Zeller, K., Shimoda, L., Topalian, S.L., Semenza, G.L., Dang, C.V., Pardoll, D.M., Pan, F. (2011). *Control of TH17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1*. Cell 146: 772–784.

- De Nicola, A.F., Garay, L.I., Meyer, M., Guennoun, R., Sitruk-Ware, R., Schumacher, M., Gonzalez Deniselle, M.C. (2018). *Neurosteroidogenesis and progesterone anti-inflammatory/neuroprotective effects*. J Neuroendocrinol;30(2).
- de Rivero Vaccari, J.P., Patel, H.H., Brand, F.J. 3rd, Perez-Pinzon, M.A., Bramlett, H.M., Raval, A.P. (2016). *Estrogen receptor beta signaling alters cellular inflammasomes activity after global cerebral ischemia in reproductively senescence female rats*. J Neurochem. 2016;136:492-496.
- Delgoffe, G.M., K.N.Pollizzi, K.N., A.T.Waickman, A.T., Heikamp, E., Meyers, D.J., Horton, M.R. Xiao, B., Worley, P.F., Powell, J.D. et al. (2011). *The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2*. Nat. Immunol. 12: 295–303.
- Denes, A., Coutts, G., Lenart, N., Cruickshank, S.M., Pelegrin, P., Skinner, J., Rothwell, N., Allan, S.M., Brough, D. (2015). *AIM2 and NLRC4 inflammasomes contribute with ASC to acute brain injury independently of NLRP3*. Proc Natl Acad Sci USA. 2015;112:4050-4055.
- Desai, M. K., & Brinton, R. D. (2019). *Autoimmune disease in women: Endocrine transition and risk across the lifespan*. Frontiers in Endocrinology, 10(APR).
- Dugas, J.C., Cuellar, T.L., Scholze, A., Ason, B., Ibrahim, A., Emery, B., Zamanian, J.L., Foo, L.C., McManus, M.T., Barres, B.A. (2010) *Dicer1 and miR-219 are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination*. Neuron 65, 597–611.
- Emery, B. (2010). *Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination*. Science 330, 779–782.
- Espinosa-Raya, J., Neri-Gómez, T., Orozco-Suárez, S., Campos, M.G., Guerra-Araiza, C. (2012). *Chronic administration of tibolone modulates anxiety-like behavior and enhances cognitive performance in ovariectomized rats*. Horm Behav. 61:76–83.
- Falcão, A. M., van Bruggen, D., Marques, S., Meijer, M., Jäkel, S., Agirre, E., Samudyata, Floriddia, E. M., Vanichkina, D. P., French-Constant, C., Williams, A., Guerreiro-Cacais, A. O., & Castelo-Branco, G. (2018). *Disease-specific oligodendrocyte lineage cells arise in multiple sclerosis*. Nature Medicine, 24(12), 1837–1844.
- Fan, W., Morinaga, H., Kim, J.J., Bae, E., Spann, N.J., Heinz, S., Glass, C.K., Olefsky, J.M. (2010). *FoxO1 regulates Tlr4 inflammatory pathway signalling in macrophages*. EMBO J. 29: 4223–4236.
- Fancy, S.P., Baranzini, S.E., Zhao, C., Yuk, D.I., Irvine, K.A., Kaing, S., Sanai, N., Franklin, R.J.M., Rowitch, D.H. (2009). *Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS*. Genes Dev. 23, 1571–1585.
- Ferguson, B., Matyszak, M.K., Esiri, M.M., Perry, V.H. (1997). *Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions*. Brain.120 (Pt 3):393-9.
- Festuccia, W. T., Pouliot, P., Bakan, I., Sabatini, D. M., & Laplante, M. (2014). *Myeloid-specific rictor deletion induces M1 macrophage polarization and potentiates in vivo pro-inflammatory response to lipopolysaccharide*. PLoS ONE, Apr 16;9(4):e95432.9(4).

- Finkelsztein, A., Brooks, J.B., Paschoal Jr., F.M., Fragoso, Y.D. (2011). *What can we really tell women with multiple sclerosis regarding pregnancy? A systematic review and meta-analysis of the literature.* BJOG 118 790-7.
- Franco, R., Fernández-Suárez, D. (2015). *Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system.* Prog. Neurobiol., 131, 65–86.
- Freeman, L. C., & Ting, J. P. Y. (2016). *The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases.* Journal of Neurochemistry, 136, 29–38.
- Garay, L., Gonzalez Deniselle, M.C., Lima, A., Roig, P., De Nicola, A.F. (2007). *Effects of progesterone in the spinal cord of a mouse model of multiple sclerosis.* J Steroid Biochem Mol Biol. Nov-Dec;107(3-5):228-37.
- Garay, L., Gonzalez Deniselle, M.C., Meyer, M., Costa, J.J., Lima, A., Roig, P., De Nicola, A.F. (2009) *Protective effects of progesterone administration on axonal pathology in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis.* Brain Res. Aug 4; 1283:177-85.
- Garay, L.I., González Deniselle, M.C., Brocca, M.E., Lima, A., Roig, P., De Nicola, A.F. (2012). *Progesterone down-regulates spinal cord inflammatory mediators and increases myelination in experimental autoimmune encephalomyelitis.* Neuroscience, 226, 40–50.
- Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S.R., Jangamreddy, J.R., Mehrpour M., Christofferson, J., Chaabane, W., Moghadam, A.R., Kashani H.H., Hashemi, M., Owji, A.A., Łos, M.J., (2014). *Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders.* Prog Neurobiol.;112:24–49.
- Gholamzad, M., Ebtekar, M., Ardestani, M. S., Azimi, M., Mahmodi, Z., Mousavi, M. J., & Aslani, S. (2019). *A comprehensive review on the treatment approaches of multiple sclerosis: currently and in the future.* Inflammation Research, 68(1), 25–38.
- Gilmore, W., Weiner, L.P., Correale, J. (1997). *Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects.* J Immunol; 158:446–51.
- Gitto, L. (2017). Chapter 2: *Living with Multiple Sclerosis in Europe: Pharmacological Treatments, Cost of Illness, and Health-Related Quality of Life Across Countries.* En Zagon, I.S., McLaughlin, P.J. *Multiple Sclerosis – Perspectives in Treatment and Pathogenesis Cover.* Brisbane, Australia: Codon Publications. 187 páginas. ISBN: 978-0-9944381-3-3.
- Glass, C.K.; Saijo, K.; Winner, B.; Marchetto, M.C.; Gage, F.H. (2010). *Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration.* Cell 2010, 140, 918–934.
- Gombault, A., Baron, L., Couillin, I. (2012). *ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation.* Front Immunol. 3:414.
- Gong, D., Shi, W., Yi, S.J., Chen, H., Groffen, J., Heisterkamp, N. (2012). *TGFβ signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation.* BMCImmunol. 13: 31.

- Govindarajan, V., De Rivero Vaccari, J. P., & Keane, R. W. (2020). *Role of inflammasomes in multiple sclerosis and their potential as therapeutic targets*. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 1–15.
- Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hanneschläger, N., Endres, S., Hartmann, G., Tardivel, A., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Mocsai, A., Tschopp, J., Ruland, J. (2009). *Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence*. *Nature*, 459, 433–436.
- Guarda, G., Zenger, M., Yazdi, A.S., Schroder, K., Ferrero, I., Menu, P., Tardivel, A., Mattmann, C., Tschopp, J. (2011). *Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells*. *J Immunol.*; 186:2529-2534.
- Hallgren, B., Sourander, P. (1958). *The effect of age on the non-haemin iron in the human brain*. *J. Neurochem.*;3(1):41-51.
- Han, S.J., Jung, S.Y., Wu, S.P., Hawkins, S.M., Park, M.J., Kyo, S. Qin, J., Lydon, J.P., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., DeMayo, F.J., O'Malley, B.W. (2015). *Estrogen receptor beta modulates apoptosis complexes and the inflammasome to drive the pathogenesis of endometriosis*. *Cell*. 163:960-974.
- Hart, F.M. & Bainbridge, J. (2016). *Current and emerging treatment of multiple sclerosis*. *Am J Manag Care*. Jun;22(6 Suppl):s159-70.
- Hartline, D.K. & Colman, D.R. (2007). *Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers*. *Curr. Biol*. 17, R29–R35.
- Hassanpour, M., Hajihassani, F., Hiradfar, A., Aghamohammadzadeh, N., Rahbarghazi, R., Safaie, N., Nouri, M., & Panahi, Y. (2020). *Real-state of autophagy signaling pathway in neurodegenerative disease; Focus on multiple sclerosis*. *Journal of Inflammation (United Kingdom)*, 17(1), 1–8.
- He, A., Shao, J., Zhang, Y., Lu, H., Wu, Z., Xu, Y. (2017). *CD200Fc reduces LPS-induced IL-1 β activation in human cervical cancer cells by modulating TLR4-NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathway*. *Oncotarget* 2017, 8, 33214–33224.
- Hidalgo-Lanusca, O., Ávila-Rodríguez, M., Baez-Jurado, E., Zamudio, J., Echeverría, V., García-Segura, L. M., & Barreto, G. E. (2018). *Tibolone Reduces Oxidative Damage and Inflammation in Microglia Stimulated with Palmitic Acid through Mechanisms Involving Estrogen Receptor Beta*. *Molecular Neurobiology*, 55(7), 5462–5477.
- Hofstetter, H.H., Shive, C.L., Forsthuber, T.G. (2002). *Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells*. *J Immunol*. Jul 1;169(1):117-25.
- Høglund, R.A.; & Maghazachi, A.A. (2014). *Multiple sclerosis and the role of immune cells*. *World J. Exp. Med*. 2014, 4, 27–37.
- Holland, J., Bandelow, S., Hogervorst, E. (2011). *Testosterone levels and cognition in elderly men: a review*. *Maturitas* 2011 Aug; 69(4):322-37.

- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K.A., Latz, E. (2008). *Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization*. Nat. Immunol. 9, 847–856.
- Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P., Pietrowski, E., Bechmann, I., Becher, B., Luhmann, H.J., Waisman, A., Kuhlmann, C.R.W. (2010). *Cellular mechanisms of IL-17-induced blood–brain barrier disruption*. Faseb J 24:1023–1034.
- Inoue, M., Shinohara, M.L. (2013). *NLRP3 Inflammasome and MS/ EAE*. Autoimmune Dis 2013; 2013:859145.
- Iyer, S.S., He, Q., Janczy, J.R., Elliott, E.I., Zhong, Z., Olivier, A.K., Sadler, J.J., Knepper-Adrian, V., Han, R., Qiao, L., Eisenbarth, S.C. 7, Nauseef, W.M., Cassel, S.L., Sutterwala, F.S. (2013). *Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation*. Immunity 39, 311–323.
- Jabir, M. S., Hopkins, L., Ritchie, N. D., Ullah, I., Bayes, H. K., Li, D., Tourlomousis, P., Lupton, A., Puleston, D., Simon, A.K., Bryant, C., Evans, T.J. *Mitochondrial damage contributes to Pseudomonas aeruginosa activation of the inflammasome and is downregulated by autophagy*. Autophagy 11, 166–182.
- Jana, M., Jana, A., Liu, X., Ghosh, S., Pahan, K. (2007). *Involvement of Phosphatidylinositol 3-Kinase-Mediated Up-Regulation of IκBα in Anti-Inflammatory Effect of Gemfibrozil in Microglia*. J. Immunol., 179, 4142–4152.
- Javadian, A., Salehi, E., Bidad, K., Sahraian, M.A., Izad, M. (2014). *Effect of Estrogen on Th1, Th2 and Th17 Cytokines Production by Proteolipid Protein and PHA Activated Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolated From Multiple Sclerosis Patients*. Arch Med Res. Feb;45(2):177-82.
- Jha, S., Srivastava, S.Y., Brickey, W.J., Iocca, H., Toews, A., Morrison, J.P., Chen, V.S., Gris, D., Matsushima, G.K., Ting, J.P.Y. (2010). *The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18*. Journal of Neuroscience, vol. 30, no. 47, pp. 15811–15820.
- Jorgensen, I., Miao, E.A. (2015). *Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens*. Immunol Rev; 265:130–42.
- Kanneganti, T.-D., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.-H., Whitfield, J., Franchi, L., Taraporewala, Z.F., Miller, D., Patton, J.T., Inohara, N., Núñez, G. (2006). *Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA*. J. Biol. Chem., 281, 36560–36568.
- Kelley, N., Jeltama, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). *The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation*. International Journal of Molecular Sciences, 20(13), 1–24.
- Ketelut-Carneiro, N., Silva, G.K., Rocha, F. A., Milanezi, C.M., Cavalcanti-Neto, F. F., Zamboni, D. S., et al. (2015). *IL-18 triggered by the Nlrp3 inflammasome induces host innate resistance in a pulmonary model of fungal infection*. J. Immunol. 194, 4507–4517.

- Khalaj, A. J., Hasselmann, J., Augello, C., Moore, S., & Tiwari-Woodruff, S. K. (2016). *Nudging oligodendrocyte intrinsic signaling to remyelinate and repair: Estrogen receptor ligand effects*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 160, 43–52.
- Kim, J.Y., Shen, F., Dietz, K., He, Y., Howell, O., Reynolds, R., Casaccia, P. (2010) *HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage*. Nat. Neurosci. 13, 180–189.
- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A. (2007). *Inmunología de Kuby*. Sexta edición*. [s.l.]: Mc Graw Hill. ISBN: 13: 978-970-10-6454-2.
- Kipp, M., Nyamoya, S., Hochstrasser, T., Amor, S. (2014). *Multiple sclerosis animal models: A clinical and histopathological perspective*. The Laryngoscope, 49(August), 2–31.
- Kloosterboer, H. J. (2001). *Tibolone: A steroid with a tissue-specific mode of action*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 76(1–5), 231–238.
- Kloosterboer, H. J. (2011). *Historical milestones in the development of tibolone (Livial®)*. Climacteric. Dec;14(6):609-21.
- Kloosterboer, H.J., Ederveen, A.G.H. (2002). *Pros and cons of existing treatment modalities in osteoporosis: a comparison between tibolone, SERMs and estrogen (+/-progestogen) treatments*. J Steroid Biochem Mol Biol. Dec;83(1-5):157-65.
- Kobayashi, K., Hernandez, L.D., Galán, J.E., Janeway Jr., C.A., Medzhitov, R., Flavell, R.A. (2002). *IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling*. Cell 110: 191–202.
- Koch-Henriksen, N., Sørensen, P.S. (2010). *The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology*. Lancet Neurol; 9: 520-32.
- Kornek B, Storch MK, 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(1):267-76.
- Kurebayashi, Y., S. Nagai, S., A. Ikejiri, A. Ohtani, M., Ichiyama, K., Baba, Y., Yamada, T., Egami, S., Hoshii, T., Hirao, A., Matsuda, S., Koyasu, S. (2012). *PI3K-Akt- mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi1 expression and nuclear translocation of RORγ*. Cell Rep. 1: 360–373.
- Lammerding L, Slowik A, Johann S, Beyer C, Zendedel A. (2016). *Poststroke inflammasome expression and regulation in the peri- infarct area by gonadal steroids after transient focal ischemia in the rat brain*. Neuroendocrinology. 103:460-475.
- Lassmann, H., Van Horssen, J., & Mahad, D. (2012). *Progressive multiple sclerosis: Pathology and pathogenesis*. Nature Reviews Neurology, 8(11), 647–656.
- Lee, Y.Y., Park, J.S., Jung, J.S., Kim, D.H., Kim, H.S. (2013). *Anti-inflammatory effect of ginsenoside Rg5 in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells*. Int. J. Mol. Sci., 14, 9820–9833.

- Leicaj, M.L., Pasquini, L., Lima, A., Gonzalez Deniselle, M.C., Pasquini, J.M., De Nicola, A.F., Garay, L.I. (2018). *Changes in neurosteroidogenesis during demyelination and remyelination in cuprizone treated mice*. J Neuroendocrinol;30(11):e12649.
- Liu, C., Li, Y., Yu, J., Feng, L., Hou, S., Liu, Y., Guo, M., Xie, Y., Meng, J., Zhang, H., Xiao, B., Ma, C. (2013). *Targeting the shift from M1 to Macrophages in experimental autoimmune encephalomyelitis mice treated with fasudil*. PLoS ONE 8 (2). (2013) e54841.
- Liu, J., Casaccia, P. (2010). *Epigenetic regulation of oligodendrocyte identity*. Trends Neurosci. 33, 193–201.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method*. Methods, 25(4), 402–408.
- Loma, I., Heyman, R. (2011). *Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment*. Curr. Neuropharmacol. 9, 409–416.
- Lopez-Diego R.S., Weiner H.L. (2008). *Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis? a multifaceted adversary*. Nat. Rev. Drug Discov. 7 (11) 909–925.
- Lublin, F.D., Reingold, S.C. (1996). *Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey*. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. Neurology 46: 907–911.
- Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000). *Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination*. Annals of neurology.47(6):707-17.
- Maghazachi, A.A. (2012). *Role of Chemokines in the Biology of Natural Killer Cells*. Curr Top Microbiol Immunol. 341:37-58.
- Mammana, S., Fagone, P., Cavalli, E., Basile, M. S., Petralia, M. C., Nicoletti, F., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2018). *The role of macrophages in neuroinflammatory and neurodegenerative pathways of alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and multiple sclerosis: Pathogenetic cellular effectors and potential therapeutic targets*. International Journal of Molecular Sciences, 19(3), 1–20.
- Marcus, E.M., Jacobson, S. (2003). *Integrated neuroscience*. Springer-Science+Business Media, LLC.
- Markou A., Duka T., and Prelevic G.M. (2005). *Estrogens and brain function*. Hormones. Vol.4, no. 1, pp.9–17.
- McFarland, H.F., Martin, R. (2007). *Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity*. Nat. Immunol.; 8:913–919.
- McKenzie, B.A., Mamik, M.K., Saito, L.B., Boghozian, R., Monaco, M.C., Major, E.O., Lu, J.Q., Branton, W.G., Power, C. (2018). *Caspase-1 inhibition prevents glial inflammasome activation and pyroptosis in models of multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 26;115(26):E6065-E6074.

- McQualter, J.L., Bernard, C.C. (2007). *Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair*. J Neurochem 100:295–306.
- Meltser, I., Tahera, Y., Simpson, E., Hultcrantz, M., Charitidi, K., Gustafsson, J.A., Canlon, B. (2008). *Estrogen receptor beta protects against acoustic trauma in mice*. J. Clin. Invest. 118 (4) 1563–1570.
- Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N., Ben-Nun, A. (1995). *A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells*. Eur J Immunol 25: 1951–1959.
- Meylan, E., Tschopp, J., and Karin, M. (2006). *Intracellular pattern recognition receptors in the host response*. Nature 442, 39–44.
- Miao, H., Ou, J., Ma, Y., Guo, F., Yang, Z., Wiggins, M., et al. (2014). *Macrophage CGI-58 deficiency activates ROS-inflammasome pathway to promote insulin resistance in mice*. Cell Rep. 7, 223–235.
- Michailov, G.V., Sereda, M.W., Brinkmann, B.G., Fischer, T.M., Haug, B., Birchmeier, C., Role, L., Lai, C., Schwab, M.H., Nave, K.A. (2004). *Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness*. Science 304, 700–703.
- Moldovan, I.R., Cotleur, A.C., Zamor, N., Butler, R.S., Pelfrey, C.M. (2008). *Multiple sclerosis patients show sexual dimorphism in cytokine responses to myelin antigens*. 193(1-2):161-9.
- Murray, P. J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F.O., Mege, J.L., Mosser, D.M., Natoli, G., Saeij, J.P., Schultze, J.L., Shirey, K.A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Ginderachter, J.A., Vogel, S.N., Wynn, T.A. (2014). *Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines*. Immunity, Jul 17;41(1):14-20.
- Nagai, S., Kurebayashi, Y., Koyasu, S. (2013). *Role of PI3K/Akt and mTOR complexes in Th17 cell differentiation*, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1280 (2013) 30–34.
- Nahum, R., Brenner, O., Zahalka, M.A., Traub, L., Quintana, F., Moroz, C. (2004). *Blocking of the placental immune-modulatory ferritin activates Th1 type cytokines and affects placenta development, fetal growth and the pregnancy outcome*. Hum Reprod. 19:715–22.
- Nikic, I., Merkler, D., Sorbara, C., Brinkoetter, M., Kreutzfeldt, M., Bareyre, F.M., Bruck, W., Bishop, D., Misgeld, T., Kerschensteiner, M. (2011). *A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis*. Nature medicine.17(4):495-9.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F. (2005). *Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma In Vivo*. Science, 308, 1314–1319.
- Orihuela, R., McPherson, C.A., Harry, G.J. (2016). *Microglial M1/M2 polarization and metabolic states*. Br. J. Pharmacol., 173, 649–665.
- Palaszynski, K.M., Loo, K.K., Ashouri, J.F., Liu, H., Voskuhl, R.R. (2004). *Androgens are protective in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis*. Journal of Neuroimmunology Volume 146, Issues 1–2, January, Pages 144-152.

- Palumbo, S., Pellegrini, S. (2017). *Chapter 11: Experimental In Vivo Models of Multiple Sclerosis: State of the Art*. En: Zagon, I.S., McLaughlin, P.J. *Multiple Sclerosis – Perspectives in Treatment and Pathogenesis Cover*. Brisbane, Australia: Codon Publications. 187 páginas. ISBN: 978-0-9944381-3-3.
- Park, H.J., Lee, S.J., Kim, S.H., Han, J., Bae, J., Kim, S.J., Park, C.G., Chun, T. (2011). *IL-10 inhibits the starvation induced autophagy in macrophages via class I phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway*. *Mol. Immunol.* 48: 720– 727.
- Paudel, Y.N., Angelopoulou, E., Bhuvan, K.C., Piperi, C., Othman, I. (2019). *High mobility group box 1 (HMGB1) protein in Multiple Sclerosis (MS): Mechanisms and therapeutic potential*. *Life Sci. Dec* 1;238:116924.
- Pearce, L.R., Komander, D., Alessi, D.R. (2010) *The nuts and bolts of AGC protein kinases*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 9–22
- Perry, V.H. (2010). *Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration*. *Acta Neuropathol.* Sep;120(3):277-86.
- Piaton, G., Gould, R.M., Lubetzki, C. (2010) *Axon–oligodendrocyte interactions during developmental myelination, demyelination and repair*. *J. Neurochem.* 114, 1243–1260.
- Pinto-Almazán R., Calzada-Mendoza C.C., Campos-Lara M.G., and Guerra-Araiza C. (2012). *Effect of chronic administration of estradiol, progesterone, and tibolone on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β and the micro- tubule-associated protein tau in the hippocampus and cerebellum of female rat*. *Journal of Neuroscience Research*, vol.90, no. 4, pp. 878–886.
- Pinto-Almazán, R., Rivas-Arancibia, S., Farfán-García, E.D., Rodríguez-Martínez, E., Guerra-Araiza, C. (2014). *Neuroprotective effects of tibolone against oxidative stress induced by ozone exposure*. *Rev Neurol.* May 16;58(10):441-8.
- Pinto-Almazán, R., Segura-Uribe, J. J., Farfán-García, E. D., & Guerra-Araiza, C. (2017). *Effects of Tibolone on the Central Nervous System: Clinical and Experimental Approaches*. *BioMed Research International*, 2017.
- Prieto, A., Díaz, D., Barcenilla, H., Castrillo, C., Monserrat, J., Merino, A.G., Alvarez-Mon, M., GENIO II-group. (2006). *Increased spontaneous ex vivo apoptosis and subset alterations in peripheral blood T cells from patients with multiple sclerosis*. *J Clin Immunol*; 26:101–12.
- Racke, M.K., Bonomo, A., Scott, D.E., Cannella, B., Levine, A., Raine, C.S., Shevach, E.M., Röcken, M. (1994). *Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease*. *J Exp Med.* Nov 1;180(5):1961-6.
- Ransohoff, R.M. & Brown, M.A. (2012). *Innate immunity in the central nervous system*. *J. Clin. Investig.* 2012, 122, 1164–1171.

- Reed, M.J., Kloosterboer, H.J. (2004). *Tibolone: a selective tissue estrogenic activity regulator (STEAR)*. Maturitas. Aug 30;48 Suppl 1:S4-6.
- Rocher, C., Singla, D.K. (2013). *SMAD-PI3K-Akt-mTOR pathway mediates BMP-7 polarization of monocytes into M2 macrophages*. PLoS One 8: e84009.
- Runmarker, B., Andersen, O. (1995). *Pregnancy is associated with a lower risk of onset and a better prognosis in multiple sclerosis*. Brain 118:253–261.
- Sahoo, S., Meijles, D.N., Pagano, P.J. (2016). *NADPH oxidases: key modulators in aging and age-related cardiovascular diseases?* Clin Sci (Lond) 130:317–335.
- Sarvari, M., Hrabovszky, E., Kallo, I., Solymosi, N., Tóth, K., Likó, I., Széles, J., Mahó, S., Molnár, B., Liposits, Z. (2011). *Estrogens regulate neuroinflammatory genes via estrogen receptors alpha and beta in the frontal cortex of middle-aged female rats*. J Neuroinflammation. 8:82.
- Sauer, S., L. Bruno, L., A. Hertweck, A., Finlay, D., Leleu, M., Spivakov, M., Knight, Z.A., Cobb, B.S., Cantrell, D., O'Connor, E., Shokat, K.M., Fisher, A.G., Merckenschlager, M. (2008). *T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 7797– 7802.
- Savage, C.D., Lopez-Castejon, G., Denes, A., Brough, D. (2012). *NLRP3-inflammasome activating dampers stimulate an inflammatory response in glia in the absence of priming which contributes to brain*. Front Immunol., 18;3:288.
- 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: 464–68
- Schoenborn, J. R., & Wilson, C. B. (2007). *Regulation of Interferon-γ During Innate and Adaptive Immune Responses*. Advance Immunology. 96:41-101.
- Schroder, K., Tschopp, J. (2010). *The inflammasomes*. Cell;140:821–32.
- Shao, B. Z., Xu, Z. Q., Han, B. Z., Su, D. F., & Liu, C. (2015). *NLRP3 inflammasome and its inhibitors: A review*. Frontiers in Pharmacology, 6(NOV), 1–9.
- Sheedy, F.J., Grebe, A., Rayner, K.J., Kalantari, P., Ramkhelawon, B., Carpenter, S.B., Christine, Becker, E., Ediriweera, H.N., Mullick, A.E., Golenbock, D.T., Stuart, L.M., Latz, E., Fitzgerald, K.A., Moore, K.J. (2013). *CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation*. Nat. Immunol. 14, 812–820.
- Shemer, A., Jung, S. (2015). *Differential roles of resident microglia and infiltrating monocytes in murine CNS autoimmunity*. Semin. Immunopathol. 37, 613–623.
- Sherman, D.L. and Brophy, P.J. (2005). *Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth*. Nat. Rev. Neurosci. 6, 683–690.

- Shi, J.J., Zhao, Y., Wang, Y.P., Gao, W.Q., Ding, J.J., Li, P., Hu, L., Shao, F. (2014). *Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS*. Nature; 514:187.
- Shi, L.Z., Wang, R., G. Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D.R., Chi, H. (2011). *HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells*. J. Exp. Med. 208: 1367–1376.
- Shin, D., Shin, J.Y., McManus, M.T., Ptáček, L.J., Fu, YH. (2009). *Dicer ablation in oligodendrocytes provokes neuronal impairment in mice*. Annu. Neurol. 66, 843–857.
- Shiratsuchi, H., Basson, M.D. (2007). *Akt2, but not Akt1 or Akt3 mediates pressure-stimulated serum-opsinized latex bead phagocytosis through activating mTOR and p70 S6 kinase*. J. Cell. Biochem. 102: 353–367.
- Simard, J., Gingras, S. (2001). *Crucial role of cytokines in sex steroid formation in normal and tumoral tissues*. Mol Cell Endocrinol; 171: 25–40.
- Simons, M., Trotter, J. (2007). *Wrapping it up: the cell biology of myelination*. Curr. Opin. Neurobiol. 17, 533–540.
- Slowik, A., Lammerding, L., Hoffmann, S., Beyer, C., (2018). *Brain inflammasomes in stroke and depressive disorders: Regulation by oestrogen*. J Neuroendocrinol. Feb;30(2).
- Ślusarczyk, J., Trojan, E., Głombik, K., Budziszewska, B., Kubera, M., Lasoń, W., Popiołek-Barczyk, K., Mika, J., Wedzony, K., Basta-Kaim, A. (2015). *Prenatal stress is a vulnerability factor for altered morphology and biological activity of microglia cells*. Front. Cell. Neurosci., 9, 82.
- Ślusarczyk, J., Trojan, E., Głombik, K., Piotrowska, A., Budziszewska, B., Kubera, M., Popiołek-Barczyk, K., Lasoń, W., Mika, J., & Basta-Kaim, A. (2018). *Targeting the NLRP3 inflammasome-related pathways via tianeptine treatment-suppressed microglia polarization to the M1 phenotype in lipopolysaccharide-stimulated cultures*. International Journal of Molecular Sciences, 19(7), 1–23.
- Smith, J.A.; Das, A.; Ray, S.K.; Banik, N.L. (2012). *Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases*. Brain Res. Bull. 2012, 87, 10–20.
- Storch, M.K., Stefferl, A., Brehm, U., Weissert, R., Wallström, E., Kerschensteiner, M., Olsson, T., Linington, C., Lassmann, H. (1998). *Autoimmunity to Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein in Rats Mimics the Spectrum of Multiple Sclerosis Pathology*. Brain Pathol. Oct;8(4):681-94.
- Sun, D., Zhang, Y., Wei, B., Peiper, S.C., Shao, H., Kaplan, H.J. (2003). *Encephalitogenic activity of truncated myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptides and their recognition by CD8+ MOG-specific T cells on oligomeric MHC class I molecules*. Int. Immunol. 15. 261–268.
- Taveggia, C., Feltri, M.L., Wrabetz, L. (2010). *Signals to promote myelin formation and repair*. Nat. Rev. Neurol. 6, 276–287.
- Taveggia, C., Zanazzi, G., Petrylak, A., Yano, H., Rosenbluth, J., Einheber, S., Xu, X., Esper, R.M., Loeb, J.A., Shrager, P., Chao, M.V., Falls, D.L., Role, L., Salzer, J.L. Taveggia, C. (2005). *Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons*. Neuron 47, 681–694.

- Tawk, M., Makoukji, J., Belle, M. Fonte, C., Trousson, A., Hawkins, T., Li, H., Ghandour, S., Schumacher, M., Massaad, C. (2011). *Wnt/b-catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelinogenesis*. J. Neurosci. 31, 3729–3742.
- Thakkar, R., Wang, R., Sareddy, G., Wang, J., Thiruvaiyaru, D., Vadlamudi, R., Zhang, Q., Brann, D. (2016). *NLRP3 inflammasome activation in the brain after global cerebral ischemia and regulation by 17beta-estradiol*. Oxid Med Cell Longev. 8309031.
- Thompson, A. J., Baranzini, S. E., Geurts, J., Hemmer, B., & Ciccarelli, O. (2018). *Multiple sclerosis*. The Lancet, 391(10130), 1622–1636.
- Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., Zhao, J.J. (2015). *PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting*. Nat. Rev. Cancer 15, 7-24.
- Trager, U., Tabrizi, S.J. (2013). *Peripheral inflammation in neurodegeneration*. J. Mol. Med. (Berl); 91(6):673-81.
- Trapp, B.D., Nave, K.A. (2008). *Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?* Annu Rev Neurosci 31:247–269.
- Trendelenburg G. (2014) *Molecular regulation of cell fate in cerebral ischemia: role of the inflammasome and connected pathways*. J Cereb Blood Flow Metab. 34:1857-1867.
- Tseng, W. A., Thein, T., Kinnunen, K., Lashkari, K., Gregory, M. S., D’amore, P. A., Ksander, B.R. (2013). *NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells by lysosomal destabilization: implications for age-related macular degeneration*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54, 110–120.
- Tsiperson, V., Gruber, R.C., Goldberg, M.F., Jordan, A., Weinger, J.G., Macian, F., Shafit-Zagardo, B. (2013). *Suppression of inflammatory responses during myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis is regulated by AKT3 signaling*. J. Immunol. 190: 1528–1539.
- Van Beek, E.M.; Cochrane, F.; Barclay, A.N.; van den Berg, T.K. (2005). *Signal regulatory proteins in the immune system*. J. Immunol. 2005, 175, 7781–7787.
- Van Horssen, J., Witte, M.E., Schreibelt, G., De Vries, H.E. (2011). *Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Mol Basis Dis.; 1812(2):141–50.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M. and Bilanges, B. (2010). *The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 329-341.
- Aguiar, R.B., Dickel, O.E., Cunha, R.W., Monserrat, J.M., Barros, D.M., Martinez, P.E. (2008). *Estradiol valerate and tibolone: Effects upon brain oxidative stress and blood biochemistry during aging in female rats*. Biogerontology, 9(5), 285–298.
- Vergadi, E., Ieronymaki, E., Lyroni, K., Vaporidi, K., & Tsatsanis, C. (2017). *Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization*. The Journal of Immunology, 198(3), 1006–1014.
- Vergadi, E., Vaporidi, K., Theodorakis, E.E., Doxaki, C., Lagoudaki, E., Ieronymaki, E., Alexaki, V.I., Helms, M., Kondili, E., Soennichsen, B., Stathopoulos, E.N., Margioris, A.N., Georgopoulos, D.,

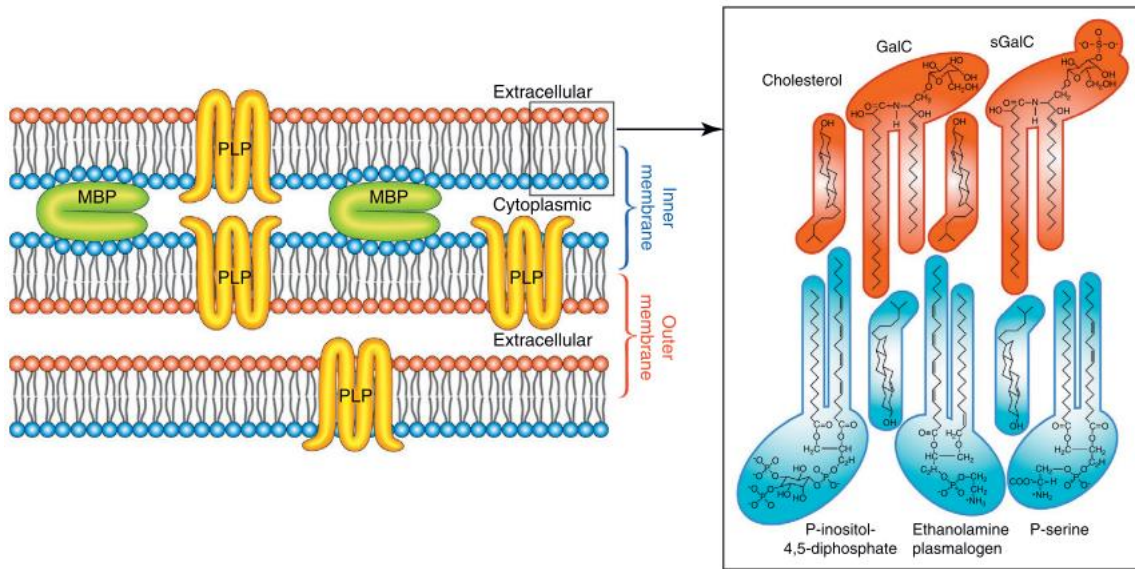
- Tsatsanis, C. (2014). *Akt2 deficiency protects from acute lung injury via alternative macrophage activation and miR-146a induction in mice*. J. Immunol. 192: 394–406.
- Vergouwen, M.D.I., Anderson, R.E., Meyer, F.B. (2000). *Gender differences and the effects of synthetic exogenous and non- synthetic estrogens in focal cerebral ischemia*, Brain Research, vol. 878, no. 1-2, pp. 88–97.
- Verheul, H.A.M., van Iersel, M.L.P.S., Delbressine, L.P.C., Kloosterboer, H.J. (2007). *Selective tissue distribution of tibolone metabolites in mature ovariectomized female cynomolgus monkeys after multiple doses of tibolone*. Drug Metab Dispos. Jul;35(7):1105-11.
- Waisman, A., Hauptmann, J., & Regen, T. (2015). *The role of IL-17 in CNS diseases*. Acta Neuropathologica, 129(5), 625–637.
- Waxman, S.G. (2006). *Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels*. Nat. Rev. Neurosci. 7, 932–941.
- Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L., Mosmann, T.R. (1993). *Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?* Immunol Today. 14:353–6.
- Witte, M. E., Mahad, D. J., Lassmann, H., & van Horssen, J. (2014). *Mitochondrial dysfunction contributes to neurodegeneration in multiple sclerosis*. Trends in Molecular Medicine, 20(3), 179–187.
- Wu, J.J., Quijano, C., Chen, E., Liu, H., Cao, L., Fergusson, M.M., Rovira, I.I., Gutkind, S., Daniels, M.P., Komatsu, M., Finkel, T. (2009). *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy*. Aging.; 1(4):425.
- Xu, Y., Sheng, H., Bao, Q., Wang, Y., Lu, J., Ni, X. (2016). *NLRP3 inflammasome activation mediates estrogen deficiency-induced depression-and anxiety-like behavior and hippocampal inflammation in mice*. Brain Behav Immun. 56:175-186.
- Yang, H.M., Yang, S., Huang, S.S., Tang, B.S., Guo, J.F. (2017). *Microglial activation in the pathogenesis of Huntington's Disease*. Front. Aging Neurosci., 9, 193.
- Yang, J., Wise, L., & Fukuchi, K. I. (2020). *TLR4 Cross-Talk With NLRP3 Inflammasome and Complement Signaling Pathways in Alzheimer's Disease*. Frontiers in Immunology, 11(April), 1–16.
- Yang, J.L., Zhao, Y., Shao, F. (2015). *Non-canonical activation of inflammatory caspases by cytosolic LPS in innate immunity*. Curr Opin Immunol; 32:78–83.
- Ye, Y., Jin, T., Zhang, X., Zeng, Z., Ye, B., Wang, J., Zhong, Y., Xiong, X., & Gu, L. (2019). *Meisoindigo Protects Against Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation and Regulating Microglia/Macrophage Polarization via TLR4/NF-κB Signaling Pathway*. Frontiers in Cellular Neuroscience, 13(December), 1–18.
- Yurube, T., Ito, M., Kakiuchi, Y., Kuroda, R., & Kakutani, K. (2020). *Autophagy and mTOR signaling during intervertebral disc aging and degeneration*. Jor Spine, 3(1), 1–13.

- Zawadzka, M. & Franklin, R.J.M. (2010). *Myelin regeneration in demyelinating disorders: new developments in biology and clinical pathology*. *Curr. Opin. Neurol.* 20, 294–298.
- Zhang, B., Ma, Y., Guo, H., Sun, B., Niu, R., Ying, G., Zhang, N. (2009). *Akt2 is required for macrophage chemotaxis*. *Eur J Immunol.* Mar;39(3):894-901.
- Zhao, X., He, X., Han, X., Yu, Y., Ye, F., Chen, Y., Hoang, T., Xu, X., Mi, Q.S., Xin, M., Wang, F., Appel, B., Lu, Q.R. (2010). *MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation*. *Neuron* 65, 612–626.
- Zhuang, Y., Yasinta, M., Hu, C., Zhao, M., Ding, G., Bai, M., Yang, L., Ni, J., Wang, R., Jia, Z., Huang, S., Zhang, A. (2015). *Mitochondrial dysfunction confers albumin-induced NLRP3 inflammasome activation and renal tubular injury*. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 308, F857– F866.

Anexos

Anexo A

Estructura de la vaina de mielina con sus componentes mayoritarios y a la derecha, la estructura de los lípidos mayoritarios (imagen extraída de Aggarwal et al., 2011).



Anexo B

Solución de ketamina para la anestesia (ver Tabla IX).

TABLA IX: componentes y cantidades la solución de anestesia.

Componente	Cantidad
Xilacina (10 mg/kg)	200 ul
Ketamina (100 mg/kg)	750 ul
Solución salina de cloruro de sodio (NaCl) (0,9%)	2800 ul

Anexo C

Los cebadores utilizados para la cuantificación por qPCR (ver Tabla X).

TABLA X: información de cebadores utilizados, a saber, código de acceso en NCBI (*National Center of Biotechnology Information*), secuencias de ambos cebadores.

Gen	Número de acceso	Secuencia Forward (5 – 3')	Secuencia Reverse (5 – 3')
CD11B	NM_001082960	AAACCACAGTCCCAGAGAGA	CGTGTCACCAGCTGGCTTA
Ciclofilina B	M19533	GTGGCAAGATCGAAGTGGAGAAAC	TAAAAATCAGGCCTGTGGAATGTG
ER α	NM_007956	GATCCCACCATGCACAGTGA	GGAGCATCTACAGGAACACAGGTA
ER β	NM_207707	CCAGACTGCAAGCCCAAATGT	AGAAGCGATGATTGGCAGTGG
IL-18	NM_008360	TGCCAAAAGGAAGATGATGC	ACACAAACCTCCCCACCTA
IL-1 β	NM_008361	CCATGGCACATTCTGTTCAAA	GCCCATCAGAGGCAAGGA
MBP	NM_001025100	ATCCAAGTACCTGGCCACAG	CCTGTCACCGCTAAAGAAGC
mTOR	NM_020009	CAGTTCGCCAGTGGACTGAAG	GCTGGTCATAGAAGCGAGTAGAC
NF-kB	DQ020177	GCCTACCCGAAACTCAACTTC	CTCTTTGGAACAGGTGCAGAC
NLRP3	NM_145827	AGCCTTCAGGATCCTCTTC	CTTGGGCAGCAGTTTCTTTC
TLR4	NM_021297	GGCTCCTGGCTAGGACTCTGA	TCTGATCCATGCATTGGTAGGT

Anexo D

Para la preparación del Buffer de lisis se mezclaron los componentes de la Tabla XI, se llevó a volumen con agua RO y a pH de 7,4.

TABLA XI: componentes del Buffer de lisis de WB.

Componente	Cantidad para 30 ml
Tris HCl 50 mM	182 ng
NaCl 150 mM	262,98 ng
EDTA 2 mM	22,32 ng
Na ₃ VO ₄ 1 mM	5,5 ng
Triton 1% 100X	300 ul

Al momento del uso, se le agregaron dos soluciones de inhibidores (ver Tabla XII e XIII).

TABLA XII: componente para los inhibidores para proteínas fosforiladas.

Componente	Cantidad para 50 ml de Buffer de lisis
NaF	0,5 ml

Para la preparación de la segunda solución de inhibidores, los componentes tuvieron que armarse de la siguiente manera: el PMSF 200 mM fue disuelto en etanol puro mientras que

para el inhibidor 25X se diluyó una pastilla en 2 ml de Buffer de lisis, luego, se mezclaron en las cantidades indicadas por la Tabla XIII.

TABLA XIII: componentes para la segunda solución de inhibidores.

Componente	Cantidad para 50 ml de Buffer de lisis
PMSF 200 mM	0,25 ml
Inhibidor de proteasas 25X (Roche Diagnostics)	2 ml

Anexo E

Para la preparación del *Sample buffer* se mezclaron los componentes de la Tabla XIV y al momento del uso de colocaron 50 ul de β -mercaptoetanol por 950 ul de *Sample buffer*.

TABLA XIV: componentes para la preparación del *Sample buffer*.

Componente	Cantidad para 30 ml
H ₂ O destilada	3,55 ml
HCl 0,5 M de pH 6,8	1,25 ml
glicerol	2,5 ml
SDS al 10%	2 ml
Azul de Bromofenol al 0,5%	0,2 ml

Anexo F

Los componentes de los geles se armaron como se describe a continuación:

La solución de Tris-HCl 0,5 M de pH 6,8 se armó diluyendo 6 g en 60 ml de agua RO y ajustando su pH a 6,8 utilizando HCl 6 N. Luego se llevó a volumen final de 100 ml con agua RO. Para la preparación del buffer de Tris-HCl 0,5 M de pH 8,8 se pesaron 27,23 g que se diluyeron en 80 ml de agua RO y se ajustó el pH con HCl 6 N. Por último, se llevó a volumen final de 150 con agua RO. El SDS al 10% fue preparado con 10 g de él en 90 ml de agua RO, y luego llevado a volumen final de 100 ml. La bis/acrilamida al 30% fue preparada pesando 14,6 g de acrilamida y 0,4 g de bisacrilamida y llevándolo a volumen de 30 ml. Luego se completó a 50 ml de volumen final. En todo momento se lo protegió de la luz.

Anexo G

Para la preparación del Buffer de corrida, en primer lugar, se armó un buffer concentrado al 10X mezclando los componentes de la Tabla XV y llevándolo a volumen con agua RO y pH 8,3.

TABLA XV: componentes para elaborar el Buffer de corrida.

Componente	Cantidad para 1 L
Tris base	30,3 g
Glicina	144 g
SDS	10 g

Para la corrida de electroforesis se diluyó el buffer a 1X.

Anexo H

En primer lugar, se armó Buffer de transferencia 10X mezclando 30,3 g de Tris base y 144 g de Glicina en 1 L de agua RO. Luego, para preparar el 1X se mezclaron en orden (para evitar la precipitación) los componentes que figuran en la Tabla XVI.

TABLA XVI: componentes para preparar el Buffer de transferencia.

Componente	Cantidad para 1 L
Buffer de transferencia 10X	100 ml
H ₂ O RO	700 ml
Metanol	200 ml

Anexo I

Para la preparación de TBS 10X se mezclaron 88 g de NaCl con 24 g de Tris base y se llevó a volumen final de 1 L y pH 7,7. Para el TBS-T se debía agregar 0,1 % de Tween 20.

Anexo J

Para el preparado de luminol se mezclaron 22 mg en 500 ul de DMSO (dimetil sulfóxido) mientras que para el cumárico 7,4 mg en 500 ul de DMSO.

Anexo K

Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el WB (ver Tabla XVII).

TABLA XVII: información de los anticuerpos usados en WB.

Anticuerpo	Dilución	Marca, # Catálogo
Primario anti Akt (hecho en conejo)	1/1000	Cell Signaling, #4685
Primario anti Beclin-1 (hecho en ratón)	1/1000	Santa Cruz Biotechnology, #SC-48341
Primario anti caspasa-1 (hecho en ratón)	1/500	Santa Cruz Biotechnology, #SC-56036
Primario anti ER β (hecho en ratón)	1/500	Santa Cruz Biotechnology, #SC-390243
Primario anti HMGB1 (hecho en ratón)	1/750	Santa Cruz Biotechnology, #SC-56698
Primario anti MBP (hecho en conejo)	1/1000	Abcam #AB-40390
Primario anti p-Akt (hecho en conejo)	1/1000	Cell Signaling, #92415
Primario anti TLR4 (hecho en ratón)	1/500	Santa Cruz Biotechnology, #SC-293072
Primario anti β -Actin (hecho en ratón)	1/1000	Santa Cruz Biotechnology, #SC-47778
Secundario anti conejo HRP	1/1000	Bio-Rad, #1706515
Secundario anti ratón HRP	1/1000	Bio-Rad, #170-6516

Anexo L

La preparación del Buffer de *stripping* consistía en la mezcla de los componentes de la Tabla XVIII para luego llevar a pH de 2,2 y volumen de 1 L.

TABLA XVIII: elementos necesarios para preparar el Buffer de *stripping*.

Componente	Cantidad
Glicina	15 g
SDS	1 g
Tween 20	10 ml