

## **Título. Identificación de nuevos eventos moleculares en la patogénesis y mecanismos de acción de terapias en enfermedades desmielinizantes.**

Unidad Ejecutora Principal del Resultado.

**Autor principal:** Giselle Pentón Rol. ([giselle.penton@cigb.edu.cu](mailto:giselle.penton@cigb.edu.cu)).

**Centro de procedencia:** Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

**Otros Autores:** Majel Cervantes Llanos, Gregorio Martínez Sánchez, Carmen Valenzuela Silva, Pedro Antonio López Saura, Ileana Lopategui Cabezas.

### **Introducción**

Las enfermedades desmielinizantes (ED), en particular la esclerosis múltiple (EM) y la neuromielitis óptica (NMO), están entre las principales causas de discapacidad neurológica que afectan a adultos jóvenes, en ocasiones con curso agresivo y fulminante

La EM es una enfermedad desmielinizante crónica del Sistema Nervioso Central (SNC), mientras que la NMO es una enfermedad inflamatoria, también del SNC, pero que afecta selectivamente los nervios ópticos y la médula espinal. La característica patológica de la EM son las placas desmielinizantes exquisitamente definidas con axones relativamente preservados, mientras que en la NMO, ambos, tanto la mielina como los axones, están involucrados, resultando en cavitación necrótica.

Las investigaciones en los mecanismos moleculares de las ED de naturaleza autoinmune, han progresado rápidamente debido al descubrimiento de enfermedades autoinmunes producidas por células Th17 en la EM y de la NMO-IgG, que usa como blanco aquaporin-4 (AQP4), sobre los procesos pediculares de los astrocitos en la NMO.

### **Resultados y discusión**

#### *Citoquinas, quimiocinas, metaloproteinasas e inhibidores en Esclerosis Múltiple y Neuromielitis óptica.*

El mecanismo inmunopatogénico de ambas ED ha sido abordado por diferentes investigadores, se ha visto participación de ambos tipos de respuesta inmune, tanto celular como humoral, pero se conoce que en la EM predomina la respuesta inmune celular, sin embargo en la NMO se postula un predominio de la respuesta inmune humoral, siendo el componente celular poco estudiado.

Esta investigación refiere una comparación de parámetros moleculares, fundamentalmente asociados a la respuesta inmune celular, involucrados en la patogénesis de la NMO y EM, sobre las bases de la identificación del comportamiento los niveles séricos de citoquinas, quimiocinas, metaloproteinasas/inhibidores, así como marcadores de estrés oxidativo en ambas ED.

En nuestros resultados resaltan los niveles significativos bajos y homogéneos (casi no existentes) de TNF-alfa que caracterizan los sueros de los pacientes de NMO respecto a los pacientes de EM y Controles (figura 1A). TNF-alfa es considerada una citoquina con actividad pro-inflamatoria en la respuesta inmune pero también tiene funciones inmunosupresivas, y consecuentemente participa en los procesos de reparación o recuperación, sugiriendo un papel dual para esta citoquina.

Diferentes reportes indican tanto exacerbación como mejoría de condiciones patológicas en el cerebro durante el tratamiento con TNF-alfa. En un modelo animal de desmielinización/remielinización, la ausencia de TNF-alfa o TNFR2 produjo una significativa reducción de los oligodendrocitos produciendo un retardo en la generación de estas células, mostrando un papel no esperado para el TNF-alfa o TNFR2 en la reparación del SNCii. En humanos, los efectos beneficiosos del tratamiento con anti-TNF-alfa en pacientes con enfermedades autoinmunes han sido probados; sorpresivamente una de las vertientes del efecto del tratamiento es la inducción o exacerbación de autoinmunidad humoraliii.

Esta citoquina es importante para proteger al SNC del daño causado por la cascada de eventos inmunes e inflamatorios que caracterizan estas enfermedades y nuestros resultados avalan reportes que demuestran acciones neuroprotectoras,ivneurotróficasv e inmunomoduladoras del TNF-alfa, por tanto; este estudio constituye el primer reporte que apunta hacia un papel neuroprotector del TNF-alfa en NMO.

Adicionalmente, nuestros resultados muestran una disminución de los niveles séricos de IL-10 en ambas ED, sugiriendo que un desequilibrio del balance efector –regulador puede estar implicado.

IL-10 es una citoquina Th2, pero además citoquina reguladora producida por las células T reguladoras adaptativasvi. Se han reportado bajos niveles séricos de IL-10 en pacientes de EM comparado con controles, más drásticos en las formas progresivas de la enfermedad vii y los tratamientos que aumentan los niveles de IL-10 mejoran la enfermedad.

Los mecanismos reguladores son esenciales en la prevención de los desórdenes autoinmunes. La terapia con citoquinas reguladoras es una estrategia atractiva para restablecer el balance inmune y por tanto prevenir o revertir estos desórdenes. Evidentemente, la regulación negativa de TNF-alfa e IL-10 en ambas enfermedades desmielinizantes sugieren un marcado desbalance, posiblemente responsable de diferentes eventos de sus mecanismos patogénicos. Nuestros resultados son consistentes con aquellos obtenidos por otros para EM, sugiriendo que es posible el control de estas enfermedades restaurando el balance de citoquinas reguladoras.

### Identificación de marcadores moleculares predictivos de la evolución clínica en pacientes con NMO.

Actualmente se conoce que la NMO puede distinguirse de la EM sobre la base de sus características clínicas y neuro-imagenológicas, pero esto es posible una vez que la enfermedad es explícitamente evidente.

Anti-aquaporin-4 o NMO-IgG es usada como marcador diagnóstico de NMOviii, su identificación abrió las puertas a nuevas posibilidades de diagnóstico y por tanto intervenciones terapéuticas tempranas. De forma similar, se hace necesario la

búsqueda de otros marcadores moleculares con fines diagnósticos o predictivos del curso clínico de la enfermedad.

En nuestro estudio, se realizaron correlaciones entre los parámetros moleculares (MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1 y marcadores de estrés oxidativo) con parámetros clínicos (escala EDSS, número de crisis). Observamos que la EDSS está fuertemente cercana a TIMP-1 y MMP-9, así como con la relación MMP-9/TIMP-1, con un alto grado de correspondencia entre las distancias entre los puntos implicados en el mapa de Escalado Multidimensional y la contribución de la matriz dado por un coeficiente de stress de 0.0086.

El Escalado Multidimensional y el modelo de regresión lineal bayesiana reveló una dependencia lineal entre la escala EDSS y TIMP-1, apuntando a un posible valor predictivo o pronóstico de esta relación clínico-molecular.

### *Estrés oxidativo en Esclerosis Múltiple y Neuromielitis óptica*

El estrés oxidativo tiene un papel protagónico en diferentes patologías del SNC. Las especies reactivas del oxígeno (ERO) generadas en exceso fundamentalmente por macrófagos activados, han sido identificadas como mediadoras del daño desmielinizante y axonal<sup>ix</sup>. El papel de las ERO en la NMO no había sido estudiado con anterioridad, mientras que en la EM las evidencias anteriores eran escasas. El estudio del papel del ambiente redox en esta enfermedad tiene implicaciones importantes tanto para su diagnóstico diferencial, para la comprensión de la patología, así como para una futura intervención terapéutica y el seguimiento de la evolución de la enfermedad.

Durante el estudio se encontró que los indicadores de daño a lípidos (MDA) (figura 1B), y proteínas (PAOP) se encuentran incrementados tanto en NMO como en EM, indicativo de que en ambas enfermedades está presente el desbalance redox. La variable PAOP alcanza valores mayores en NMO, esta variable está directamente correlacionada con la magnitud del proceso inflamatorio y la activación de polimorfonucleares, por lo cual es fuertemente sugerente que la magnitud del proceso inflamatorio es superior en NMO. Por otra parte, el balance entre las enzimas SOD y CAT es diferente en ambas patologías a pesar que los valores individuales de la actividad de las enzimas SOD y CAT son similares, este ambiente redox provoca que en NMO la concentración de hidroperóxidos totales sea superior al de individuos aparentemente sanos mientras que en EM el balance de hidroperóxidos totales es similar al de los pacientes controles. El indicador de actividad antioxidante total PP (Potencial de Peroxidación) muestra un incremento (indicativo de deficiencia de los sistemas antioxidantes) para ambas patologías, esta deficiencia de antioxidantes es más acentuada en NMO que en EM.

Ambas patologías desmielinizantes se caracterizan por un estrés oxidativo severo pero las diferencias encontradas en el ambiente redox entre ambos grupos de pacientes indican que los mecanismos moleculares que subyacen en ambas siguen patrones diferenciados, lo cual se corresponde con los hallazgos inmunológicos que evidencian las diferencias entre estas dos patologías x.

***Nuestros resultados constituyen el primer reporte de caracterización del estrés oxidativo en NMO, contribuyen a reforzar el diagnóstico diferencial y revelan por primera vez los patrones de desregulación redox presentes en esta enfermedad.***

### Inducción de células T reguladoras como mecanismo molecular de acción crucial en los nuevos enfoques terapéuticos en enfermedades desmielinizantes autoinmunes

Con el objetivo de identificar los eventos moleculares involucrados en el mecanismo de acción de terapias internacionalmente reconocidas para el tratamiento de la EM, evaluamos la modulación de los transcritos específicos de genes relacionados con las diferentes etapas del mecanismo patogénico: presentación antigénica, balance Th1/Th2, integridad de la barrera hemato-encefálica y células T reguladoras durante el tratamiento “in vitro” de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EMRR, con IFNs tipo I.

Los mecanismos de tolerancia inmunológica particularmente periféricas son los que controlan, regulan y “educan” estas respuestas inmunes, en un lugar especial y estudiadas abundantemente están las células T reguladoras (cTr). La pérdida, independientemente de la causa, de estos mecanismos de regulación puede desencadenar la autoinmunidad.

Se describen dos tipos de cTr que se distinguen por la expresión de marcadores celulares de superficie, origen, producción de citoquinas y mecanismos de acción como los son: las nTrxi y las células T reguladoras adaptativas (aTr)xii. Foxp3 juega un rol específico en el desarrollo y función de las nTr.

Conjuntamente a lo anteriormente expresado, más las evidencias acerca que la deficiencia ya sea en número o función de las cTr en pacientes con EMxiii, hace relevante la importancia de su estudio, así como la necesidad de terapias eficaces en el restablecimiento de la tolerancia en estos pacientes.

En nuestro trabajo obtuvimos un incremento de los marcadores de nTr luego de la estimulación “in vitro” con ambos IFNs tipo I, tanto a nivel de ARN (figura 2) como de proteínas, sugiriendo que el efecto de los mismos en la EM está dado, en gran medida, por el restablecimiento de la tolerancia mediada por las cTr, lo que se traduce en el un equilibrio de los componentes efectores y reguladores del SI.

Nuestros resultados pueden explicar la mejoría clínica observada en estos pacientes, cuando reciben tratamiento con IFNs tipo I. La disminución de las recaídas y en la severidad de los pacientes con EMRR sugiere que uno de los mecanismos de acción de los IFNs tipo I en la EM es la inducción de células T reguladoras.

El IFN-alfa2b recombinante, IFN tipo I de producción nacional, representa una alternativa terapéutica viable desde el punto de vista económico y nuestros resultados aportan elementos moleculares para validar su uso.

Los resultados incluidos en este trabajo fueron publicados en:

- Pentón-Rol G, Cervantes-Llanos M, Martínez-Sánchez G, Cabrera-Gómez JA, Valenzuela Silva C, Ramírez-Nuñez O, Casanova-Orta M, Robinson-Agramonte MA, Lopategui-Cabezas I, López-Saura PA. TNF- $\alpha$  and IL-10 downregulation and marked oxidative stress in Neuromyelitis Optica. *J Inflamm* 2009; 6: 18.
- Pentón-Rol G, Cervantes-Llanos M, Cabrera-Gómez JA, Alonso-Ramírez R, Valenzuela-Silva C, Rodríguez-Lara R, Montero-Casimiro E, Bello-Rivero I, López-Saura PA. Treatment with type I interferons induces a regulatory T cell subset in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *Int Immunopharm* 2008; 8: 881–886.

- Lopategui Cabezas I, Cervantes Llano M, Pentón Rol G. Neuromielitis óptica. Principales diferencias con la esclerosis múltiple. *An Med Interna* 2008; 25: 294-296.
- Lopategui Cabezas I, Cervantes Llano M, Pentón Rol G. Respuesta inmune en la neuromielitis óptica. *An Med Interna* 2008; 25: 362-365.

## Conclusiones

Las enfermedades desmielinizantes (ED), en particular la esclerosis múltiple (EM) y la neuromielitis óptica (NMO), están entre las principales causas de discapacidad neurológica que afectan a adultos jóvenes, en ocasiones con curso agresivo y fulminante.

En esta investigación se hacen aportes moleculares a la patogénesis y a los mecanismos de acción de terapias en ED.

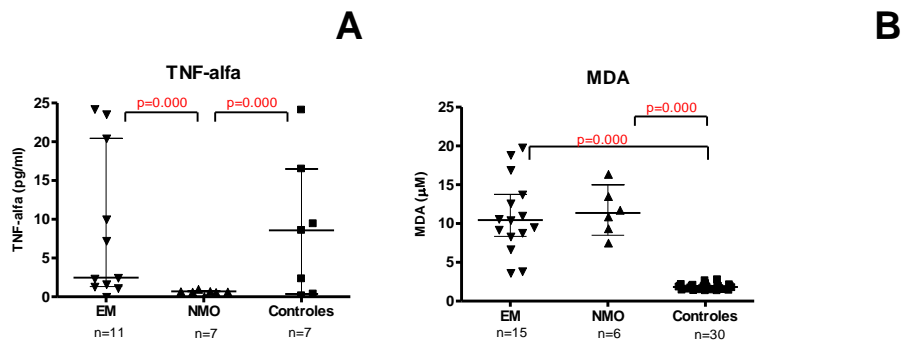
- Se reporta, por primera vez, niveles extremadamente bajos de TNF-alfa en NMO, lo que avala el papel neuroprotector de esta citoquina,
  - Se detecta una reducción de IL-10 en ambas ED, lo que evidencia el desbalance efector-regulador, dado el carácter autoinmune de estas enfermedades
  - Se identifica la existencia de un estrés oxidativo marcado en ambas ED, constituyendo, para la NMO, el primer reporte de una caracterización molecular de marcadores de estrés oxidativo en esta enfermedad.
  - Se identifica una variable molecular, el inhibidor de metaloproteinasa 9, con valor predictivo de una variable clínica relacionada con la escala de discapacidad neurológica en los pacientes con NMO.
  - Se demostró que la inducción de células T reguladoras, es un evento crucial en el mecanismo molecular de acción de terapias en ED de naturaleza autoinmune, se evidenció para los IFNs tipo I en EM y se identificó, por primera vez, para el IFN-alfa 2b recombinante. Estos resultados avalan y están en consonancia con el nuevo cambio de paradigma de la inmunología hacia la Tolerancia Dominante.
- Los resultados están avalados por cuatro publicaciones internacionales, dos tesis de maestría y diversas presentaciones y premios en eventos nacionales e internacionales.

## Bibliografía

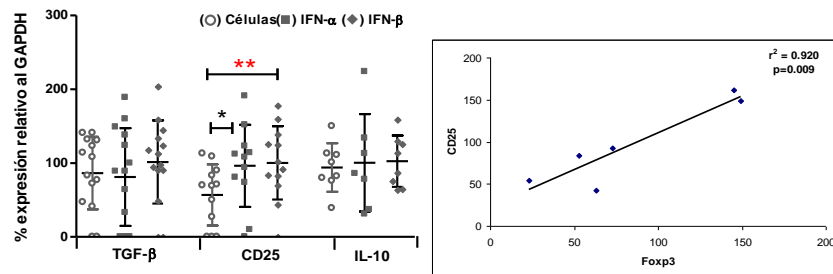
- 
- <sup>i</sup> Correale J, Villa A: The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J Neurol* 2004, 251:1304-1316.
  - <sup>ii</sup> Arnett HA, et al. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 2001, 4:1116-1122.
  - <sup>iii</sup> Charles PJ, et al. Assessment of antibodies to double-stranded DNA induced in rheumatoid arthritis patients following treatment with infliximab, a monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha: findings in open-label and randomized placebo-controlled trials. *Arthritis Rheum* 2000, 43:2383-2390.
  - <sup>iv</sup> Turrin NP, Rivest S: Tumor necrosis factor alpha but not interleukin 1 beta mediates neuroprotection in response to acute nitric oxide excitotoxicity. *J Neurosci* 2006, 26:143-151.

- v Pickering M, et al. Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp Physiol* 2005, 90:663-670.
- vi Moore KW, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor 2001; *Annu Rev Immunol* 19: 683-765.
- vii Salmaggi A, et al. Low serum interleukin-10 levels in multiple sclerosis: further evidence for decreased systemic immunosuppression? *J Neurol* 1996, 243:13-17.
- viii Saiki S, et al. Extensive hemispheric lesions with radiological evidence of blood-brain barrier integrity in a patient with neuromyelitis optica. *J Neurol Sci.* 2009;284:217-9.
- ix Manto M, Marmolino D. Cerebellar Disorders-At the Crossroad of Molecular Pathways and Diagnosis. *Cerebellum.* 2009 Oct 27. [in press]
- x Kale N, et al. Humoral pattern II multiple sclerosis pathology not associated with neuromyelitis Optica IgG. *Arch Neurol.* 2009;66:1298-9.
- xi Sakaguchi S, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995.; 155:1151–1164.
- xii Wing K, et al. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int Immunol.* 2006.; 18: 991-1000.
- xiii Venken K, et al. Compromised CD4+ CD25high regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology* 2008, 123, 79–89

**Figura 1**



**Figura 2**



**Palabras claves:** Enfermedades desmielinizantes, Neuromielitis óptica, Esclerosis Múltiple, citoquinas, estrés oxidativo