



Universidad
Nacional
de Córdoba



FCQ
Facultad de
Ciencias Químicas



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas - Departamento de Química Biológica.

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba CIQUIBIC-
CONICET

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Efecto del tratamiento con diazepam durante la inducción de las alteraciones neuropatológicas en la encefalomiелitis autoinmune experimental

Tesista: Bioq. Nicolás Fernández Hurst

Director de Tesis: Prof. Dr. German A. Roth

Córdoba, Argentina

Signatura 57A 242

Topografia H

N.º inventari 13723

Aguja Auler

Comodin

Fronte

Esquadro

Cadau P.....

Livro

Régua

Fechar de /20

.....

.....

7mL		
-----	--	--

Comisión Asesora:

Dr. German Alfredo Roth (director)

Dra. María Angélica Perillo

Dra. Ana María Cabanillas

Dra. Alicia Laura Degano

Handwritten signatures in blue ink. From top to bottom: a signature for German Alfredo Roth, a signature for María Angélica Perillo, a signature for Ana María Cabanillas, and a signature for Alicia Laura Degano.

Evaluador externo:

Dra. María Silvia Di Genaro

Handwritten signature in blue ink for Dra. María Silvia Di Genaro.

El presente trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo Económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (Secyt- UNC)



"Debe entenderse que todos somos educadores. Cada acto de nuestra vida cotidiana tiene implicancias, a veces significativas. Procuremos entonces enseñar con el ejemplo"

Rene Favaloro

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a German por darme la posibilidad de trabajar en su grupo de investigación, por confiar en mí y apoyarme cuando le propuse cambiar la orientación de la tesis, y por brindarme libertad a la hora de diseñar y hacer los experimentos.

A los miembros de la comisión de tesis: Dra. Degano, Dra. Cabanillas y Dra. Perillo, por la predisposición para asistir a las reuniones, seguimiento y aportes realizados durante todos estos años y en la corrección del manuscrito. A la Dra. María Silvia Di Genaro por aceptar formar parte de la comisión evaluadora, tomarse el tiempo para leer y evaluar el manuscrito.

A la facultad de Ciencias Químicas e instituciones de financiamiento por brindarme el lugar y los recursos para poder continuar mi formación.

Agradezco al CIQUIBIC por abrirme las puertas, y a todos sus integrantes, siempre dispuestos a ayudar con las mejores intenciones, tanto en lo material como en lo intelectual. Aprovecho para destacar el gesto que tuvieron cuando en los primeros años de la tesis sufrí el robo de mi computadora y todos colaboraron para que pueda comprar otra, es una actitud que valoro mucho.

En particular quiero agradecer a algunas personas que conocí en el instituto, me integraron rápidamente al grupo y en estos años forjamos una linda amistad: Nico Maube, Fede, Mario, Marcos, Rodri, Dani, Hernán, Seba, Gabi, Juancito, Alvaro, Quio. Compartimos asados, salidas y juntadas, y con algunos también tardes de fútbol.

A la gente del CIBICI, donde también tengo varios amigos, por "adoptarme" como uno más a la hora de los congresos, juntadas, salidas, asados, y como no, fútbol también.

Al personal de apoyo del CIQUIBIC y CIBICI, Susana, Gabi, Dani, Rosa, Ceci, Carlos, Marce, Pilar y Paula, por su predisposición, asesoramiento y tiempo para ayudarme con los experimentos.

Al grupo Roth - Monferran - Degano, con quienes compartí estos años:

A Clarita por las discusiones de resultados, consejos (científicos y "de la vida") y por soportar las charlas de fútbol (especialmente los lunes a la mañana). A Alicia, por su tiempo para mis reiteradas consultas, su predisposición para ayudar con las correcciones de la tesis y la defensa oral. A Natalí, por su dedicación, predisposición para enseñarme y ayudarme con los experimentos en los primeros años de la tesis. A Mario, por transmitirme sus conocimientos y experiencia cuando comencé a trabajar en inmunología. A Cristian, una persona que valoro mucho, con quien trabajamos juntos y me ayudó mucho para poder llevar a cabo los ensayos *in vitro*. A Lucy, por su predisposición para enseñarme y colaborar en el tema de Macrófagos. A Laurita, Inés

y Caro, por estar siempre atentas y dispuestas a ayudarme.

Quiero agradecer a la Dra. Bouzat, por confiar en mí y aceptarme para realizar una colaboración, brindarme lugar y tiempo para poder discutir los resultados en cada visita que hago a "Bahía". A la Dra. Samanta Zanetti, por su dedicación, voluntad para trabajar y responder mis inquietudes, por involucrarse en el trabajo y aconsejarme.

Agradezco a mi familia. Mis hermanos Mati y Lara, Tía Miriam, tíos y primos, por su compañía, apoyo incondicional durante estos años y siempre. En especial a mis padres, Carmen y Jorge que, tanto a mí como a mis hermanos nos educaron con su ejemplo, transmitiendo los valores de responsabilidad, dedicación, respeto, humildad y honestidad, proyectando ser cada día mejores personas.

A Nati, mi esposa, la compañera que elegí para compartir mi vida, por su amor incondicional y estar siempre pendiente de mí. Por sus consejos y contención en los momentos más difíciles, y mi mejor compañía para disfrutar los lindos momentos que me regala la vida. No puedo dejar de mencionar su ayuda con los experimentos: sacrificio de animales, procesamiento, turnos de citometría (fines de semana o a deshora). Extiendo este agradecimiento a su familia, por integrarme como uno más.

A mis amigos de "Bahía", Santi y flia., Gato y flia., Nico y flia., Berni, Manu, Juampi, Juanma, Ruso, Nacho, Cuervo, Ale, Cuchu, por interesarse siempre en lo que estoy haciendo (entiendan más o menos, de que se trata el doctorado), y porque conservamos la amistad intacta a pesar de la distancia y cada vez que nos encontramos, da la sensación que no paso más de una semana desde la última vez que nos vimos.

Finalmente quiero agradecer a una persona muy importante en mi vida, mi abuelo Pablo "el cuervito" que me impulsó a disfrutar del juego más lindo y más hermoso del mundo, me enseñó lo que es el amor eterno e incondicional. Me mostró que uno debe cumplir con sus obligaciones, trabajar de manera responsable, dando siempre lo mejor de uno desde el lugar que le toca, por esto y muchas cosas más, siempre vas a estar presente!

INDICE

Abreviaturas y Acrónimos	X
Resumen	XIV
Introducción	17
Sistema inmune.....	18
Perfiles que puede adquirir una célula T CD4 ⁺	20
Esclerosis múltiple (EM)	21
Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)	24
Inmunopatogénesis de la EAE y EM	26
Células del sistema inmune involucradas en la EAE y EM	28
Señalización por LPS y producción de citocinas.....	32
GABA (ácido γ-aminobutírico)	34
Rol del GABA en el sistema inmune y patologías asociadas	36
Las benzodiazepinas y sus receptores	37
El TSPO como marcador de activación	39
Objetivos	41
Objetivo general	42
Objetivos específicos	42
Materiales	44
Métodos	46
Inducción activa de la EAE	46
Tratamiento para supresión de la EAE	46
Reacción de hipersensibilidad de tipo retardada	47
<u>Caracterización de poblaciones celulares en ganglios y SNC</u>	47
Sacrificio de los animales	47
Obtención de células de ganglios poplíteos	47
Aislamiento de células inflamatorias del SNC	48
Caracterización de poblaciones celulares	48
Determinación de citocinas intracelulares	49
<u>Procedimientos para linfocitos</u>	49
Ensayo de citotoxicidad y viabilidad celular	50
Detección de apoptosis y muerte celular	50
Ensayos de proliferación	50
Ensayo de inducción de anergia por Diazepam (Dz)	51
Determinación de citocinas en sobrenadante de cultivo	51

Determinación de citocinas intracelulares	52
Estudio del estado de activación de células T	52
<u>Procedimiento para células dendríticas (CDs) y macrófagos (Mφs)</u>	53
Obtención de GM-CSF y M-CSF	53
Preparación y cultivo de CDs y Mφs	53
Expresión de CMHII y moléculas co-estimuladoras	54
Determinación de citocinas en sobrenadante de cultivo	54
Ensayo de producción de NO por Mφs	54
SDS-PAGE y Western blot	55
<u>Estudio de los receptores de benzodiazepinas</u>	57
Identificación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA _A y TSPO por citometría de flujo	57
Identificación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA _A y TSPO en célula T CD4 ⁺ por microscopia	58
Obtención y procesamiento de corteza cerebral	58
Aislamiento de ARN	58
Obtención del ADNc	59
Diseño de los cebadores utilizados en qPCR	59
PCR en tiempo real	59
Cuantificación relativa de genes	60
Resultados	61
Capítulo 1: Efecto de Dz durante el desarrollo de la EAE	62
La administración de Dz reduce la incidencia y atenúa algunos parámetros clínicos de la EAE	62
Dz disminuye la reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)	64
Caracterización de células en ganglios popliteos	65
Efecto de Dz sobre células inflamatorias de SNC	68
El tratamiento con Dz reduce el número de células inflamatorias en SNC	69
El tratamiento con Dz reduce el número de células CD11b/c ⁺ inflamatorias en SNC	69
En animales E-Dz sanos, se aislaron menos linfocitos infiltrantes de SNC	73
El tratamiento con Dz reduce el número de células T encefalitogénicas en SNC	76
Conclusiones capítulo 1	75

Capítulo 2: Efectos del Dz sobre distintas poblaciones del sistema inmune involucradas en el desarrollo de la EAE.....	76
Capítulo 2 (I): Efecto de Dz sobre linfocitos	76
Caracterización de poblaciones celulares en ganglios linfáticos	76
Dz no afecta la viabilidad celular hasta una concentración 25 μ M	77
Dz no induce apoptosis temprana ni muerte celular a bajas concentraciones	78
Dz inhibe la proliferación celular de manera dosis dependiente.....	78
La pre-incubación con Dz no induce anergia	79
Dz reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias	80
Dz reduce el porcentaje de células T CD8+ activadas.....	82
Capítulo 2 (II): efecto de Dz sobre CD4 y Mϕs	83
Efectos del DZ sobre las CD4	83
Dz no afecta la viabilidad celular.....	83
Dz disminuye la activación de CD4 inducida por LPS	83
Dz modula la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias.....	84
Efecto del Dz sobre los M ϕ s	85
Dz reduce el estado de activación	85
Dz reduce los niveles de la enzima iNOS y la producción de NO	87
Dz afecta la señalización intracelular gatillada por LPS	88
Conclusiones capítulo 2.....	89
Capítulo 3: Receptores de Dz	90
Los linfocitos T CD4 ⁺ , presentan bajos niveles de la subunidad γ 2 del receptor GABA _A	90
El receptor TSPO está presente en linfocitos T CD4 ⁺	91
Niveles de TSPO en linfocitos T CD4 ⁺ aislados de SNC.....	93
Estudio de ARNm codificante para la subunidad γ 2 del receptor GABA _A en tejido cerebral.....	93
Niveles de ARNm codificantes para TSPO en tejido cerebral	94
Niveles de TSPO en células inflamatorias de SNC	95
Conclusiones Capítulo 3.....	96
Discusión	97
Resumen grafico	111
Conclusiones y perspectivas	111
Publicaciones científicas realizadas durante esta tesis	113
Referencias	114

Abreviaturas y Acrónimos

- ADNc: Acido desoxirribonucleico complementario
- AFC: Adyuvante de Freund completo
- ANOVA: Análisis de varianza
- AP-1: Proteína activadora 1
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- BHE: Barrera hemato-encefálica
- BSA: Albúmina sérica bovina
- CBR: Receptor central de benzodiazepinas
- CD: "*Cluster*" de diferenciación
- CDs: Células dendríticas
- Con A: Concanavalina A
- CPA: Célula presentadora de antígeno
- cpm: Cuentas por minuto
- DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño
- DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- dpi: Días post inducción
- DTH: Reacción de hipersensibilidad retardada
- Dz: Diazepam
- EAE: Encefalomiелitis autoinmune experimental
- E-Dz: Animales desafiados para la encefalomiелitis autoinmune experimental, tratados con diazepam
- ELISA: Ensayo de unión enzimática inmunoabsorbente
- EM: Esclerosis múltiple
- ERK1/2: Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2

FoxP3: Factor de transcripción Forkhead box P3

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GM-CSF: Factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos

hi: Elevado, del inglés "high"

HPR: Peroxidasa de rábano picante

hs: Horas

Ig: Inmunoglobulina

IgG: Gammaglobulina

IFN- γ : Interferón gamma

IL: Interleucina

IMF: Intensidad media de fluorescencia

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

JNK: Quinasas c-Jun N-terminal

kDa: Kilodalton

KO: Knockout

LCE: Líquido cerebroespinal

lo: Disminuido, del inglés "low"

LPS: Lipopolisacárido, endotoxina bacteriana

mA: miliampere

M-CSF: Factor estimulante de colonia de macrófagos

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

min: Minutos

MO: Médula ósea

MOG: Glicoproteína de mielina y oligodendrocitos

M.S.C.M: media de la severidad clínica máxima

MTT: Bromuro de difenil tetrazolio

Mφs: Macrófagos

NO: Óxido nítrico

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógeno

PBM: Proteína Básica de Mielina

PBR: Receptor periférico de benzodiazepinas

PBS: Buffer fosfato salino

PET: Tomografía de emisión de positrones

PFA: Paraformaldehído

PLP: Proteína del proteolípido

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato

PMN: Polimorfonucleares

P-ERK1/2: Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 fosforilada.

P-p38 MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno P38 fosforilada.

p38 MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno P38

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RMN: Resonancia magnética nuclear

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

ESM: Error estándar de la media

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecil sulfato de sodio

SFB: Suero fetal bovino

SNC: Sistema nervioso central

T amb.: Temperatura ambiente

TCR: Receptor de células T

TdR: Timidina radiactiva

TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta

Th: Células T colaboradoras, del inglés "*T helper*"

TLR: Receptores de Tipo Toll

TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa

Treg: Células T regulatorias

Tr1: Células T regulatorias inducibles tipo 1

TBS: Buffer Tris salino

TSPO: Proteína translocadora de 18 kDa, del inglés "translocator protein (18 kDa)"

μCi: Micro Curie

Resummen



Las bz son Clásicamente conocidas como tranquilizantes menores, son drogas que poseen propiedades farmacológicas de ansiolíticos, hipnóticos, miorelajantes de acción central, anticonvulsivantes e inducen sedación. Esta acción es mediada por el receptor central de benzodiazepinas (CBR), también conocido como receptor GABA_A (Ácido γ -aminobutírico) de localización principalmente neuronal. Las benzodiazepinas, cuentan también con un sitio de unión alternativo, conocido como receptor periférico de benzodiazepinas (PBR), o proteína translocadora de 18 kDa (TSPO). Su expresión es abundante en órganos endocrinos, piel, corazón, hígado, y en sistema nervioso central (SNC) se encuentra asociado con células de la microglía. TSPO también se encuentra presente en células inmunes y la acción de benzodiazepinas sobre TSPO ha sido asociada a algunas propiedades inmunomodulatorias sobre funciones del sistema inmune.

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es un modelo animal que reproduce muchas de las características clínicas, patológicas e inmunológicas de la enfermedad humana esclerosis múltiple (EM). Tanto la enfermedad humana como el modelo experimental se caracterizan por una respuesta inmune contra antígenos del SNC llevando a una patología inflamatoria. Se desencadena por la activación periférica de células T luego de entrar en contacto con células dendríticas (CDs). Consecuentemente, estos linfocitos se activan, proliferan, producen mediadores inflamatorios, y aumentan la expresión de adhesinas e integrinas que permiten acceder al SNC. Allí, son reactivados por células presentadoras de antígenos locales o que llegan desde periferia, favoreciendo el reclutamiento de otros leucocitos, entre ellos macrófagos (M ϕ s), que exacerban la inflamación, favorecen la degeneración de oligodendrocitos, destrucción de la mielina y daño axonal.

En este trabajo demostramos que animales desafiados para la EAE que fueron tratados con diazepam (Dz), presentaron una menor incidencia de la patología, parámetros clínicos atenuados, y una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) contra la PBM (proteína básica de mielina) disminuida. Luego caracterizamos la respuesta inmunológica durante la etapa aguda de la patología. En periferia (ganglios poplíteos), no se detectaron grandes cambios en cuanto al número de células aisladas y a la distribución de las poblaciones celulares mayoritarias entre los grupos experimentales. Sin embargo, en SNC de animales EAE tratados con Dz que no presentaron signos clínicos, se aislaron menos células infiltrantes y tanto las poblaciones de M ϕ s, microglía activada así como también la población de linfocitos T CD4⁺ infiltrantes productores de IFN- γ e IL-17 resultaron disminuidas con respecto a

los animales EAE tratados con vehículo.

Posteriormente, evaluamos el efecto directo de esta droga sobre diferentes poblaciones celulares que participan activamente durante la inducción y desarrollo de la patología. En cultivos de linfocitos T, principales responsables del desarrollo de la patología, no se observó un efecto tóxico ni pro-apoptótico del Dz; sin embargo, la adición de esta droga redujo la proliferación y producción de citocinas pro-inflamatorias. En CDs, población importante para la iniciación de respuestas específicas de antígeno, el Dz no afectó la viabilidad. Sin embargo, cuando las CDs fueron estimuladas con LPS en presencia de Dz, se observó una reducción en las moléculas involucradas en la presentación antigénica, en la producción de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-12, IL-6 y TNF- α y un aumento en los niveles de la citocina anti-inflamatoria IL-10. Por otra parte, M ϕ s tratados con Dz presentaron menor secreción de citocinas pro-inflamatorias, menores niveles de expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y niveles elevados de las citocinas anti-inflamatorias, IL-10 y TGF- β , indicando que esta droga lleva a los M ϕ s a adquirir un fenotipo de activación alternativo (M2).

Por último, nos enfocamos en identificar el receptor responsable de los efectos ejercidos por el Dz en linfocitos T CD4+. Nuestros resultados indican que solo un porcentaje bajo de estas células expresa la subunidad γ 2 del receptor GABA $_A$; sin embargo presentan una expresión generalizada de TSPO. Esto lleva a pensar que los efectos inducidos por Dz en esta población celular serían mediados por el receptor TSPO. Es importante mencionar que el mismo se encuentra presente en células de la microglía en pacientes con EM, como en animales con EAE y que cambios en sus niveles de expresión permiten emplearlo como un buen marcador molecular de neuroinflamación en nuestro modelo experimental.

En conclusión podemos decir que Dz actúa como una potente droga inmunosupresora tanto *in vivo* sobre el desarrollo de la EAE como *in vitro* sobre células involucradas durante la evolución de la patología, siendo una herramienta importante para modular funciones del sistema inmune en enfermedades inflamatorias.

Introducción

Sistema inmune

El sistema inmune es el principal sistema de control del organismo frente a la invasión de agentes foráneos: bacterias, virus, hongos y parásitos. Está formado por órganos, tejidos, células y proteínas específicas, con funciones asociadas entre sí. Para que la respuesta inmunológica sea efectiva, es indispensable la acción coordinada y conjunta del sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo. El primero, es la primera línea de defensa del organismo frente a agentes invasores. Los elementos del sistema inmune innato incluyen las barreras anatómicas (piel y capas epiteliales internas), moléculas secretorias (lisozima y fosfolipasas presentes en lágrimas, saliva y secreciones nasales), componentes celulares que cumplen funciones de fagocitosis y citotoxicidad (polimorfonucleares (PMN), monocitos y macrófagos (Mφs), células dendríticas (CDs), células *natural killer* (NK), microglía (en SNC) y factores solubles (citocinas, quimiocinas y proteínas del complemento). Las células del sistema inmune innato poseen receptores de tipo Toll (TLR), capaces de reconocer patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y ciertas moléculas en la superficie de los microorganismos denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Portou y col., 2015). Los PAMPs consisten en lípidos, hidratos de carbono, proteínas o ácidos nucleicos, compartidos por ciertos grupos de microorganismos, como por ejemplo, los lipopolisacáridos (LPS), presentes en la membrana externa de bacterias Gram negativas, que son capaces de iniciar las respuestas protectoras que van desde inflamación hasta la inducción de la respuesta de tipo adaptativa (Abbas y Lichtman, 2005). Esta última, se genera a través de la secreción de quimiocinas y citocinas, que reclutan células inmunes de regiones distantes del organismo al sitio de inflamación y las activan para resistir la infección. El microambiente en el cual se gestiona la respuesta inmune innata, determinará el perfil de la respuesta inmune adaptativa que se desarrollará (Gi y col., 2009).

Cuando la respuesta inmune innata generada no es suficiente para combatir la infección, se desencadena la respuesta inmune adaptativa, cuyas principales características son especificidad (amplio repertorio de receptores capaces de reconocer regiones moleculares de estructuras propias y ajenas) y capacidad de generar memoria inmunológica, es decir, ante un segundo contacto con el mismo agente patógeno, las células de memoria desencadenan una respuesta específica rápida con el fin de eliminarlo. Las células que participan en la respuesta inmune adaptativa son los linfocitos, estos se pueden subdividir en linfocitos B y linfocitos T. Los primeros participan principalmente en la respuesta humoral produciendo

anticuerpos contra microorganismos extracelulares. Los anticuerpos liberados se fijan a los antígenos o microorganismos y atraen fagocitos para ayudar a destruirlo. Los linfocitos T se pueden dividir en 2 subpoblaciones: células T CD8⁺ (linfocitos T citotóxicos) y las células T CD4⁺ (linfocitos T colaboradores). Los linfocitos T CD8⁺ están encargados de las funciones efectoras de la inmunidad celular, reconocen células infectadas y las destruyen a partir de la liberación de una serie de moléculas (perforinas y granzimas) que activan la apoptosis de la célula diana. Los linfocitos T CD4⁺ tienen un papel muy importante en establecer y maximizar las capacidades de defensa del sistema inmunológico. Están involucrados en la activación y direccionamiento de otras células, son esenciales en el proceso de conmutación para la posterior formación de anticuerpos por parte de los linfocitos B, en la activación y crecimiento de los linfocitos T citotóxicos, y en el aumento de la actividad bactericida de fagocitos como los Mφs (Abbas y Lichtman, 2005).

Para activar la respuesta inmune adaptativa mediada por las células T se necesita de la interacción directa entre los linfocitos y las células presentadoras de antígeno profesionales (CPA) entre las cuales se encuentran las CD, Mφs, linfocitos B y microglía en SNC. En particular, las CD captan y procesan antígenos del medio y migran hacia los órganos linfáticos secundarios más cercanos, bazo y nódulos linfáticos. En ellos maduran, es decir, aumentan la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), asociadas a pequeños péptidos del patógeno, y moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD40), junto con la secreción de mediadores pro- y anti-inflamatorios. El patrón de activación que presenta la CD depende del microambiente en el cual se encuentra y puede desencadenar diferentes programas de diferenciación de las células T colaboradoras (Th) dependiendo del tipo de citocina que produce y los niveles de expresión de MHCII y moléculas co-estimuladoras presentes en su superficie celular. Como se muestra en la figura 1, la presencia de interleucina 12 (IL-12), una citocina pro-inflamatoria y altos niveles de MHCII y CD40, son necesarias para la inducción de linfocitos T con un perfil inflamatorio Th1; IL-6 e IL-23 inducen una respuesta Th17; IL-4 y bajos niveles de expresión de CD40 en las CPA favorecen el perfil Th2; IL-10 es necesaria para la diferenciación de células T vírgenes a células T regulatorias inducibles (Tr1), y TGF-β para T regulatorias (Treg) que establecen un balance entre inmunidad y tolerancia (Gi y col., 2009).

Perfiles que puede adquirir una célula T CD4⁺

Como se mencionó previamente, los linfocitos T CD4⁺ pueden diferenciarse en distintos subtipos celulares al entrar en contacto con las CPA dependiendo del ambiente de citocinas en el que esto ocurre. Por un lado, podemos citar a los linfocitos Th1, altamente efectivos en la eliminación de patógenos intracelulares. Secretan principalmente interferón-gamma (IFN- γ) e IL-2, favorecen la activación de M ϕ s y estimulan la proliferación de linfocitos T, generando así la activación de una respuesta inmune de tipo celular. Un exceso de las señales generadas por los linfocitos Th1, se asocia a procesos inflamatorios (Serrano Hernandez, 2009; Jager y Kuchroo, 2010). La liberación de IL-4 en el medio promueve la transformación de los linfocitos T CD4⁺ en células Th2. Estas son de gran importancia en la eliminación de microorganismos extracelulares y parásitos (Jager y Kuchroo, 2010), liberan IL-4, IL-13 e IL-5 que favorecen una respuesta inmune humoral. Una activación desmedida de la respuesta Th2 puede desencadenar patologías como alergias y asma (Zhu y Paul, 2008). Los linfocitos T (CD4⁺) que secretan IL-17 se denominan Th17. Desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos. Las citocinas implicadas en la diferenciación y el control de la actividad Th17 son la IL-23, TGF- β e IL-6 (Ghaffarinia y col., 2016). Su activación excesiva se ha asociado a procesos inflamatorios crónicos y autoinmunes, promovidos fundamentalmente por el efecto pro-inflamatorio de la IL-17 (Korn y col., 2007; Volpe y col., 2015). Los diferentes tipos de células colaboradoras se controlan mutuamente, a través de las citocinas liberadas por cada una de ellas que ejercen una función inhibitoria (Ivanov y col., 2007). Las células Treg juegan un papel esencial en el mantenimiento de la tolerancia a lo propio y en la inducción de tolerancia a los trasplantes. Se pueden clasificar en regulatorias naturales e inducibles. Las células Treg naturales expresan el marcador de superficie CD25 y el factor de transcripción "forkhead box P3" (FoxP3), que es esencial para dirigir su función (Hori y Sakaguchi, 2004). Las células T regulatorias naturales fueron identificadas inicialmente por su función de controlar la autoinmunidad mediando la tolerancia inmunológica frente a antígenos propios. Por otra parte, las células T regulatorias inducibles (Tr1) derivan de células T vírgenes de periferia que fueron estimuladas con un antígeno en presencia de citocinas inmunosupresoras, IL-10 y TGF- β (Battaglia y col., 2004). Las células Tr1 ejercen su función supresora principalmente por la secreción de IL-10 (Fig. 1).

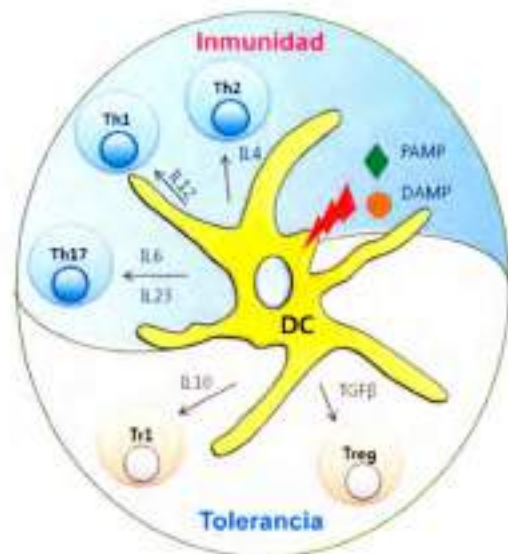


Figura 1: Funciones inmunológicas de las CD. La activación de las CD a través de receptores de PAMPs y DAMPs en su superficie puede inducir la diferenciación de linfocitos T colaboradores a distintos perfiles dependiendo de las citocinas liberadas. Estos juegan un rol clave en el desarrollo de la respuesta inmune generando un balance entre inmunidad y tolerancia. Adaptado de Gi y col. (2009).

Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria, desmielinizante y degenerativa que afecta el sistema nervioso central (SNC). Se caracteriza por una respuesta autoinmune contra componentes de la mielina. Es considerada la principal causa de discapacidad neurológica en adultos jóvenes y conlleva a grandes consecuencias de salud, psicológicas, y económicas (Constantinescu y col., 2011). Esta patología, afecta principalmente a personas entre 20 y 40 años de edad, con una incidencia de 2 a 3 veces mayor en mujeres que en hombres (Schwartz y Kipnis, 2011). En cuanto a la distribución geográfica, presenta mayor predominancia en países con climas fríos. En Canadá, Estados Unidos y los países escandinavos, la incidencia es de aproximadamente 1 en 1.000 habitantes. Algunas comunidades presentan cierta "resistencia" al desarrollo de la patología, como los países asiáticos, mientras que otras presentan alta prevalencia (Ejemplo: el pueblo lapón en países escandinavos) (O' Gorman y col., 2012). En el continente Sudamericano en particular, Argentina es el país con mayor prevalencia, afectando entre 15 y 25 personas cada 100.000 habitantes (Melcon y col., 2013).

Si bien la etiología de esta enfermedad se desconoce, existen factores genéticos y ambientales que predisponen o podrían favorecer el desarrollo de la misma. Entre los primeros podemos citar por ejemplo la presencia del alelo

DRB1*1501 que forma parte de la molécula del MHC, y ha sido asociada a EM en varias poblaciones, así como también la cadena alfa del receptor de IL-7 y cadena alfa del receptor de IL-2 podrían ser considerados factores de riesgo (Caillier y col., 2008; Trapp y col., 2008; O'Gorman y col., 2012). Un gran número de factores etiológicos han sido implicados en la predisposición al desarrollo de la EM, como tabaquismo, baja exposición al sol (deficiencia de vitamina D), exposición a algunos microorganismos (virus Epstein Barr, virus de varicela-zoster), que pueden producir reacción cruzada con los principales auto antígenos de la EM (Lutton y col., 2003; Kakalacheva y col., 2011), entre otros. A partir de los datos mencionados previamente, es posible sugerir que una combinación entre genes y factores ambientales podrían contribuir al desarrollo de la EM (Lutton y col., 2004).

La EM es una enfermedad bifásica, presenta un periodo inflamatorio temprano y un proceso degenerativo tardío. Existen considerables evidencias que indican que linfocitos T, B y Mφs logran atravesar la barrera hemato-encefálica (BHE) bajo la influencia de una variedad de moléculas de adhesión y citocinas pro-inflamatorias, causando injuria en SNC (Goodin y col., 2014). Esto se refleja en el aumento de la concentración de proteína total, número de células mononucleares, fracción de gammaglobulina (IgG), encontradas en LCE (líquido cerebroespinal) de individuos afectados. Las lesiones en SNC (placas), presentes tanto en la inflamación aguda como crónica, son típicamente multifocales y se localizan alrededor de las venas del SNC. El diagnóstico preciso de la patología se realiza confirmando la presencia de dichas placas de desmielinización por resonancia magnética nuclear (RMN) (Ludwin y col., 2006; Fletcher y col., 2010; Goodin y col., 2014). El proceso degenerativo tardío se caracteriza por gliosis, pérdida de oligodendrocitos, y un grado variable de degeneración axonal que se evidencian como una progresiva atrofia de cerebro y médula espinal (Constantinescu y col., 2011; Dutta y Trapp., 2011). Existen datos contundentes respecto del daño en materia gris en términos de lesiones focales, anormalidades difusas en tejido y pérdida de tejido irreversible, que tienen una relevancia clínica en cuestión de alteraciones motoras y cognitivas (Filippi y col., 2007, Grassiot y col., 2009).

Los síntomas más comunes incluyen alteraciones sensoriales (hormigueo y entumecimiento de extremidades), motrices (pérdida de coordinación y reflejos, debilidad o espasticidad, falta de equilibrio, etc.), cognitivas (dísfunción ejecutiva, fatiga cognitiva, pérdida de memoria, etc.) y psicopatológicas (depresión, apatía, ansiedad, deterioro mental, etc.) (Gelfand, 2014). El síntoma más común e incapacitante de la

EM es la fatiga cognitiva, afectando al ~80% de los pacientes. Es una sensación abrumadora de agotamiento mental que se asocia a cambios en el funcionamiento de la corteza prefrontal, los ganglios basales y/o la pérdida de conectividad entre ellos (Calabrese y col., 2012; Dobryakova y col., 2013). La calidad de vida del 50-70 % de los pacientes se ve disminuida por la aparición de discapacidad cognitiva, específicamente fallas en la atención, la velocidad de procesamiento de información, la memoria de trabajo y, englobando estos aspectos, las funciones ejecutivas. Estas funciones complejas también se relacionan a alteraciones en la neurotransmisión en distintas regiones de la corteza prefrontal (Cerezo García y col., 2015; Grech y col., 2015).

Frecuentemente el primer ataque desmielinizante agudo no puede ser diagnosticado fehacientemente como EM y se denomina como síndrome aislado clínicamente (SAC). Alrededor del 80% de estos casos desarrollan EM en los siguientes 15-20 años (Miller y col., 2012). Entre el 85-90% de los pacientes que desarrollan EM presentan una patología con remisiones y recaídas (EM-RR), que es la forma más común de EM, en la cual los pacientes experimentan episodios alternados (días o semanas) de discapacidad neurológica y recuperación que puede durar muchos años (Fig. 2). Entre estos episodios los pacientes permanecen neurológicamente estables. Estudios de RMN durante esta etapa presentan la evidencia típica de inflamación con focos de desmielinización. Luego de 25 años aproximadamente, el 90% de los pacientes EM-RR pasan a la fase de EM progresiva secundaria (EM-PS), caracterizada por un constante deterioro neurológico, alteraciones físicas y cognitivas que se acumulan y empeoran con el tiempo, independientes de la aparición de algún ataque agudo. Durante esta etapa aparecen la mayoría de las discapacidades irreversibles y los pacientes se vuelven no ambulatorios. Ensayos de RMN muestran menor evidencia de inflamación aguda, pero la atrofia cerebral se hace más prominente. Alrededor del 10% de los pacientes con EM experimentan un curso de la enfermedad con un decaimiento constante de la función neurológica sin recuperación y se clasifican como EM progresiva primaria (EM-PP). Una pequeña minoría de estos (~ 5%) desarrollan una forma mixta de EM con disminución neurológica progresiva acompañada de ataques agudos bien marcados, con o sin recuperación. Este curso de la enfermedad se clasifica como EM progresiva recurrente (EM-PR) (Hauser y Oksenberg, 2006; Trapp y Nave, 2008; Dutta y Trapp, 2011) (Fig. 2).

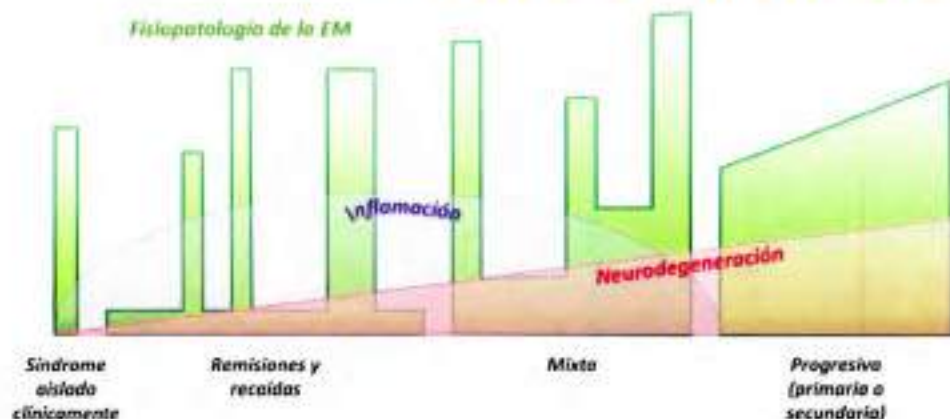


Figura 2: Diagrama que esquematiza la progresión de la esclerosis múltiple. Adaptado de Chandran y col. (2008).

Uno de los principales desafíos para los grupos de investigación en EM ha sido desarrollar terapias que no sólo impidan la discapacidad neurológica asociada a la patología, sino que también sean capaces de detener la inflamación. Algunas estrategias involucran al Interferón beta (IFN- β) y acetato de glatiramer (GA), que reducen las recaídas y disminuyen la actividad de RMN, pero no detienen la progresión de la discapacidad neurológica permanente (Trapp y Nave, 2008; Chen y col., 2012). Además, algunos pacientes no responden al tratamiento y otros producen anticuerpos neutralizantes. Otras estrategias fueron desarrolladas con el objetivo de manipular células T (neutralizarlas, bloquear sus funciones efectoras, etc.), como por ejemplo Alemtuzumab, que es un anticuerpo específico contra un marcador de maduración de linfocitos T (CD52); este compuesto conduce a la depleción de las células T CD4⁺ y CD8⁺ en los pacientes tratados (Cox y col., 2005; Dutta y Trapp, 2011). Otra droga, Natalizumab (anticuerpo anti-VLA4), que inhibe la entrada de células T a SNC, es relativamente efectivo a corto plazo (Fletcher y col., 2010). Sin embargo, ningún medicamento en uso ha demostrado ser efectivo a largo plazo y esto refleja la gran complejidad de la patogénesis de la EM. Enfoques multidisciplinarios, nuevos modelos animales y estrategias orientadas a buscar nuevos aspectos de la patogénesis de la EM, ayudarán en esta importante y deseosa búsqueda de tratamiento.

Encefalomiелitis autoinmune experimental

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es un modelo que reproduce muchas de las características clínicas, bioquímicas, inmunológicas y patológicas de la enfermedad humana, EM. De acuerdo con el protocolo de inmunización empleado, la especie o cepa del animal seleccionado para el estudio y el modelo de inducción (activa o pasiva), el desarrollo de la EAE puede tener diferentes cursos clínicos: patología aguda, crónica o progresiva con recaídas y remisiones. Entre las especies animales empleadas podemos mencionar: ratas, ratones, conejos, cobayos y monos (Simmons y col., 2013). La inducción activa de la EAE se realiza por inyección de mielina completa o antígenos de mielina como la proteína básica de mielina (PBM), la proteína del proteolípido (PLP) o la glicoproteína miélinica de oligodendrocitos (MOG), junto con componentes bacterianos altamente capaces de activar el sistema inmune innato a través de sus TLR (Libbey y Fujinami, 2010). La EAE también puede ser inducida de forma pasiva por la transferencia adoptiva de células T CD4⁺ activadas específicamente contra antígenos de mielina, generadas en animales "donantes" por inmunización activa (Lutton y col., 2004; Stromnes y Goverman, 2006; Constantinescu y col., 2011). Es importante mencionar que la EAE también puede desarrollarse espontáneamente en ciertos modelos de ratón diseñados por ingeniería genética, en los cuales los linfocitos T expresan un receptor de células T (TCR) transgénico, que reconoce específicamente algún componente de la mielina (Goverman, 1999).

En general, los signos clínicos presentados por los animales durante el curso de la patología son pérdida de peso, seguida por una parálisis ascendente, que comienza con flacidez en la cola, parálisis de las extremidades posteriores, ataxia, continúa con incontinencia fecal y urinaria y pocas veces puede llevar a un estado moribundo o de muerte (Chanaday y col., 2011). Si bien las lesiones presentadas en EAE así como en la EM se caracterizan por inflamación y frecuente desmielinización, existen algunas diferencias entre la patología humana y los modelos experimentales. Una de ellas es que en estos últimos, las lesiones se presentan predominantemente en la médula espinal, mientras que en la EM son más comunes en cerebro (Constantinescu y col., 2011). Sin embargo, los modelos experimentales son una herramienta útil tanto para desarrollar un mejor entendimiento del proceso inflamatorio durante el curso de la patología, como también para el desarrollo de nuevas terapias contra la EM. A veces, las diferencias que existen entre los modelos de EAE y la patología humana pueden dificultar las interpretaciones, pero dan nota de la

complejidad y heterogeneidad de los sistemas de autoinmunidad en SNC (Simons y col., 2013).

Inmunopatogénesis de la EAE y EM.

El empleo de modelos experimentales como la EAE ha generado importantes avances en el conocimiento de mecanismos inmunopatológicos relacionados al desarrollo de la EM. Se han podido identificar diferentes poblaciones celulares que participan durante la inducción y desarrollo de la respuesta inmune contra antígenos de mielina, y estudiar los mecanismos moleculares subyacentes, su interacción y cooperación.

De acuerdo con la hipótesis autoinmune del desarrollo de la EM, factores genéticos (MHC) y ambientales como una infección viral, o la presencia de ciertos antígenos o superantígenos que presentan similitudes moleculares (mimetismo) con antígenos de SNC promueven la activación de células T CD4⁺ (Sospedra y Martin, 2005). En la EAE, la patología se desarrolla cuando las CPA, principalmente CDs, captan y procesan los péptidos (de mielina) inyectados y migran a los órganos linfáticos secundarios (nódulos linfáticos y bazo) (Constantinescu y col., 2011). Allí son activadas por componentes del *Mycobacterium tuberculosis* presente en el adyuvante de Freund completo (AFC) a través de los TLR y presentan péptidos derivados de antígenos mielínicos a las células T vírgenes (Fletcher y col., 2010). Aquellos linfocitos T que posean receptores específicos para el antígeno que se está presentando, se van a activar y diferenciar, principalmente en células Th1 y Th17 que proliferan, producen citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ e IL-17, respectivamente) y aumentan la expresión de moléculas de adhesión como la integrina de superficie $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) y el antígeno funcional de leucocitos (LFA-1) (McFarland y Martin, 2007). Estas moléculas interactúan con otras específicas presentes en el endotelio como la molécula de adhesión de células vasculares (V-CAM-1) y moléculas de adhesión intercelulares (ICAM-1 o ICAM-2), respectivamente. De esta manera, las células reducen su velocidad de circulación, y son capaces de atravesar la BHE y acceder a un sistema inmuno-privilegiado como es el SNC. Solo aquellos linfocitos que posean en su superficie un receptor (TCR) capaz de dar una reacción cruzada con los péptidos derivados de antígenos de mielina o neuronales presentados por las CPA locales (microglia y astrocitos) e infiltrantes (M ϕ s y CDs), van a ser retenidas en el parénquima (Sospedra y Martin, 2005; Engelhardt y col., 2006; Ludwin y col., 2006). Allí producen daño directo a células neuronales y gliales, e indirecto a través de la liberación de mediadores inflamatorios (quimiocinas) que favorecen el reclutamiento

de otros leucocitos de periferia a SNC. Las principales quimiocinas involucradas en esta patología son, CXCL9, CXCL10, CXCL1 y CXCL2 (Fletcher y col., 2010; Simmons, 2013). Una vez en SNC, estos leucocitos infiltrantes (neutrófilos, monocitos/Mφs, CDs, linfocitos T CD8⁺, linfocitos B, etc.) y células residentes, como microglia activada, pueden liberar una gran cantidad de mediadores inflamatorios, incluidas enzimas proteolíticas, metaloproteasas de matriz, citocinas, productos oxidativos y radicales libres, que pueden dañar los axones de las neuronas (Nave y Trapp, 2008). En particular, la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (enzima clave para la síntesis de óxido nítrico (NO)), aumenta significativamente su expresión en lesiones agudas de EM (Liu y col., 2001). Las células plasmáticas (linfocitos B activados) que infiltran SNC producen anticuerpos que pueden activar complemento o inducir citotoxicidad dependiente de anticuerpo. Las células T CD8⁺ (citotóxicas) pueden amplificar el daño a través de la producción de citocinas y otras moléculas como granzimas y perforinas que dañan los axones directamente (Fletcher y col., 2010). Conjuntamente, el daño se exagera a causa de la excitotoxicidad mediada por glutamato. Células inmunes activadas, axones y astrocitos, son potenciales fuentes de niveles excesivos de glutamato en lesiones agudas de EM (Lassmann, 2003). Cuando este neurotransmisor se libera en exceso, activa receptores ionotrópicos y metabotrópicos, que provocan la acumulación de calcio citoplasmático en concentraciones tóxicas, lo que lleva a la muerte de oligodendrocitos, astrocitos y neuronas acompañado por pérdida de volumen de tejido cerebral. Además, se afectan la transmisión y plasticidad sináptica (Ludwin, 2006; Trapp, 2008; Dutta y Trapp, 2011) (Fig. 3).

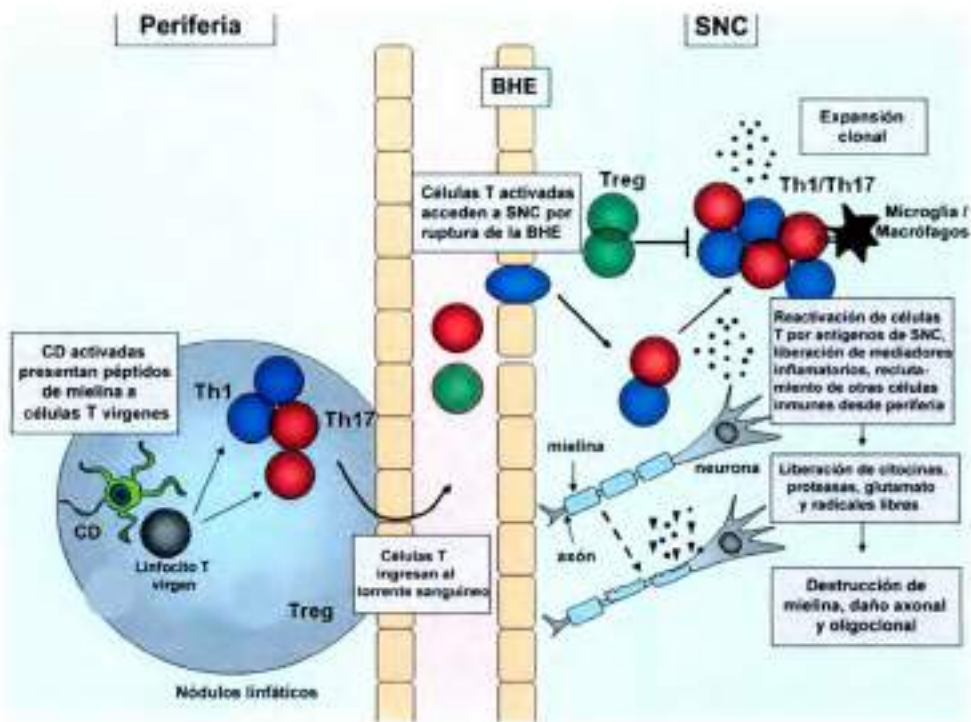


Figura 3: Mecanismos de patogenicidad involucrados en el desarrollo de la EAE. Activación periférica de linfocitos T, pasaje a través de la BHE, reactivación en SNC e inducción de inflamación y daño neuronal. Adaptado de Fletcher y col. (2010).

Células del sistema inmune involucradas en la EAE y EM

Células T CD4⁺

Según varios antecedentes, tanto durante el desarrollo de la EM como en la EAE, las células T (Th1 y Th17) han sido postuladas como las principales responsables de la iniciación de la respuesta autoinmune, invasión del SNC y desarrollo del daño en el órgano blanco favoreciendo la llegada de otros leucocitos (Stomnes y col., 2008; Fletcher y col. 2010; Constantinescu y col., 2011).

Células Th1, productoras de IFN- γ fueron inicialmente consideradas como la subpoblación de células T efectoras responsable del desarrollo de la EAE y EM. Esta conclusión se basó en que estudios utilizando animales knock-out (KO) para IL-12 (citocina necesaria para la diferenciación de células Th1) eran resistentes al desarrollo de EAE (Gi y col., 2009). Esta población es muy importante durante el desarrollo de la EM, se encuentra presente en sangre, líquido cerebroespinal (LCE) y se acumulan en lesiones cerebrales de los pacientes (Olsson y col., 1990). El IFN- γ producido es capaz de activar M ϕ s, inducir la expresión de MHCII, promover el reclutamiento de

células T, así como gatillar la muerte de oligodendrocitos favoreciendo la inflamación del SNC (Vartanian y col., 1995; Navikas y Link, 1996). Sin embargo, estudios más recientes han destacado el rol central de las células Th17 y apuestan a esta población como principal responsable en el desarrollo y la patogénesis de la EAE (Volpe y col., 2015). La transferencia pasiva de células Th17 específicas para PLP induce el desarrollo de la EAE en un modelo de ratón (Langrish y col., 2005), mientras que la administración de un anticuerpo neutralizante anti-IL-17, reduce la severidad de la EAE. Los animales KO para IL-17 desafiados para EAE presentaron una variante atenuada de la patología, con retraso en la aparición de los signos clínicos, menor severidad y recuperación temprana (Fletcher y col., 2010; Jadidi-Niaragh y col., 2011). El rol de las células Th17 en la patología humana aún no se encuentra bien establecido, pero algunos estudios han revelado un aumento de IL-17 en LCE de los pacientes. También están presentes ARNm codificante para IL-17 y proteína, en lesiones activas y en los bordes de lesiones crónicamente activas de pacientes con EM (Tzartos y col., 2008). Estudios recientes sugieren que ambos subtipos celulares juegan roles complementarios en la patología, las células Th1 liberan quimiocinas que reclutan principalmente monocitos y M ϕ s a médula espinal, mientras que las células Th17 atraen neutrófilos al parénquima cerebral, que en algunos modelos resulta en una EAE clínicamente atípica (Simmons y col., 2013). Otros trabajos han mostrado que el estudio parece ser más complejo, dado que algunas células Th17 presentan una plasticidad unidireccional hacia el fenotipo Th1, por lo que existen células que producen ambas citocinas (IFN- γ e IL-17) y han sido identificadas en SNC y LCE de pacientes con EM (Lock y col., 2002; Kebir y col., 2007). Se postula que estas células podrían presentar una patogenicidad amplificada en EAE. Sin embargo, aún no es claro cómo se correlaciona con las diferentes manifestaciones de la patología o patrones de inflamación (Peters y col., 2011).

Células T regulatorias

Varios tipos de células Treg desempeñan un rol clave en mantener la homeostasis inmune y regular la inflamación autoinmune durante EM y EAE. Algunos trabajos han demostrado que los pacientes con EM-RR, presentan menores niveles de células Treg en comparación con individuos control (Haas y col., 2007), mientras que otros no encuentran diferencias en el número total de células Treg en EM, pero en varios estudios funcionales empleando supresión *in vitro* se han observado alteraciones en la respuesta ejercida por células Treg de pacientes con EM (Viglietta y

col., 2004). En el modelo experimental, las células Treg parecen tener un papel clave en la resolución y recuperación de la EAE a partir de la liberación de TGF- β e IL-10 cuando se acumulan en SNC y su depleción inhibe estos procesos (Bettelli y col., 2006).

Células T CD8⁺

La EM ha sido históricamente vista como una patología autoinmune mediada por células T CD4⁺. Sin embargo, la presencia de células T CD8⁺ en las placas de inflamación y LCE es mayor que las células T CD4⁺, insinuando un rol patogénico de las mismas en la EM (Friese y Fugger, 2009). Las células T CD8⁺, tienen la capacidad de liberar perforina junto con granzima y serglicina, que contribuyen a la patología. Se ha demostrado que la perforina es crucial para la ruptura de la BHE. Células T CD8⁺ dañan activamente las neuritas y son cruciales para generar daño axonal. Además, existe una correlación entre este último y el número de células T CD8⁺ infiltrantes de SNC en animales con EAE (Bitsch y col., 2000).

Células B

La secreción de auto anticuerpos es una característica común de las patologías autoinmunes y se encuentra bien establecido en la enfermedad de Graves y Miastenia Gravis. En pacientes con EM se detectan comúnmente bandas oligoclonales de IgG en LCE y son claves para el diagnóstico (Giovannoni, 2014). Además de la secreción de anticuerpos, los linfocitos B pueden actuar como CPA profesionales.

Células Dendríticas:

Las CD^s son células presentadoras de antígeno profesionales, jugadores claves en mediar respuestas inmunes e inducir tolerancia. Se encuentran involucradas en dos etapas de la EAE: iniciación y desarrollo. En condiciones basales presentan un fenotipo inmaduro, carente de MHCII y de moléculas co-estimuladoras en superficie. Cuando reconocen los PAMPs del *Mycobacterium* y fagocitan los péptidos de mielina, se incrementa la expresión de MHCII, moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 y CD86) y la producción de citocinas pro-inflamatorias, favoreciendo la presentación antigénica (Askew y col., 2000; Xie y col., 2015). Este proceso ocurre en los órganos linfáticos secundarios y las CD^s activan a los linfocitos T CD4⁺ vírgenes y promueven

la diferenciación a células T efectoras de tipo Th1 y Th17, principalmente. El rol de las CD80 en autoinmunidad de SNC no sólo se limita a la polarización de las células T en la periferia, sino que también contribuyen a la liberación de mediadores que favorecen el reclutamiento y reactivación de células T en SNC (Miller y col., 2007). En EM, el papel de las CD80 aún no está bien definido y no hay pruebas suficientes de su función en la enfermedad. Generalmente se encuentran en niveles aumentados en sangre, LCE y lesiones de materia blanca (Zozulyay col., 2010). Las CD80 de pacientes con EM se caracterizan por presentar niveles elevados de moléculas co-estimuladoras como CD80 y por la secreción elevada de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-12, IL-6, e IL-23, necesarias para la diferenciación de linfocitos Th1 y Th17 (Karni y col., 2006).

Macrófagos

En la patología de la EM y el modelo experimental (EAE) los M ϕ s desempeñan un rol dual. Pueden contribuir al daño tisular y axonal por la producción de mediadores inflamatorios o ejercer efectos neuroprotectores, mediando mecanismos de reparación de tejidos (Batoulis y col., 2010; Vogel y col., 2013). La función efectora de los M ϕ s depende de la vía por la cual son activados. La activación clásica (o M1), ocurre en un contexto inflamatorio, en presencia de IFN- γ , TNF- α , LPS. Estos presentan propiedades citotóxicas, liberan quimiocinas como la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23), aumentan la expresión de MHCII y moléculas co-estimuladoras y producen altos niveles de metabolitos oxidativos como especies reactivas del oxígeno (ROS) y nitrógeno (NO) (Tierney y col., 2009; Vogel y col., 2013; Martínez y Gordon, 2014). Durante el curso de la patología, los M ϕ s activados clásicamente son reclutados a SNC, presentan antígenos a los linfocitos T y contribuyen al daño a partir de la liberación de mediadores inflamatorios. Los M ϕ s activados alternativamente (M2), representan una población involucrada en la tolerancia inmunológica, fagocitosis de células apoptóticas y resolución de la inflamación (Gordon y Martínez, 2010) mediante la liberación de mediadores anti-inflamatorios (IL-10, TGF- β) y el incremento en los niveles de expresión de la enzima arginasa-1. Éstos M ϕ s son diferenciados en un microambiente caracterizado por la presencia de IL-4, IL-10 o TGF- β . En la EAE, tienen una función importante en la resolución de la inflamación a partir de la liberación de mediadores anti-inflamatorios, fagocitosis de restos celulares, etc. (Vogel y col., 2013).

Microglía

Las células de la microglía son Mφs residentes de SNC capaces de responder rápidamente ante daño e inflamación (isquemia, trauma, condiciones neurodegenerativas) dada su capacidad migratoria. En condiciones normales, la microglía presenta una estructura ramificada y se encuentran censando constantemente el ambiente. Cuando ésta se activa por la presencia de inmunógenos, PAMPs o DAMPs, retrae sus procesos y modifica su morfología adquiriendo una estructura ameboide. La microglía expresa constitutivamente MHCI, MHCII y moléculas co-estimuladoras en bajos niveles. En condiciones de inflamación y daño, estas moléculas aumentan su expresión rápidamente, lo que convierte a estas células en buenas CPA (Tambuyzer y col., 2009). Además son capaces de secretar moléculas pro-inflamatorias como especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, prostaglandinas, citocinas tales como TNF- α , IL-6 y quimiocinas que favorecen el reclutamiento de monocitos, Mφs y células T al sitio de inflamación (Lee y col., 2013). Al igual que los Mφs, de acuerdo al microambiente en el cual se encuentran, pueden adquirir un fenotipo M1 (clásico) o M2 (alternativo) (Bachstetter y col., 2013). Otra molécula que aumenta los niveles de expresión cuando la microglía se activa es el marcador de superficie CD45, cuya expresión también se encuentra incrementada en monocitos y Mφs que infiltran SNC durante el desarrollo de la EAE (Sedgwick y col., 1991; Bibolini y col., 2014). En una etapa tardía de la EAE, la microglía desempeña un rol beneficioso fagocitando mielina y restos celulares del parénquima cerebral para controlar el daño y rescatar neuronas y oligodendrocitos (Cherry y col., 2014).

Señalización por LPS y producción de citocinas

Las citocinas que participan en la patogénesis de la EM pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: pro- y anti-inflamatorias. Las primeras contribuyen al proceso de desmielinización y daño axonal, agravando la severidad de la patología, mientras que las anti-inflamatorias, reducen la inflamación, la severidad de los signos y favorecen la recuperación de la enfermedad. Las CD, Mφs y microglía, son capaces de secretar ambos tipos de citocinas dependiendo del microambiente en el que se encuentran y su estado de maduración (Xie y col., 2015). La IL-12 es la principal citocina pro-inflamatoria, producida por Mφs, CD, y linfocitos B que media la actividad biológica en células T y NK, favoreciendo la inducción de IFN- γ y la amplificación de citotoxicidad mediada por células. IL-12 es necesaria para la inducción de respuestas

Th1 y es regulada por retroalimentación positiva con IFN- γ y negativa por IL-10 (Aste-Amezaga y col., 1998). La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria producida por CD4 y M ϕ s que junto con IL-23 promueve la diferenciación de células Th17. Animales IL-6 KO son completamente resistentes a la inducción de EAE (Samoilova y col., 1998). En pacientes con EM, la IL-6 se encuentra elevada en cerebro, sugiriendo que participa en la patogénesis de la misma (Maimone y col., 1997). TNF- α es una citocina pleiotrópica que regula numerosos procesos fisiológicos y patológicos. La expresión de TNF- α en lesiones activas de EM, así como en suero o LCE, correlaciona con la actividad de la lesión. Algunas de las funciones relacionadas con esta citocina son inducir apoptosis, generar daño indirectamente a oligodendrocitos y neuronas modulando la liberación de glutamato por parte de astrocitos y de esta forma contribuir a la inflamación crónica (Hisahara y col., 1997). TNF- α también se encuentra involucrada en la ruptura de la BHE en varios modelos de inflamación de SNC (Lv y col., 2010) y favorece la entrada de células inflamatorias al parénquima cerebral generando inflamación, activación de la microglía y desmielinización (Valentin-Torres y col., 2016). En cuanto a las citocinas anti-inflamatorias, IL-10 es un potente inhibidor de numerosas funciones de monocitos y M ϕ s, incluyendo la producción de NO, expresión de MHCII y moléculas co-estimuladoras, producción de citocinas pro-inflamatorias y fagocitosis (Moore y col., 2001). Estudios en monocitos humanos demostraron que IL-10 inhibe la producción de citocinas mediadas por estimulación por LPS, bloqueando la transcripción génica (Aste-Amezaga y col., 1998). IL-10 ejerce roles beneficiosos en EM suprimiendo la respuesta autoinmune a través de la inhibición de células T antígeno específicas y mediante la inducción de células Treg. TGF- β es otra citocina anti-inflamatoria que induce CD4 tolerogénicas o inmaduras con una menor capacidad de estimular a las células T (Xie y col., 2015).

Las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) son un conjunto de señales moleculares que juegan un rol importante en varias respuestas celulares como crecimiento celular, diferenciación, inflamación y el control de respuestas celulares a estrés y citocinas. La activación de p38MAPK, JNK y ERK1/2 ocurre como consecuencia de la traducción de señales inducida por LPS en M ϕ s y CD4 (Figura 4). Hay pruebas claras de que la fosforilación de MAPK se encuentra relacionada a la producción de citocinas pro-inflamatorias en M ϕ s activados (Niu y col., 2015). La proteína p38 se activa por estimulación con LPS y ha sido postulada por jugar un rol clave en la regulación de la expresión del gen de IL-6, TNF- α e iNOS (Bhat y col., 2010). La inhibición dirigida contra MAPKs ha sido propuesta como un método

terapéutico para enfermedades inflamatorias (Niu y col., 2015).

NF- κ B es un factor de transcripción ampliamente expresado, que regula la transcripción de genes de algunas citocinas pro-inflamatorias. En condiciones basales, se encuentra en el citoplasma la forma inactiva, es decir, asociado a proteínas I κ B inhibitorias tales como, I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ . En respuesta a estímulos como citocinas pro-inflamatorias, LPS, infecciones virales, las proteínas I κ B son degradadas y NF- κ B transloca al núcleo y actúa como un factor de transcripción (Whiteside y col., 1997; Zhang y col., 1999) (Fig. 4).

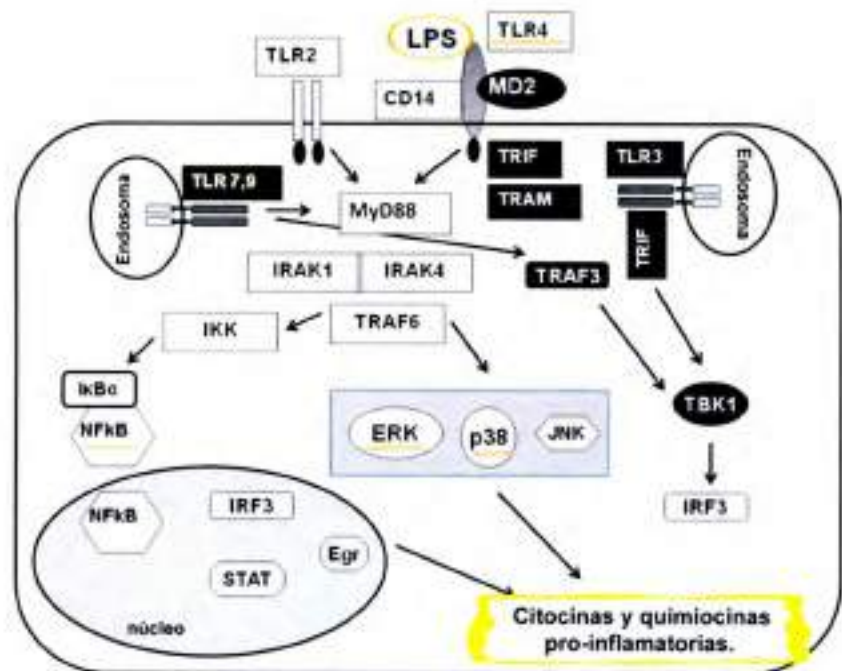


Figura 4: Cascada de señalización gatillada por LPS a través de su receptor específico TLR4, y consecuente activación de proteínas adaptadoras, quinasas y factores de transcripción para inducir la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias. Adaptado de Mandrekar y Ambade (2012)

GABA (ácido γ -aminobutírico)

El GABA (ácido γ -aminobutírico), es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC. Su principal función es controlar la actividad de sistemas excitatorios (principalmente glutamato) y su concentración en el espacio sináptico se encuentra finamente regulada. El GABA se sintetiza a partir de ácido glutámico, por la acción de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), en presencia de piridoxalfosfato (derivado de vitamina B6) como cofactor. Se almacena en vesículas sinápticas y su



liberación es dependiente de calcio (Dionisio y col., 2011). Una vez en el espacio sináptico, puede unirse a 2 tipos de receptores: ionotrópicos ($GABA_A$) y metabotrópicos ($GABA_B$), provocando hiperpolarización o disminución de la capacidad de despolarización de la neurona y de esta forma, se reduce la aptitud de la misma para transmitir el impulso nervioso (Olsen y Sieghart, 2008). El GABA es recaptado por transportadores específicos (neuronaes y gliales) y metabolizado a semialdehído succínico por la enzima GABA transaminasa (GABA-T).

El receptor $GABA_B$ o metabotrópico es un heterodímero (B1 y B2) que se activa en presencia de GABA o Baclofeno e inhibe la adenilciclase y a través de esta a varios sistemas efectores que bloquean la entrada de calcio y facilitan la salida de potasio (Bowery y col., 2002).

El receptor $GABA_A$ o receptor ionotrópico de GABA es una glicoproteína heteropentamérica de 275kDa, que forma un canal permeable a iones negativos. Se activa en presencia de GABA o Muscimol, pero existe gran cantidad de moléculas, tales como esteroides, anestésicos, benzodiacepinas, barbitúricos, entre otras, que pueden modular la actividad del mismo (Henschel y col., 2008). Se encuentra formado por una selección de 5 subunidades entre 19 posibles ($\alpha(1-6)$, $\beta(1-3)$, $\gamma(1-3)$, δ , ϵ , θ , π , y ρ) (Henschel y col., 2008; Mortensen y col., 2012). En general, consta de dos subunidades α , dos β (indispensables para que se una GABA y sea un receptor funcional) y se completa con una subunidad γ , δ , ϵ , etc., que le confiere propiedades farmacológicas específicas (Fig. 5). Cuando una molécula de GABA se une al receptor, se produce la apertura del canal que favorece el flujo de cargas negativas hacia el interior de la célula, lo que genera hiperpolarización y de esta forma, se reduce la despolarización espontánea y descarga neuronal (Rudolph y col., 2001).

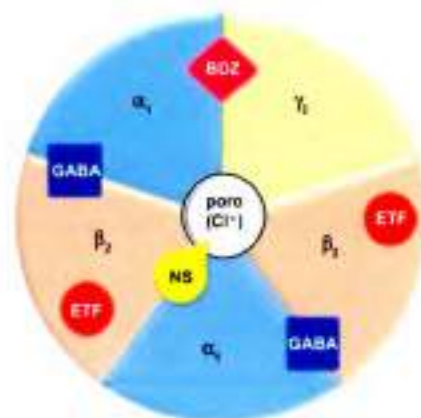


Figura 5: Representación esquemática de la composición y sitios de unión de la isoforma más común del receptor $GABA_A$. Abreviaturas: BDZ = benzodiacepinas, ETF = etifoxina, GABA = ácido γ -aminobutírico, NS = neuroesteroides, Cl^- = iones cloruro. Adaptado de Nuss (2015).

Rol del GABA en el sistema inmune y patologías asociadas

Los receptores GABA_A se localizan principalmente en neuronas, sin embargo han sido encontrados en menor cantidad en tejido no neuronal, como algunos órganos endócrinos, páncreas, testículos, tracto gastrointestinal, ovarios y médula adrenal (Borboni y col., 1994; Gladkevich y col., 2006). En los últimos años se ha demostrado que células del sistema inmune expresan componentes característicos del sistema de neurotransmisión neuronal, incluido el sistema GABAérgico. Se ha reportado la presencia de transportadores y receptores (canales iónicos capaces de generar corrientes de cloruro a través de la membrana, cuya función y regulación está siendo estudiada) (Bjurstom y col., 2008; Bhat y col., 2010; Dionisio y col., 2011; Mendu y col., 2011). Más aún, estudios han mostrado que algunas células del sistema inmune, son capaces de sintetizar y liberar el neurotransmisor GABA (Dionisio y col., 2011) (Fig. 6). Además, se han descrito numerosos efectos de GABA en células del sistema inmune, como reducción de la secreción de citocinas pro-inflamatorias: TNF- α , IFN- γ e IL-12 (Tian y col., 2004; Soltaniy col., 2011), disminución de la proliferación de linfocitos (Bjurstom y col., 2008; Mendu y col., 2011), reducción de la actividad fagocítica y quimiotaxis en monocitos (Wheeler y col., 2011; Mendu y col., 2012). Sin embargo, aún queda mucho por descubrir y actualmente se sabe relativamente poco respecto de los mecanismos moleculares por los cuales el sistema GABAérgico ejerce su efecto sobre las células del sistema inmune. Éstas entran en contacto con este neurotransmisor inhibitorio principalmente cuando es liberado por ellas mismas o cuando ingresan al cerebro, sin embargo, GABA también se puede encontrar en nódulos linfáticos, islotes de Langerhans y en sangre periférica (Bjurstom y col., 2008).

El sistema GABAérgico parece estar involucrado en patologías autoinmunes como EM, diabetes tipo 1, artritis reumatoidea y podría modular la respuesta inmune frente a infecciones (Jin y col., 2011). Los niveles de GABA se encuentran reducidos en el suero de pacientes con EM (Demakova y col., 2003). En algunos estudios se observó que el tratamiento oral con GABA reduce la respuesta inflamatoria en un modelo murino de artritis reumatoidea y en otros, la desregulación del metabolismo del GABA antecede a la autoinmunidad en los islotes pancreáticos en niños que luego desarrollan diabetes tipo I (Oresic y col., 2008). El rol y mecanismo por el que actúa el sistema GABAérgico en estas patologías aún se desconoce. Sin embargo, algunos antecedentes revelan que cuando se incrementa la concentración sistémica de GABA, se reduce la incidencia y se retrasa el inicio de diabetes tipo I en ratones NOD/scid que son ratones que desarrollan espontáneamente la enfermedad (Tian y col., 2004).

De manera similar, el aumento de la actividad GABAérgica mejora el curso de la parálisis en EAE, a través de la inhibición de la respuesta inflamatoria (Bhat y col., 2010) (Fig. 6).

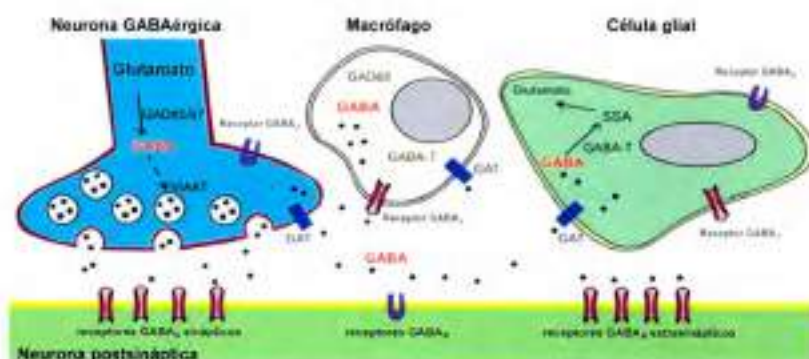


Figura 6: Figura esquemática que presenta varios componentes del sistema de señalización GABAérgico en diferentes células, incluido M ϕ s (Células del sistema inmune). VIAAT = transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios, GAT = transportador de GABA, GABA-T = GABA transaminasa, GAD= ácido glutámico decarboxilasa, SSA= semialdehído succínico. Adaptado de Levite y col. (2012)

Las benzodiazepinas y sus receptores

Benzodiazepinas son clásicamente conocidas como tranquilizantes menores, son drogas que poseen propiedades farmacológicas de ansiolíticos, hipnóticos, miorelajantes de acción central, anticonvulsivantes y sedantes (Yousefi y col., 2013). Estas acciones se encuentran mediadas por el receptor central de benzodiazepinas (CBR), también conocido como receptor GABA $_A$ (Olsen y Sieghart, 2009).

Las benzodiazepinas son agonistas alostéricos del receptor GABA $_A$, no desplazan al neurotransmisor GABA, sino que se unen a un sitio diferente en el receptor, generan un cambio conformacional que promueve la unión de GABA y de esta forma aumenta la frecuencia de apertura de los canales de cloruro, lo que lleva a una mayor hiperpolarización de la célula. Este evento resulta en una diferencia mayor entre el potencial de reposo y el umbral necesario para que se produzca la transmisión del impulso nervioso, de manera que este acontecimiento se torna menos probable (Riss y col., 2008). Para que las benzodiazepinas puedan ser capaces de unirse al receptor de GABA es necesario que éste se encuentre formado por las subunidades α 1, 2, 3 o 5, cualquier subunidad β y es indispensable la presencia de la subunidad γ 2

Por otro lado, las benzodiazepinas, presentan un sitio de unión alternativo al del receptor $GABA_A$. Este fue identificado en riñón en el año 1977, cuando investigadores estudiaban la presencia de sitios de unión para Dz en tejido periférico. La caracterización temprana de este receptor de Dz fuera del cerebro se denominó inicialmente como receptor periférico de benzodiazepinas (PBR), para diferenciarlo del receptor central o $GABA_A$ (Lacapere y col., 2003; Papadopoulos y col., 2006). Aunque el término PBR es ampliamente aceptado en la comunidad científica, múltiples nombres han sido empleados para referirse a esta proteína, incluyendo: receptor mitocondrial de benzodiazepinas, sitio de unión de PK11195, proteína de unión de isoquinolonas, pk18 y receptor v3. Sin embargo, TSPO o proteína translocadora de 18 kDa, también ha sido propuesto y es el más empleado actualmente (Zavala, 1997; Papadopoulos y col., 2006). Este receptor se localiza en membrana mitocondrial externa, particularmente concentrada en los sitios de contacto entre las membranas mitocondriales interna y externa. Además, TSPO se encuentra en pequeñas cantidades en la membrana plasmática y en la fracción nuclear de algunas células (Scarf y col., 2009). Este receptor forma un complejo de 4 a 6 moléculas, cuya organización se postula que forma un poro, reflejando su función como una proteína transportadora en la membrana mitocondrial. Interacciona con otras proteínas en este sitio, incluyendo el canal iónico dependiente de voltaje (VDAC) de 32 kDa y la proteína transportadora de nucleótidos adenina (ANT) de 30kDa, proteína 1 asociada a PBR (PRAX-1), subunidad regulatoria de la proteína asociada R1 α (PAP7) (Casellas y col., 2002; Papadopoulos y col., 2006; Scarf y col., 2009) (Fig. 7).

TSPO se encuentra expresado con mayor abundancia en órganos endócrinos (corteza adrenal, glándula tiroidea, próstata, placenta, útero, ovarios), piel, corazón, epitelio pulmonar, medula ósea, hígado, bazo y en menor medida en SNC, donde está asociado a células de la glía (Zavala, 1997; Wilms y col., 2003; Joo y col., 2012). Además, algunos trabajos más recientes han mostrado que se expresa en leucocitos, particularmente en monocitos, PMN y linfocitos (Scarf y col., 2009). Algunas de las funciones atribuidas a este receptor son, regulación del transporte mitocondrial de colesterol para la conversión a pregnenolona, paso determinante en esteroidogénesis y neurosteroidogénesis (Papadopoulos y col., 2006), unión y transporte de porfirinas involucradas en la síntesis del grupo hemo, apoptosis, proliferación celular, diferenciación, regulación de las funciones mitocondriales e inmunomodulación (Bento de Lima y col., 2010; Huemer y col., 2010; Gut y col., 2015; Hatty y col., 2015), sin

embargo los mecanismos moleculares por los cuales ejerce estas últimas funciones, aún se desconocen.

Algunas benzodiazepinas son llamadas mixtas, tales como Dz y Flunitrazepam por su capacidad de unirse al receptor GABA_A y TSPO, mientras que otras como Clonazepam y Flumazenil, presentan muy baja afinidad por este último. Existen otros ligandos capaces de unirse a TSPO, los principales son Ro5-4864 (4'-chlorodiazepam) y la isoquinolonacarboxamida, PK11195, cuya afinidad por TSPO es mayor que por CBR (receptor GABA_A) (Wei y col., 2010). Ro5-4864 es un agonista, mientras que PK11195 en algunos trabajos ha sido descrito como antagonista y en otros como agonista débil de TSPO (Casellas y col., 2002).

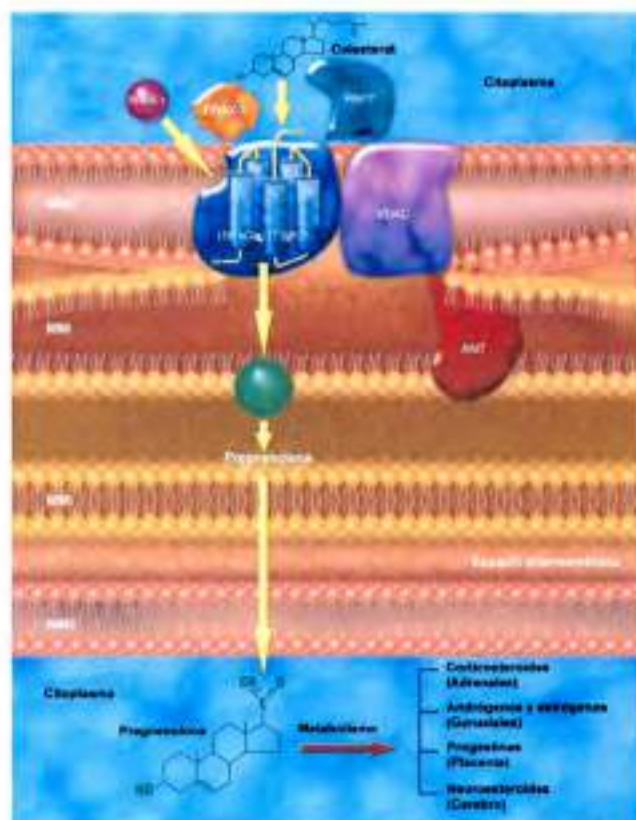


Figura 7: Esquema representativo de la localización de TSPO, interacción con otras proteínas, y funciones en la que se encuentra involucrado. Adaptado de Papadopoulos y col. (2006).

El TSPO como marcador de activación

En SNC, el TSPO se localiza principalmente en células de la glia. Varios estudios han demostrado su presencia en astrocitos y microglia y la densidad de este

receptor se incrementa en condiciones de activación glial, incluyendo inflamación y estrés metabólico (Casellas y col., 2002; Venneti y col., 2006; Politis y col., 2012; Bae y col., 2014). Algunos ejemplos de patologías inflamatorias y/o neurodegenerativas de SNC humanas y en modelos experimentales donde se ha observado un aumento en la densidad de TSPO incluyen: enfermedad de Alzheimer, Huntington, tumores cerebrales, lesión por traumatismo cerebral, varios tipos de epilepsia, esclerosis lateral amiotrófica, Parkinson y EM (Papadopoulos y col., 2006; Venneti y col., 2006; Daugherty y col., 2013). Sin embargo el rol asociado al incremento en la expresión de esta proteína aún se desconoce. Se ha postulado que podría estar participando en procesos de regulación de muerte celular, producción de citocinas, generación de radicales libres o proliferación de microglía (Venneti y col., 2006; Selvaraj y col., 2015) (Fig. 8). En base a esto se lo considera un potencial blanco terapéutico y se han realizado algunos estudios empleando agonistas de TSPO como Vinpocetina y Ro5-4864 en modelos animales de Alzheimer e inflamación mediada por LPS (Zhao y col., 2011; Barron y col., 2013).

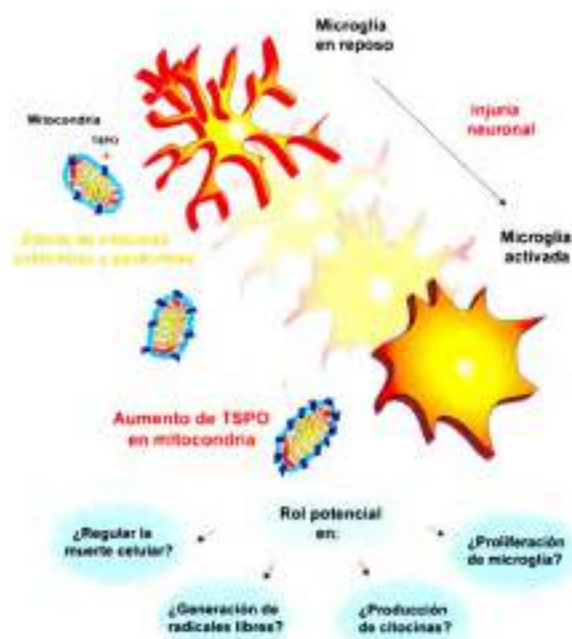


Figura 8: Esquema representativo de las potenciales funciones y mecanismos asociadas al aumento de TSPO en microglía activada. Adaptado de Venneti y col. (2006).

Obbiettivos

Objetivo general:

En base a los antecedentes citados, nuestra hipótesis de trabajo establece que es posible modular la respuesta inmunológica durante el desarrollo de la EAE, empleando un tratamiento con Dz. Por ello, proponemos estudiar el efecto de esta droga en células que participan durante el desarrollo de la patología *in vivo* como *in vitro*.

Objetivos específicos:

- 1- Analizar el efecto de la administración intraperitoneal de Dz sobre la incidencia, los signos clínicos característicos de la EAE y sobre las poblaciones celulares y las moléculas involucradas en el desarrollo de la patología.
- 2- Evaluar el efecto directo de Dz sobre diferentes poblaciones celulares que participan activamente durante la inducción y desarrollo de la EAE: linfocitos, CD4 y Mφs.
- 3- Estudiar la presencia de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A y del receptor TSPO en linfocitos T CD4⁺ como posibles vías por las cuales podría estar actuando el Dz y comparar con la composición de los mismos en tejido cerebral.

Materialiales y métodos

Animales

Para los experimentos realizados se utilizaron ratas de una cepa Wistar endocriadas en nuestro laboratorio por 45 años. Sin establecer diferencias en cuanto al sexo, los animales contaban con 40-47 días de edad y un peso entre 120 y 150 g. Los mismos se mantuvieron en condiciones estándares de luz, temperatura y fueron tratados de acuerdo con las reglamentaciones internacionales e institucionales para su cuidado, siendo el protocolo aprobado por el Comité para el Uso y Cuidado de los Animales de la Facultad de Ciencias Químicas (Exp. No. 15-99-40426 y Res. Dec. 832/2015). Todo el esfuerzo posible fue realizado para minimizar el número de animales y su sufrimiento.

Para los experimentos realizados en el capítulo 2 (II), se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 (B6; H-2b). Los mismos fueron comprados a la Fundación José A. Balseiro, Centro de Energía Atómica Ezeiza, Bs.As., Argentina. Los ratones fueron mantenidos bajo condiciones específicas libres de patógenos y usados entre las semanas 6-8 de edad. Los protocolos de uso de animales estuvieron en concordancia con la guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio publicada por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) y el Comité de cuidado animal institucional local.

Reactivos

Suero fetal bovino (SFB) de Natocor (Córdoba, Argentina), Gentamicina de Schering-Plough (México D.F., México). Adyuvante de Freund completo (AFC), medio RPMI 1640, L-Glutamina, Deoxiribonucleasa I de páncreas bovino (DNAsa I), tripsina, Azul de tripán, concanavalina A (Con A), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-YI)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), lipopolisacárido (LPS, *Escherichia coli*, cepa 0111:B4), Sulfanilamida, N-(1-naftil)-etilendiamina, nitrito de sodio, 2-Mercaptoetanol, acrilamida y bis-acrilamida de Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, USA). Ketamina (Ketonal, 50 mg/mL) anestésico general disociativo, Xilazina (Xiliacina 20 Richmond, 20 mg/mL) analgésico sedante. Colagenasa tipo IV de GIBCO Invitrogen Co. (Grand Island, NY), Percoll de GE Healthcare Life Sciences (Pittsburgh, PA, USA), Solución fisiológica esterilizada (Laborit). Buffer fosfato salino (PBS) 1X. Ésteres de forbol (PMA), Ionomicina, monensina, Kit de ELISA Interleucina 17 (IL-17) de eBioscience (San Diego, CA, USA). Dz (7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-1,4-benzodiazepin-2(3)-ona, Valium) 5 mg/mL obtenido de Roche Internacional Limited (Montevideo, Uruguay). Albúmina sérica bovina (BSA) (Tetrahedron). Kit de detección anti-Anexina V-FITC (Isotiocianato de fluoresceína), Ioduro de propidio (IP), obtenidos de BD Biosciences (San Diego, CA, USA).

Timidina tritiada ([³H] TdR) de NEN Life Science Products, Inc. (Boston, MA, USA). Kit de ELISA interferón gamma (IFN- γ), IL-12p70, factor de necrosis tumoral (TNF), IL-6, IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), Sustrato de ELISA TMB (BD Pharmingen). Ácido fosfórico (H₃PO₄) (MERCK), membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), Marcador de peso molecular (Biorad), DAPI (Invitrogen), TRIzol reagent (AMBION by Life Technologies).

El resto de los reactivos químicos fueron de grado analítico de la máxima pureza disponible.

Buffers y soluciones

Buffer FACS: 1 mL de EDTA 0,5 M, 1 mL de solución 10 g% de azida de sodio, 1mL de solución de BSA 1%, llevar a volumen final de 100 mL con PBS

Buffer RIPA: 50 mM Tris-HCl Ph=7,4, NP-40 1 %, desoxicolato de sodio 0,5 %, SDS 0,1 %, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, ortovanadato de sodio 100mM, NaF 50 mM.

Buffer de fijación (eBioscience)

Buffer de permeabilización (eBioscience)

Antígenos

La mielina fue purificada de médula espinal bovina según el método de Haley y col., (1981). Brevemente, la muestra fue sometida a tres ciclos de ultracentrifugación (75.000 x g) en gradiente discontinuo de sacarosa 0,32 y 0,8 M, seguidos de lisis osmótica en agua bidestilada. Finalmente la fracción de mielina purificada, obtenida de la interface del gradiente de sacarosa, fue resuspendida en agua bidestilada, liofilizada por 24 hs y conservada a -20 °C hasta su uso.

Anticuerpos

Anticuerpos comerciales empleados contra la especie rata: anti-CD8a conjugado a complejo piridina de la proteína clorofila (PerCp) (Clon ox-8), anti-CD4 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), (OX-35), anti- CD11b/c conjugado a ficoeritrina (PE), (Clon OX-42), Anti-CD4 conjugado a biotina (OX-35). Anti-CD3 conjugado a biotina (G4.18), anti CD45-biotina (OX-1), anti-IFN- γ conjugado PE, anti -IL-17 conjugado a alofococianina (APC) de BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Anti-CD45RA conjugado a biotina (Clon OX-33) de Invitrogen (Frederick, MD, USA). Anti-MHCII conjugado a FITC (ABDserotec). Anti-CD25 conjugado a APC (IL-2Ra, clon OX-39) de Ebioscience (San Diego, CA, USA). Anti-CD4 marcado con APC-cy7 (BD Pharmingen). Anti-CD4 biotina (BD Pharmingen) Estreptavidina conjugada a APC obtenida de eBioscience (San Diego,

CA, USA).

Se utilizaron anticuerpos monoclonales comerciales para ensayos de citometría de flujo: anti-CD11c conjugado a FITC, anti-CD40 conjugado con PE, anti-IA/IE (MHCII) conjugado con PE, anti-CD11b conjugado a APC, anti-F4/80 conjugado con APC-Cy7, todos de BD Pharmingen (San Diego, CA, USA).

Se obtuvieron anticuerpos policlonales comerciales para ensayos de SDS-PAGE y *Western Blot*: Anticuerpos dirigidos contra P-ERK1/2 (T202/Y20), ERK1/2 total, P-p38MAPK (T180/Y182), p38MAPK total, anti I κ B ϵ hechos en conejo, fueron adquiridos en Cell Signaling Technology. El anticuerpo policlonal anti-iNOS se obtuvo de BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA). Como control de carga se empleó el anticuerpo monoclonal, anti-alpha tubulina (DM1A) (Sigma-Aldrich). Los anticuerpos secundarios IRDye 800CW anti-IgG de ratón e IRDye 800CW anti-IgG de conejo fueron de LICOR (Lincoln, NE, USA).

Los anticuerpos contra la subunidad gamma2 del receptor GABA α de humano, rata y ratón, fueron producidos en conejo y obtenidos de Alomone Labs. Anti PBR (TSPO) de humano, rata y ratón, producido en conejo (Bio vision). Alexa 488 anti-conejo, producido en cabra, IgG (H+L) 2 mg/mL, Invitrogen, Alexa 555 anti-ratón, producido en cabra, IgG (H+L) 2 mg/mL (Invitrogen).

MÉTODOS

Inducción activa de la EAE

Los animales fueron separados en diferentes grupos experimentales y anestesiados por vía intraperitoneal con una mezcla de Xilazina y Ketamina (10 y 65 mg/kg, respectivamente) e inyectados intradérmicamente en las almohadillas de grasa de las patas traseras con una emulsión conteniendo 0,25 mL de PBS y 0,25 mL de AFC con 8 mg de mielina liofilizada obtenida a partir de médula espinal bovina. En algunos experimentos, otro grupo de ratas recibió 0,5 mL de la misma emulsión sin preparación antigénica (grupo control, AFC). Los animales fueron pesados, observados diariamente para registrar los signos clínicos de la enfermedad, y fueron sacrificados por asfixia con dióxido de carbono (CO $_2$) al día 13 post-inducción (dpi), durante el pico de la patología.

Tratamiento para supresión de la EAE:

Cuando se indicó, los animales recibieron por vía intraperitoneal una solución de Dz 0,5 mg/kg de peso/día en vehículo (SF estéril). Las inyecciones fueron realizadas diariamente a partir de los 6 dpi y hasta el día en que fueron sacrificados (13 dpi). Los

animales se pesaron y examinaron diariamente para detectar los signos clínicos característicos de la patología. La graduación de los mismos fue la siguiente: 0= ausencia de signo clínico, 1: flacidez en la cola, 2: ataxia o parálisis en las patas traseras, 3: parálisis definitiva posterior e incontinencia fecal y urinaria, 4: tetraparálisis definitiva, 5: estado moribundo o muerte. Se registraron los datos relacionados con la incidencia de la patología, día de comienzo, duración, y analizaron parámetros indicativos de la severidad clínica de la enfermedad tales como:

1- La media de la severidad clínica máxima (M.S.C.M), es la relación entre la suma de la severidad clínica máxima alcanzada por cada rata durante la fase aguda de la enfermedad sobre el número de ratas de cada grupo.

2- El índice de enfermedad, es la suma de la severidad clínica diaria de cada animal a lo largo del periodo experimental, dividido por el día de comienzo de los signos clínicos y multiplicado por 100.

Reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH)

Para estudiar la respuesta celular *in vivo* contra uno de los antígenos que participan en el desarrollo de la enfermedad, el día 9 post-inducción, se realizó una inyección subcutánea con 120 µg de PBM en 40 µL de SF en la oreja derecha y con 40 µL de SF en la oreja izquierda. A las 24 hs de la inyección se determinó el espesor de las orejas en el sitio de inyección, por un ensayo ciego con un calibre digital. Los resultados se expresaron como la diferencia (en mm) entre la oreja derecha e izquierda (Bibolini y col., 2011).

Caracterización de poblaciones celulares en ganglios y SNC

Sacrificio de los animales:

Los animales fueron sacrificados a los 13 dpi durante el periodo agudo de la patología por eutanasia con CO₂. Se procedió a abrir el tórax y los animales fueron perfundidos intracardiamente a través del ventrículo izquierdo con 60 mL de PBS frío. Se extrajo el cerebro, cerebelo, médula espinal, y posteriormente los ganglios linfáticos poplíteos.

Obtención de células de ganglios poplíteos

Se aislaron asépticamente los ganglios poplíteos. Se prepararon suspensiones celulares a partir de dispersión mecánica con un émbolo sobre una malla metálica. Las células fueron filtradas a través de una malla de nylon de 70 µm (BD Pharmingen) para

eliminar los restos de tejido y posteriormente lavadas por centrifugación a $400 \times g$ con 50 mL de PBS frío conteniendo $40 \mu\text{g/mL}$ de Gentamicina. Las células fueron resuspendidas en medio RPMI con 10% de SFB, $40 \mu\text{g/mL}$ de Gentamicina y $0,3 \text{ mg/mL}$ de L-glutamina (RPMI completo). El número y viabilidad de las células se estimaron por recuento en solución 0,2 % azul de tripán en cámara de Neubauer.

Aislamiento de células inflamatorias del SNC

Una vez obtenidos el cerebro, cerebelo y médula espinal, el tejido se cortó en pequeños trozos y fue digerido con Colagenasa tipo IV 1 mg/mL , ADNasa I $30 \mu\text{g/mL}$ por 45 min. a 37°C con agitación. Luego de detener la digestión enzimática agregando 1 mL de SFB, se realizó una disgregación mecánica con un émbolo a través de una malla metálica. El homogenato fue pasado a través de filtros de $70 \mu\text{m}$ (BD Pharmingen) y las células fueron lavadas, centrifugadas a $400 \times g$, 10 min. a 4°C y resuspendidas en 20 mL de PBS-Percoll al 30 %, colocadas sobre 10 mL de PBS-Percoll 70 % y luego centrifugadas nuevamente a $500 \times g$ por 30 min. a 4°C . Las células inflamatorias de SNC fueron aisladas a partir de la interface formada por Percoll 30/70 %, lavadas y resuspendidas en medio RPMI completo. El número total y la viabilidad de las células obtenidas se estimaron por recuento en una solución 0,2 % de azul de tripán en cámara de Neubauer.

Caracterización de poblaciones celulares

$7,5\text{-}10 \times 10^5$ células aisladas de ganglios poplíteos y $5\text{-}7,5 \times 10^5$ células inflamatorias del SNC de cada animal, fueron incubadas con buffer FACS durante 10 min. en frío, y posteriormente por 30 min. con diferentes mezclas de anticuerpos: anti-CD11b/c conjugado a PE, anti-CD45 conjugado a biotina, anti-MHCII conjugado a FITC, anti-CD3 conjugado a biotina, anti-CD4 conjugado a FITC, anti-CD8 conjugado a PerCp, anti-CD45RA conjugado a biotina (Fux y col., 2008) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Fueron lavadas con PBS y cuando correspondiere incubadas con estreptavidina conjugada a APC. Finalmente fueron lavadas y resuspendidas en $100 \mu\text{l}$ de PBS. Se adquirieron al menos 50.000 eventos de cada muestra utilizando un citómetro FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) y se analizaron con el software FlowJo versión 5.7.2 y FlowJo versión 10. Los resultados se graficaron empleando el programa GraphPad Prism, versión 5.0. Por un lado, los valores relativos corresponden al porcentaje de la población X, es decir: el número de eventos adquiridos de la población X en relación al número de eventos totales adquiridos por el citómetro de flujo. Los valores absolutos corresponden al producto entre el valor relativo para la población X de un

animal y el número de células totales aisladas de cada órgano, del mismo animal.

Determinación de citocinas intracelulares

1×10^6 células aisladas de ganglios poplíteos y $5-7,5 \times 10^5$ células inflamatorias del SNC de cada animal, fueron cultivadas por 5 hs en 1 mL de medio RPMI completo con ésteres de forbol (PMA) 50 ng/mL e Ionomicina 400 ng/mL y 3 hs antes de la finalización del cultivo, se agregó monensina a una concentración final de 2 μ M (Momcilovic y col., 2008). Las células fueron lavadas y se procedió a la marcación de antígenos de superficie, para lo cual las mismas fueron incubadas en frío por 10 min. en buffer FACS, luego lavadas e incubadas durante 30 min. con anticuerpo anti-CD4 conjugado a FITC. Las células fueron lavadas nuevamente e incubadas por 20 min. en buffer de fijación, luego con buffer de permeabilización por 30 min. en presencia de anti-IFN- γ conjugado a PE y anti-IL-17 conjugado a APC. Finalmente las células fueron lavadas y resuspendidas en PBS. Se adquirieron al menos 50.000 eventos de cada muestra utilizando un citómetro FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) y se analizaron con el software FlowJo versión 5.7.2

Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados al menos 3 veces. Los datos obtenidos en cada grupo fueron expresados como la media \pm error estándar (ESM), analizados mediante ANOVA de una vía, seguido de un análisis *post-hoc* mediante el test de Tukey. Para descartar datos que se alejaban de la media mediante una herramienta estadística, se aplicó el test de Grubbs. Para realizar los análisis estadísticos, se utilizó el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., CA, USA) y se consideró significativa toda diferencia que arrojará un valor de $p < 0,05$.

Procedimientos para linfocitos

Se evaluó el efecto directo de Dz sobre la viabilidad celular, inducción de apoptosis, proliferación, producción de citocinas y estado de activación de linfocitos. Para ello, luego de aislar las células de ganglios poplíteos de animales EAE enfermos, $1,25 \times 10^6$ células/mL fueron cultivadas por triplicado en un volumen de 200 μ l en placas de 96 pocillos de fondo plano (250.000 células/pocillo) por 24 o 48 hs en incubador a 37°C, 5 % CO₂. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de Dz (entre 2,5-500 μ M) y estimuladas por 24-48 hs con 1 μ g/mL de Con A o 100 μ g/mL de PBM.



Ensayo de citotoxicidad y viabilidad celular

La viabilidad celular fue ensayada empleando MTT (tetrazol amarillo), un reactivo que es reducido a formazán (violeta) en células vivas. El ensayo de colorante de tetrazolio también puede ser utilizado para medir citotoxicidad (pérdida de células viables) o actividad citostática de potenciales agentes medicinales y materiales tóxicos. Diferentes concentraciones de Dz fueron agregadas a las células en cultivo a 37°C. Luego de 20 o 44 hs (según corresponda), se agregaron 20 µL de una solución de MTT 5 mg/mL a cada pocillo y las células fueron incubadas por 4 hs más a 37°C para que se produzca la metabolización del compuesto. Las placas fueron centrifugadas a 350 x g durante 10 min., se removió el sobrenadante y se agregaron 200 µL de DMSO. La absorbancia fue registrada a 570 nm en un lector de microplaca (Xiong y col., 2013).

Detección de apoptosis y muerte celular

Para la identificación de células apoptóticas y muertas, se utilizó la marcación con Anexina V-Ioduro de propidio (IP). Las células fueron cultivadas en placa de 96 pocillos por 24 hs. en presencia de diferentes concentraciones de Dz (µM), posteriormente, se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en 100 µl de Buffer de unión de Anexina, conteniendo anti-Anexina V conjugado a FITC (0,5 µg/7,5 x 10⁵ células) y solución de IP (0,1µg/7,5 x 10⁵ células). Las células fueron incubadas por 10 min. en oscuridad a temperatura ambiente y finalmente analizadas por citometría de flujo. Del análisis se puede interpretar que las células apoptóticas tempranas resultan positivas únicamente para Anexina V, las células en etapa de apoptosis tardía o necrosis, se observan doble positivas (Anexina V (+) y PI (+)), ya que la técnica no permite distinguir entre estos 2 procesos, mientras que las células viables, son doble negativas (Vermes y col., 1995; Guasconi y col., 2012).

Ensayos de proliferación

Las células aisladas fueron cultivadas por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo plano en presencia de diferentes concentraciones de Dz (µM), y se estimularon con 1 µg/mL de Con A o 100 µg/mL de PBM. Se incubaron por 24 o 48 hs respectivamente a 37° con 5 % de CO₂. 18 hs previas a la finalización del cultivo, los pocillos fueron pulsados con 20 µL de medio conteniendo 1 µCi de [³H] TdR, las células fueron cosechadas en papel de fibra de vidrio y se midió la radiactividad incorporada por las mismas usando un contador de centelleo líquido. Los resultados fueron expresados como índice de estimulación (I.E), definido como la relación entre las cuentas por minuto (cpm) promedio de las células estimuladas, respecto de las cpm promedio de las células no

estimuladas.

Ensayo de inducción de energía por Dz

Las células fueron incubadas por 24 hs a 37°C con 5 % de CO₂ en presencia de 0 - 10 o 25 μM de Dz, sin estímulo alguno. Transcurrido el tiempo, las mismas fueron lavadas 2 veces con PBS para remover el Dz, resuspendidas en medio completo y se volvieron a incubar por 24 hs en placas de 96 pocillos a 37°C con 5 % de CO₂, en presencia de Con A o anticuerpo anti-CD3 (estímulos inespecíficos). 18 hs previas a la finalización del cultivo, los pocillos fueron pulsados con 20 μl de medio conteniendo 1 μCi de [3H] TdR, las células fueron cosechadas en papel de fibra de vidrio y se midió la radiactividad incorporada por las mismas usando contador de centelleo líquido. Los resultados fueron expresados en índice de estimulación (I.E), definido como la relación entre las cuentas por minuto (cpm) promedio de las células estimuladas, respecto de las CPM promedio de las células no estimuladas.

Determinación de citocinas en sobrenadante de cultivo

Las citocinas en sobrenadante de cultivo, se determinaron utilizando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Las células fueron preparadas y cultivadas como se describió previamente, con el estímulo correspondiente (Con A o PBM) y diferentes concentraciones de Dz. Luego de 24-48 hs, las placas fueron centrifugadas a 350 x g por 10 min. y los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados y almacenados a -70°C hasta el momento de ser procesados.

Brevemente, el procedimiento para procesar los sobrenadantes fue el siguiente: placas de 96 pocillos mitad de área, fondo plano y con alta capacidad de unión (Costar, INC, NY, USA) se incubaron toda la noche a 4°C con 25 μL de "coating" buffer conteniendo los anticuerpos de captura anti-IFN-γ y anti-IL-17 (dilución 1/250 y 1/125, respectivamente); las placas fueron lavadas y bloqueadas según instrucciones del fabricante y se incubaron con 25 μL de los sobrenadantes de cultivo por triplicado por 2 hs a temperatura ambiente. Luego se lavó y se incubó con buffer conteniendo los anticuerpos de detección correspondientes conjugados a biotina durante 1 h a temperatura ambiente (1/250 y 1/125, respectivamente). Se lavó y se incubó con 25 μL de estreptavidina conjugada a HRP (dilución 1/250) durante 30 min. a temperatura ambiente. Se lavó e incubó con 40 μL de sustrato de la enzima, TMB (3',3',5',5'-tetrametilbenzidina, sustrato líquido). La reacción fue interrumpida con el agregado de 20 μL de H₂SO₄ 2N. La absorbancia fue medida a 450 nm. Las concentraciones de citocinas presentes en cada sobrenadante fueron extrapoladas a partir de la curva estándar de

cada una de ellas.

Determinación de citocinas intracelulares

500.000 células aisladas de ganglios popliteos fueron cultivadas en placas de 24 pocillos durante 24 hs en presencia o no de Con A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Dz 25 μM en 1 mL de medio RPMI completo a 37°C y 5 % CO_2 . 3 hs antes de la finalización del cultivo, se agregó monensina a una concentración final de 2 μM (Momcilovic y col., 2008). Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y se procedió a la marcación de antígenos de superficie, para lo cual fueron incubadas durante 10 min. con buffer FACS en hielo. Las células fueron lavadas con PBS e incubadas durante 30 min. con los anticuerpos anti-CD4 de rata conjugado a FITC y anti-CD8 de rata conjugado a PerCp. Luego fueron lavadas nuevamente e incubadas por 20 min. en buffer de fijación, seguido por 30 min. con anti-IFN- γ conjugado a PE y anti-IL-17 conjugado a APC preparados en buffer permeabilización. Finalmente las células fueron lavadas y resuspendidas en PBS. Se adquirieron 50.000 eventos utilizando el citómetro FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) y los datos se analizaron con el software FlowJo, versión 5.7.2.

Estudio del estado de activación de células T

Para determinar la respuesta funcional de células T, se evaluó la expresión del marcador de activación CD25 (subunidad alfa del receptor de interleucina 2) en células cultivadas en medio RPMI completo a 37°C y 5 % CO_2 en placas de 96 pocillos en presencia de Con A y Dz. A las 24 hs de cultivo, las células fueron cosechadas, 3 pocillos fueron agrupados y marcados para antígenos de superficie con anticuerpos anti-CD4 conjugado a FITC, anti-CD8 conjugado a PerCp y anti-CD25 conjugado a APC. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo empleando el equipo FACS Canto II (Becton Dickinson, San José, CA, USA). Se utilizó el software FlowJo versión 5.7.2 para el análisis. Se adquirieron un mínimo de 50.000 células por muestra.

Análisis estadístico:

Los resultados fueron expresados como la media \pm ESM. Los datos fueron analizados usando el análisis de varianza ANOVA de una vía. Una comparación por pares de la media de todo los grupos respecto a un grupo control fue llevado a cabo (prueba de comparación múltiple de Dunnet). En todo el análisis estadístico, $p < 0,05$ fue considerado por representar una diferencia significativa entre grupos.

Obtención de GM-CSF y M-CSF

Para la obtención de factores de crecimiento necesarios para diferenciar progenitores de médula ósea en CD_s y M ϕ _s inmaduros, se utilizaron líneas celulares específicas. La línea celular J558 produce grandes cantidades de GM-CSF, necesario para la diferenciación de CD_s, mientras que la línea celular L929, produce grandes cantidades de M-CSF, necesario para la diferenciación de M ϕ _s. Brevemente, 200.000 células fueron colocadas en placas de cultivo de 10 cm de diámetro con 12 mL de medio RPMI completo e incubadas durante 7 días. Transcurrido este periodo, se colectó el sobrenadante (enriquecido en factor de diferenciación) y se conservó a -20°C hasta la realización del experimento.

Preparación y cultivo de CD_s y M ϕ _s

Las CD_s fueron generadas como se describió previamente (Falcón y col., 2012). Brevemente, se obtuvo médula ósea de fémur y tibia de ratones y las células fueron colocadas en placas de Petri bacteriológicas a una concentración 2×10^5 /mL en 10 mL de medio completo suplementado con 2 mM de L-Glutamina, 1 % de sobrenadante de cultivo de células J558 productoras de GM-CSF (concentración final: 20 ng/mL), 10 % SFB libre de endotoxinas, y 50 μ g/mL de Gentamicina. Al día 3, se adicionaron 10 mL más de medio conteniendo GM-CSF. Al día 7 las células fueron cosechadas y marcadas con el anticuerpo específico (anti-CD11c) siendo el 85 % positivas para ese marcador. El número y viabilidad de células se estimaron por recuento en solución 0,2 % azul de tripán en cámara de Neubauer.

Los M ϕ _s fueron obtenidos utilizando el mismo método, pero los progenitores de médula ósea fueron cultivados en RPMI 1640 con 10 % de SFB en presencia de M-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos). Al día 3, se adicionaron 10 mL más de medio conteniendo M-CSF. Al día 7 de cultivo, más del 85 % de las células colectadas expresaron el marcador de superficie CD11b y F4/80, moléculas características de M ϕ _s. El número y viabilidad de células se estimaron por recuento en solución 0,2 % azul de tripán en cámara de Neubauer.

Se evaluó el efecto directo de Dz sobre la viabilidad celular, estado de activación, producción de citocinas, producción de óxido nítrico (NO), inducción de la enzima iNOS, y activación de vías de señalización intracelular (gatilladas por LPS). Para ello, CD_s y M ϕ _s

diferenciadas de médula ósea fueron cultivadas en una concentración $1,5 \times 10^6$ células/mL en 200 μ l de volumen final en placas de 96 pocillos en con diferentes concentraciones de Dz (5-25-50 μ M) en presencia o ausencia de LPS (1 μ g/mL) a 37°C, 5 % CO₂ durante 18 hs (salvo aclaración).

Expresión de CMHII y moléculas co-estimuladoras

CDs y M ϕ s diferenciadas de médula ósea fueron cultivadas como se indicó previamente. Luego de 18 hs., las células fueron cosechadas, lavadas y marcadas con anticuerpos específicos para antígenos de superficie, de igual manera al procedimiento detallado en: "tipificación de células drenantes en ganglio y SNC". Para ello se emplearon los siguientes anticuerpos: anti-CD11c conjugado a FITC (para caracterizar la población de CDs) o anti-CD11b conjugado a APC y Anti-F4/80 conjugado con APC-Cy7 (para caracterizar a población correspondiente a M ϕ s), anti-IA/IE (CMHII) conjugado a PE y anti-CD40 conjugado a PE (para molécula del complejo mayor de histocompatibilidad y molécula co-estimuladora respectivamente).

Determinación de citocinas en sobrenadante de cultivo

Las citocinas en sobrenadante de cultivo se determinaron utilizando ELISA. CDs y M ϕ s diferenciados de médula ósea fueron cultivadas como se indicó previamente. Transcurrido el periodo de incubación, los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados y almacenados a -80°C hasta el momento de ser procesados. La concentración de IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-10, TGF- β fue determinada usando un juego de anticuerpos en un ELISA sándwich de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El procedimiento detallado de la técnica fue descrito previamente en la sección "determinación de niveles de citocinas *in vitro* – determinación de citocinas en sobrenadante de cultivo" (página 51)

Ensayo de producción de NO por M ϕ s

La producción de NO se midió indirectamente cuantificando los nitritos presentes en los sobrenadantes de 18 hs de los cultivos de M ϕ s diferenciados de médula ósea, mediante la reacción de Griess (Dulgerian y col., 2011). Brevemente, se transfirieron por duplicado 100 μ L de sobrenadante a una microplaca de 96 reservorios de fondo plano, se agregaron 100 μ L de una mezcla de sulfanilamida 10 mg/mL y N-(1-naftil)-etilendiamina 1 mg/mL disuelta en 2,5 % H₃PO₄ y se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente. Se cuantificó la densidad óptica (DO) desarrollada a una longitud de onda de 550 nm. Los valores obtenidos se expresaron como concentración de nitritos (μ M) por comparación con una curva estándar de nitrito de sodio.

SDS-PAGE y Western blot

Se utilizó la técnica de inmunotinción para cuantificar las proteínas óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), inhibidor épsilon del Factor Nuclear kappa B ($\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$), proteína quinasa con actividad mitógena fosforilada en Treonina 180y tirosina 182 y total (P-p38MAPK y p38MAPK total), quinasa reguladora de señal extracelular, fosforilada en treonina 202 o tirosina 204 y total (P-ERK1/2 y ERK1/2 total respectivamente).

Para el estudio de iNOS, se prepararon muestras de cultivos de Mφs diferenciados de médula ósea que habían sido cultivados por 24 hs en placas de 24 pocillos, a una concentración de 1×10^6 células/mL, en un volumen final de 500 μL a 37°C y 5 % CO_2 , en presencia de Dz con o sin LPS.

Para evaluar el efecto de Dz sobre las vías de señalización intracelular gatilladas por LPS, a los Mφs diferenciados a partir de sus progenitores de médula ósea, luego de ser cultivados durante 24 hs en incubadora a 37°C 5 % CO_2 a una concentración de 1×10^6 células/mL, en placas de 24 pocillos en un volumen final de 500 μL , se les adicionó LPS y diferentes concentraciones de Dz durante 60 min. a 37°C.

Para la preparación de extractos celulares, luego de la incubación los Mφs fueron colectados y lisados con RIPA, luego se cuantificaron las proteínas, se centrifugaron y resuspendieron en buffer de siembra, hervidas a 96°C durante 5 min y conservadas a -20°C hasta el momento de siembra.

Cantidades iguales de proteínas (40 μg por carril) fueron separadas por SDS-PAGE. Resumidamente, se utilizaron geles de poliacrilamida al 10 % y 1,5 mm de espesor y la corrida electroforética se realizó a voltaje creciente desde 120 V a 180 V. Marcadores de peso molecular de amplio rango se corrieron en paralelo. Posteriormente, las proteínas separadas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, (poro de 0,45 μm), durante 60 min. a 350 mA. Luego de bloquear las membranas con una solución de ABS 3 % en solución tampón de Tris salino con Tween 20 (TBS-T, Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, Tween 20 0,1 %, Ph=7,6) durante 1 h a temperatura ambiente, estas fueron incubadas con los anticuerpos primarios específicos (ver diluciones en la Tabla 1) disueltos convenientemente en TBS-T 1 % BSA, con agitación constante durante toda la noche a 4 °C. Las membranas fueron lavadas e incubadas con los anticuerpos secundarios unidos a un fluoróforo infrarrojo (Tabla 1), los cuales se diluyeron en TBS-T y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Luego de extensos lavados, la señal de fluorescencia fue detectada en el sistema de imágenes infrarrojo Odyssey (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). Las bandas obtenidas fueron cuantificadas mediante el uso del programa Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD,

USA). En cada membrana se detectó la forma fosforilada y total de la proteína de interés (teniendo la precaución de medir la forma fosforilada en primer lugar) y finalmente tubulina. Para ello se realizó un tratamiento con una solución de hidróxido de sodio 2 M, durante 5 min., a temperatura ambiente y agitación, que remueve todas las proteínas asociadas a la membrana. A continuación se repitió el protocolo de Western blot desde el paso de bloqueo en adelante. El grado de fosforilación de las diferentes proteínas analizadas se relativizó a la intensidad de fluorescencia de la proteína total correspondiente. La señal obtenida de la banda correspondiente a alfa tubulina fue utilizada como control de siembra. Todos los resultados se expresaron como Índice de aumento (IA) respecto de la condición basal (sin LPS ni Dz).

Tabla 1 (Anticuerpos primarios)

Proteína que reconoce	Peso molecular	Especie	Dilución
iNOS	130 kDa	Conejo	1/1.000
P-p38MAPK	38 kDa	Conejo	1/1.500
p38MAPK total	38 kDa	Conejo	1/1.500
P-ERK1/2	42/44 kDa	Conejo	1/1.000
ERK1/2 total	42/44 kDa	Conejo	1/1.000
I κ B ϵ	53 kDa	Ratón	1/2.000
α -tubulina (DM1A)	50 kDa	Ratón	1/1.000

Anticuerpos secundarios:

IRDye 800CW anti-IgG de ratón, dilución 1/15.000.

IRDye 800CW anti-IgG de conejo dilución 1/15.000.

Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media \pm ESM y fueron analizados por ANOVA de una vía. Para establecer niveles significativos para comparaciones múltiples, se empleó test de corrección de Bonferroni. Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado. Diferencias con valores de $p < 0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

Procesamiento de nódulos linfáticos poplíteos

Los nódulos linfáticos fueron procesados como se describió previamente en "Obtención de células de ganglios poplíteos", (página 47). Una fracción de las células obtenidas fue empleada para ensayos de identificación de la subunidad $\gamma 2$ y TSPO por citometría de flujo y microscopia.

Aislamiento de células inflamatorias del SNC

El SNC (cerebro, cerebelo y médula espinal) fue procesado como se describió previamente en "aislamiento de células inflamatorias de SNC" (página 48). Una fracción de las células obtenidas fue empleada para ensayos de identificación de la subunidad $\gamma 2$ y TSPO por citometría de flujo.

Identificación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A y TSPO por citometría de flujo

Para el estudio de la subunidad $\gamma 2$ en superficie, las células aisladas de ganglio y SNC fueron marcadas para moléculas de superficie con los siguientes anticuerpos: anti-CD4 conjugado a APC-Cy7, Anti-CD11b/c conjugado a PE, y Anti- $\gamma 2$ "frio" (anticuerpo no acoplado a un fluorocromo) hecho en conejo. Las células fueron incubadas durante 1 h a 4°C, lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario anti-Ig de conejo acoplado a Alexa 488 (dilución 1/1000). Finalmente fueron lavadas y resuspendidas en 100 μ L de PBS.

Para el análisis de TSPO, luego de la marcación de superficie inicial (CD4⁺ y CD11b/c⁺), las células fueron incubadas por 20 min. en buffer de fijación, y posteriormente 1 h con anticuerpo anti-TSPO "frio" hecho en conejo y preparado en buffer de permeabilización. Se procedió a lavar nuevamente las células e incubarlas con un anticuerpo secundario anti-Ig G de conejo, acoplado a Alexa 488 (dilución 1/1000) también preparado en buffer de permeabilización. Finalmente las células fueron lavadas, resuspendidas en 100 μ l de PBS.

Se adquirieron al menos 50.000 eventos de cada muestra utilizando un citómetro FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) y se analizaron con el software FlowJo versión 5.7.2

Identificación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A y TSP0 en células T CD4⁺ por microscopia

Una fracción de células aisladas de ganglios popliteos fueron marcadas para la molécula de superficie (CD4) empleando un anticuerpo anti-CD4-biotina hecho en ratón (BD Pharmingen) y anti- $\gamma 2$ "frio" hecho en conejo, durante 1h a 4°C. Seguido por la incubación con un anticuerpo acoplado a Alexa 555 (1/1.500) específico para ratón y anti-Ig de conejo, acoplado a Alexa 488 (dilución 1/1000). Finalmente se tiñó el núcleo celular con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y las células fueron resuspendidas en 30 μL de PBS-paraformaldehido (PFA) al 1 %. Se tomó una alícuota de 7 μL y fue colocada en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos redondo (12 mm de diámetro) y se selló con esmalte. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal Olympus FluoView™ FV1000 equipado con un láser de argón/helio/neón, configurado para 3 fluoróforos y un objetivo de 60X (objetivo 60 X Laton 1,4 NA). La sensibilidad de los detectores fue configurada evitando alcanzar niveles de saturación. Las imágenes fueron procesadas con el programa Olympus FluoView versión 4.0a.

Obtención y procesamiento de corteza cerebral

A partir de cerebro total se aisló región frontal de la corteza cerebral y fue congelada a -80°C hasta su procesamiento. Para ser procesada, se colocó en pequeñas bolsas libres de ARNasa y ADNasa, y se trabajó en frío utilizando hielo seco. El tejido fue pulverizado mecánicamente en un bloque de hierro empleando un pistilo de porcelana, y lisado con TRIZOL para el posterior aislamiento del ARNm, obtención del ADNc y estudio de secuencias de interés por la técnica de qPCR empleando cebadores específicos (página 60).

Aislamiento de ARN total

A partir de tejido cerebral pulverizado en frío y lisado en 1mL de Trizol, se procedió a la extracción de ARN total haciendo uso del método de extracción con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Mylonas y col., 2009). Brevemente, a las muestras lisadas en Trizol, se le adicionó 0,2 mL de cloroformo y se procedió a la separación de fases. La fase acuosa superior se incubó con igual volumen de 2-propanol para inducir la precipitación del ARN, luego de centrifugar a 12.000 x g durante 15 min., se descartó el sobrenadante y el ARN fue lavado con etanol 70 %, para finalmente ser diluido en agua tratada con dietilpirocarbamato (DEPC). Por último el ARN fue cuantificado mediante la medición de la absorbancia a 260 nm. Se utilizó la relación Abs260nm/Abs280nm como medida del grado de pureza.

Obtención del ADNc

El ARN aislado fue utilizado para la síntesis del ADN complementario (ADNc). La metodología se llevó a cabo partiendo de 2 µg de ARN total, y utilizando la transcriptasa reversa murina M-MLV (M-MLV RT, Promega, Wisconsin, USA) (Mylonas y col., 2009). De acuerdo a las especificaciones del fabricante se incubaron el ARNm, la transcriptasa reversa, desoxirribonucleótidos trifosfato y oligonucleótidos aleatorios (Promega, USA). La transcripción reversa se realizó en un solo ciclo de la siguiente manera: 6 min a 25°C, 60min a 37°C, 18min a 70°C y 10 min a 4°C.

A partir del templado obtenido (ADNc), se procedió a la amplificación de los fragmentos de interés por la reacción de PCR en tiempo real (qPCR).

Diseño de los cebadores utilizados en qPCR

Para cada gen se diseñaron oligonucleótidos específicos enlistados en la Tabla 2. Para el diseño de los oligonucleótidos utilizados para PCR en tiempo real se utilizó el programa Primer Express.

GEN	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')	Tm	Producto (pb)
PCR en tiempo real				
TSPO	GGGAGGTTTCACAGAGGAGGCT	TCCACCAAAGCCGAGCCCAT	64°C	120
γ2 (GABA _A)	AGATGCTCACTGGATCGA	CAGGGGGCAGGAGTGTTTCAT	56°C	145
GADPH	TTCACCACCATGGAGAAGGC	AGTGATGGCATGGACTGTGGTC	60°C	243

Tabla 2: información de los cebadores empleados

PCR en tiempo real

Para la reacción de PCR en tiempo real se utilizaron 2,5 µL de la dilución correspondiente del ADNc obtenido y 17,5 µL de la mezcla de reacción PCR master mix (Biodynamics, Argentina), conteniendo los cebadores específicos a una concentración de 30 pico moles por volumen final. La reacción se realizó en un ciclador Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Australia) utilizando un programa de amplificación de 40 ciclos. Al finalizar la reacción de amplificación, se realizó una curva de disociación, estableciendo una rampa de temperaturas comprendidas entre 72°C y 98°C, con una adquisición de la señal cada 0,2°C. De esta manera, el valor de temperatura de disociación del producto obtenido permite establecer la especificidad de la reacción.

El producto final de cada reacción de qPCR se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2,5 % teñido con una solución al 1% de bromuro de etidio, para chequear que producto obtenido sea del tamaño esperado.

Cuantificación relativa de genes

La amplificación por PCR en tiempo real permite realizar la cuantificación de un determinado gen de interés. En nuestro caso, se recurrió a la cuantificación relativa utilizando un gen de referencia que presente una expresión constitutiva (genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican proteínas que son esenciales, en nuestro caso se empleó el gen de la GADPH). En este trabajo de tesis determinaremos la cuantificación relativa de un gen de interés aplicando el método de $\Delta\Delta CT$ (Livak y col., 2001). En este método, se establece un parámetro denominado CT, que se define como el número de ciclo de la reacción de PCR en el cual la señal de fluorescencia supera un umbral arbitrario, determinado en la zona de fase exponencial de la reacción de amplificación (Schmittgen y col., 2008). Para cada gen evaluado, los valores de CT se normalizan con los valores de CT correspondientes al gen de referencia, utilizando la siguiente fórmula: $\Delta CT = CT(\text{gen de interés}) - CT(\text{gen de referencia})$

Luego, se obtiene la expresión relativa del gen de interés en una muestra determinada expresando el ΔCT como $2^{-\Delta CT}$. El método también se aplica para determinar la expresión relativa de un gen en dos condiciones o muestras diferentes:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{condición A}) - \Delta CT(\text{condición B})$$

De la misma manera, la expresión relativa del gen de interés se expresa como $2^{-\Delta\Delta CT}$ (RQ) (Schmittgen y col., 2008).

Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media \pm ESM y fueron analizados por ANOVA de una vía, seguido de un análisis post-hoc mediante el test de Tukey. Para realizar los análisis estadísticos, se utilizó el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., CA, USA) y se consideró significativa toda diferencia que arrojara un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Capítulo 1: Efecto de diazepam (Dz) durante el desarrollo de la EAE

Para estudiar la capacidad de Dz como inmunomodulador de la EAE, se llevó a cabo un protocolo de administración luego de la inducción activa de la patología. El mismo consistió en administrar a los animales 8 dosis de Dz o vehículo por vía intraperitoneal todos los días a partir de los 6 dpi. Primeramente se analizó el efecto del tratamiento con la benzodiacepina sobre la incidencia de la patología, signos clínicos, reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) y posteriormente se realizaron estudios inmunológicos para caracterizar las poblaciones celulares que participan durante el desarrollo de la EAE tanto en periferia como en el SNC. El esquema de la Fig. 9 muestra el desarrollo temporal de estos estudios en el curso de la EAE.

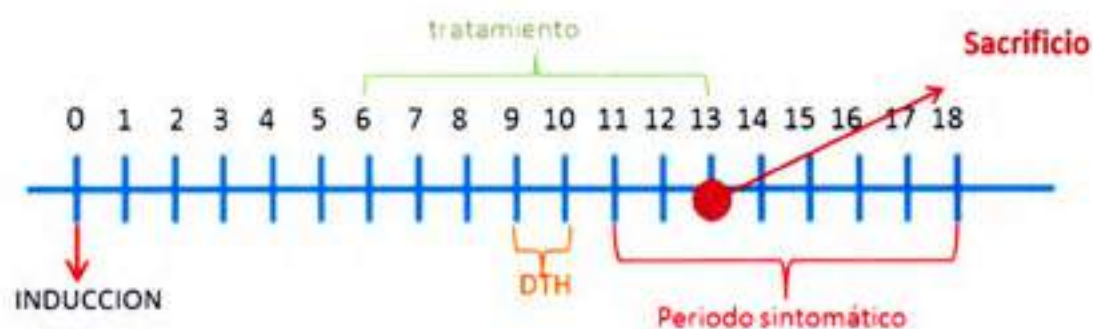


Figura 9: Esquema experimental.

La administración de Dz reduce la incidencia y atenúa algunos parámetros clínicos de la EAE

Los animales desafiados para la EAE (0 dpi), fueron tratados con Dz (o vehículo) como se muestra en la Fig. 9, pesados y examinados diariamente hasta 25 dpi para evaluar los signos clínicos de la enfermedad de acuerdo a una escala de severidad de 0 a 5. Este análisis mostró una disminución significativa en la incidencia de la patología de los animales tratados con Dz (aproximadamente un 50 %), mientras que en los animales desafiados para la EAE tratados con vehículo, la incidencia fue del 92 %. El grupo tratado con Dz que no manifestó signos clínicos presentó un comportamiento similar a los animales AFC en cuanto a la variación de pesos corporales, mientras que los animales tratados con Dz que manifestaron los signos clínicos característicos, presentaron una pérdida de peso corporal similar a los EAE (tratados con vehículo), durante el periodo agudo de la enfermedad (Fig. 10 y Tabla 3).

Cuando estos últimos dos grupos fueron comparados entre sí en cuanto a varios parámetros indicativos de la severidad de la patología tales como día de comienzo, severidad clínica máxima alcanzada, duración e índice de la enfermedad, se observó una tendencia a que en los animales del grupo E-Dz el curso de la patología sea más leve (Tabla 3). Por otro lado, se evaluó el efecto del tratamiento con Dz sobre animales control (AFC) y se observó que esta droga no ejerce efecto alguno sobre el comportamiento normal de estos animales (datos no mostrados).

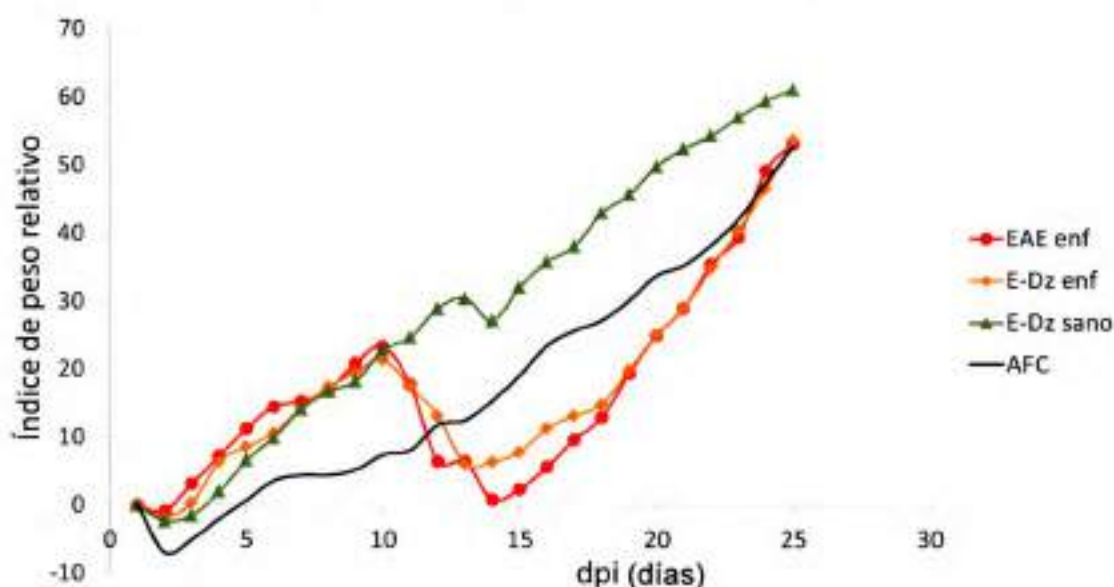


Figura 10: Evaluación clínica de la EAE en los diferentes grupos de animales. Comparación de la variación de peso corporal de 0 a 25 dpi. El índice de peso relativo de cada animal se obtiene aplicando la siguiente fórmula: $(\text{peso de cada día} - \text{peso al 0 dpi}) \times 100 / \text{peso al 0 dpi}$.

Tabla 3: Efecto de la administración intraperitoneal de Dz sobre los signos clínicos de la EAE

Grupo	Incidencia	Día de comienzo de los signos clínicos	Duración (días)	M.S.C.M. ^(a)	Índice de enfermedad ^(b)
AFC	0/20	-	-	-	-
AFC-Dz	0/6	-	-	-	-
EAE	23/25	11,6 ± 0,23	3,7 ± 0,29	2,71 ± 0,27	47,3 ± 10
EAE-Dz	13/27	12,0 ± 0,35	3,4 ± 0,29	2,66 ± 0,32	38,0 ± 5,2

Los animales recibieron una inyección de Dz por vía intraperitoneal (0,5 mg/kg de peso/día) entre los 6 y 13 dpi, fueron pesados y examinados diariamente durante el desarrollo de signos clínicos hasta los 25

dpi. Los signos clínicos fueron graduados en una escala de 0-5 como se indica en Materiales y Métodos. Los datos son compilados de 4 experimentos independientes. Los cálculos estadísticos de los parámetros clínicos analizados se realizaron solo con los animales que desarrollaron la enfermedad. Los resultados se muestran como la media \pm ESM.

^(a)M.S.C.M., media de la severidad clínica máxima es la relación entre la suma de la severidad clínica máxima alcanzada por cada rata durante la fase aguda de la enfermedad sobre el número de ratas de cada grupo.

^(b)Índice de enfermedad, es la suma de la severidad clínica diaria de cada animal a lo largo del periodo experimental dividido por el día de comienzo de los signos clínicos \times 100.

Efecto de Dz sobre la respuesta de células inmunes en la EAE

La EAE es una enfermedad mediada principalmente por células T autorreactivas contra antígenos mielínicos. Estas células son activadas en la periferia (nódulos linfáticos) y posteriormente migran e infiltran el SNC, favoreciendo el acceso de otras células inflamatorias a dicho sitio. Por ello se analizó el efecto de Dz sobre la reacción de DTH y se caracterizaron las poblaciones celulares en periferia (ganglios popliteos) y SNC.

Los animales desafiados para la EAE fueron clasificados en 3 grupos experimentales de acuerdo al tratamiento recibido y signos clínicos que manifestaron: animales tratados con vehículo (solución fisiológica) que se enfermaron con una incidencia de 92 % (EAE enf), tratados con Dz que resultaron enfermos con una incidencia del 50% (E-Dz enf) y EAE tratados con Dz que resultaron clínicamente sanos al momento de sacrificarlos (E-Dz sano).

Dz disminuye la reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)

La DTH es una respuesta inmune mediada por linfocitos T antígeno específica. Para evaluar el estado de la respuesta inmune *in vivo*, a los 9 dpi se realizó la reacción de DTH contra PBM. Los resultados mostraron que los animales que fueron tratados con Dz presentaron un menor edema inflamatorio respecto de los animales que recibieron el vehículo, independientemente si estos presentaron o no los signos clínicos característicos posteriormente (11-15 dpi). Este resultado indica que el tratamiento con Dz disminuye la respuesta celular de tipo Th1 *in vivo* (Fig. 11).

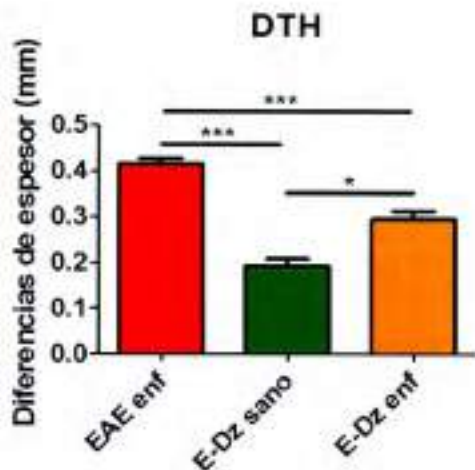


Figura 11: El tratamiento con Dz reduce la reactividad de células T específicas contra PBM. La reacción de DTH fue realizada a los 9 dpi a partir de la inyección de PBM y SF en la oreja derecha e izquierda, respectivamente, y medida 24 hs posteriores. Los resultados se expresan como diferencia de espesor entre las orejas de cada animal. Las diferencias significativas, corresponden a: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Caracterización de células en ganglios poplíteos

Cuando los animales son inyectados en las almohadillas de grasa de las patas traseras con la emulsión de mielina en AFC ocurre un fenómeno de inflamación y reclutamiento de células del sistema inmune en dicho sitio. Las primeras células en actuar son CD4 que fagocitan los antígenos, procesan y migran a los órganos linfáticos secundarios más cercanos, en este caso los ganglios poplíteos. Allí entran en contacto con los linfocitos que vienen de circulación, y aquellos que tengan un receptor específico para el antígeno que se está presentando, van a ser activados, proliferan y finalmente migran al SNC donde generan daño y favorecen el reclutamiento de otros leucocitos de periferia. (Fletcher y col., 2010)

A los 13 dpi, los animales fueron sacrificados y se aislaron los nódulos linfáticos poplíteos. Se cuantificó el número total de células obtenidas y se caracterizaron por citometría de flujo las poblaciones celulares presentes, empleando los siguientes anticuerpos: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11b/c, anti-CD45RA, anti-MHCII, anti-IFN- γ , anti-IL17. Como se puede observar en la Fig. 12A, no existen diferencias significativas en cuanto al número total de células aisladas entre los diferentes grupos experimentales. Cuando analizamos los diferentes fenotipos celulares presentes en ganglio, no observamos diferencias significativas en el porcentaje (valor relativo) así como tampoco en el número total de la población linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y de células B que son los mayoritarios en los ganglios (Fig. 12 B, C y D respectivamente).

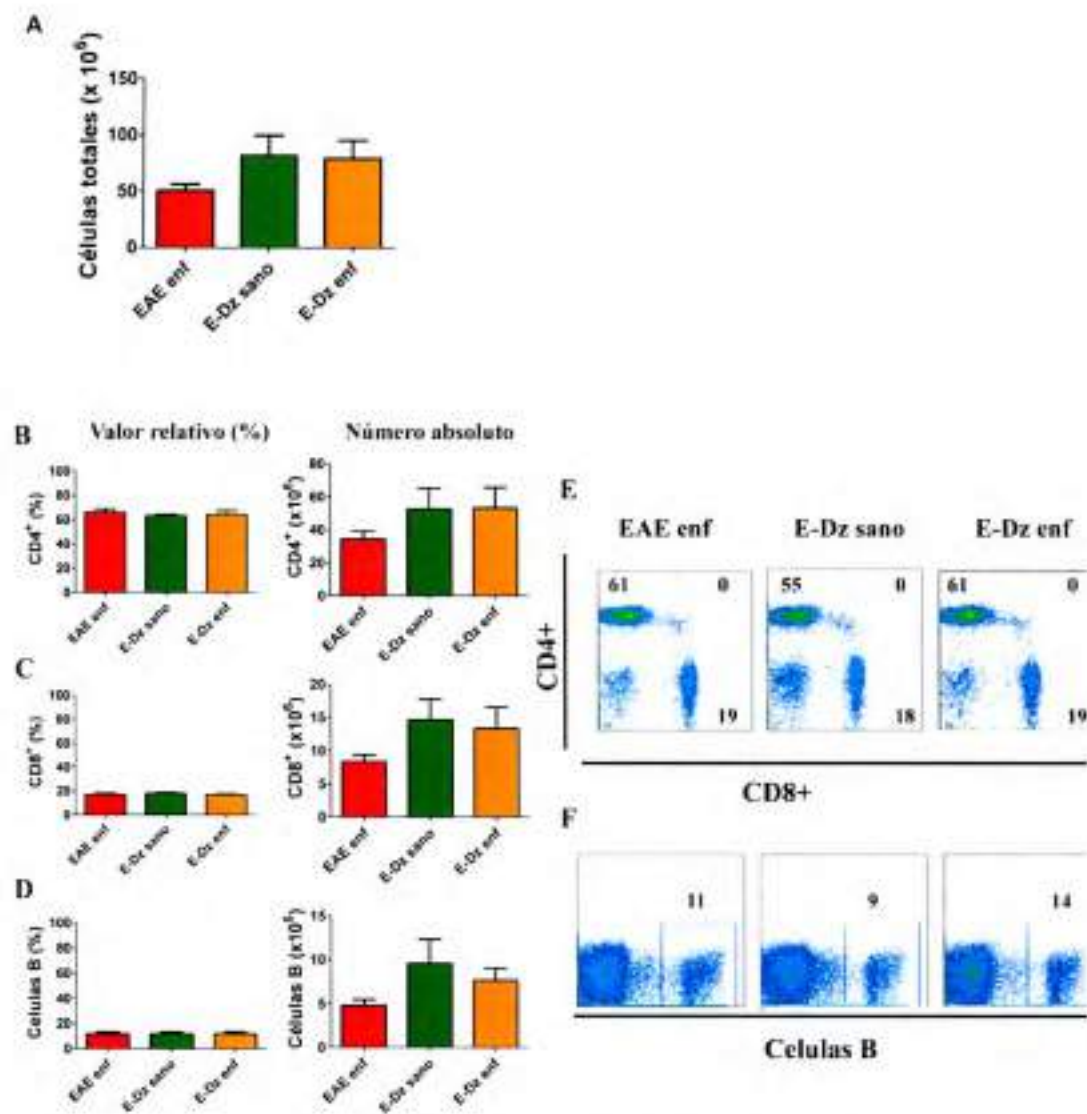


Figura 12: El tratamiento con Dz no afecta las poblaciones celulares aisladas de ganglios poplíteos. Se evaluó el efecto del tratamiento con Dz sobre el número total de células aisladas de ganglio (A). El valor relativo (porcentaje de células adquiridas de cada subpoblación de interés respecto del 100 % de eventos adquiridos por el citómetro de flujo) y número absoluto (valor relativo multiplicado por el número de células aisladas de cada animal) para cada una de las poblaciones celulares: células T CD4⁺, CD8⁺ y células B, se observa en las figuras B, C y D respectivamente. Las células fueron aisladas a los 13 dpi, marcadas con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RA y analizadas por citometría de flujo. Los resultados corresponden al promedio de 6 experimentos realizados con 2 animales por grupo. Los gráficos de puntos (E y F) son representativos de las tres poblaciones celulares en un animal de cada grupo experimental.

Por otro lado, estudiamos la producción de citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ e IL 17) característica de linfocitos encefalitogénicos, dentro de la población de células T CD4⁺, y observamos una producción muy baja de estos mediadores inflamatorios en todos los grupos experimentales (Fig. 13).

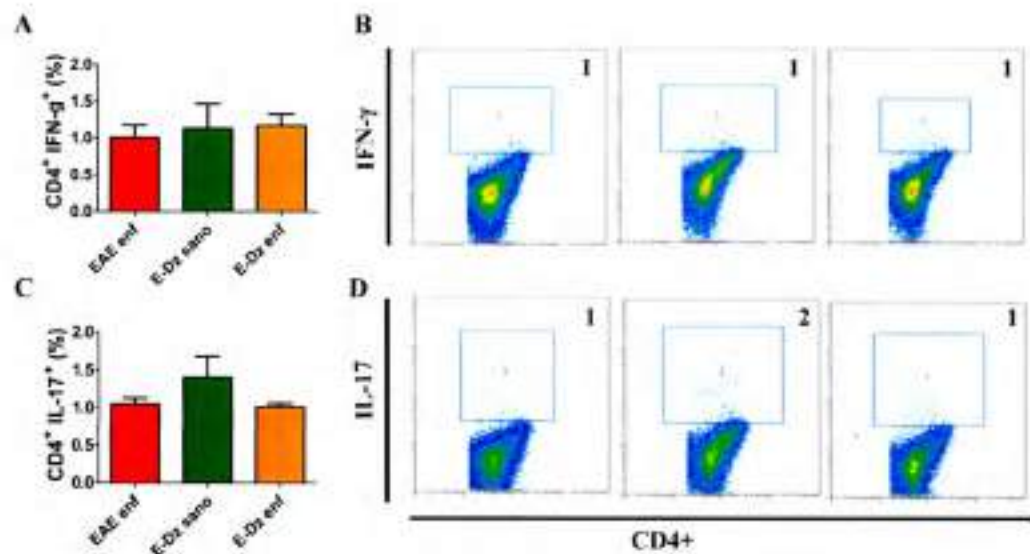


Figura 13: La población de células T CD4⁺ aisladas de ganglios poplíteos producen baja cantidad de citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ e IL-17). Células aisladas de ganglio fueron estimuladas con PMA e Ionomicina y posteriormente incubadas con monensina, tratadas para la marcación superficial de CD4 e intracelular de IFN- γ e IL-17 y analizadas por citometría de flujo. En los gráficos (A y C) se muestra el porcentaje de células positivas para cada una de las citocinas: células CD4⁺IFN- γ ⁺ y CD4⁺IL-17⁺ respectivamente. Los gráficos de puntos ("dot plots") (B y D) son representativos de las tres poblaciones celulares en un individuo de cada grupo experimental. Los resultados corresponden al promedio de 2 experimentos realizados con 2 animales por grupo.

Luego estudiamos la población positiva para el marcador de superficie CD11b/c, que es característico de las CDs, monocitos, M ϕ s y PMN. Como se muestra en la Fig. 14, no observamos diferencias significativas en cuanto al número total de células aisladas, ni al valor relativo (porcentaje de células CD11b/c⁺ respecto al total de eventos adquiridos por el citómetro de flujo) de la población de interés (Fig. 14A y B). Pero, al estudiar la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHCII), que juega un rol clave en la presentación antigénica por parte de las células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales (CDs y M ϕ s, principalmente) frente a los linfocitos T para su posterior activación, observamos diferencias significativas tanto en el porcentaje de la población considerada positiva para MHCII (Fig. 14C), así como también en los niveles de intensidad media de fluorescencia (IMF) correspondientes a esta proteína entre los grupos EAE enf y E-Dz sano (Fig. 14D y E). Estos resultados indican que si bien el tratamiento con Dz durante el desarrollo de la EAE no afecta los fenotipos celulares en este órgano, está regulando negativamente los niveles de una molécula clave en la presentación antigénica como lo es MHCII, lo cual podría disminuir el número de linfocitos T activados y de esta manera, reducir la infiltración de

los mismos en SNC.

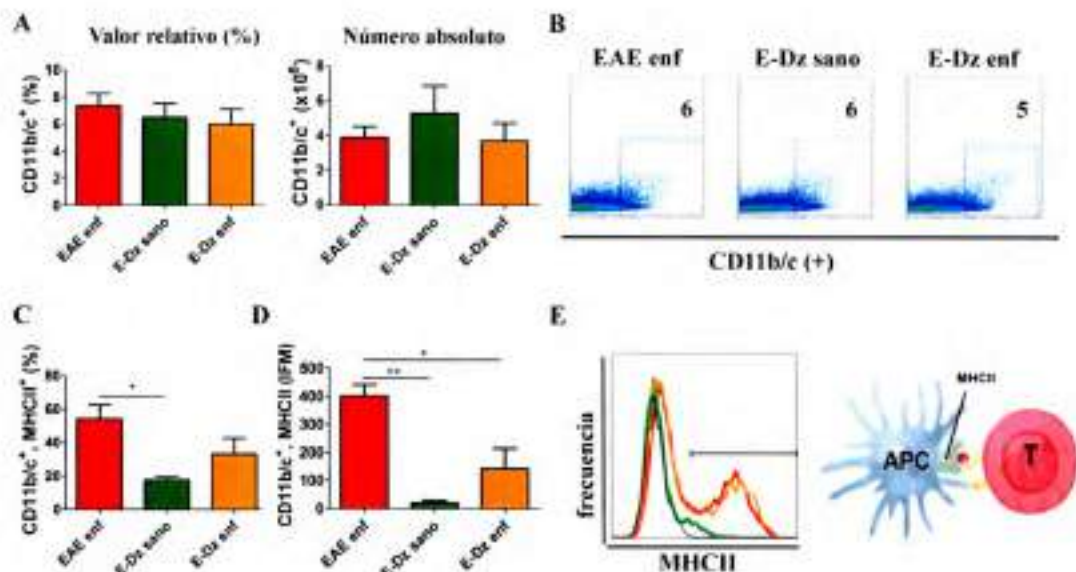


Figura 14: El tratamiento con Dz no afecta el porcentaje y número absoluto de CDs y Mφs en ganglio poplíteo, pero genera cambios en la expresión de la molécula MHCII. Se realizaron estudios de citometría de flujo en células aisladas de ganglios poplíteos a los 13 dpi. Se graficó el porcentaje y número absoluto de las células CD11b/c⁺ (A). Se analizó la molécula de superficie: complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) como un marcador de activación, dentro de la población CD11b/c⁺. Los resultados fueron expresados como porcentaje de células CD11b/c⁺ MHCII⁺ (C) e intensidad media de fluorescencia (IMF), relativa a los niveles de expresión de MHCII en la población CD11b/c⁺ (D). Los gráficos de puntos (B) e histogramas (E) son representativos de las poblaciones celulares en un animal de cada grupo experimental. En el gráfico E, la línea negra representa la condición control. Los resultados corresponden al valor medio ± ESM de 3 experimentos realizados con 2 animales por grupo. Las diferencias significativas corresponden a: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Efecto de Dz sobre células inflamatorias de SNC

La inflamación y daño tisular en el SNC de animales con EAE, en general correlaciona temporalmente con los signos clínicos y las alteraciones histológicas en el SNC. Ya que se ha descrito que gran parte de los daños al SNC son ocasionados principalmente por leucocitos infiltrantes provenientes de la sangre circulante y la microglia activada (Stomnes y col., 2008), en este trabajo nuestro interés consistió en cuantificar y caracterizar las poblaciones de células inflamatorias presentes en SNC durante la etapa aguda de la patología.

El tratamiento con Dz reduce el número de células inflamatorias en SNC

Para evaluar el efecto del Dz se aislaron las células inflamatorias de SNC (cerebro, cerebelo y médula espinal) a los 13 dpi de animales de los 3 grupos experimentales descritos previamente. Como se puede observar en la Fig. 15, los animales desafiados para la EAE tratados con Dz que no manifestaron signos clínicos, tienen menor número de células inflamatorias en SNC en comparación con los otros 2 grupos experimentales, correspondientes a animales enfermos al momento de ser sacrificados (tratados con Dz o vehículo).

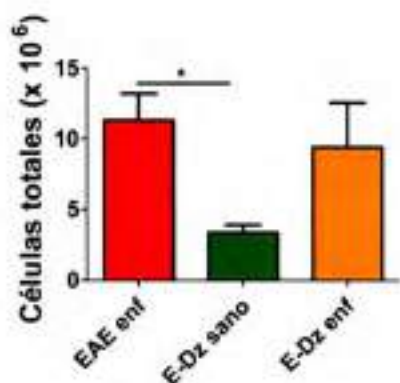


Figura 15. Disminución de células inflamatorias en SNC en el grupo experimental E-Dz sano. En la figura se muestra el número absoluto de células aisladas de SNC de animales EAE enf, E-Dz sanos y E-Dz enf. Los resultados corresponden al promedio de 4 experimentos realizados con 2 animales por grupo. La diferencia significativa observada corresponde a $*p < 0,05$.

El tratamiento con Dz reduce el número de células CD11b/c⁺ inflamatorias en SNC

Se evaluó por citometría de flujo la expresión de CD11b/c, CD45 y MHCII en células aisladas de SNC a los 13 dpi. Pudimos observar que los animales que fueron tratados con Dz y no se enfermaron, presentaron una disminución significativa en el número absoluto de células CD11b/c⁺ entre las cuales se encuentran principalmente monocitos, Mφs, granulocitos y microglía, aunque no así en los valores relativos de esta población entre los diferentes grupos experimentales (Fig. 16A). Al estudiar la molécula MHCII en esta población aislada de SNC, observamos un menor porcentaje de células CD11b/c⁺ MHCII⁺ en animales E-Dz sanos (Fig. 16C), así como también reducidos niveles de expresión de MHCII en la población CD11b/c⁺ total (Fig. 16D), de forma similar a lo observado en ganglios. Estos resultados podrían indicar menor grado de presentación antigénica en SNC con la consecuente disminución de la reactivación de linfocitos a nivel del órgano blanco, reducción de los niveles de mediadores inflamatorios, resultando así en un menor estado de activación de la microglía y Mφs infiltrantes, lo que llevaría conjuntamente a disminución del daño

producido a nivel de SNC.

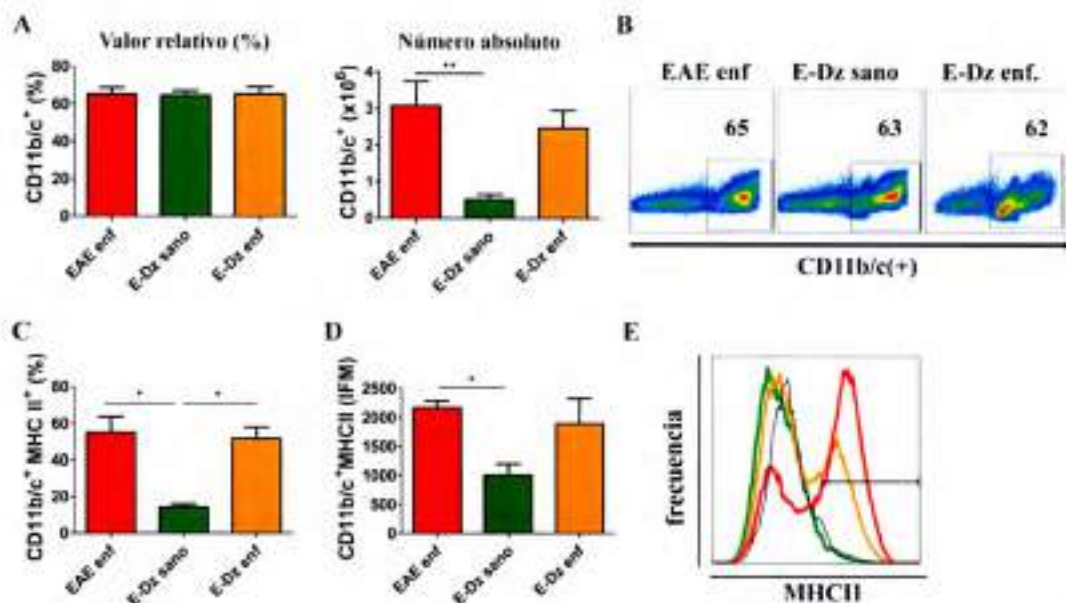


Figura 16: Disminución en la población total de células Cd11b/c⁺ aisladas de SNC y reducción de los niveles de expresión de MHCII de las mismas en el grupo E-Dz sano. Se realizaron estudios de citometría de flujo en células aisladas de SNC a los 13 dpi. Se graficaron los valores relativos y número absoluto de las células CD11b/c⁺ (A). Se analizó la molécula de superficie: complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) dentro de la población CD11b/c⁺. Los resultados fueron expresados como porcentaje de células CD11b/c⁺ MHCII⁺ (C) e intensidad media de fluorescencia (IMF), relativos a la expresión de la molécula MHCII en la población CD11b/c⁺ total (D). Los gráficos de barra presentan los datos conforme al promedio de 4 experimentos independientes con 2 animales por grupo. Las diferencias significativas, corresponden a: **p*<0,05, ***p*<0,01. Los gráficos de puntos (B) e histogramas (E) son representativos de las poblaciones celulares en un animal de cada grupo experimental. La línea negra en (E), corresponde a la condición control).

Luego estudiamos la molécula de superficie CD45 (marcador panleucocitario, presente en todos los glóbulos blancos), que dentro de la población CD11b⁺, clasifica diferentes poblaciones celulares en relación a su grado de activación. La población CD11b/c⁺ CD45^{hi}, corresponde a células infiltrantes (PMN, monocitos, Mφs) y microglia activada. En la Fig. 17B podemos observar que tanto el valor relativo como número absoluto de células CD11b/c⁺ CD45^{hi} se encuentra reducido significativamente en los animales E-Dz sano respecto de los otros dos grupos experimentales. Estos resultados indican que en animales que no presentan los signos característicos de la patología, esta población es muy chica. Cuando evaluamos que ocurría con la población CD11b/c⁺CD45^{lo}, que corresponde principalmente a microglia no activada, observamos que existe un mayor porcentaje de esta población en SNC de animales EAE tratados con Dz sanos (Fig. 17A); Como era de esperar, esto no se refleja en los

valores absolutos, dado que el número total de células aisladas de los animales enfermos es mayor que en los animales tratados (E-Dz) sanos, por lo tanto en el gráfico de valores absolutos, la población de CD11b/c⁺ CD45^{lo} es mayoritaria en el grupo EAE enf. Podemos decir entonces, que en aquellos animales tratados con Dz en los cuales la droga previno el desarrollo de la patología, se observa una disminución de células con fenotipo activado (CD45^{hi}) dentro de la población Cd11b/c, respecto de los animales enfermos.

Posteriormente evaluamos que ocurría con la expresión de la molécula MHCII dentro de las poblaciones descritas previamente. Como podemos observar en la Fig. 17D en la población que corresponde principalmente microglía no activada (Cd11b/c⁺ CD45^{lo}), se observan bajos valores relativos (porcentaje) de células positivas para MHCII así como también valores bajos de IMF, correspondiente a los niveles de expresión de la molécula en todos los grupos experimentales. Esto era de esperarse dado que los niveles de MHCII aumentan cuando las células se activan y de esta forma se favorece la presentación antigénica (Harms y col., 2013). Al estudiar la población CD11b/c⁺ CD45^{hi} enriquecida en animales EAE enfermos (tratados o no), podemos ver que tanto el porcentaje de células positivas para MHCII, así como el valor de IMF asociado al nivel de expresión de dicha molécula, son mayores respecto de la población CD11b/c⁺ CD45^{lo} (Fig. 17D y E respectivamente). Dentro de la población de leucocitos infiltrantes y microglía activada (CD11b/c⁺ CD45^{hi}), observamos una disminución significativa tanto en el valor relativo como absoluto de células que expresan MHCII en los animales E-Dz sano respecto de EAE enf. Al observar los valores de IMF, podemos ver que en promedio los valores de MHCII para la población CD11b/c⁺ CD45^{hi} en el grupo EAE enf son aproximadamente 2,5 veces mayores que en los animales E-Dz sanos. Además, es importante destacar que en estos últimos (E-Dz sano), la población CD45^{hi} presenta valores de IMF para MHCII similares a las observadas dentro de la población CD11b/c⁺ CD45^{lo} del mismo grupo experimental, reforzando la hipótesis de que las células aisladas de SNC de los animales E-Dz sanos presentan menor estado de activación. En base a estos resultados, podemos decir que la población CD11b/c⁺ CD45^{hi} enriquecida en animales EAE enfermos es la principal contribuyente de los altos niveles de MHCII en SNC.

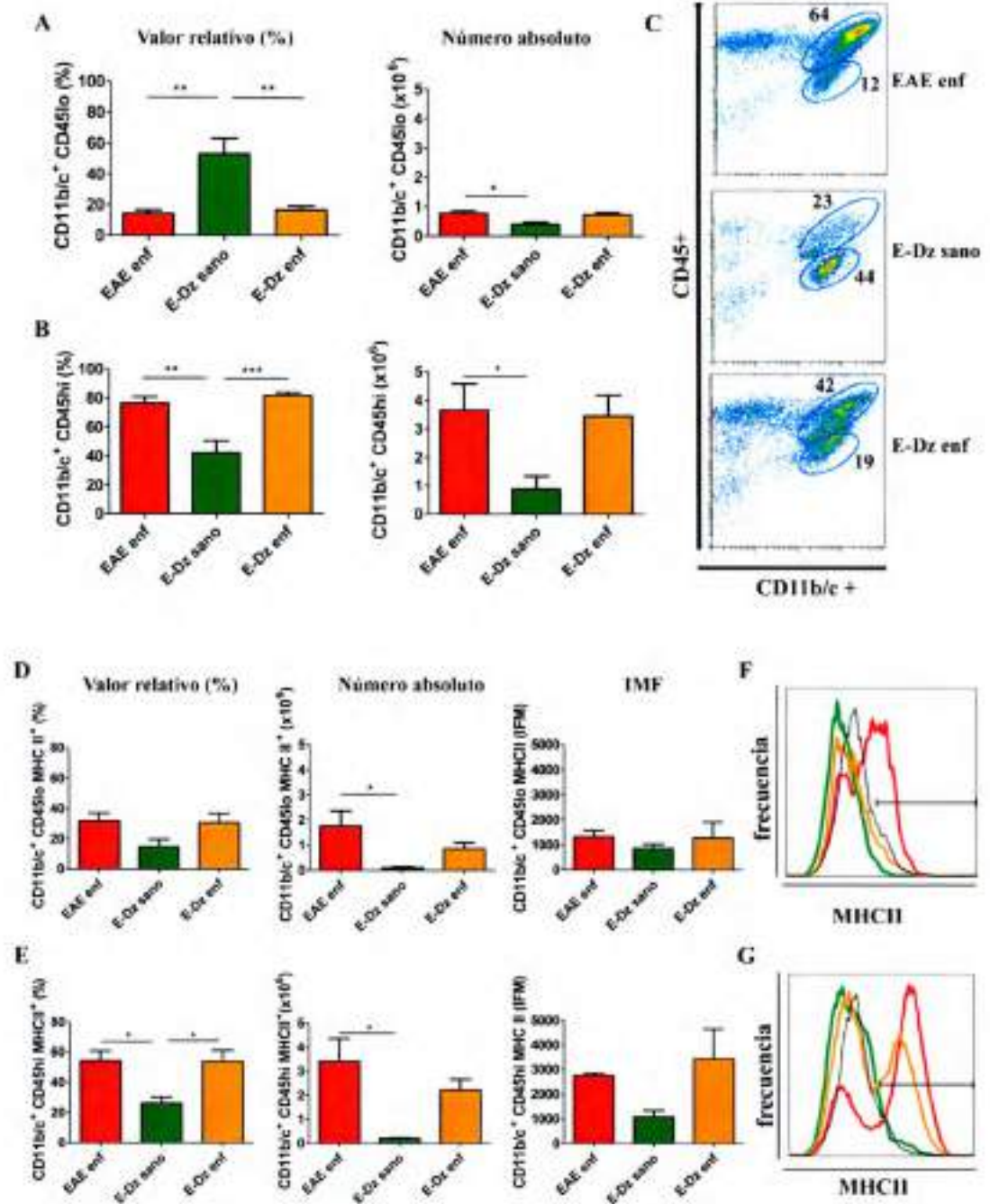


Figura 17: Cambio en el perfil fenotípico en función de la expresión de CD45 y MHCII en la población CD11b/c⁺. Se aislaron las células inflamatorias de SNC y luego se marcaron con anticuerpos anti-CD11b/c, anti-CD45 y anti-MHCII y se analizaron por citometría de flujo. En (A y B) se observa valores relativo y número absoluto de las poblaciones CD11b/c⁺CD45^{lo} y CD11b/c⁺CD45^{hi} en los diferentes grupos experimentales. Los gráficos de puntos (C) son representativos de una muestra de cada condición experimental, y en cada uno de ellos se pueden distinguir las poblaciones CD11b/c⁺CD45^{lo} y CD11b/c⁺CD45^{hi}. En (D y E), se exhiben los valores relativos, números absolutos y la IMF (intensidad media de fluorescencia) de MHCII en las poblaciones CD11b/c⁺CD45^{lo} y CD11b/c⁺CD45^{hi} respectivamente. Los gráficos de barras son el resultado del promedio de 4 experimentos independientes

realizados con 2 animales por grupo. Las diferencias significativas corresponden a: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Los histogramas (F y G) son representativos de los niveles de expresión de MHCII en un animal correspondiente a cada grupo experimental (la línea negra corresponde a la condición control).

En animales E-Dz sanos, se aislaron menos linfocitos infiltrantes de SNC

Células inflamatorias aisladas de SNC a los 13 dpi fueron incubadas con los siguientes anticuerpos: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD45RA (marcador de células B). La molécula CD3 es un marcador de superficie de linfocitos T (presente en células T CD4⁺ y CD8⁺). Como se puede observar en la Fig. 18A, tanto el valor relativo como el número absoluto de células correspondiente a la población CD3⁺ en SNC se encuentran significativamente reducidos en animales EAE tratados con Dz sanos respecto de animales EAE enfermos. Al evaluar las dos subpoblaciones dentro de las células T, observamos que la población CD3⁺CD8⁺, linfocitos T citotóxicos, es la minoritaria y su número absoluto, se encontraba reducido en el grupo experimental E-Dz sano con respecto a los grupos EAE enf, como consecuencia de un menor número de células infiltrantes, mientras que las proporciones relativas entre los grupos experimentales no se modificaron (Fig. 18E). En cuanto a la población de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ (T colaboradores), observamos una disminución significativa tanto en el valor relativo como número absoluto en los animales E-Dz sanos respecto de los otros grupos (Fig. 18C). Estos resultados nos indican que en SNC de animales tratados con Dz que no se enfermaron, podemos aislar menor cantidad de células T colaboradoras (CD4⁺), población dentro de la cual se encuentran los linfocitos encefalitogénicos que son los principales responsables del desarrollo de la patología. En cuanto a la población de células B (CD45RA⁺), estas se encuentran en proporciones muy bajas en SNC (0-1 %), en los diferentes grupos experimentales (resultados no mostrados).



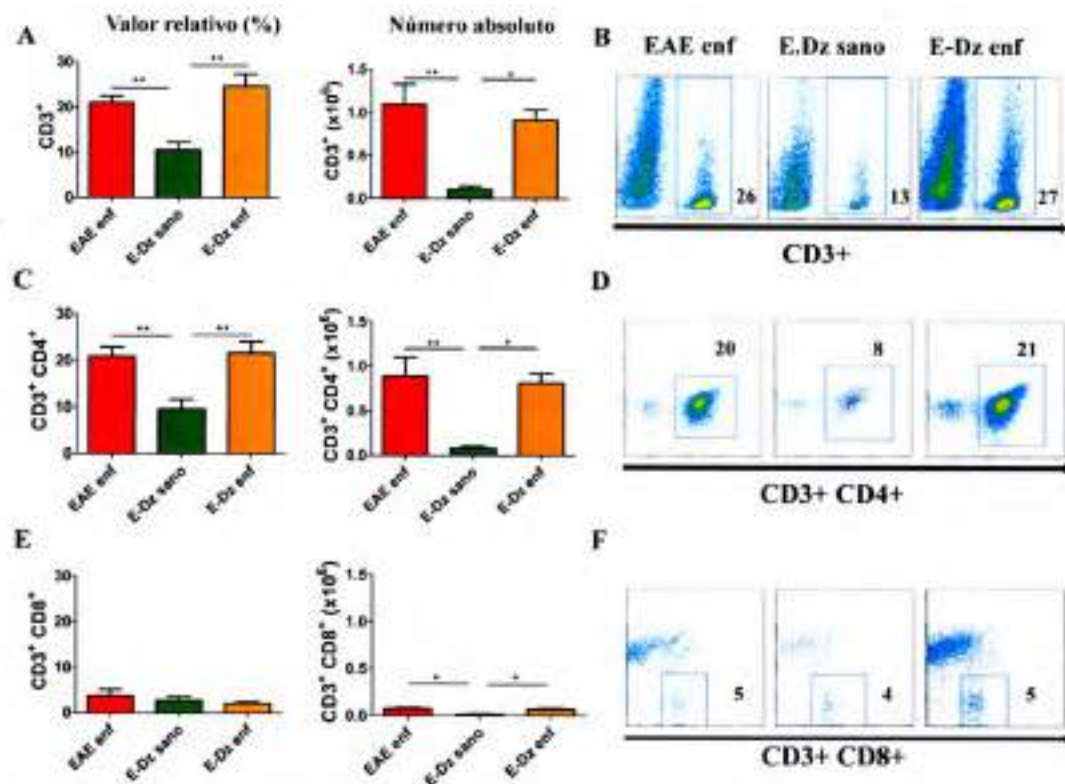


Figura 18: El tratamiento con Dz disminuye el porcentaje y número absoluto de células T que infiltran el SNC, (principalmente células T CD4⁺), en aquellos animales que resultaron sanos. Células infiltrantes de SNC aisladas a los 13 dpi fueron marcadas con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 y analizadas por citometría de flujo. Se analizaron los valores relativos y número absoluto de células CD3⁺ (A), CD3⁺CD4⁺ (C) y CD3⁺CD8⁺ (E). Los gráficos de barra representan el promedio de 4 experimentos independientes con 2 animales por grupo. Las diferencias significativas, corresponden a: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Los gráficos de puntos (B, D y F) son representativos de cada una de las poblaciones analizadas en un animal por grupo.

El tratamiento con Dz reduce el número de células T encefalitogénicas en SNC

Los rasgos patológicos de la EM como de la EAE están asociados con la invasión de células T CD4⁺ capaces de secretar citocinas pro-inflamatorias en el SNC, siendo las principales responsables de la inflamación local en el periodo agudo. Estas son capaces de producir citocinas del perfil Th1 y Th17, importantes para generar daño, activación de microglia y quimiotaxis de leucocitos de sangre periférica.

Grupos de animales fueron tratados con Dz o vehículo, luego de la inducción de la EAE y se evaluaron las poblaciones de células T CD4⁺ (mayoritaria dentro de los linfocitos T) productoras de diferentes citocinas pro-inflamatorias: IFN- γ (CD4⁺IFN γ ⁺) e

IL-17 (CD4⁺ IL-17⁺) entre las células infiltrantes de SNC. Para ello, a los 13 dpi se aislaron células inflamatorias del SNC, y se activaron en cultivo para estimular la producción de citocinas. Las células fueron marcadas en su superficie con un anticuerpo anti-CD4 y de modo intracelular con los anticuerpos anti-IL-17 y anti-IFN- γ de rata conjugados a diferentes fluorocromos. Por citometría de flujo pudimos observar que los animales tratados con Dz que resultaron sanos, presentaron una disminución significativa en el número absoluto de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ y CD4⁺IL-17⁺ aisladas de SNC respecto de los animales EAE enfermos (Fig. 19).

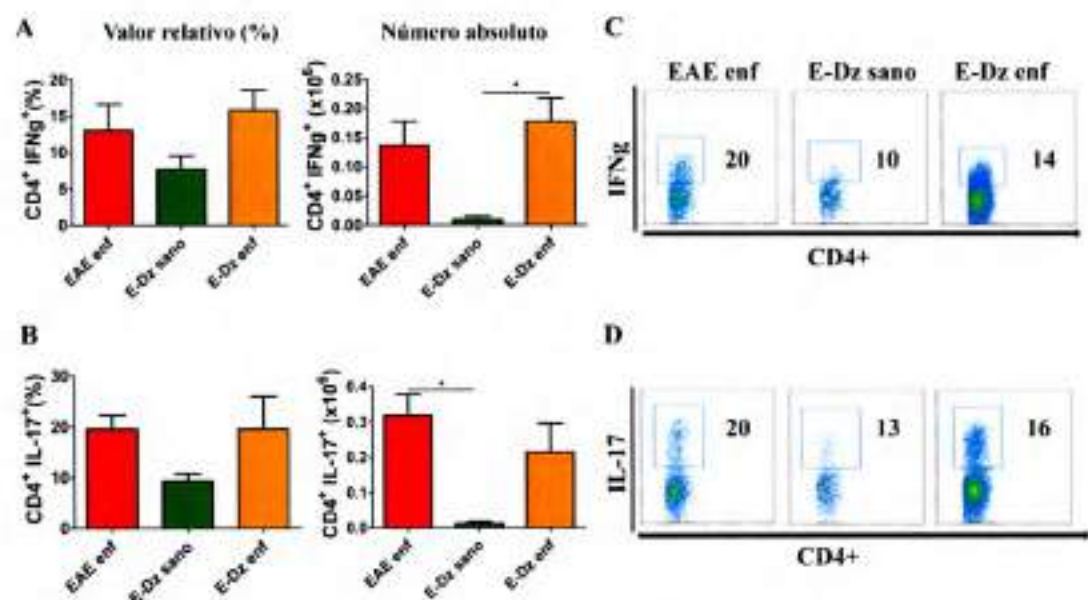


Figura 19: El tratamiento con Dz disminuye las poblaciones T CD4⁺IFN- γ ⁺ y CD4⁺ IL-17⁺ en el SNC de animales E-Dz sanos a los 13 dpi. Células infiltrantes de SNC fueron estimuladas en cultivo con PMA e Ionomicina y posteriormente incubadas con monensina, tratadas para marcación superficial de CD4 e intracelular de IFN- γ e IL-17 y analizadas por citometría de flujo. En los gráficos se muestran las poblaciones celulares positivas para las citocinas dentro de la población de células CD4⁺. Los resultados fueron expresados como valores relativos (porcentaje) y número absoluto de células CD4⁺IFN- γ ⁺ (A), CD4⁺IL-17⁺ (B) en el SNC. Los gráficos de puntos (C y D) son representativos de las poblaciones celulares en un individuo de cada grupo experimental. Los resultados corresponden al valor medio \pm ESM de 3 experimentos independientes realizados con 2 animales por grupo. Las diferencias significativas, corresponden a * $p < 0,05$.

Conclusiones capítulo 1:

En ganglios poplíteos de animales E-Dz sanos no se observan diferencias significativas respecto de los otros dos grupos experimentales en cuanto a poblaciones

de células T, B y CD11b/c, y producción de citocinas inflamatorias. Sólo se observa disminución en el porcentaje de células positivas para MHCII, así como en la intensidad media de fluorescencia de las mismas.

En el SNC de los animales EAE tratados con Dz que no manifestaron signos clínicos, se aisló un menor número de células inflamatorias. La población CD11b/c⁺, que en números absolutos es minoritaria en este grupo experimental, presenta menores niveles de expresión de la molécula MHCII, importante durante el proceso de presentación antigénica. Se observa un "cambio en el perfil" de la población CD11b/c⁺, prevaleciendo la población CD45 low, que representa la microglía no activada. Ocurre una disminución en porcentaje y número total de linfocitos T infiltrantes, y dentro de la misma disminuyen específicamente los linfocitos T CD4⁺, que además, son menos productores de IFN- γ e IL-17.

Capítulo 2: Efectos del Dz sobre distintas poblaciones del sistema inmune involucradas en el desarrollo de la EAE

Capítulo 2 (I): Efecto de Dz sobre linfocitos

Caracterización de poblaciones celulares en ganglios linfáticos

Los ganglios linfáticos poplíteos son los órganos linfoides secundarios drenantes al sitio de inoculación para la inducción de la EAE, es el lugar donde ocurre la presentación antigénica y comienza la expansión clonal de ciertas poblaciones de linfocitos.

De ellos se aislaron las células reclutadas a dicho sitio durante el desarrollo de la EAE y se evaluó por citometría de flujo las diferentes poblaciones celulares, empleando anticuerpos específicos para antígenos de superficie característicos de cada una de ellas (Fig. 20). La población de células estaba compuesta por un 72 % de linfocitos T (54 % T CD4⁺ y 18 % T CD8⁺), 18 % linfocitos B (células CD45RA⁺), un porcentaje muy bajo de células T inmaduras (CD4⁺ CD8⁺), entre 0 y 1 % y alrededor del 7 % de las células aisladas fueron positivas para el antígeno de superficie CD11b/c, correspondiente a una población heterogénea de monocitos, granulocitos, M ϕ s y CDs.

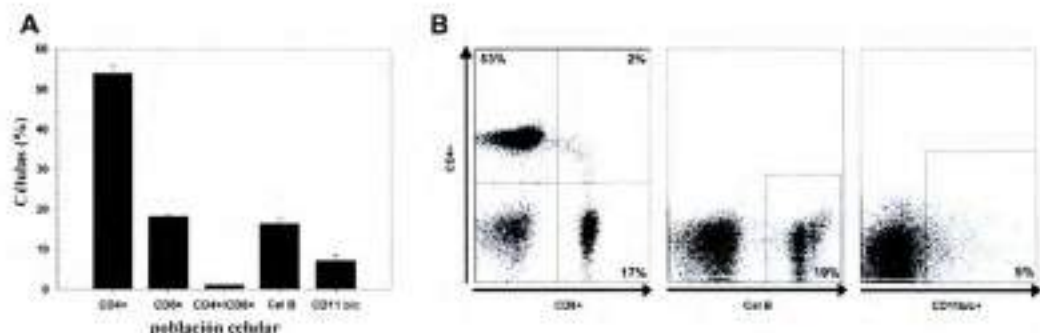


Figura 20: Análisis de frecuencia de poblaciones celulares en ganglios poplíteos de ratas EAE. Se emplearon los siguientes anticuerpos: Anti-CD4 y anti-CD8 para identificar subpoblaciones de linfocitos T, anti CD45RA para linfocitos B y anti-CD11b/c para monocitos, granulocitos, M ϕ s y CDs. En (A) se muestran los porcentajes relativos de cada población obtenidos de 20 muestras diferentes y en (B), los gráficos de puntos representativos de una determinación individual.

Dz no afecta la viabilidad celular hasta una concentración 25 μ M

Las células aisladas de ganglios de animales EAE fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de Dz y el efecto sobre la viabilidad celular fue evaluado por el ensayo de MTT (Fig. 21). Los resultados muestran que Dz no afecta la viabilidad en células no estimuladas hasta la concentración 25 μ M durante la exposición por 24 o 48 hs. Sin embargo, a concentraciones de 50 μ M o mayores, el % de células viables decrece y a la mayor dosis evaluada (500 μ M), hay una marcada citotoxicidad. Estos datos correlacionan con los resultados obtenidos en el ensayo de apoptosis y muerte celular (Fig. 22).

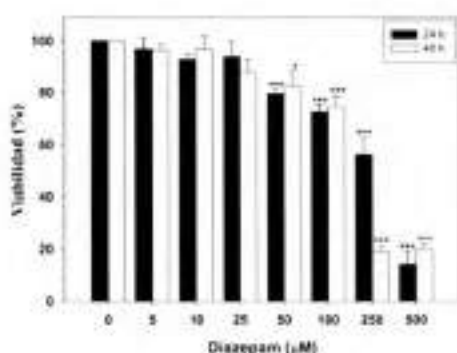


Figura 21: Efecto de Dz en viabilidad celular. Células aisladas de nódulos linfáticos poplíteos de animales EAE fueron cultivados durante 24 o 48 hs sin estímulo, en presencia de concentraciones crecientes de Dz. Las últimas 4 hs de cultivo, se adicionó MTT al mismo y la viabilidad fue determinada a 570 nm a partir de la producción de formazan, como resultado del metabolismo mitocondrial. El gráfico muestra el porcentaje de células viables y se representan como promedio \pm ESM de 5 experimentos independientes. * $p < 0.05$, *** $p < 0.00$, con respecto a la condición 0 μ M

Dz no induce apoptosis temprana ni muerte celular a bajas concentraciones

Con el fin de analizar el efecto de Dz sobre la inducción de apoptosis temprana *in vitro* sobre células aisladas de ganglios linfáticos poplíteos en ratas con EAE durante la etapa aguda de la patología, las células obtenidas fueron incubadas con diferentes dosis (0-50 μ M) de esta benzodiacepina. La inducción de apoptosis y muerte celular fue evaluada por citometría de flujo a las 24 hs (Fig. 22). En este ensayo, se observó que el porcentaje de células Anexina V (+), IP (-) no se modificó en presencia de Dz, indicando que no hay efecto de la droga sobre la apoptosis temprana hasta la concentración 25 μ M de Dz. El porcentaje de la población doble positiva (Anexina V (+), IP (+)), tampoco se modificó hasta la concentración 25 μ M, pero si se evidenció un aumento significativo en la concentración de Dz 50 μ M, indicando que esta concentración de Dz aumenta el porcentaje de células en apoptosis tardía o muerte celular. Sin embargo, este ensayo no permite diferenciar entre estas dos condiciones.

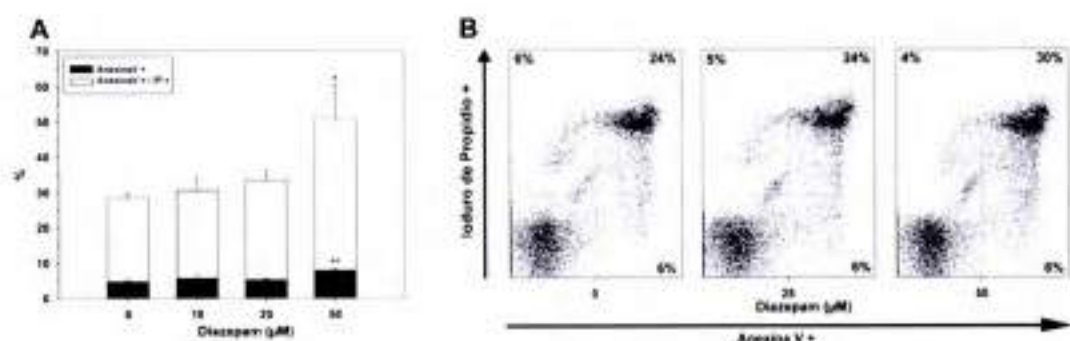


Figura 22: Dz no induce apoptosis temprana ni muerte celular a bajas concentraciones. Células aisladas de ganglios poplíteos de animales EAE durante el estado agudo de la patología fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de Dz sin estímulo, y la inducción de apoptosis luego de 24 hs de incubación fue determinada por citometría de flujo. Se evaluó el efecto de Dz en: apoptosis temprana (Anexina V+/IP-) y células en apoptosis tardía o con muerte celular (Anexina V+/IP+). (A) representa el porcentaje de células en cada condición (promedio \pm ESM de 5 experimentos independientes). (B) Los gráficos de puntos son representativos de una determinación individual. Las diferencias significativas, * p <0,05, ** p < 0,01, con respecto a la condición basal, se obtuvieron empleando el test t de Student por grupos.

Dz inhibe la proliferación celular de manera dosis dependiente

La activación y proliferación de células T en ganglios linfáticos periféricos es un evento clave en el desarrollo temprano de la EAE. En consecuencia, se realizó un ensayo para evaluar la proliferación celular en cultivo, a partir de células aisladas de

ganglios poplíteos durante la fase aguda de la patología (13 dpi). Las células fueron cultivadas y estimuladas con Con A, un mitógeno inespecífico, o específicamente con proteína básica de mielina (PBM) durante 24 o 48 hs respectivamente, en presencia de diferentes concentraciones de Dz. Cuando las células fueron estimuladas con Con A o PBM en ausencia de Dz, se observó una buena respuesta proliferativa (I.E > 2). La presencia de la benzodiacepina en el medio redujo la proliferación de manera dosis-dependiente a dosis no tóxicas (2,5-25 μM), en células estimuladas con Con A así como con PBM (Fig. 23). Células aisladas de ratas control (grupo AFC), mostraron una respuesta similar con Dz cuando fueron estimuladas con Con A, pero en presencia de PBM no se observó proliferación (datos no mostrados).

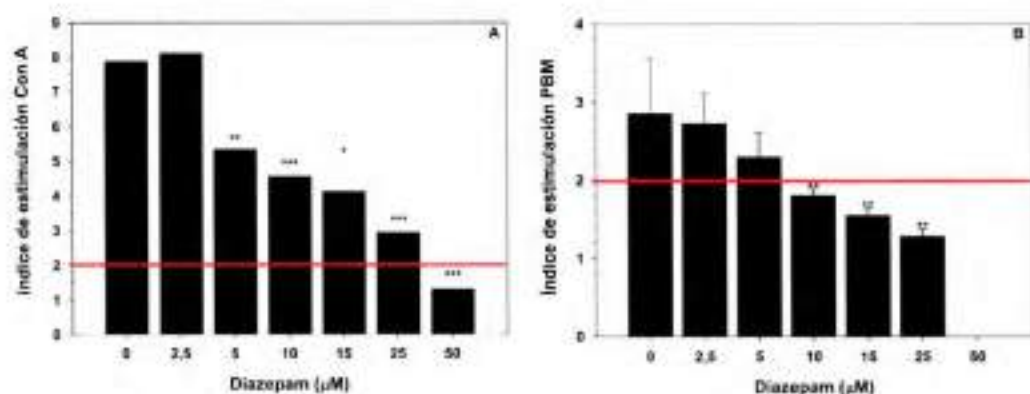


Figura 23. Dz inhibe la proliferación celular de manera dosis dependiente. Células aisladas de ganglios poplíteos, fueron cultivadas con Con A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 hs o PBM (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 48 hs en presencia de diferentes concentraciones de Dz. Los gráficos muestran el índice de estimulación (I.E) obtenido como la relación entre las cuentas por minuto (cpm) entre cada condición experimental y las cpm de una condición sin estímulo (media \pm ESM de 7 experimentos independientes). La línea roja determina el valor mínimo de I.E necesario para considerar que hubo proliferación. Las diferencias significativas, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto de la condición: con estímulo y en ausencia de Dz, se obtuvieron empleando el test ANOVA de una vía.

La pre-incubación con Dz no induce anergia

Para evaluar si la incubación de células en presencia de Dz conduce a las mismas a un estado anérgico, es decir, altera su capacidad para responder a un estímulo posterior, estas fueron incubadas durante 24 hs en presencia de Dz 0-25 μM sin estímulo. Posteriormente, fueron lavadas para remover el la benzodiacepina del medio, resuspendidas en medio completo nuevo e incubadas nuevamente por 24 hs, ahora en presencia de Con A o de un anticuerpo anti-CD3 (estímulos inespecíficos)



(Fig. 24). Los resultados de este ensayo muestran que las células responden de manera similar tanto a la estimulación con Con A como con anti-CD3, independientemente de haber sido incubadas previamente o no con diferentes dosis de Dz, indicando que esta droga no altera la capacidad de proliferar que tienen estas células ante posteriores estimulaciones.

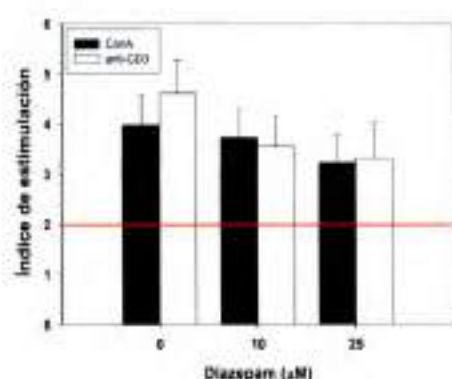


Figura 24: La incubación con Dz no induce anergia en linfocitos T. Células aisladas de ganglio fueron incubadas por 24 hs en presencia de Dz (0, 10, 25 μM), en ausencia de estímulo. Las células fueron cosechadas, lavadas con PBS, resuspendidas en medio completo nuevo e incubadas nuevamente por 24 hs en presencia de Con A o anticuerpo anti-CD3. Se grafica el índice de estimulación de células pre-incubadas o no con Dz. (Media \pm ESM de 5 experimentos independientes).

Dz reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias

Teniendo en cuenta que la incubación en presencia de Dz redujo la proliferación de las células *in vitro* cuando estas fueron estimuladas con Con A o PBM, sin afectar la viabilidad celular ni inducir apoptosis, decidimos evaluar si esta droga es también capaz de afectar la producción de citocinas pro-inflamatorias involucradas en los procesos de activación y proliferación celular, relacionadas al desarrollo de la EAE. Para ello, células aisladas de ganglios linfáticos popliteos fueron cultivadas durante 24 o 48 hs en presencia de estímulo, Con A o PBM y diferentes concentraciones de Dz (0, 5, 10 y 25 μM). Transcurrido el tiempo de incubación, se aislaron los sobrenadante de cultivo y se realizó un test de ELISA para determinar la producción de IFN- γ e IL-17. Se observó una disminución significativa, dosis dependiente en la producción de IFN- γ en presencia de Dz en células estimuladas de manera específica y no específica (Fig. 25A, C). Los niveles de IL-17, una citocina involucrada en condiciones de autoinmunidad, alcanzó altas concentraciones cuando las células fueron activadas principalmente con PBM (estimulación específica), en comparación con Con A. Sin embargo, con ambos estímulos se observó que Dz redujo los niveles de esta citocina, pero con el estímulo inespecífico el efecto dosis dependiente no es tan marcado (Fig. 25 B, D).

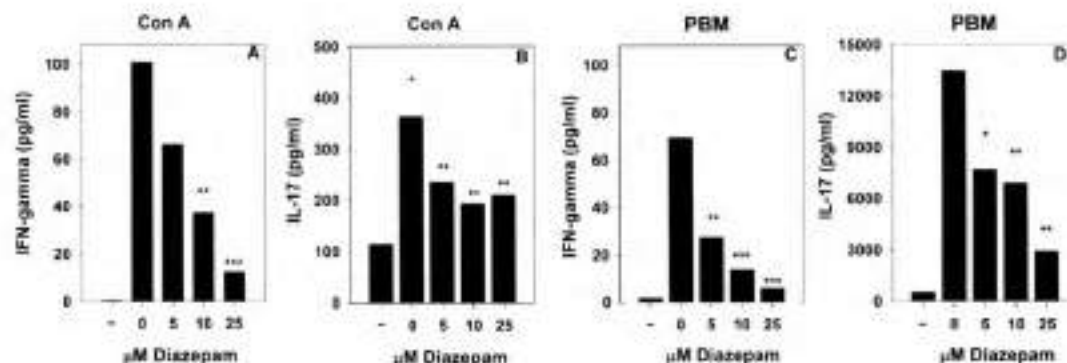


Figura 25: Dz reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias. Células aisladas de ganglio fueron cultivadas con 1 μg/mL de Con A por 24 hs (A, B) o 100 μg/mL de PBM por 48 hs (C, D) en presencia de diferentes concentraciones de Dz. Las concentraciones de IFN-γ (A, C) e IL-17 (B, D) fueron determinadas empleando los anticuerpos específicos en un ensayo de ELISA sándwich. Los gráficos indican los niveles de producción de citocinas en cada condición, (media ± ESM) de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ se obtuvieron de comparar cada condición respecto de Dz 0μM, en presencia de estímulo (test ANOVA de una vía). En el gráfico, (-) hace referencia a células incubadas sin estímulo y en ausencia de diazepam.

Dado que la proliferación celular disminuye cuando las células son incubadas en presencia de Dz, la disminución en los niveles de citocinas pro-inflamatorias en sobrenadante de cultivo puede ser una consecuencia de un menor número de células en el pocillo. Para evaluar esta posibilidad, realizamos marcaciones intracelulares para estas citocinas y las analizamos por citometría de flujo. Como se muestra en la Tabla 4, se observó una disminución en el porcentaje de células productoras de IFN-γ e IL-17 cuando estas fueron estimuladas con Con A e incubadas en presencia de Dz 25 μM, comparado con la condición Con A sola.

Tabla 4:

Población celular	Sin estímulo (%)	Con A (%)	Con A + Dz (%)	(%) diferencia Con A
CD4+IFN-γ+	2,33 ± 0,33	8,00 ± 1,15	4,33 ± 1,20*	-45,88
CD8+IFN-γ+	2,33 ± 0,33	9,33 ± 1,33	5,33 ± 1,20*	-42,87
CD4+IL-17+	3,00 ± 0,58	13,67 ± 1,45	9,33 ± 1,33*	-31,75
CD8+IL-17+	6,33 ± 0,68	18,33 ± 3,18	14,33 ± 3,84	-21,82

Los datos son expresados como el promedio de cada grupo ± ESM. * $p < 0,05$ para la comparación entre Con A y Con A + Dz.

Dz reduce el porcentaje de células T CD8⁺ activadas

El marcador de superficie CD25 corresponde a la cadena α del receptor de IL-2. Es una proteína transmembrana tipo I presente en células T y B activadas, algunos timocitos, precursores mieloides y oligodendrocitos. Esta cadena se asocia con la proteína CD122 para formar un heterodímero que puede actuar como un receptor de alta afinidad para IL-2 (Brisslert y col., 2006). La IL-2 es una pequeña molécula que puede actuar como factor de crecimiento, y se encuentra involucrada en la supervivencia y proliferación de linfocitos T. En este ensayo, evaluamos el porcentaje de la población T CD4⁺CD25⁺ y CD8⁺CD25⁺ en cultivo, de células estimuladas o no con Con A durante 24 hs, en presencia de diferentes dosis de Dz (Fig. 26). Pudimos observar una disminución en el porcentaje de población de células T CD8⁺CD25⁺ de manera dosis dependiente en células estimuladas con Con A en presencia de Dz, mientras que no se observaron cambios en la población de células T CD4⁺CD25⁺ a cualquier dosis de Dz empleada.

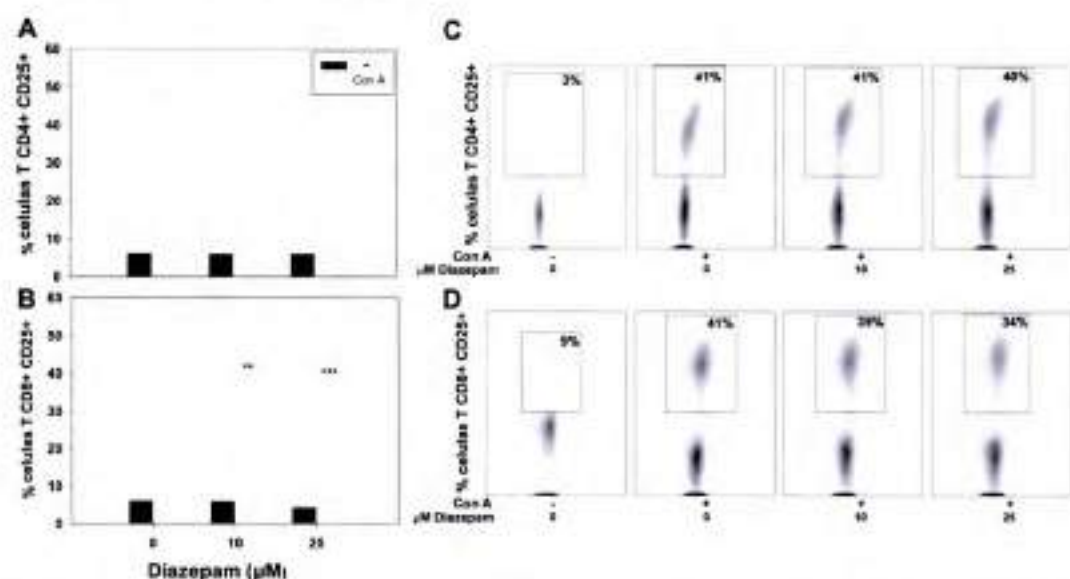


Figura 26. Disminución de los niveles de expresión de CD25 en células T CD8⁺ estimuladas, en presencia de Dz. La expresión de la molécula de superficie CD25 como marcador de activación, fue determinada en células cultivadas por 24 hs en presencia o ausencia de Con A y con determinadas concentraciones de Dz. Los gráficos de barra muestran el promedio de los porcentajes de células CD25⁺ dentro de la población de células T CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B), obtenidos de 5 experimentos independientes. Los gráficos de densidad (C, D) corresponden a un experimento representativo. Las diferencias significativas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto de la condición Con A en ausencia de DZ, se obtuvieron empleando el test t de Student para muestras apareadas.

Capítulo 2 (II): efecto de Dz sobre CDs y Mφs

Efectos del DZ sobre las CDs

Dz no afecta la viabilidad celular

Los lipopolisacáridos (LPS) son un componente de la pared celular de bacterias Gram negativas que tiene la capacidad de desencadenar respuestas inmunes e inflamatorias (Niu y col., 2015).

Las CDs diferenciadas a partir de sus progenitores mieloides, fueron cultivadas con diferentes concentraciones de Dz, en presencia o ausencia de LPS y el efecto sobre la viabilidad celular fue evaluado por el ensayo de MTT (Fig. 27). Se demostró que la incubación de las células en presencia de Dz no reduce la viabilidad al menos hasta la concentración 50 μ M. Cuando las células fueron incubadas en presencia LPS, se observa que la viabilidad disminuye respecto de la condición basal. Esto puede ser consecuencia de que la activación con esta molécula induce la liberación de mediadores inflamatorios que se acumulan en el medio y son tóxicos para las propias células. De todas maneras, la incubación de las mismas con Dz en presencia de LPS, no afecta la viabilidad celular respecto de su condición control (LPS solo). Estos datos indican que las concentraciones de Dz empleadas en los experimentos no tienen efecto tóxico o alteran la viabilidad celular en las condiciones de trabajo empleadas.

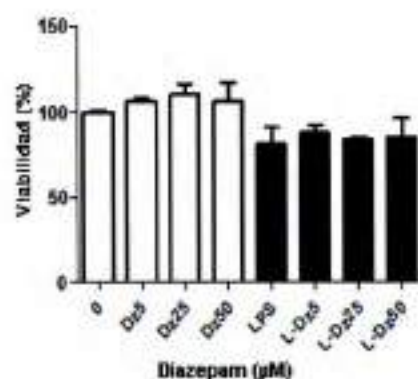


Figura 27: Dz no afecta la viabilidad celular. CDs diferenciadas de médula ósea fueron incubadas durante 18 hs sin estímulo o estimuladas con LPS, en presencia de concentraciones crecientes de Dz. Las últimas 4 hs de cultivo se adicionó MTT y la viabilidad fue determinada por la absorbancia a 570 nm a partir de la producción de formazán, resultado del metabolismo mitocondrial. El gráfico muestra el porcentaje de células viables y se representan como promedio \pm ESM de 3 experimentos independientes.

Dz disminuye la activación de CDs inducida por LPS

Teniendo en cuenta la capacidad de las CDs de actuar como células presentadoras de antígenos profesionales, se decidió evaluar el efecto de Dz sobre la modulación de la expresión de MHCII y CD40, dos moléculas que aumentan su

expresión cuando las células son activadas (Askew y col., 2000). MHCII es la molécula encargada de presentar los péptidos captados y procesados por las CD a los linfocitos T; CD40 es una importante molécula co-estimuladora necesaria para una óptima interacción entre la CD y linfocitos T y para una efectiva activación de este último (Grewal y col., 1996; Hernández y col., 2007). Como se puede observar en la Fig. 28, la incubación de las CD en presencia de LPS conduce a un aumento en el porcentaje de células MHCII⁺ y CD40⁺ respecto de la condición basal. Cuando las CD se incubaron en presencia de estímulo (LPS) y Dz, se observa una disminución en el porcentaje de células positivas para estas dos moléculas.

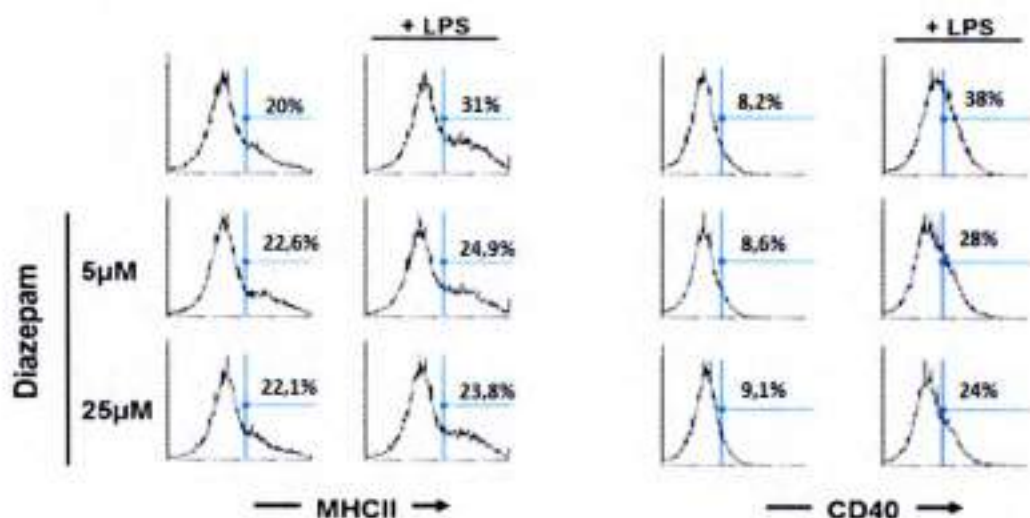


Figura 28: Dz disminuye la activación de CD inducida por LPS. Las CD derivadas de médula ósea fueron cultivadas durante 18 hs en presencia de diferentes concentraciones de Dz con o sin estímulo (LPS). Posteriormente, se marcaron con los siguientes anticuerpos: anti-Cd11c (para caracterizar la población de CD), anti-MHCII y anti-CD40 (marcadores de activación celular) y se analizó por citometría de flujo. Se realizaron 2 experimentos y los histogramas son representativos de uno de ellos.

Dz modula la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias

Posteriormente se evaluó el efecto de Dz sobre la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-12, TNF- α e IL-6), liberadas durante la activación de CPA profesionales, que *in vivo* promueven y favorecen el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa mediadas por células Th1 y Th17 (Hsieh y col., 1993). Por otro lado se determinaron los niveles de producción de la citocina anti-inflamatoria IL-10, caracterizada por sus efectos inmunoregulatorios, como disminuir los niveles de citocinas producidas por células Th1 (IFN- γ e IL-17), inducir células Treg y reducir los niveles de expresión de MHCII y moléculas co-estimuladoras en CD y M ϕ s (Aste-

Amezaga y col., 1998; Moore y col., 2001). Como se puede observar en la Fig. 29, la incubación de las células en presencia de LPS aumenta la producción de las citocinas. Cuando las células se incubaron en presencia de LPS y Dz, ocurre una disminución de manera dosis dependiente en la producción de citocinas pro-inflamatorias (Fig. 29A, B y C) y en la condición Dz 5 μ M, aumentan los niveles de IL-10 tanto en presencia como en ausencia de LPS (Fig. 29D).

Estos resultados nos indican que la incubación en presencia de Dz, estaría favoreciendo a las CD4 a adquirir un perfil más tolerogénico, menos inflamatorio.

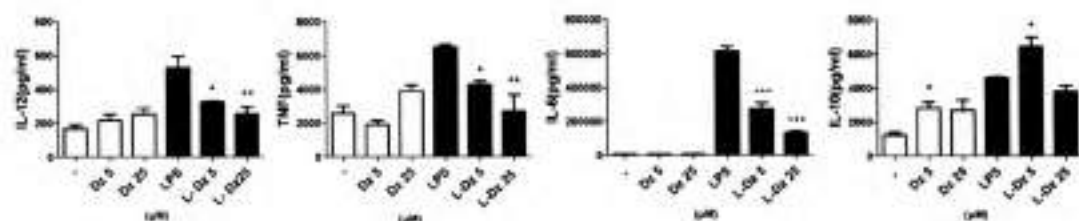


Figura 29: Dz modula la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias. CD4 derivadas de médula ósea fueron cultivadas con o sin LPS durante 18 hs en presencia de diferentes dosis de Dz. Las concentraciones de IL-12, TNF- α , IL-6, IL-10 fueron determinadas en sobrenadante de cultivo, empleando los anticuerpos específicos en un ensayo de ELISA sándwich. Los gráficos indican los niveles de producción de citocinas en cada condición (media \pm ESM de 3 experimentos independientes). El análisis estadístico se realizó con un test ANOVA de una vía, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ corresponden a las diferencias significativas de cada condición respecto de la condición basal o LPS (según corresponda). En el gráfico, (-) hace referencia a células incubadas sin estímulo y en ausencia de diazepam.

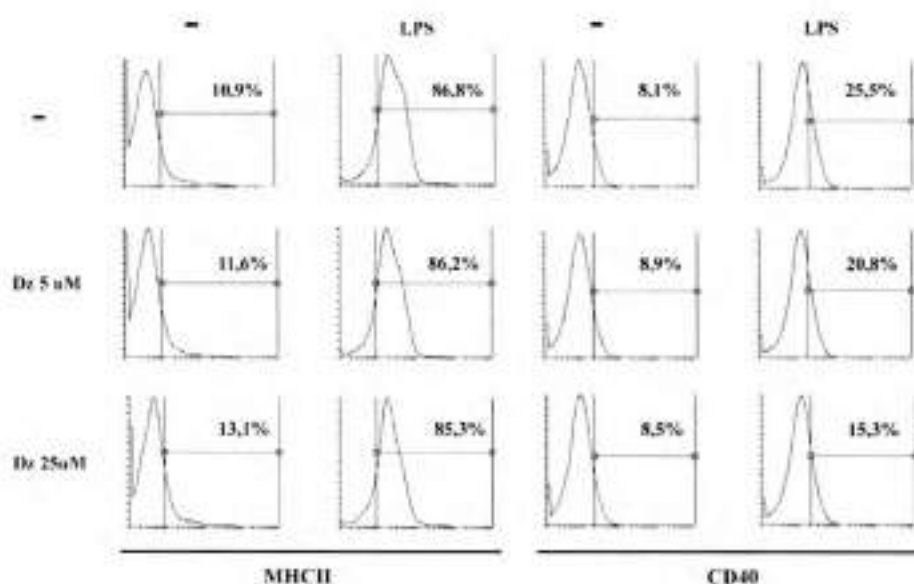
Efecto del Dz sobre los M ϕ s

Dz reduce el estado de activación

De manera similar a lo observado en las CD4, cuando los M ϕ s fueron estimulados con LPS, aumenta el porcentaje de células activadas, es decir, el porcentaje de células positivas para las moléculas de superficie: MHCII y CD40 dentro de la población CD11b⁺. Pero en presencia de Dz se observa una disminución significativa en el % de células CD11b⁺CD40⁺, indicando que esto podría resultar en una incorrecta interacción entre el M ϕ y la célula T y de esta forma una inadecuada activación de esta última población. Sin embargo, no observamos diferencias en cuanto a los niveles de expresión de la molécula MHCII cuando las células fueron incubadas en presencia de LPS y Dz (Fig. 30A).

Por otro lado, observamos que el Dz reduce los niveles de producción de citocinas pro-inflamatorias gatilladas por el LPS y eleva la producción de citocinas anti-inflamatorias (IL-10 y TGF- β), en ausencia de estímulo, lo que estaría favoreciendo un perfil de activación alternativo (M2) (Fig. 30B) (Rupil y col., 2012).

A



B

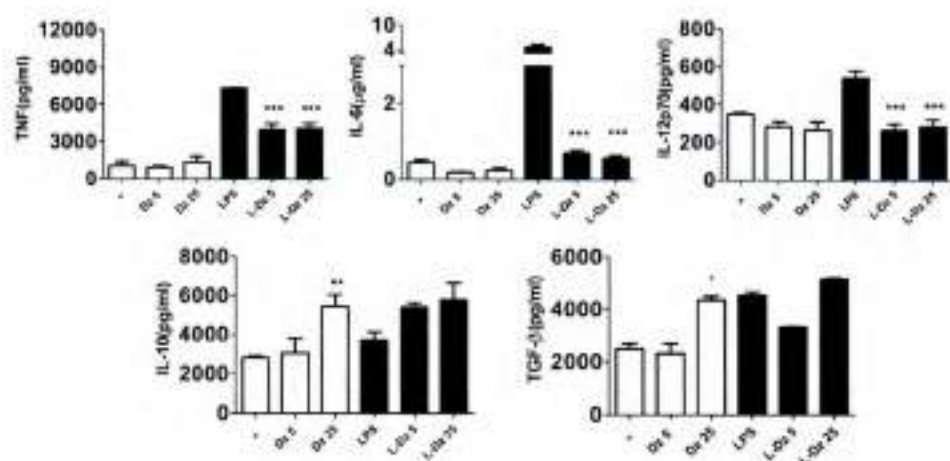


Figura 30: Dz reduce los niveles de moléculas co-estimuladoras así como la producción de citocinas pro-inflamatorias y favorece las anti-inflamatorias. (A) M ϕ s derivados de médula ósea, cultivados durante 18 hs en presencia de diferentes dosis de Dz con o sin estímulo (LPS), se marcaron con los siguientes anticuerpos: anti-CD11b, anti-MHCII y anti-CD40 y se analizó por citometría de flujo. Se realizaron 2 experimentos y los histogramas son representativos de uno de ellos. (B) M ϕ s derivados de MO fueron cultivados con o sin LPS durante 18 hs en presencia de diferentes concentraciones de Dz. Las concentraciones de IL-12, TNF- α , IL-6, IL-10, TGF- β fueron determinadas en sobrenadantes de cultivo,



empleando los anticuerpos específicos en un ensayo de ELISA sándwich. Los gráficos indican los niveles de producción de citocinas en cada condición (media \pm ESM de 3 experimentos independientes). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (test ANOVA de una vía). En el gráfico, (-) hace referencia a células incubadas sin estímulo y en ausencia de diazepam.

Dz reduce los niveles de la enzima iNOS y la producción de ON

M ϕ s fueron cultivados por 24 hs y se determinó la cantidad de nitritos en los sobrenadantes de cultivos como una medida indirecta de la producción de NO (Fig. 31B). En M ϕ no activados, el tratamiento con Dz no indujo cambios en los niveles de nitritos mientras que la exposición a LPS indujo un notorio aumento en la liberación de NO. En presencia de Dz, se observa una disminución dosis dependiente en la producción de este mediador, observándose diferencias significativas a la concentración de Dz 25 μ M. Por otra parte, con el objetivo de profundizar en el mecanismo inhibitorio de esta benzodiazepina hacia la producción de NO, se evaluó mediante Western blot la expresión de la enzima responsable de su producción (iNOS) en un contexto inflamatorio (Fig. 31A). La relación iNOS/tubulina, reveló que la incubación de las células en presencia de LPS, aumentó significativamente los niveles de iNOS. Sin embargo, la condición LPS y Dz25 μ M indujo una marcada disminución en los niveles de expresión de la enzima. Podemos decir que la incubación de los M ϕ s en presencia de Dz reduce los niveles de NO como consecuencia de una disminución de los niveles de la enzima iNOS, cuando estas células son estimuladas con LPS.

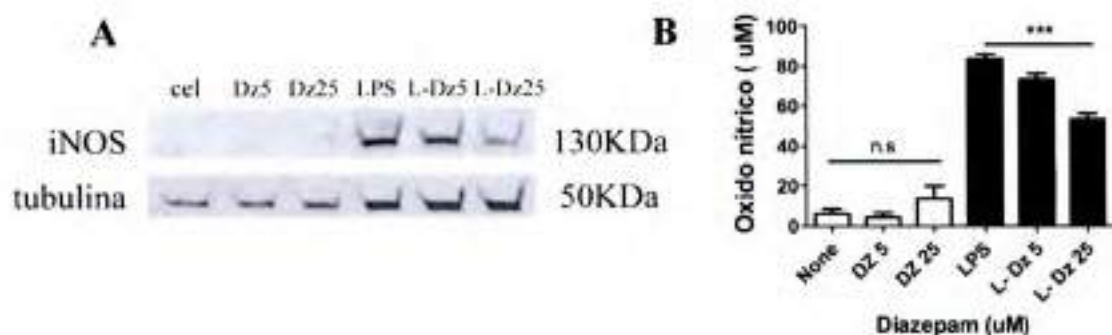


Figura 31: Dz reduce los niveles de la enzima iNOS y la producción de NO. M ϕ s derivados de médula ósea fueron cultivados con o sin LPS durante 18 hs en presencia de diferentes concentraciones de Dz, las células fueron colectadas y la expresión de iNOS fue evaluada mediante Western blot (A). Se realizaron 3 experimentos y las imágenes son representativas de uno de ellos. (B) Los sobrenadantes se cosecharon y se determinó la producción de nitritos mediante el ensayo de Griess. Los datos del gráfico de barras corresponden al promedio de 9 experimentos independientes. Las diferencias significativas de grupos tratados con respecto a la condición LPS, se indican como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Dz afecta la señalización intracelular gatillada por LPS

La producción de citocinas pro-inflamatorias se encuentra finamente regulada por la vía de señalización de las MAPK, dado que la misma lleva a la activación de ciertos factores de transcripción: c-fos, c-jun, con la posterior formación del complejo AP1 (proteína activadora 1), que transloca al núcleo y favorecen la transcripción y posterior síntesis de citocinas pro-inflamatorias. La inhibición selectiva de las MAPKs ha sido identificada como un nuevo blanco terapéutico en enfermedades inflamatorias (Niu y col., 2015; Xie y col., 2015; Ahn y col., 2016). Con la idea de evaluar si el Dz podría modular las vías de señalización intracelular gatilladas por LPS a través de TLR4, diseñamos ensayos de Western blot para estudiar la cascada de señalización de las MAPK. Observamos que las células no estimuladas (sin LPS), presentan muy bajos niveles de fosforilación para ERK1/2 y p38MAPK. Cuando los Mφs fueron estimulados con LPS durante 60 min., los niveles de P-ERK1/2 y P-p38 MAPK aumentaron significativamente, al igual que los niveles de citocinas pro-inflamatorias presentado previamente (Fig. 30B). Cuando analizamos la condición LPS en presencia de Dz, observamos que esta droga inhibe parcialmente la fosforilación de p38 MAPK (a la dosis 5 μ M), y ERK1/2 a ambas concentraciones de Dz (5 y 25 μ M). Como se puede observar en la Fig. 32 A y B los niveles de tubulina, p38 MAPK total y ERK1/2 total no varían entre las diferentes condiciones. Esto indicaría que Dz actúa sobre el estado de fosforilación de estas proteínas, sin cambiar los niveles totales de las mismas. Paralelamente, estudiamos la vía de señalización mediada por el factor nuclear NF- κ B. Esta proteína, en condiciones basales se encuentra en el citoplasma celular asociada a inhibidores, uno de ellos la proteína I κ B ϵ . Durante la estimulación celular, como puede ocurrir con LPS, el inhibidor es degradado y NF- κ B transloca al núcleo para favorecer la transcripción y posterior síntesis de proteínas pro-inflamatorias (Ahn y col., 2016). Es por eso que en la condición LPS solo (Fig. 32C) observamos menores niveles del inhibidor, pero esta situación no es revertida por la incubación en presencia de LPS y Dz, manteniéndose reducidos los niveles del mismo. A partir de estos resultados podemos decir que Dz es incapaz de prevenir o revertir la degradación de I κ B ϵ gatillada por el LPS.

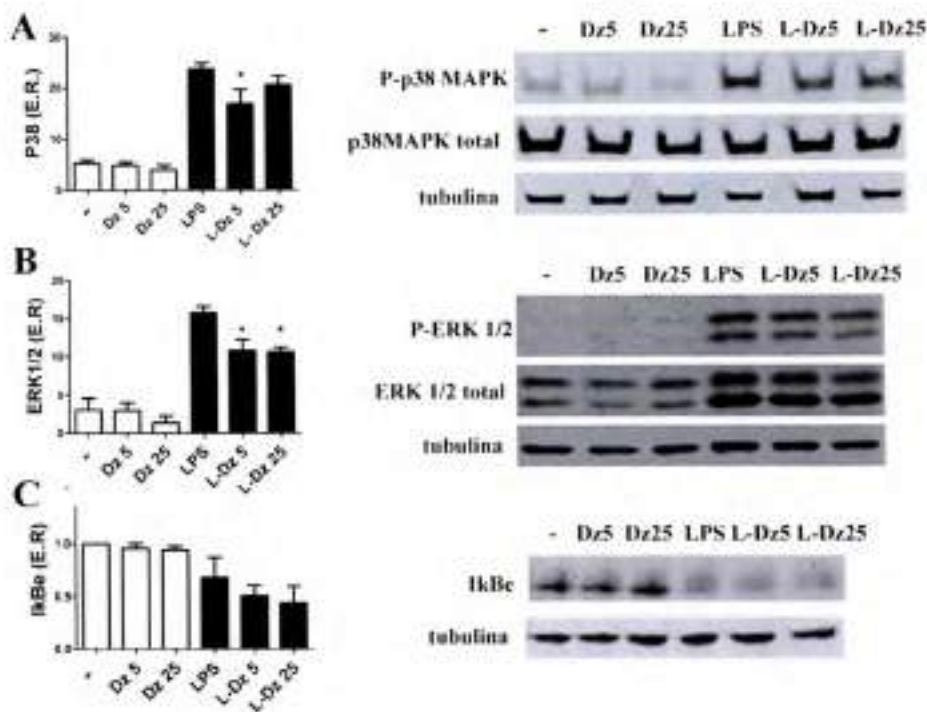


Figura 32. Dz inhibe las vías de señalización gatillada por LPS. Los Mφs derivados de médula ósea fueron cultivados durante 24 hs a 37°C y estimulados por 1 h en presencia de Dz, con o sin LPS. Las células fueron colectadas y los niveles de expresión de P-p38MAPK, p38MAPK total (A), P-ERK1/2, ERK1/2 total (B), IκBα (C) fue evaluada mediante Western blot. Las imágenes son representativas de un experimento, y los gráficos de barra corresponden al análisis de al menos 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas de grupos de células tratados con respecto a la condición LPS se indican como * $p < 0,05$. (ER = expresión relativa). En el gráfico, (-) hace referencia a células incubadas sin estímulo y en ausencia de diazepam.

Conclusiones capítulo 2:

La incubación de células aisladas de ganglios poplíteos de animales EAE en presencia de Dz, reduce la proliferación de células T y la producción de citocinas pro-inflamatorias, sin alterar la viabilidad de las mismas, inducir apoptosis ni llevarlas a un estado anérgico.

La incubación de CD4 en presencia de Dz, reduce los niveles de expresión de MHCII y CD40 en membrana plasmática, cuando estas son activadas con LPS, disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias, y aumenta la anti-inflamatoria (IL-10), por lo que estaría favoreciendo a las CD4 a adquirir un perfil más tolerogénico (menos inflamatorio).

En M ϕ s se puede observar que esta benzodiazepina, reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias y aumenta las anti-inflamatorias, favoreciendo el perfil de activación alternativo (M2), reduce la liberación de NO como consecuencia de una disminución en los niveles de expresión de iNOS. Estos efectos pueden ser mediados al menos en parte, por la inhibición de los mecanismos de señalización intracelular gatillado por el LPS, reduciendo la fosforilación de p38MAPK y ERK.

Capítulo 3: Receptores de Dz

En los capítulos previos hemos descrito el efecto preventivo de Dz sobre el desarrollo de la EAE, así como también el efecto directo de esta benzodiazepina sobre diferentes poblaciones celulares que participan activamente durante la inducción y desarrollo de la patología. En este capítulo, en colaboración con el grupo de la Dra. Bouzat, INIBIBB, Bahía Blanca, describimos la presencia de los posibles receptores de Dz (GABA $_A$ y TSPO) en los linfocitos T CD4 $^+$, una población crítica durante el desarrollo de la EAE, susceptible a la acción de esta benzodiazepina, tanto *in vivo* como *in vitro*, así como también su presencia en la región frontal de tejido cerebral y en la población CD11b/c $^+$ de SNC constituida por microglía y M ϕ s, principalmente.

Si bien estudios previos han descrito la presencia de receptores GABA $_A$ en células del sistema inmune, entre ellos linfocitos T (Tian y col., 2004; Bjurström y col., 2008; Mendu y col., 2011), sólo algunos trabajos confirman la presencia de la subunidad gamma2 (γ 2), que como se describió previamente, es indispensable para la unión de benzodiazepinas a dicho receptor. Es por eso, que en este trabajo, nos enfocamos en evaluar la presencia de esta subunidad y no las 16 subunidades que pueden conformar el receptor GABA $_A$.

Los linfocitos T CD4 $^+$, presentan bajos niveles de la subunidad γ 2 del receptor GABA $_A$

Los animales de los diferentes grupos experimentales (EAE enf, E-Dz sano, E-Dz enf) fueron sacrificados a los 13 dpi, se aislaron los ganglios popliteos y se purificaron las células. Estas fueron marcadas para la molécula de superficie CD4 y la subunidad γ 2 de receptor GABA $_A$ y posteriormente analizadas por citometría de flujo o microscopía. Como se puede observar en la Fig. 33A y B, los niveles de γ 2 en la

población de células T CD4⁺ es muy baja para todos los grupos experimentales (2-6 %), sin observarse diferencias significativas entre ellos. Las imágenes de microscopia (Fig. 33D y E) son ilustrativas, y si bien la cuantificación se realizó en base a los resultados obtenidos por citometría de flujo, en la imagen D se puede observar que la mayoría de las células T CD4⁺ (rojo), no presentan, señal para $\gamma 2$ (verde).

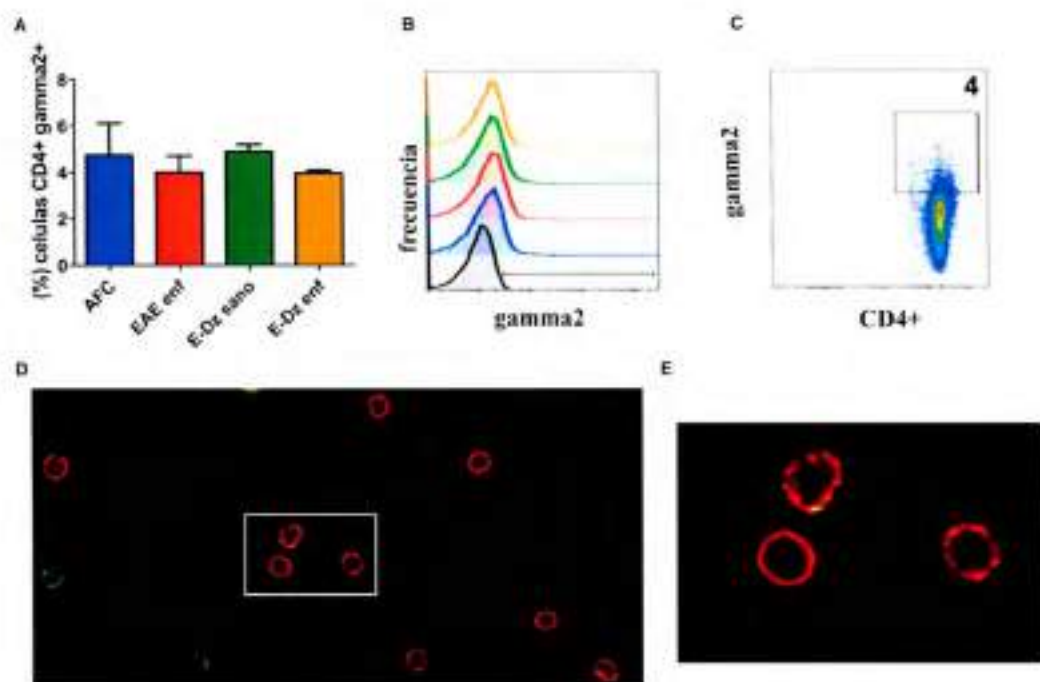


Figura 33: Determinación de la subunidad $\gamma 2$ en linfocitos aislados de ganglios poplíteos. Se aislaron las células de nódulos poplíteos de animales de los diferentes grupos experimentales y las mismas fueron marcadas con anticuerpos específicos para la proteína CD4 y la subunidad $\gamma 2$ del receptor de GABA_A. (A) Se representa el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ que expresan la subunidad $\gamma 2$ en su superficie a partir del análisis por citometría de flujo. Los resultados corresponden a al menos 3 animales por grupo. El histograma (B) es representativo de un animal correspondiente de cada condición experimental, la línea negra corresponde a la condición control (empleando el anticuerpo secundario, en ausencia del primario). El gráfico de puntos (C) es representativo de un animal, y los puntos dentro del recuadro corresponden a las células T CD4⁺ $\gamma 2$ ⁺. Las imágenes obtenidas de microscopia son cualitativas, en (D) se muestra una foto de microscopia representativa de la expresión de $\gamma 2$ (verde) sobre los linfocitos T CD4⁺ (rojo) de un animal. La imagen (E) es una ampliación de una región de (D), donde se observa que la célula superior presenta la subunidad $\gamma 2$.

El receptor TSPO está presente en linfocitos T CD4⁺

Las células aisladas de ganglios poplíteos fueron marcadas para el antígeno de

superficie CD4, e intracelularmente para la proteína TSPO de localización mitocondrial (Midzak y col., 2011). Como se puede observar en las Fig. 34A, B y C, los resultados obtenidos por citometría de flujo, indican que alrededor del 90 % de las células T CD4⁺ aisladas son positivas para el receptor TSPO, y presentan buenos niveles del mismo, sin observarse diferencias significativas entre los grupos experimentales. Todos presentan valores similares tanto en el porcentaje de células T CD4⁺ TSPO⁺, como en la intensidad media de fluorescencia (IMF). Cuando evaluamos esta proteína empleando la técnica de microscopia de manera cualitativa (Fig. 34D y E), pudimos corroborar que tanto las células T CD4⁺ como las negativas para este marcador, presentan señal citoplasmática para el receptor TSPO.

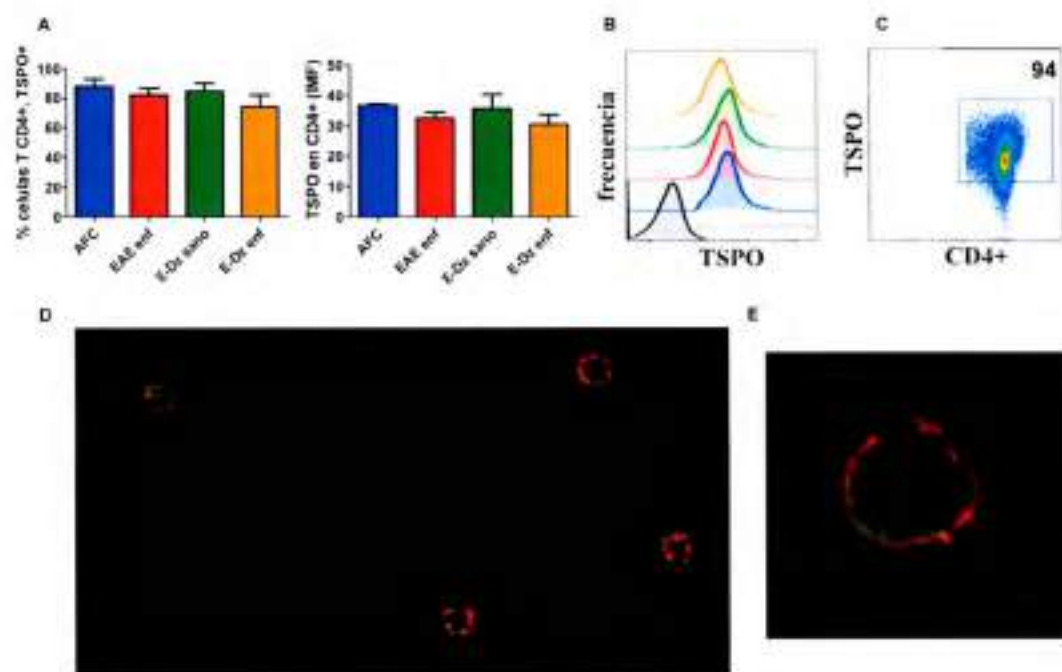


Figura 34: Determinación de la presencia del receptor intracelular TSPO en linfocitos T CD4⁺ aislados de ganglios popliteos. Se aislaron las células de ganglios popliteos de ratas de los diferentes grupos experimentales y las mismas fueron marcadas con anticuerpos específicos para la proteína de superficie CD4 y el receptor intracelular TSPO. (A) Se representa el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ considerados positivos para el receptor TSPO y la IMF de expresión de TSPO en estas células. Los resultados corresponden a al menos 6 animales por grupo. El histograma (B) relativo a la IMF, es representativo de un animal en cada condición experimental. La línea negra representa la condición control (empleando el anticuerpo secundario, en ausencia del primario). El gráfico de puntos (C) es representativo de un animal, y los puntos dentro del recuadro corresponden a las células T CD4⁺ TSPO⁺. Las imágenes (D) y (E) fueron obtenidas por microscopia confocal, con diferente aumento, y son cualitativas de la expresión de TSPO (verde) en las células T CD4⁺ (rojo).

Niveles de TSPO en linfocitos T CD4⁺ aislados de SNC

Teniendo en cuenta los datos obtenidos respecto de TSPO como receptor de Dz presente en células T CD4⁺ aisladas de nódulos linfáticos popliteos, decidimos evaluar su presencia en linfocitos T CD4⁺ infiltrantes de SNC (encefalitogénicos). Como se puede observar en la Fig. 35B las células T CD4⁺ aisladas del grupo E-Dz sano presentan mayores niveles de expresión de la proteína TSPO (IMF), respecto de los animales enfermos. A partir de estos resultados y los obtenidos en el capítulo 1 (Fig. 19), es importante remarcar la presencia de altos niveles de TSPO en los linfocitos T CD4⁺ aislados de este grupo, y los bajos niveles de producción de citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ e IL-17).

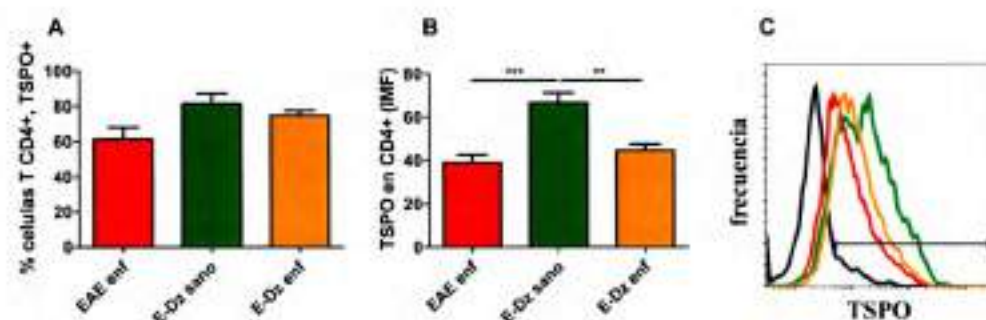


Figura 35: Niveles de TSPO en linfocitos T CD4⁺ aislados de SNC. Se aislaron las células inflamatorias de SNC, y se marcaron con un anticuerpo específico para la molécula CD4. Luego de fijación y permeabilización, las células se incubaron con un anticuerpo específico para TSPO y finalmente se analizaron las poblaciones por citometría de flujo. El gráfico de barra (A) presenta el porcentaje de células positivas para TSPO dentro de la población CD4⁺, mientras que (B) representa el promedio en la IMF de TSPO en cada una de las poblaciones en las diferentes condiciones experimentales. Los resultados corresponden a 2 experimentos con 2 animales por grupo. Los histogramas (C) son representativos de un animal correspondiente a cada grupo, la línea negra corresponde a la condición control (empleando el anticuerpo secundario, en ausencia del primario). Las diferencias significativas se indican como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Estudio de ARNm codificante para la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A en tejido cerebral

Estudiamos la presencia de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A en la región frontal de la corteza cerebral, una región del cerebro donde tanto la neurotransmisión glutamatérgica, como la modulación GABAérgica se encuentra alterada durante el curso clínico de la EAE (Vilcaes y col., 2009; Cid y col., 2011; Chanaday y col., 2015; Fernández Hurst y col., 2015). Los resultados obtenidos indican que en tejido cerebral,

particularmente a nivel neuronal que es donde se localiza principalmente el receptor $GABA_A$, no ocurren cambios significativos en los niveles de transcritos codificantes para la subunidad $\gamma 2$ del receptor como consecuencia de la inflamación o tratamiento (Fig. 36).

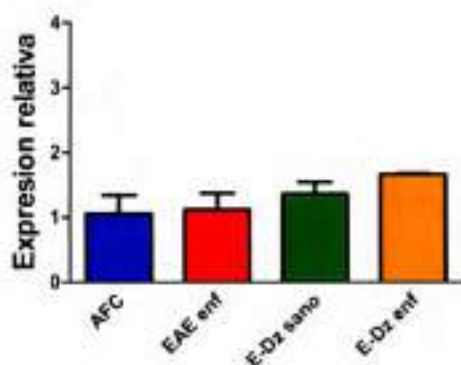


Figura 36: Niveles relativos de ARN mensajero para la subunidad $\gamma 2$ del receptor $GABA_A$ en tejido correspondiente a la región frontal de la corteza cerebral. El resultado corresponde a 1 experimento con 3 animales por grupo.

Niveles de ARNm codificantes para TSPO en tejido cerebral

A partir del mismo material de partida empleado para la detección de la subunidad $\gamma 2$, pero utilizando cebadores específicos para la amplificación del receptor TSPO, estudiamos los niveles de transcritos codificantes para este receptor en tejido de la región frontal de la corteza cerebral de animales de los diferentes grupos experimentales.

En tejido cerebral, antecedentes bibliográficos describen que el receptor TSPO se localiza principalmente en la microglia, y sus niveles aumentan cuando las células se activan, generalmente en condiciones de inflamación o daño (Politis y col., 2012). En la Fig. 37, observamos que los niveles de transcritos para esta proteína se encuentran incrementados significativamente en la región frontal de la corteza cerebral aislada de animales EAE respecto de los animales control. Cuando los animales fueron desafiados para la patología y tratados con Dz, los que se enfermaron mostraron un comportamiento similar al grupo EAE (vehículo), mientras que aquellos que no manifestaron signos clínicos característicos, presentaron una tendencia a expresar menores niveles de transcritos respecto del grupo EAE.

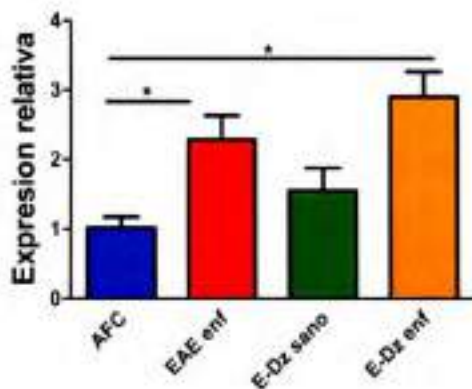


Figura 37: Niveles relativos de ARN mensajeros para el receptor TSPO en tejido correspondiente a la región frontal de la corteza cerebral. El resultado corresponde a 1 experimento con 3 animales por grupo. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Niveles de TSPO en células inflamatorias de SNC

Los resultados obtenidos respecto de los niveles de ARNm codificante para TSPO en tejido cerebral correlacionan con los antecedentes bibliográficos respecto del aumento en los niveles de expresión de TSPO en microglia activada en varias patologías y condiciones inflamatorias (Venneti y col., 2006; Politis y col., 2012). Por ello, decidimos evaluar por citometría de flujo la presencia y niveles de expresión de esta proteína en células CD11b/c⁺ (microglia y Mφs principalmente) aisladas de SNC en animales desafiados para la EAE durante la etapa aguda de la patología. Observamos que en los animales E-Dz sanos, las células CD11b/c⁺ presentaban una tendencia a expresar menores niveles de TSPO (IMF) (Fig. 38B), lo que estaría indicando menores niveles de activación. Esto podría ser considerado como una medida indirecta del grado de inflamación y daño en SNC según antecedentes reportados por Wilms y col., (2003). Estos resultados correlacionan con los obtenidos por RT-qPCR en la región frontal de la corteza cerebral (Fig. 37), donde evidenciamos una tendencia a menores niveles de ARNm codificante para TSPO en los animales E-Dz sanos con respecto a los animales EAE enfermos (ya sea tratados con vehículo o Dz).

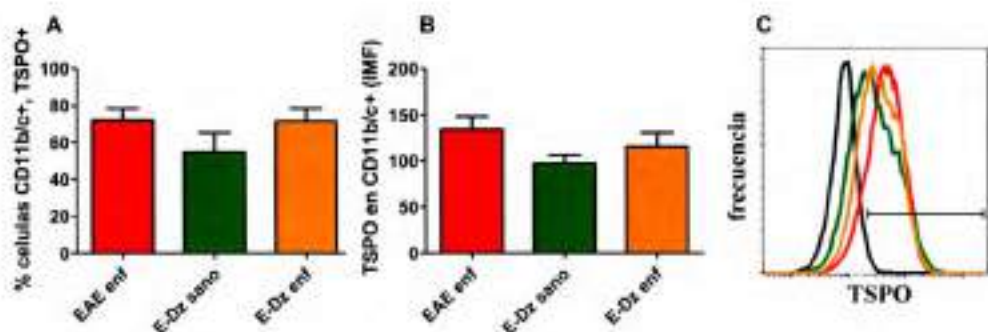


Figura 38: Niveles de TSPO en células CD11b/c⁺ aisladas de SNC. Se aislaron las células inflamatorias de SNC, y se marcaron con un anticuerpo específico para CD11b/c. Luego de fijación y permeabilización, las células se incubaron con un anticuerpo específico para TSPO y finalmente se analizaron las poblaciones por citometría de flujo. El gráfico de barras (A) presenta el porcentaje de células positivas para TSPO dentro de la población Cd11b/c⁺. Mientras que (B) representan el promedio en la IMF de TSPO en cada una de las poblaciones en las diferentes condiciones experimentales. Los resultados corresponden a 2 experimentos con 2 animales por grupo. Los histogramas (C) son representativos de un animal correspondiente a cada grupo, la línea negra corresponde a la condición control (empleando el anticuerpo secundario, en ausencia del primario). Las diferencias significativas se indican como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Conclusiones Capítulo 3:

Cuando evaluamos la expresión de la subunidad $\gamma 2$ de receptor de GABA_A y TSPO en linfocitos T CD4⁺ aislados de ganglios popliteos, observamos que presentan muy bajos niveles de $\gamma 2$ (5 % de las células), mientras que aproximadamente el 90 % de las células expresan TSPO, sin observarse diferencias significativas entre los grupos experimentales. Esto nos lleva a pensar que el efecto directo de Dz sobre los linfocitos durante el desarrollo de la EAE, así como en ensayos *in vitro*, estaría mediado principalmente por el receptor TSPO. Los linfocitos T CD4⁺ aislados de SNC del grupo E-Dz sano expresan niveles de TSPO significativamente mayores respecto de los animales EAE enfermos. Esto podría estar relacionado con un rol protector de esta proteína, o una reducida producción de citocinas pro-inflamatorias.

En tejido aislado de la región frontal de corteza cerebral no se observan cambios en cuanto a los niveles de transcritos codificantes para $\gamma 2$ entre los grupos experimentales. En animales EAE durante el curso clínico de la patología se observa un aumento en los niveles de transcritos para TSPO respecto de animales control. Los animales EAE tratados con Dz que no manifestaron signos clínicos, presentaron niveles disminuidos. Estos resultados correlacionan con la tendencia observada en la población CD11b/c purificada de SNC, indicando que TSPO puede ser un buen marcador de neuroinflamación en nuestro modelo experimental.

Discusión

La enfermedad humana EM y su modelo experimental EAE se caracterizan por inflamación, desmielinización y degeneración que afectan al SNC. Se generan por una fuerte reacción inmune contra componentes propios del organismo como son los antígenos de SNC, entre ellos la mielina. Los linfocitos T son activados en periferia y diferenciados principalmente en los subtipos Th1 y Th17. Estos son capaces de atravesar la BHE y acceder al SNC, allí son reactivados por CPA locales e infiltrantes y liberan mediadores inflamatorios que ejercen un daño directo sobre neuronas y células gliales. Además favorecen el reclutamiento de otros leucocitos desde periferia (células T CD8⁺, linfocitos B, Mφs) y la activación de la microglia, que contribuyen a la inflamación y daño (Ludwin y col., 2006; Fletcher y col., 2010; Simmons y col., 2013).

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC y su concentración se encuentra finamente regulada en el espacio sináptico. Varios estudios realizados en EAE, han revelado concentraciones elevadas de este neurotransmisor en SNC durante el curso clínico de la patología, evento conocido como excitotoxicidad mediada por glutamato (Werner y col., 2000; Pampliega y col., 2011). Además, trabajos realizados por nuestro grupo indican que una alteración en la neurotransmisión glutamatérgica ocurre en sinaptosomas aislados de la región frontal de la corteza cerebral de animales desafiados para la EAE, respecto de animales control (Vilcaes y col., 2009; Chanaday y col., 2015). El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio de SNC encargado de controlar la actividad excitatoria del glutamato. Algunos trabajos indican que el sistema GABAérgico se encuentra alterado en pacientes con EM y durante el curso clínico de la EAE (Demakova y col., 2003; Wang y col., 2008). Estudios previos realizados por nuestro grupo han demostrado que existe una alteración de la modulación GABAérgica sobre la liberación de glutamato en sinaptosomas aislados de la región frontal de la corteza cerebral de animales EAE enfermos (Cid y col., 2011). Con la intención de evaluar si aumentando la actividad GABAérgica en SNC se podía contribuir a mejorar el curso de la EAE, los animales desafiados para la patología fueron tratados con dos dosis de Dz (0,05 y 0,1 mg/kg/día) empleando varios esquemas de administración. Se observó que esta droga reducía tanto la incidencia de la patología, como los signos de daño histológico a nivel de la médula espinal asociados a la EAE y se inhibía la alteración en la liberación de glutamato previamente descrita (Bibolini y col., 2011). Además, se observó que el tratamiento con Dz modificaba algunos parámetros inmunológicos asociados con la patología como la reactividad celular, la proliferación antígeno específica y la producción de anticuerpos contra PBM.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se consideró elevar la dosis de Dz a la concentración 0,5 mg/kg/día, empleando un protocolo de administración entre los días 6 y 13 dpi, con el objetivo de reducir aún más la incidencia, signos clínicos, y realizar un estudio más completo del tratamiento sobre células del sistema inmune. Para ello, se aislaron leucocitos de ganglios poplíteos y SNC, dos regiones importantes en el desarrollo de la patología. Los primeros son órganos linfáticos secundarios drenantes del sitio de inducción de la EAE, lugar donde los linfocitos T entran en contacto con las CDs y otras CPA que captaron los antígenos inyectados, se activan, proliferan y comienzan a producir citocinas pro-inflamatorias, para luego migrar hacia SNC, que es el órgano blanco de la patología. Allí desencadenan la inflamación y daño neuronal, que se postulan como responsables de los signos clínicos característicos.

Se observó que el tratamiento con Dz 0,5 mg/kg/día redujo la incidencia de la EAE en un 50 % aproximadamente, atenuó la caída de peso indicativa del comienzo de los signos clínicos y redujo levemente algunos parámetros relacionados con la severidad de la enfermedad en los animales EAE que resultaron enfermos de manera similar a lo observado previamente por nuestro grupo (Bibolini y col., 2011). Cuando estudiamos lo que ocurría con las diferentes poblaciones del sistema inmune en periferia (ganglios poplíteos), no observamos cambios en los porcentajes correspondientes a los linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y las células B. Además, las células T CD4⁺ aisladas, presentaron una muy baja producción de citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ e IL-17). Esto puede deberse a que los linfocitos T aislados de este órgano a los 13 dpi, corresponden principalmente a células no específicas para los antígenos que se están presentando (péptidos de mielina). Posiblemente, las células T CD4⁺ específicas, productoras de estos mediadores inflamatorios, se encuentren infiltrando el SNC. En relación a la población CD11b/c⁺, caracterizada como CPAs, principalmente CDs (en este órgano), no observamos diferencias significativas entre los grupos experimentales en cuanto al porcentaje y número absoluto de células aisladas, mientras que si observamos cambios en los niveles de expresión de la molécula MHCII, con valores significativamente disminuidos en los animales E-Dz sano respecto de los enfermos. Estos resultados, nos llevan a pensar que la presentación antigénica se encuentra reducida en estos animales, por lo que habría menor activación de linfocitos, que se evidenciaría como un menor infiltrado en SNC.

Paralelamente, analizamos las principales poblaciones celulares inflamatorias en SNC (cerebro, cerebelo y médula espinal). Observamos que en los animales

tratados con Dz que no presentan signos clínicos, pudimos aislar un menor número de células. La población CD11b/c⁺ caracterizada principalmente por microglía, PMN, monocitos y Mφs, (sin descartar la presencia de CDs) (Miller y col., 2007), resultó ser la mayoritaria entre las células aisladas de SNC en todos los grupos experimentales. Tal como esperábamos, en el grupo E-Dz sano esta población se encontró reducida en valores absolutos, y al igual que en periferia, presentaban en su superficie menores niveles de una molécula involucrada en la presentación antigénica, MHCII. Estos resultados sugieren que podría haber una menor reactivación de los linfocitos T en SNC, con la consecuente disminución en el reclutamiento de otros leucocitos inflamatorios, reducción en la inflamación y daño asociado. Observamos que la población de células CD11b/c⁺CD45^{hi} (PMN, monocitos, Mφs infiltrantes y microglía activada) se encontraba significativamente reducida en el grupo tratado que no presentó signos clínicos, y se evidenció una mayor proporción de células CD11b/c⁺CD45^{lo}, fenotipo característico de microglía residente no activada (Sedgwick y col., 1991; Bibolini y col., 2014). Luego de un análisis focalizado en evaluar los niveles de expresión de MHCII dentro de las subpoblaciones CD11b/c⁺CD45^{low} y ^{high}, demostramos que los mayores niveles de expresión de la molécula de interés estaba presente en la población CD11b/c⁺CD45^{hi}, indicando que estas serían las principales responsables de inducir una presentación antigénica cruzada a los linfocitos T en SNC, a través de la exposición en su superficie de péptidos derivados de antígenos de mielina o neuronales (Fletcher y col., 2010; Constantinescu y col., 2011).

En este trabajo también se estudiaron los linfocitos T, que han sido descriptos como los principales responsables de la ruptura de la BHE, primeros en acceder a SNC y favorecer el reclutamiento de otros leucocitos a partir de la liberación de mediadores inflamatorios (Engelhardt y col., 2006). En nuestro modelo experimental encontramos una marcada predominancia de linfocitos T respecto de los linfocitos B, y más específicamente, de la subpoblación de células T CD4⁺. Sin embargo, ambos subtipos de linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺), se encontraron reducidos en el grupo E-Dz sano. Al analizar la producción de IFN-γ o IL-17 dentro de la población T CD4⁺, observamos que las células productoras de cada una de estas citocinas se encontraron reducidas en el grupo de animales tratados sanos. Este hecho, junto con un menor número de células CD11b/c⁺CD45^{hi} y expresión reducida de MHCII, como se describió previamente, sugieren una contribución a menor inflamación, degeneración de oligodendrocitos, pérdida de mielina y daño axonal, evidenciándose como la

ausencia de signos clínicos característicos de la EAE.

Estos resultados en conjunto, sugieren que el tratamiento con Dz tiene efecto sobre algunas de las células del sistema inmune involucradas en el desarrollo de la EAE, afectando el estado de activación, presentación antigénica, y liberación de mediadores inflamatorios, entre otros. Sin embargo, no se observa un comportamiento uniforme entre los animales tratados con Dz. Parecería que el efecto resultante del tratamiento con esta benzodiazepina es "a todo o nada" respecto del desarrollo de la patología, es decir, podríamos suponer que existe un "umbral" de activación tal, que si se supera, se desencadena el curso normal de la patología, pero que en la mitad de los animales tratados con Dz no se alcanza, por lo que se observa una disminución significativa en la cantidad de células inflamatorias en SNC y la ausencia de signos clínicos característicos en nuestro modelo experimental de EAE monofásica. A diferencia de estos resultados, en un modelo experimental murino recientemente incorporado a nuestro laboratorio, inducido por la inyección de una emulsión de la proteína MOG (en lugar de mielina total) en AFC, se observó que cuando los animales fueron tratados con Dz 2 mg/kg/día, a partir del momento en que manifiestan los signos clínicos, presentaron una atenuación de los mismos, sugiriendo que en otro modelo de trabajo y diferentes condiciones de tratamiento, el efecto de esta benzodiazepina, puede ser más modulador (Falcón y col., 2014).

Hasta el momento, no podemos definir concretamente un mecanismo por el cual estaría actuando esta benzodiazepina. Sin embargo, a partir de una buena búsqueda bibliográfica, es posible proponer varios. El Dz se puede unir al TSPO en la corteza suprarrenal y aumentar la producción de glucocorticoides a partir de impulsar el primer paso, que consiste en el transporte de colesterol al interior de la mitocondria para la síntesis de pregnenolona. Los glucocorticoides son conocidos por sus efectos moduladores o supresores la respuesta inmune (Wieggers y Reul, 1998; Massoco y Palermo-Neto, 1999; Lazzarini y col., 2003; Massoco y Palermo-Neto, 2003; Bento de Lima y col., 2010). Además, dada su capacidad de atravesar la BHE, el Dz podría acceder al SNC y estimular la síntesis de neuroesteroides por parte de células de la glía (microglía principalmente) y modular la actividad de neuronas y/o leucocitos infiltrantes a través del receptor GABA_A descrito en ambas poblaciones celulares (Ferrarese y col., 1994; Papadopoulos y col., 2006; Martín-García y Pallarès, 2007). Por otro lado, esta benzodiazepina podría actuar directamente sobre las neuronas y ejercer un rol neuro-protector (Ricci y col., 2007). Por último, no podemos omitir la posibilidad de que las benzodiazepinas ejerzan su efecto directo sobre las células del

sistema inmune. En base a esta última premisa, en esta tesis se evaluó *in vitro* el efecto de Dz sobre células del sistema inmune activamente involucradas en el desarrollo de la patología como, CD4, Mφs y linfocitos.

Para establecer las concentraciones de Dz a emplear en los ensayos *in vitro*, nos basamos en dos aspectos. Por un lado, calculamos matemáticamente la concentración de Dz en sangre considerando la volemia en relación al peso de los animales, asumiendo que toda la droga inyectada es absorbida y alcanza la circulación sanguínea. Así obtuvimos un valor de concentración de Dz en sangre de 22 μM . Por otro lado, investigamos de modo bibliográfico las concentraciones de benzodiazepinas empleadas por otros grupos de investigación en ensayos *in vitro* y observamos que trabajaban en el rango de: 0,01 – 100 μM (Bessler y col., 1992; Ramsier y col., 1993; Kalashnikov y col., 2002; Wei y col., 2010). En base a esta información, decidimos evaluar el efecto de Dz *in vitro*, trabajando en el rango de concentración micromolar (μM).

Comenzamos estudiando la población de linfocitos T, estas células se activan en periferia en órganos linfáticos secundarios, como bazo y nódulos linfáticos y luego migran hacia SNC donde ejercen su acción efectora. La activación de linfocitos es un proceso complejo que involucra la inducción de la transcripción génica, la expresión de ciertos antígenos de superficie, la secreción de citocinas, la estimulación de mitosis que resulta en proliferación. Además, juega un rol clave en el inicio y desarrollo de varias enfermedades autoinmunes (Xiong y col., 2013). Resultados previamente descritos en este trabajo y en publicaciones recientes del grupo, demuestran que el tratamiento de animales con Dz durante la fase inductiva de la patología reduce la incidencia y algunos parámetros clínicos. Además, observamos una reducción en la producción de anticuerpos y en la proliferación inducida por PBM en células aisladas de ganglios poplíteos (Bibolini y col., 2011). Asimismo, resultados preliminares obtenidos empleando el modelo murino con MOG, tratamiento con Dz y sacrificados a los 35 dpi, reportan una disminución en la producción de citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ e IL-17), por parte de las células aisladas de bazo y ganglios inguinales, cuando fueron cultivadas en presencia de MOG por 72 hs.

Como hemos mencionado, el efecto de Dz durante el tratamiento de la EAE *in vivo* puede ser mediado, al menos en parte, por un efecto directo de la droga sobre los linfocitos. En la primera parte del capítulo 2 de este trabajo, estudiamos el efecto de Dz sobre células aisladas de nódulos linfáticos poplíteos de animales EAE durante la

etapa aguda de la patología, donde la población mayoritaria corresponde a linfocitos T. Evidenciamos que la incubación de las células en presencia de Dz no afecta su viabilidad, tampoco ejerce un efecto pro-apoptótico o tóxico, al menos hasta la concentración 25 μ M. La proliferación es un evento clave durante el desarrollo de la EAE. En una primera etapa de la patología, ocurre principalmente en ganglios linfáticos, donde los linfocitos son activados por las CPA. Este evento es acompañado por un incremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias y un aumento en la expresión de integrinas que permiten a los linfocitos T acceder a SNC e inducir inflamación y daño (Sospedra y col., 2005). En este contexto, evidenciamos que Dz reduce la proliferación de células T de manera dosis dependiente cuando se administra en cultivo en presencia de PBM (estímulo específico) y Con A (estímulo inespecífico). Es importante destacar que el efecto inhibitorio de Dz sobre la proliferación no es consecuencia de la conducción de las células a un estado de anergia, dado que en un ensayo simultáneo, evidenciamos que la incubación de las células en presencia de Dz, no altera la capacidad de los linfocitos de responder ante estímulos posteriores (Fig. 16). La reducción en la proliferación, a su vez, correlaciona directamente con una disminución en la producción de citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ e IL-17) en presencia de ambos estímulos. Estudios de marcación intracelular para estas citocinas, nos permitieron evidenciar que los cambios en los niveles no corresponden únicamente a un menor número de células como consecuencia de una disminución en la proliferación, sino que también se redujo el porcentaje de células T CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN- γ e IL-17 luego de la incubación en presencia de Con A y Dz, en comparación con la condición estimulada (Con A) (Tabla 2). En concordancia con estos resultados, otro grupo de investigación afirma que Dz inhibe la producción de IFN- γ de manera dosis dependiente, por parte de células mononucleares (CMN) aisladas de sangre periférica humana estimuladas con anti-CD3. El efecto inhibitorio de Dz sobre la producción de IFN- γ es similar al obtenido por la molécula Ro5-4864, un ligando selectivo de TSPO. Colectivamente, estos resultados sugieren que Dz podría suprimir la función de células T a través del receptor TSPO (Wei y col., 2010).

La molécula CD25, es un marcador de activación para linfocitos. Los niveles de esta molécula se incrementan significativamente en células T luego de la estimulación con Con A por 24 hs, pero en presencia de Dz y estímulo, ocurre una reducción únicamente en la población T CD8⁺. Este evento correlaciona con el resultado obtenido de la reacción de DTH en animales desafiados para la EAE

tratados con Dz, respecto del vehículo (Capítulo 1). A los 9-10 dpi, los animales tratados con Dz mostraron menor espesor asociado a inflamación 24 hs luego de la inyección de PBM en la oreja correspondiente. Teniendo en cuenta que las células T CD8⁺ son las principales involucradas en la respuesta de DTH en varias patologías como dermatitis por contacto, asma, entre otras enfermedades autoinmunes (Kalish y col., 1999), es posible hipotetizar que el efecto *in vivo* durante la respuesta de DTH puede ser, al menos en parte, el resultado de un efecto directo inhibitorio de Dz sobre la activación de las células T CD8⁺.

En la segunda parte del capítulo 2, nos focalizamos en evaluar el efecto directo de Dz, sobre células de la inmunidad innata involucradas activamente durante el desarrollo de la EAE. Las CD^s desempeñan un rol clave en la iniciación de la respuesta inmune adaptativa, incluyendo la polarización de células T CD4⁺ vírgenes hacia los diferentes perfiles (Th1, Th2, Th17, Treg), el desarrollo de células T citotóxicas y de memoria y la respuesta a anticuerpos (Hespel y col., 2012). CD^s fueron obtenidas *in vitro* a partir de células diferenciadas de sus pregenitores de médula ósea. Cuando éstas fueron incubadas con diferentes concentraciones de Dz, en presencia o ausencia de LPS, no se observaron cambios en la viabilidad celular. Sin embargo, se evidenció una disminución en el porcentaje de células que expresaron las moléculas MHCII y CD40 en su superficie, las cuales son importantes en el proceso de presentación antigénica y necesarias para una correcta activación de células T (Hernandez y col., 2007). Este resultado correlaciona con los datos obtenidos *in vivo* donde las células CD11b/c⁺ aisladas de nódulos linfáticos poplíteos animales del grupo E-Dz sano, presentaron menores niveles de la molécula MHCII, respecto de los animales enfermos. La incubación de las CD^s derivadas de médula ósea en presencia de Dz redujo también la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-12, IL-6 y TNF- α inducido por LPS, mientras que se incrementaron los niveles de la citocina anti-inflamatoria IL-10 a una concentración de Dz 5 μ M. En algunos experimentos complementarios realizados por nuestro grupo de investigación (Falcón y col., 2016), CD^s pre-incubadas con Dz, presentaron menor capacidad de inducir respuestas alogénicas, en ensayos realizados tanto con células aisladas de ratones como de humanos. Además, en un experimento *in vivo*, se observó que CD^s pre-incubadas con Dz, inyectadas en ratones de una cepa diferente, inducen mayores niveles de células Treg respecto de las CD^s no incubadas previamente con esta benzodiazepina. En conjunto, estos resultados nos indican que CD^s en presencia de Dz adquieren un perfil anti-inflamatorio o menos pro-inflamatorio. Especulamos con la

posibilidad que con el tratamiento *in vivo* de Dz durante el curso de la EAE, pueda ocurrir un efecto similar, resultando en una menor activación de linfocitos T hacia los perfiles Th1 y Th17 en periferia y favoreciendo la expresión y liberación de moléculas características de un perfil más tolerogénico, con la consecuente generación de células Treg. Esta podría ser una de las vías que contribuyen a la disminución de la incidencia observados en la EAE en el modelo agudo de rata y a la atenuación de los signos clínicos en el modelo de ratón.

Posteriormente nos enfocamos en el estudio de otra población de células de la inmunidad innata, los Mφs. Como ya ha sido mencionado, desempeñan una función muy importante durante las etapas de neuroinflamación, daño a neuronas y oligodendrocitos, a partir de la liberación de mediadores inflamatorios (citocinas, quimiocinas, especies reactivas) y consecuentemente durante la reparación de tejidos a partir de la fagocitosis de mielina y restos celulares en SNC. Con la idea de simplificar el modelo de estudio, trabajamos *in vitro* con Mφs obtenidos a partir de células diferenciadas de progenitores de médula ósea. Evaluamos el efecto directo de Dz sobre la expresión de moléculas involucradas en la presentación antigénica, liberación de mediadores pro- y anti-inflamatorios que participan en la respuesta inmune, así como las vías de señalización gatilladas por LPS. Los Mφs incubados en presencia de Dz y LPS, presentaron menor porcentaje de células que expresan la molécula co-estimuladora CD40 (respecto de LPS solo), sin observarse cambios en los niveles de MHCII, un resultado discrepante con lo observado *in vivo* durante la fase aguda de la EAE, en la cual la población CD11b/c⁺ aislada de SNC, caracterizada principalmente por monocitos, Mφs y microglía presentó menores niveles de MHCII en los animales tratados con Dz (Fig.16 y Fig. 30). Por otro lado, la incubación en presencia de esta benzodiazepina induce una secreción disminuida de mediadores pro-inflamatorios característicos de la activación clásica (M1) como IL-12, TNF-α e IL-6 y reduce tanto los niveles de expresión de la enzima iNOS, así como la producción de NO, comparado con la condición en la cual se incubó solo con LPS (Benoit y col., 2008). Por otro lado, se incrementaron los niveles de citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF-β en la condición Dz 25 μM, características de un perfil de activación alternativo (M2). Estos eventos observados *in vitro* a causa de la incubación de Mφs activados por LPS en presencia de Dz, nos permite especular que durante el desarrollo de la EAE, esta benzodiazepina podría estar desfavoreciendo el perfil de activación clásico involucrado en la degeneración de oligodendrocitos, daño axonal y pérdida de mielina, y favoreciendo el perfil de activación alternativo, reduciendo la inflamación y

estimulando la reparación de tejidos y, de esta forma, contribuyendo a que los animales presenten menos incidencia de la patología.

Cuando estudiamos la cascada de señalización intracelular gatillada por LPS sobre M ϕ s diferenciados de sus progenitores de médula ósea, concluimos que al menos en parte, el efecto de Dz puede ser mediado por bloqueo o inhibición de esta vía. Observamos que Dz reduce los niveles de fosforilación de las proteínas p38MAPK y ERK, activados por LPS, lo que sugiere que inhibe la activación temprana gatillada por el ligando de TLR-4, resultado que correlaciona con antecedentes previos respecto al efecto inhibitorio de Ro5-4864 en mastocitos (Yousefi y col., 2013). Sin embargo, no observamos que Dz afecte la señalización mediada por el factor de transcripción NF- κ B, a diferencia de otro trabajo donde se determinó que la incubación de células activadas con LPS en presencia de Vinpocetina (agonista de TSPO) inhibe las vías de señalización mediada por NF- κ B y AP-1 (Zhao y col., 2011).

Como parte de un trabajo realizado en nuestro grupo de investigación, se evaluó el efecto del tratamiento con Dz sobre un modelo de shock séptico, donde los M ϕ s peritoneales son la principal población celular involucrada en la respuesta inmune (Falcón y col., 2014). Se observó que animales tratados con Dz durante los días previos a la inducción, presentaban mayor sobrevida, acompañado de una reducción en los signos clínicos característicos respecto de los no tratados. Además, el tratamiento con esta benzodiazepina fue capaz de modular la activación de M ϕ s peritoneales inducida por LPS, inhibiendo la secreción de IL-6 y favoreciendo la producción de IL-10, sugiriendo que esta benzodiazepina, tiene la capacidad de modificar la forma en que estas células responden a LPS en un modelo *in vivo*, de manera similar a lo que observamos *in vitro* (Falcón y col., 2014).

A partir de los datos presentados, podemos concluir que además de sus efectos ansiolíticos y sedantes, entre otros ejercidos en el SNC, el Dz es un potente fármaco inmunosupresor. Sin embargo, su efecto no es específico de antígeno, sino que ejerce una acción supresora general sobre linfocitos y modula la respuesta inmune innata hacia un perfil anti-inflamatorio. Estudios recientes han descrito que la administración diaria de midazolam (1 mg/kg intraperitoneal) en pacientes sujetos a lesiones por quemaduras reduce significativamente la respuesta inflamatoria. Ratones sometidos a quemaduras y tratados con esta benzodiazepina presentaron menores niveles de IL-1 β , TNF- α , IL-6 y MIP-1 α (Babcock y col., 2012). Por otro lado, ciertas benzodiazepinas han sido asociadas con un incremento en la incidencia de

infecciones, aumento en el riesgo de neumonía y mortalidad por sepsis (Obiora y col., 2013). Estos resultados sugieren que nuevas investigaciones son necesarias para establecer condiciones seguras de administración de estos fármacos con la idea de evitar efectos indeseados.

En los primeros dos capítulos hemos abordado el efecto preventivo del Dz sobre el desarrollo de la EAE, así como también el efecto directo de esta benzodiazepina sobre diferentes poblaciones celulares que participan activamente durante la inducción y el desarrollo de la patología. En el tercer capítulo nos enfocamos en estudiar los posibles sitios de unión para el Dz (receptor GABA_A y TSPO) en los linfocitos T CD4⁺, una población crítica durante el desarrollo de la EAE, susceptible a la acción de esta benzodiazepina, tanto *in vivo* como *in vitro*, así como la presencia de estos receptores en tejido cerebral y células CD11b/c⁺ aisladas de SNC.

Es conocido que los linfocitos presentan un sistema GABAérgico completo, contienen la maquinaria para síntesis, almacenaje y degradación de GABA, expresan varias subunidades capaces de formar un receptor completo, se integran formando un canal funcional y son susceptibles a la acción de agonistas directos (GABA y muscimol) (Bjurstom y col., 2008; Bhat y col., 2010; Dionisio y col., 2011; Mendu y col., 2011). Sin embargo, los antecedentes respecto de la presencia de la subunidad $\gamma 2$, indispensable para la unión de benzodiazepinas, son controvertidos en linfocitos. Mientras que algunos estudios confirman la presencia de esta subunidad en células T aisladas de nódulos linfáticos de ratones (Bjurstom y col., 2008), otros autores revelan la presencia de $\gamma 2$ solo en algunas de las muestras de linfocitos obtenidas de humanos (Dionisio y col., 2011). Además, estudios recientes postulan que la incubación de células T en presencia de diferentes estímulos (progesterona, insulina, GABA), pueden regular la composición de las subunidades de los receptores, evento conocido como "plasticidad no neuronal", de modo similar a lo que ocurre en neuronas (Dionisio y col., 2013). Estudios de la subunidad $\gamma 2$ en linfocitos T CD4⁺ aislados de ganglios poplíteos de animales de los diferentes grupos experimentales, revelaron que el porcentaje de células T CD4⁺ que expresaron la subunidad $\gamma 2$ en su superficie era minoritario, (5 %) del total, sin observarse diferencias significativas entre los grupos. De manera tal que el efecto ejercido por Dz sobre los linfocitos T CD4⁺, tanto *in vivo* como *in vitro*, no estaría mediado por su interacción con el receptor GABA_A.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, evidenciaron una alteración en la modulación GABAérgica, así como una disminución en el número de receptores

GABA_A en sinaptosomas aislados de la región frontal de la corteza cerebral de animales EAE durante el curso clínico de la patología (Cid y col., 2011; Fernández Hurst y col., 2015). Adicionalmente, otros trabajos demuestran que el tratamiento de animales con drogas como barbitúricos, etanol, benzodiazepinas e Impiramina, ciertas condiciones fisiológicas como embarazo, ansiedad o patológicas como epilepsia, generan cambios en la composición de las subunidades del receptor GABA_A (plasticidad neuronal) o su disminución en las neuronas (Lyons y col., 2000; Mostallino y col., 2009; Maguire y Mody, 2009; Wabno y Hess, 2013). Estos antecedentes motivaron el estudio de la subunidad $\gamma 2$ en tejido aislado de la región frontal de la corteza cerebral de animales de los diferentes grupos experimentales con la intención de evaluar la plasticidad neuronal como consecuencia del desarrollo de la patología y tratamiento con Dz. Sin embargo, los resultados obtenidos no evidenciaron cambios en los niveles de ARNm para esta subunidad del receptor GABA_A.

En los últimos años, la presencia de receptor TSPO ha sido estudiada principalmente en células de la microglía (Casellas y col., 2002; Venneti y col., 2006). Sin embargo, algunos trabajos mencionan la presencia del mismo en monocitos, linfocitos, entre otros leucocitos (Ferrarese y col., 1994; Scarf y col., 2009). Para confirmar estos antecedentes en nuestro modelo experimental, comenzamos evaluando la presencia del receptor TSPO en linfocitos T CD4⁺ aislados de ganglios poplíteos. Estos ensayos revelaron la presencia de esta proteína en un porcentaje mayoritario de los linfocitos T CD4⁺ aislados, sin observarse diferencias en los niveles de expresión entre los grupos experimentales. Teniendo en cuenta estos resultados, y los previamente descritos para la subunidad $\gamma 2$ en linfocitos, podemos suponer que el efecto de Dz sobre las células T CD4⁺ tanto *in vivo* como *in vitro*, se encontraría mediado principalmente por el receptor TSPO. Sin embargo, aún no existen evidencias respecto de los mecanismos moleculares mediante los cuales lo lleva a cabo.

Estos resultados nos motivaron al estudio de los linfocitos T CD4⁺ infiltrantes de SNC (encefalitogénicos) con el propósito de evaluar la presencia y niveles de expresión de TSPO en esta población y comparar con los linfocitos aislados de periferia. Observamos un incremento significativo en los niveles de TSPO en los linfocitos T CD4⁺ aislados de animales del grupo E-Dz sanos, donde además, el número total de células T CD4⁺ es minoritario en SNC y producen menores niveles de citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ e IL-17). Este incremento en los niveles del receptor, podría estar relacionado con un rol protector de esta proteína sobre esta población celular. Este resultado correlaciona con un estudio previo realizado en pacientes

epilépticos tratados con drogas anticonvulsivantes (carbamazepina, fenobarbital, ácido valproico), donde se observó un aumento en los niveles de TSPO en linfocitos respecto de controles (pacientes no epilépticos) y pacientes epilépticos no tratados (Ferrarese y col., 1994). Sin embargo, sería interesante profundizar en los estudios y caracterizar los perfiles (Th1, Th2, Th17 o Treg) de estos linfocitos T CD4+, que presentan niveles incrementados de TSPO, además de ahondar en los mecanismos moleculares que podrían estar involucrados.

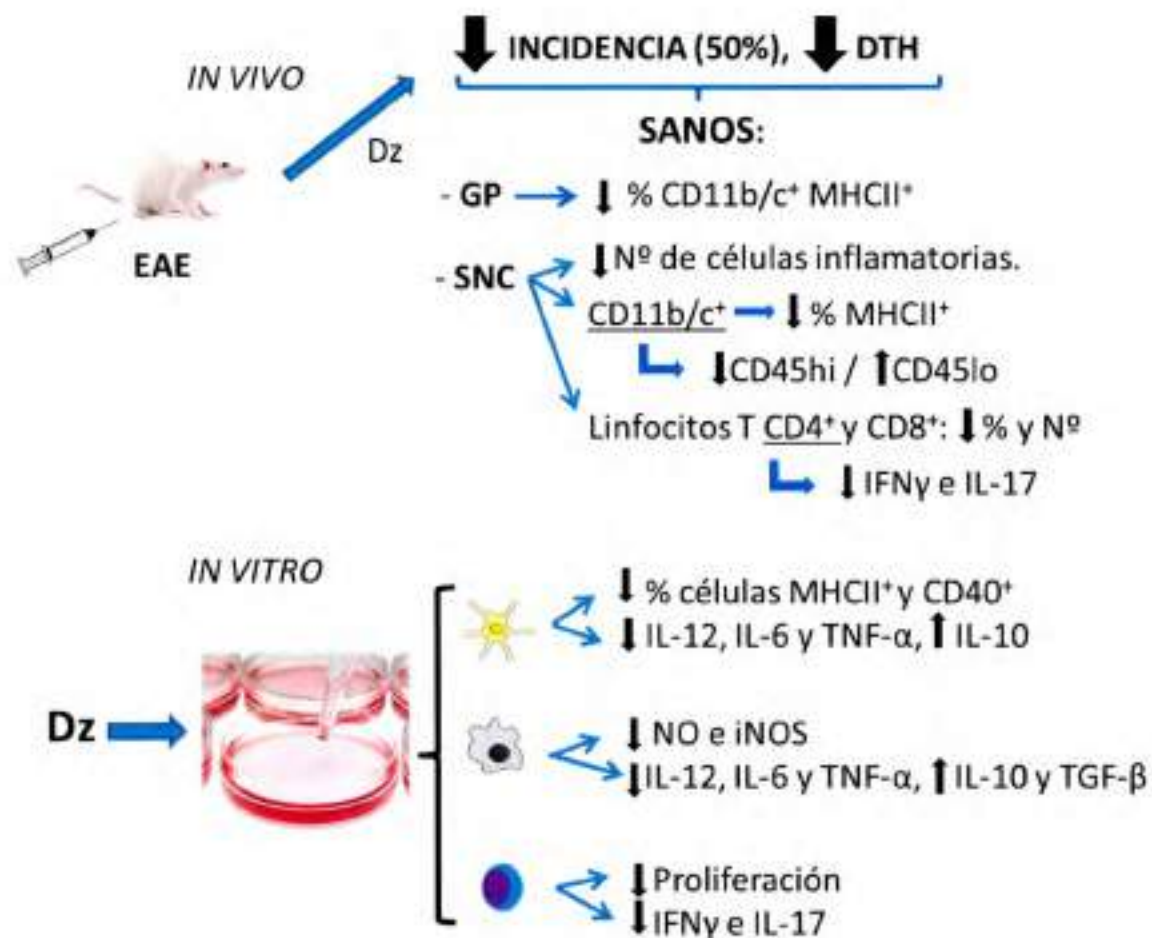
En tejido cerebral, el receptor TSPO se localiza principalmente en células de la glía (astrocitos y microglia) y sus niveles de expresión aumentan cuando las células se activan, indicando inflamación en SNC (Venneti y col., 2006; Politis y col., 2012). Nuestros resultados respecto de los niveles de transcritos para el receptor TSPO en la región frontal de la corteza cerebral, revelaron cambios interesantes en los diferentes grupos experimentales. Se observó un incremento en los niveles de ARNm de este receptor durante la fase aguda de la EAE respecto de los animales AFC, evento que podemos correlacionar con lo que ocurre en los individuos con EM y otras patologías como Alzheimer, Huntington, Parkinson, durante la etapa inflamatoria y neurodegenerativa, donde se incrementa en cerebro el número de sitios de unión para (¹¹C)-PK11195, ligando de TSPO, evidenciados por la técnica de tomografía de emisión de positrones (PET) (Politis y col., 2012). La expresión de TSPO se incrementa en la microglía en condiciones de neuroinflamación y esta proteína ha sido caracterizada como un modulador negativo de este evento. Estudios realizados con la línea celular de microglía BV-2, muestran que la sobreexpresión de TSPO reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias provocada por estimulación de la línea celular de microglía BV-2 con LPS, además aumenta la expresión de genes característicos del perfil M2 (IL-10, Arginasa1 y el receptor de manosa C tipo 1) (Rupil y col., 2011). Se sugiere que el incremento en los niveles de TSPO en microglía durante neuroinflamación, podría ser un mecanismo de respuesta adaptativa o de compensación ante el daño (Bae y col., 2014). Un mejor entendimiento de los mecanismos subyacentes al efecto inhibitorio de TSPO en neuroinflamación podría contribuir al diseño terapéutico de agonistas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas (Selvaraj y col., 2015)

Algunos trabajos exponen efectos beneficiosos resultantes del tratamiento con agonistas de TSPO en condiciones inflamatorias de SNC. Dz y Vinpocetina reducen la proliferación y producción de mediadores inflamatorios (NO, IL-6, TNF- α) en cultivos primarios de microglía y la línea celular BV-2. Además, medio condicionado obtenido

de microglía tratada con estos agonistas en presencia de LPS, protege a neuronas primarias de la muerte respecto de la condición LPS solo (Wilms y col., 2003; Zhao y col., 2012). Por otro lado, el tratamiento con Ro5-4864 induce mejoras marcadas en la memoria y disminución de comportamiento ansioso, entre otras mejoras funcionales en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer (Barron y col., 2013).

En este trabajo observamos que los animales del grupo E-Dz sanos, presentan una tendencia a expresar menores niveles de transcritos para TSPO respecto del tejido cerebral aislado de animales EAE enfermos, lo que nos induce a pensar que en este grupo, el efecto protector ejercido por el Dz durante el desarrollo de la patología en cuanto a menor infiltración de linfocitos T encefalitogénicos y Mφs en SNC, se traduciría en menor inflamación y daño celular asociado y por ende, en menores niveles de TSPO en tejido aislado de la región frontal de corteza cerebral. Según datos bibliográficos, los resultados obtenidos de ARNm codificante para TSPO en la corteza cerebral, indican que la microglía sería la principal contribuyente (Casellas y col., 2002; Venneti y col., 2006.). En este sentido, análisis preliminares realizados sobre la población CD11b/c⁺, constituida principalmente por microglía y Mφs infiltrantes aislados de SNC total, indican que en los animales del grupo E-Dz sanos esta población presentó una tendencia a expresar menores niveles de la proteína TSPO respecto de los animales enfermos tratados con Dz o no. Estos resultados correlacionan con los de ARNm obtenido de la región frontal de tejido cerebral, por lo que podemos postular que serían las células de la microglía activada y Mφs infiltrantes (incrementados en animales EAE enfermos, como se demostró en el capítulo 1), los principales contribuyentes al aumento en los niveles de TSPO en SNC; sin embargo, sería apropiado realizar un análisis más detallado evaluando los niveles de TSPO dentro de las poblaciones CD11b/c⁺CD45 "high" (microglía activada y Mφs infiltrantes) y "Low" (microglía no activada), para confirmar dicha hipótesis.

Resumen gráfico



Conclusiones y perspectivas:

En este trabajo, describimos el efecto inmunosupresor de Dz sobre el desarrollo de la EAE, caracterizamos el efecto de esta benzodiazepina sobre células de la inmunidad innata y adaptativa involucradas en el desarrollo de la patología e identificamos en linfocitos T CD4⁺, el receptor de Dz que estaría mediando los efectos inmunoregulatorios en esta población. Además presentamos algunos resultados preliminares, respecto del receptor TSPO como marcador de neuroinflamación en nuestro modelo experimental y las células que serían responsables de su expresión, cuyo estudio será profundizado.

Futuros ensayos deberán enfocarse en interpretar los mecanismos moleculares que conducen al incremento en la expresión de TSPO y al entendimiento de sus

efectos inmunomoduladores, así como al diseño de agonistas específicos que actúen directamente sobre TSPO y no ejerzan efectos adversos o indeseados sobre el receptor GABA_A.

TSPO es una proteína ampliamente descrita en células de la microglia como un marcador de neuroinflamación. Sin embargo, debido a su presencia en la mayoría de las células del organismo, es posible especular sobre la posibilidad de que esta proteína también pueda ser empleada como marcador de activación celular, daño e inflamación en tejidos periféricos. Al respecto, se ha reportado que los niveles de expresión de TSPO en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) pueden emplearse como un factor de pronóstico molecular de la progresión de la patología para individuos sometidos a diversos tratamientos. Además, esta proteína fue propuesta como un blanco prometedor para el diseño de agentes terapéuticos (De Rosa y col., 2015)

En base a los resultados presentados en esta tesis y a lo antes mencionado, proponemos que el nivel de expresión de TSPO en leucocitos aislados de sangre periférica, podría utilizarse como marcador de daño o inflamación y posiblemente como indicador de la progresión de enfermedad en patologías autoinmunes como artritis reumatoidea, Lupus Eritematoso Sistémico, Diabetes Mellitus o celiacía.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS REALIZADAS DURANTE ESTA TESIS

DIAZEPAM INHIBITS PROLIFERATION OF LYMPH NODE CELLS ISOLATED FROM RATS WITH EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS. **Nicolás Fernández Hurst**, Mario J. Bibolini, German A. Roth. *Neuroimmunomodulation* (2015) 22 (5): 293-302 (ISSN 1021-7401).

INVOLVEMENT OF THE GABAERGIC SYSTEM IN THE MODULATION OF GLUTAMATE RELEASE IN FRONTAL CORTEX SYNAPTOSOMES OF RATS WITH EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS. **Nicolás Fernández Hurst**, Natalí L. Chanaday, German A. Roth. *Inflammation & Allergy – Drug Targets* (2015) 14 (2): 105-110 (ISSN 1871-5281).

INHIBITORY EFFECT OF DIAZEPAM ON INNATE INFLAMMATORY RESPONSES. Cristian R. Falcón*, **Nicolás Fernández Hurst***, Clara G. Monferran, Laura Cervi, German A. Roth. (En preparación). * (Ambos autores contribuyeron igualmente a este trabajo)



Referencias

Abbas AK and Lichtman AH, *Inmunología celular y molecular*. 5 ed. 2005, Madrid, España: Saunders/Elsevier.

Ahn CB, Jung WK, Park SJ, Kim YT, Kim WS, Je JY, *Gallic Acid-g-Chitosan Modulates Inflammatory Responses in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells Via NF-kappaB, AP-1, and MAPK Pathways*. *Inflammation*, 2016. **39**(1): p. 366-74.

Askew D, Chu RS, Krieg AM, Harding CV, *CpG DNA Induces Maturation of Dendritic Cells with Distinct Effects on Nascent and Recycling MHC-II Antigen-Processing Mechanisms*. *The Journal of Immunology*, 2000. **165**(12): p. 6889-6895.

Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G, *Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10*. *J Immunol*, 1998. **160**(12): p. 5936-44.

Babcock GF, Hernandez L, Yadav E, Schwemberger S, Dugan A, *The burn wound inflammatory response is influenced by midazolam*. *Inflammation*, 2012. **35**(1): p. 259-70.

Bachstetter AD, Rowe RK, Kaneko M, Goulding D, Lifshitz J, Van Eldik LJ, *The p38alpha MAPK regulates microglial responsiveness to diffuse traumatic brain injury*. *J Neurosci*, 2013. **33**(14): p. 6143-53.

Bae KR, Shim HJ, Balu D, Kim SR, Yu SW, *Translocator protein 18 kDa negatively regulates inflammation in microglia*. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2014. **9**(3): p. 424-37.

Barron AM, Garcia-Segura LM, Caruso D, Jayaraman A, Lee JW, Melcangi RC, Pike CJ, *Ligand for translocator protein reverses pathology in a mouse model of Alzheimer's disease*. *J Neurosci*, 2013. **33**(20): p. 8891-7.

Batoulis H, Addicks K, Kuerten S, *Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/T(H)1 paradigm*. *Ann Anat*, 2010. **192**(4): p. 179-93.

Battaglia M, Gianfrani C, Gregori S, Roncarolo MG, *IL-10-producing T regulatory type 1 cells and oral tolerance* *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1029**: p.142-53.

Benoit M, Barbarat B, Bernard A, Olive D, Mege JL, *Coxiella burnetii, the agent of Q fever, stimulates an atypical M2 activation program in human macrophages*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(4): p. 1065-70.

Bento de Lima, CB, Sakai M, Latorre AO, Moreau RL, Palermo-Neto J, *Effects of different doses and schedules of diazepam treatment on lymphocyte parameters in rats*. *Int Immunopharmacol*, 2010. **10**(11): p. 1335-43.

Bessler H, Weizman R, Gavish M, Notti I and Djaldetti M, *Immunomodulatory effect of peripheral benzodiazepine receptor ligands on human mononuclear cells* *J Neuroimmunol*, 1992. **38**: p. 19-26.

Bettelli, E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK, *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 235-8.

Bhat R, Axtell R, Mitra A, Miranda M, Lock C, Tsien RW, Steinman L, *Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(6): p. 2580-5.

Bibolini MJ, Chanaday NL, Baez NS, Degano AL, Monferran CG, Roth GA, *Inhibitory role of diazepam on autoimmune inflammation in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Neuroscience*, 2011. **199**: p. 421-8.

Bibolini MJ, Scerbo MJ, Peinetti N, Roth GA, Monferran CG, *Treatment with a hybrid between the synapsin ABC domains and the B subunit of E. coli heat-labile toxin reduces frequency of proinflammatory cells and cytokines in the central nervous system of rats with*

Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W, *Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation*, Brain, 2000. **123**(6): p.1174-83

Bjurstom H, Wang J, Ericsson I, Bengtsson M, Liu Y, Kumar-Mendu S, Issazadeh-Navikas S, Birnir B, *GABA, a natural immunomodulator of T lymphocytes*. J Neuroimmunol, 2008. **205**(1-2): p. 44-50.

Borboni P, Porzio O, Fusco A, Sesti G, Lauro R, Marlier LN, *Molecular and cellular characterization of the GABAA receptor in the rat pancreas*. Mol Cell Endocrinol, 1994. **103**(1-2): p. 157-63.

Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ, *International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(2): p. 247-64.

Brisslert M, Bokarewa M, Larsson P, Wing K, Collins LV, Tarkowski A, *Phenotypic and functional characterization of human CD25+ B cells*. Immunology, 2006. **117**(4): p. 548-57.

Calabrese M, Rinaldi, F, Grossi P, Mattisi I, Bernardi V, Favaretto A, Perini P, Gallo P, *Basal ganglia and frontal/parietal cortical atrophy is associated with fatigue in relapsing-remitting multiple sclerosis*. Mult Scler, 2010. **16**(10): p. 1220-8.

Caillier SJ, Briggs F, Cree BA, Baranzini SE, Fernandez-Vina M, Ramsay PP, et al., *Uncoupling the roles of HLA-DRB1 and HLA-DRB5 genes in multiple sclerosis*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5473-80.

Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK, Bitsch A, et al., *Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation*. Brain, 2000. **123** (Pt 6): p. 1174-83.

Casellas P, Gallegue S, Basile AS, *Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function*. Neurochem Int, 2002. **40**(6): p. 475-86.

Cerezo Garcia M, Plasencia MP, Benito AY., *Alteration profile of executive functions in multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand, 2015. **131**(5): p. 313-20.

Chanaday NL, de Bem AF, GA Roth, *Effect of diphenyl diselenide on the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Neurochem Int, 2011. **59**(8): p. 1155-62.

Chanaday NL, Vilcaes AA, de Paul AL, Torres AI, Degano AL, Roth GA, *Glutamate release machinery is altered in the frontal cortex of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis*. Mol Neurobiol, 2015. **51**(3): p. 1353-67.

Chandran S, Hunt D, Joannides A, Zhao C, Compston A, Franklin RJ, *Myelin repair: the role of stem and precursor cells in multiple sclerosis*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2008. **363**(1489): p. 171-83.

Chen SJ, Wang YL, Fan HC, Lo WT, Wang CC, Sytwu HK, *Current status of the immunomodulation and immunomediated therapeutic strategies for multiple sclerosis*. Clin Dev Immunol, 2012.

Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK, *Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed*. J Neuroinflammation, 2014. **11**: p. 1-15

Cid MP, Vilcaes AA, Rupil LL, Salvatierra NA, Roth GA, *Participation of the GABAergic system on the glutamate release of frontal cortex synaptosomes from Wistar rats with experimental autoimmune encephalomyelitis*. Neuroscience, 2011. **189**: p. 337-44.

- Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B, *Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)*. Br J Pharmacol, 2011. **164**(4): p. 1079-106.
- Constantinescu R and Zetterberg H, *Urate as a marker of development and progression in Parkinson's disease*. Drugs Today (Barc), 2011. **47**(5): p. 369-80.
- Cox AL, Thompson SA, Jones JL, Robertson VH, Hale G, Waldmann H, Compston DA., Coles AJ, *Lymphocyte homeostasis following therapeutic lymphocyte depletion in multiple sclerosis*. Eur J Immunol, 2005. **35**(11): p. 3332-42.
- Daugherty DJ, Selvaraj V, Chechneva OV, Liu X B, Pleasure DE, Deng W, *A TSPO ligand is protective in a mouse model of multiple sclerosis*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(6): p. 891-903.
- De Rosa AD, Zappavigna S, Villa MR, Improta S, Cesario E, Mastrullo L, Caraglia M, Stiuso P, *Prognostic role of translocator protein and oxidative stress markers in chronic lymphocytic leukemia patients treated with bendamustine plus rituximab*. Oncol Lett, 2015. **9**(3): p. 1327-1332.
- Demakova EV, Korobov VP, Lemkina LM, *Determination of gamma-aminobutyric acid concentration and activity of glutamate decarboxylase in blood serum of patients with multiple sclerosis*. Klin Lab Diagn, 2003(4): p. 15-7.
- Dionisio L, De Rosa MJ, Bouzat C, Esandi Mdel C, *An intrinsic GABAergic system in human lymphocytes*. Neuropharmacology, 2011. **60**(2-3): p. 513-9.
- Dobryakova E, De Luca J, Genova HM, Wylie GR, *Neural correlates of cognitive fatigue: cortico-striatal circuitry and effort-reward imbalance*. J Int Neuropsychol Soc, 2013. **19**(8): p. 849-53.
- Dionisio L, Arias V, Bouzat C, Esandi Mdel C, *GABAA receptor plasticity in Jurkat T cells*. Biochimie, 2013. **95**(12): p. 2376-84.
- Dulgerian LR, Garrido VV, Stempin CC, Cerban FM, *Programmed death ligand 2 regulates arginase induction and modifies Trypanosoma cruzi survival in macrophages during murine experimental infection*. Immunology, 2011. **133**(1): p. 29-40.
- Dutta R and Trapp BD, *Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis*. Prog Neurobiol, 2011. **93**(1): p. 1-12.
- Engelhardt B, *Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier*. J Neural Transm (Vienna), 2006. **113**(4): p. 477-85.
- Falcon CR, Carranza FA, Aoki P, Motran CC, Cervi L, *Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with Fasciola hepatica antigens and lipopolysaccharides confers protection against fasciolosis in mice*. J Infect Dis, 2012. **205**(3): p. 506-14.
- Falcón CR, Monferran CG, Cervi LC, Roth GA, *Diazepam inhibits acute innate and ongoing adaptive inflammatory responses*. Medicina (2014) **74** (Supl. III): 287
- Fernández Hurst N, Chanaday NL, Roth GA, *GABAergic Agonists Modulate the Glutamate Release from Frontal Cortex Synaptosomes of Rats with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. Inflammation & Allergy - Drug Targets, 2015. **14**(2): p. 105-10.
- Ferrarese C, Marzorati C, Peregó M, Bianchi G, Cavarretta R, Pierpaoli C, Moretti C, Frattola L, *Effect of Anticonvulsant Drugs on Peripheral Benzodiazepine Receptors of Human Lymphocytes*. Neuropharmacology, 1994. **34**(4): p. 427-431.
- Filippi M, Valsasina P, Rocca MA, *Magnetic Resonance Imaging of Grey Matter Damage in People with MS*. The International MS Journal, 2007. **14**: p. 12-21.



- Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH, *T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*. Clin Exp Immunol, 2010. **162**(1): p. 1-11.
- Friese MA and Fugger L, *Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2009. **66**(2): p. 132-41.
- Fux M, van Rooijen N, Owens T, *Macrophage-independent T cell infiltration to the site of injury-induced brain inflammation*. J Neuroimmunol, 2008. **203**(1): p. 64-72.
- Gelfand JM, *Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation*. Handb Clin Neurol, 2014. **122**: p. 269-90.
- Ghaffarinia A, Jalil C, Riazi-Rad F, Yaslianifard S, *Immunomodulatory Effect of Chymotrypsin in CNS Is Sex-independent: Evidence of Anti-inflammatory Role for IL-17 in EAE*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2016. **15**(2): p. 145-155.
- Gi M, Im W, Hong S, *Dendritic cells as danger-recognizing biosensors*. Sensors (Basel), 2009. **9**(9): p. 6730-51.
- Giovannoni G, *Cerebrospinal fluid analysis*, Handb Clin Neurol, 2014. **122**: p.681-702
- Gladkevich A, Korf J, Hakobyan VP, Melkonyan KV, *The peripheral GABAergic system as a target in endocrine disorders*. Auton Neurosci, 2006. **124**(1-2): p. 1-8.
- Goodin DS, *The epidemiology of multiple sclerosis: insights to disease pathogenesis*. Handb Clin Neurol, 2014. **122**: p. 231-66.
- Gordon S and Martinez FO, *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 593-604.
- Goverman J, *Tolerance and autoimmunity in TCR transgenic mice specific for myelin basic protein*. Immunol Rev, 1999. **169**: p. 147-59.
- Grassiot B, Desgranges B, Eustache F, Defer G, *Quantification and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis: a review*. J Neurol, 2009. **256**(9): p. 1397-412.
- Grech LB, Kiroopoulos LA, Kirby KM, Butler E, Paine M, Hester R, *The effect of executive function on stress, depression, anxiety, and quality of life in multiple sclerosis*. J Clin Exp Neuropsychol, 2015. **37**(5): p. 549-62.
- Grewal IS and Flavell RA, *The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation*. Immunol Rev, 1996. **153**: p. 85-106.
- Guasconi L, Serradell MC, Masih DT, *Fasciola hepatica products induce apoptosis of peritoneal macrophages*. Vet Immunol Immunopathol, 2012. **148**(3-4): p. 359-63.
- Gut P, Zweckstetter M, Banati RB., *Lost in translocation: the functions of the 18-kD translocator protein*. Trends Endocrinol Metab, 2015. **26**(7): p. 349-56.
- Haas J, Fritzsching B, Trubswetter P, Korporal M, Milkova L, Fritz B, Vobis D, Krammer PH, Suri-Payer E, Wildemann B, *Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 1322-30.
- Haley JE, Samuels FG, and Ledeen R, *Study of myelin purity in relation to axonal contaminants*. Cell Mol Neurobiol, 1981. **1**(2): p. 175-87.
- Harms AS, Cao S, Rowse AL, Thome AD, Li X, Mangieri LR, Cron RQ, Shacka JJ., Raman C, Standaert DG, *MHCII is required for alpha-synuclein-induced activation of microglia, CD4 T cell proliferation, and dopaminergic neurodegeneration*. J Neurosci, 2013. **33**(23): p. 9592-600.



Hatty CR and Banati RB, *Protein-ligand and membrane-ligand interactions in pharmacology: the case of the translocator protein (TSPO)*. Pharmacol Res, 2015. **100**: p. 58-63.

Hauser SL and Oksenberg JR, *The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 61-76.

Henschel O, Gipson KE, Bordey A, *GABAA receptors, anesthetics and anticonvulsants in brain development*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2008. **7**(2): p. 211-24.

Hernandez MG, Shen L, Rock KL, *CD40-CD40 ligand interaction between dendritic cells and CD8+ T cells is needed to stimulate maximal T cell responses in the absence of CD4+ T cell help*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2844-52.

Hespeel C and Moser M, *Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity*. Eur J Immunol, 2012. **42**(10): p. 2535-43.

Hevers W and Luddens H, *The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes*. Mol Neurobiol, 1998. **18**(1): p. 35-86.

Hisahara Shoji S, Okano H, Miura M, *ICE/CED-3 family executes oligodendrocyte apoptosis by tumor necrosis factor*. J Neurochem, 1997. **69**(1): p. 10-20.

Hori S and S Sakaguchi, *Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells*. Microbes Infect, 2004. **6**(8): p. 745-51.

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS., Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM, *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages*. Science, 1993. **260**(5107): p. 547-9.

Huemer HP, Lassnig C, Nowotny N, Irschick EU, Kitchen M, Pavlic M, *Diazepam leads to enhanced severity of orthopoxvirus infection and immune suppression*. Vaccine, 2010. **28**(38): p. 6152-8.

Ivanov II, Zhou L, Littman DR, *Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation*. Semin Immunol, 2007. **19**(6): p. 409-17.

Jadidi-Niaragh F and Mirshafiey A, *Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis*. Scand J Immunol, 2011. **74**(1): p. 1-13.

Jager A and VK Kuchroo, *Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation*. Scand J Immunol, 2010. **72**(3): p. 173-84.

Jin XT, Galvan A, Wichmann T, Smith Y, *Localization and function of GABA transporters GAT-1 and GAT-3 in the basal ganglia*. Front Syst Neurosci, 2011. **5**(63): p. 1-10.

Joo HK, Lee YR, Lim SY, Lee EJ, Choi S, Cho EJ, Park MS, Ryoo S, Park JB, Jeon BH, *Peripheral benzodiazepine receptor regulates vascular endothelial activations via suppression of the voltage-dependent anion channel-1*. FEBS Lett, 2012. **586**(9): p. 1349-55.

Kakalacheva K, Munz C and Lunemann JD, *Viral triggers of multiple sclerosis*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(2): p. 132-40.

Kalish RS and Askenase PW, *Molecular mechanisms of CD8+ T cell-mediated delayed hypersensitivity: implications for allergies, asthma, and autoimmunity*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(2 Pt 1): p. 192-9.

Kalashnikov SV, Kalashnikova EA and Kokarovtseva SN, *Immunomodulating effects of tofizopam (Grandaxin) and diazepam in vitro*. Mediators Inflamm., 2002. **11**(1): p. 53-59.

Karni A, Abraham M, Monsonogo A, Cai G, Freeman GJ, Hafler D, Khoury SJ, Weiner HL, *Innate immunity in multiple sclerosis: myeloid dendritic cells in secondary progressive multiple sclerosis are activated and drive a proinflammatory immune response.* J Immunol, 2006. **177**(6): p. 4196-202.

Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A, *Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation.* Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1173-5.

Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E, *Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties.* Semin Immunol, 2007. **19**(6): p. 362-71.

Lacapère JJ and Papadopoulos V, *Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis.* Steroids, 2003. **68**(7-8): p. 569-585.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD., McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ, *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation.* J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.

Lassmann H, *Hypoxia-like tissue injury as a component of multiple sclerosis lesions.* J Neurol Sci, 2003. **206**(2): p. 187-91.

Lee M, *Neurotransmitters and microglial-mediated neuroinflammation.* Curr Protein Pept Sci, 2013. **14**(1): p. 21-32.

Levite M., *Neurotransmitters and Neuropeptides in the Immune System.* Nerve-Driven Immunity, 2012 **5**: p. 163-172.

Libbey JE y Fujinami RS, *Experimental autoimmune encephalomyelitis as a testing paradigm for adjuvants and vaccines.* Vaccine, 2011. **29**(17): p. 3356-62

Liu JS, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC, *Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions.* Am J Pathol, 2001. **158**(6): p. 2057-66.

Livak KJ and Schmittgen TD, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, et al., *Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis.* Nat Med, 2002. **8**(5): p. 500-8.

Ludwin SK, *The pathogenesis of multiple sclerosis: relating human pathology to experimental studies.* J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(4): p. 305-18.

Lutton JD, Winston R, Rodman TC, *Multiple sclerosis: etiological mechanisms and future directions.* Exp Biol Med (Maywood), 2004. **229**(1): p. 12-20.

Lv S, Song HL, Zhou Y, Li LX, Cui W, Wang W, Liu P, *Tumour necrosis factor-alpha affects blood-brain barrier permeability and tight junction-associated occludin in acute liver failure.* Liver Int, 2010. **30**(8): p. 1198-210.

Lyons HR, Gibbs TT, Farb DH, *Turnover and down-regulation of GABA(A) receptor alpha1, beta2S, and gamma1 subunit mRNAs by neurons in culture.* J Neurochem, 2000. **74**(3): p. 1041-8.

Maguire J and Mody I, *Steroid hormone fluctuations and GABA(A)R plasticity.* Psychoneuroendocrinology, 2009. **34** Suppl 1: p. S84-90.



Maimone D, Guazzi GC, Annunziata P, *IL-6 detection in multiple sclerosis brain*. J Neurol Sci, 1997. **146**(1): p. 59-65.

Mandrekar and Ambade, *Cellular Signaling Pathways in Alcoholic Liver Disease*. Trends in Alcoholic Liver Disease Research – Clinical and Scientific Aspects, 2012: p 92-112

Martin-Garcia E, Darbra S, Pallarès M, *Implicación de los neuroesteroides en la conducta normal y patológica*. Revisión en Neurociencia, 2007. **44**(11): p. 661-676.

Martinez FO and Gordon S, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. F1000Prime Rep, 2014, **6**(13)

Massoco CO and Palermo-Neto J, *Diazepam effects of peritoneal macrophage activity and corticosterone serum levels in Balb/C mice*. Life Sci., 1999. **65**(20): p. 2157-2165.

Massoco CO and Palermo-Neto J, *Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2003. **95**(1-2): p. 11-19.

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

Melcon MO, Melcon CM, Bartoloni L, Cristiano E, Duran JC, Grzesiuk AK, et al., *Towards establishing MS prevalence in Latin America and the Caribbean*. Mult Scler, 2013. **19**(2): p. 145-52.

Mendu SK, Akesson L, Jin Z, Edlund A, Cilio C, Lernmark A, Bimir B, *Increased GABA(A) channel subunits expression in CD8(+) but not in CD4(+) T cells in BB rats developing diabetes compared to their congenic littermates*. Mol Immunol, 2011. **48**(4): p. 399-407.

Mendu SK, Bhandage A, Jin Z, Bimir B, *Different subtypes of GABA-A receptors are expressed in human, mouse and rat T lymphocytes*. PLoS One, 2012. **7**(8) p. 1-11.

Midzak A, Rone M, Aghazadeh Y, Culty M, Papadopoulos V, *Mitochondrial protein import and the genesis of steroidogenic mitochondria*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **336**(1-2): p. 70-9.

Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O, *Clinically isolated syndromes*, Lancet Neurol, 2012. **11**(2): p.157-69

Miller SD, McMahon EJ, Schreiner B, Bailey SL, *Antigen presentation in the CNS by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1103**: p. 179-91.

Momcilovic M, Miljkovic Z, Popadic D, Miljkovic D, Mostarica-Stojkovic M, *Kinetics of IFN-gamma and IL-17 expression and production in active experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats*. Neurosci Lett, 2008. **447**(2-3): p. 148-52.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A, *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.

Mortensen M, Patel B, Smart TG, *GABA Potency at GABA(A) Receptors Found in Synaptic and Extrasynaptic Zones*. Front Cell Neurosci, 2012. **6**: p. 1-10

Mostallino MC, Sanna E, Concas A, Biggio G, Follesa P, *Plasticity and function of extrasynaptic GABA(A) receptors during pregnancy and after delivery*. Psychoneuroendocrinology, 2009. **34** Suppl 1: p. S74-83.

Nave KA y Trapp BD, *Axon-glia signaling and the glial support of axon function*. Annu. Rev. Neurosci., 2008. **31**: p. 535-61

Navikas V and Link H, *Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis*. J Neurosci Res, 1996. **45**(4): p. 322-33.

Niu X, Wang Y, Li W, Zhang H, Wang X, Mu Q, He Z, Yao H., *Esculin exhibited anti-inflammatory activities in vivo and regulated TNF-alpha and IL-6 production in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages in vitro through MAPK pathway*. Int Immunopharmacol, 2015. **29**(2): p. 779-86.

Nuss P, *Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation*. Neuropsychiatr Dis Treat, 2015. **11**: p. 165-75.

Obiora E, Hubbard R, Sanders RD, Myles PR, *The impact of benzodiazepines on occurrence of pneumonia and mortality from pneumonia: a nested case-control and survival analysis in a population-based cohort*. Thorax, 2013. **68**(2): p. 163-170.

O'Gorman C, Lucas R, Taylor B, *Environmental risk factors for multiple sclerosis: a review with a focus on molecular mechanisms*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(9): p. 11718-52.

Olsen RW and Sieghart W, *International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update*. Pharmacol Rev, 2008. **60**(3): p. 243-60.

Olsen RW and Sieghart W, *GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology*. Neuropharmacology, 2009. **56**(1): p. 141-8.

Olsson T, Zhi WW, Hojeberg B, Kostulas V, Jiang YP, Anderson G, Ekre HP, Link H, *Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma*. J Clin Invest, 1990. **86**(3): p. 981-5.

Oresic M, Simell S, Sysi-Aho M, Nanto-Salonen K, Seppanen-Laakso T, Parikka V, Katajamaa M, et al., *Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes*. J Exp Med, 2008. **205**(13): p. 2975-84.

Pampliega O, Domercq M, Soria FN, Villoslada P, Rodriguez-Antiguedad A and Matute C, *Increased expression of cystine/glutamate antiporter in multiple sclerosis*. J Neuroinflammation, 2011. **8**(63): p. 1-12.

Papadopoulos V, Baraldi M, Guillarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR and Gavish M, *Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(8): p. 402-9.

Peters A, Lee Y, Kuchroo VK, *The many faces of Th17 cells*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(6): p. 702-6.

Politis M, Su P and Piccini P, *Imaging of microglia in patients with neurodegenerative disorders*. Front Pharmacol, 2012. **3**(96): p. 1-10.

Portou MJ, Baker D, Abraham D, Tsui J, *The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review*. Vascul Pharmacol, 2015. **12**(21): p. 1-10

Qi X, Xu J, Wang, F and Xiao J, *Translocator protein (18 kDa): a promising therapeutic target and diagnostic tool for cardiovascular diseases*. Oxid Med Cell Longev, 2012.

Ramseier H, Lichtensteiger W, Schlumpf M, *In vitro inhibition of cellular immune responses by benzodiazepines and PK 11195. Effects on mitogen- and alloantigen-driven lymphocyte proliferation and on IL-1, IL-2 synthesis and IL-2 receptor expression*. Immunopharmacol. and Immunotoxicol., 1993. **15**(5): p. 557-582.



Ricci L, Valoti M, Sgaragli G, Frosini M, *Neuroprotection afforded by diazepam against oxygen/glucose deprivation-induced injury in rat cortical brain slices*. Eur J Pharmacol, 2007. **561**(1-3): p. 80-4.

Riss J, Cloyd J, Gates J, Collins S, *Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics*. Acta Neurol Scand, 2008. **118**(2): p. 69-86.

Rudolph U, Crestani F, Mohler H, *GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions*. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(4): p. 188-94.

Rupil LL, de Bem AF, Roth GA, *Diphenyl diselenide-modulation of macrophage activation: down-regulation of classical and alternative activation markers*. Innate Immun, 2012. **18**(4): p. 627-37.

Samoilova EB, Horton JL, Hilliard B, Liu TS, Chen Y, *IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6480-6.

Scarf LMI, Ittner LM and Kassiou M, *The Translocator Protein (18 kDa): Central Nervous System Disease and Drug Design*. Journal of medical Chemical 2009. **52**(3): p. 581-92.

Schmittgen TD and Livak KJ, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.

Schwartz M and Kipnis J, *A conceptual revolution in the relationships between the brain and immunity*. Brain Behav Immun, 2011. **25**(5): p. 817-9.

Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dorries R, Butcher GW, ter Meulen V, *Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(16): p. 7438-42.

Selvaraj V and Stocco DM, *The changing landscape in translocator protein (TSPO) function*. Trends Endocrinol Metab, 2015. **26**(7): p. 341-8.

Serrano Hernandez A, *Helper (TH1, TH2, TH17) and regulatory cells (Treg, TH3, NKT) in rheumatoid arthritis*. Reumatol Clin, 2009. **5 Suppl 1**: p. 1-5.

Simmons SB, Pierson ER., Lee SY and Goverman JM, *Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals*. Trends Immunol, 2013. **34**(8): p. 410-22.

Soltani, N, Qiu H, Aleksic M, Glinka Y, Zhao F, Liu R, et al., *GABA exerts protective and regenerative effects on islet beta cells and reverses diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(28): p. 11692-7.

Sospedra M and Martin R, *Immunology of multiple sclerosis*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 683-747.

Stromnes IM and JM Goverman, *Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis*. Nat Protoc, 2006. **1**(4): p. 1952-60.

Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM, *Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 337-42.

Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ, *Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(3): p. 352-70.

Thompson SA, Jones JL, Robertson VH, Hale G, Waldmann H, Compston DA, Coles AJ Libbey JE and Fujinami RS, *Potential triggers of MS*. Results Probl Cell Differ, 2010. **51**: p. 21-42.

Tian J, Lu Y, Zhang H, Chau CH, Dang HN, Kaufman DL, *Gamma-aminobutyric acid inhibits T cell autoimmunity and the development of inflammatory responses in a mouse type 1 diabetes model.* J Immunol, 2004. **173**(8): p. 5298-304.

Tierney JB, Kharkrang M, La Flamme AC, *Type II-activated macrophages suppress the development of experimental autoimmune encephalomyelitis.* Immunol Cell Biol, 2009. **87**(3): p. 235-40.

Trapp BD and Nave KA, *Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?* Annu Rev Neurosci, 2008. **31**: p. 247-69.

Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L, *Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis.* Am J Pathol, 2008. **172**(1): p. 146-55.

Vartanian T, Li Y, Zhao M, Stefansson K, *Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis.* Mol Med, 1995. **1**(7): p. 732-43.

Valentin-Torres A, Savarin C, Hinton DR, Phares TW, Bergmann CC and Stohlman SA, *Sustained TNF production by central nervous system infiltrating macrophages promotes progressive autoimmune encephalomyelitis.* J Neuroinflammation, 2016. **13**: p. 46.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingsperger C, *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.* J Immunol Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA, *Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis.* J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 971-9.

Vilcaes AA, Furlan G, Roth GA, *Inhibition of Ca²⁺-dependent glutamate release from cerebral cortex synaptosomes of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis.* Journal of Neurochem., 2009. **108**(4): p. 881-890.

Vogel DY, Vereyken EJ, Glim JE., Heijnen PD, Moeton M, van der Valk P, Amor S, Teunissen CE, van Horssen J and Dijkstra CD, *Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status.* J Neuroinflammation, 2013. **10**(35): p. 1-12.

Venneti S, Lopresti BJ, Wiley CA, *The peripheral benzodiazepine receptor in microglia: from pathology to imaging.* Prog Neurobiol, 2006. **80**(6): p. 308-322.

Volpe E., Battistini L. and Borsellino G., *Advances in T Helper 17 cell biology: pathogenic role and potential therapy in multiple sclerosis.* Mediators Inflamm, 2015. P.1-11.

Wabno J and Hess G, *Repeated administration of imipramine modifies GABAergic transmission in rat frontal cortex.* J Neural Transm (Vienna), 2013. **120**(5): p. 711-9.

Wang, Y, Feng D, Liu G, Luo Q, Xu Y, Lin S, Fei J, Xu L, *Gamma-aminobutyric acid transporter 1 negatively regulates T cell-mediated immune responses and ameliorates autoimmune inflammation in the CNS.* J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8226-36.

Wheeler DW, Thompson AJ, Corletto F, Reckless J, Loke JC, Lapaque N, et al., *Anaesthetic impairment of immune function is mediated via GABA(A) receptors.* PLoS One, 2011. **6**(2): p. 1-8.

Whiteside STEpinat JC, Rice NR, Israel A, *I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity.* The EMBO Journal, 1997. **16**(6): p. 1413-1426.

Wei M, Li L, Meng R, Fan Y, Liu Y, Tao L, Liu X, Wu C, *Suppressive effect of diazepam on IFN-gamma production by human T cells.* Int Immunopharmacol, 2010. **10**(3): p. 267-71.

Werner P, Pitt D, Raine CS, *Glutamate excitotoxicity—a mechanism for axonal damage and oligodendrocyte death in Multiple Sclerosis?* J Neural Transm Suppl, 2000(60): p. 375-85.

Wiegers GJ and Reul JM, *Induction of cytokine receptors by glucocorticoids: functional and pathological significance.* Trends Pharmacol Sci, 1998. **19**(8): p. 317-21.

Wilms H, Claasen J, Röhl C, Sievers J, Deuschl G, Lucius R, *Involvement of benzodiazepine receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases: evidence from activated microglial cells in vitro.* Neurobiol Dis., 2003. **14**(3): p. 417-24.

Xie ZX, Zhang HL, Wu XJ, Zhu J, Ma DH, Jin T, *Role of the immunogenic and tolerogenic subsets of dendritic cells in multiple sclerosis.* Mediators Inflamm, 2015. p. 1-20.

Xiong Y, Zhang S, Lu J, Sun S, Song B, Xu L, Yang Z, Guan S, *Investigation of effects of farrerol on suppression of murine T lymphocyte activation in vitro and in vivo.* Int Immunopharmacol, 2013. **16**(2): p. 313-21.

Yousefi OS, Wilhelm T, Maschke-Neuss K, Kuhny M, Martin C, Molderings GJ, Kratz F, Hildenbrand B, Huber M, *The 1,4-benzodiazepine Ro5-4864 (4-chlorodiazepam) suppresses multiple pro-inflammatory mast cell effector functions.* Cell Commun Signal, 2013. **11**(1): p. 13.

Zavala F, *Benzodiazepines, anxiety and immunity.* Pharmacol Ther, 1997. **75**(3): p. 199-216.

Zhang FX, Kirschning CJ, Mancinelli R, Xu XP, Jin Y, Faure E, Mantovani A, Rothe M, Muzio M and Arditi M, *Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes.* J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 7611-4.

Zhao YY, Chiu TH, Rosenberg HC, *TSPO-specific ligand vinpocetine exerts a neuroprotective effect by suppressing microglial inflammation.* Neuron Glia Biol, 2011. **7**(2-4): p. 187-97.

Zhu J and Paul WE, *CD4 T cells: fates, functions, and faults.* Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.

Zozulya AL, Clarkson BD, Ortler S, Fabry Z and Wiendl H, *The role of dendritic cells in CNS autoimmunity.* J Mol Med (Berl), 2010. **88**(6): p. 535-44.

