

# **PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA**

## **IMPACTO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA MELATONINA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

**Rodríguez Murúa, Sofía – LU 1056654**

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

**Farez, Mauricio Franco, FLENI**

Co-Tutor:

**Cardozo, Julián, Universidad Argentina de la Empresa**

**Agosto, 2018**



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

## **Agradecimientos**

Son muchas las personas que han contribuido para poder llevar a cabo este trabajo de tesis, y esta es mi oportunidad para agradecerles.

Principalmente, quiero darle las gracias a Mauricio, mi director, quien confió en mí y me dio la oportunidad de ingresar en el mundo de la investigación y enseñarme a querer cada día más la ciencia de la neuroinmunología. También quería agradecerle al Doctor Jorge Correale por permitirme ser parte de su laboratorio, es un placer y orgullo formar parte del laboratorio CIEN y pertenecer a la institución de FLENI. Eternamente agradecida por esta oportunidad.

Después de un año y medio en el CIEN, no sólo gané experiencia y conocimiento, también tuve la oportunidad de conocer a Aldo y Eve, mis bellas neurochicas, a quienes hoy tengo la felicidad de llamarlas amigas. Les agradezco por acompañarme a diario en el laboratorio y por su gran apoyo en este proyecto del cual también forman parte.

Agradezco al Instituto Leloir, especialmente a Adriana Fontanals quien nos permitió el acceso a las instalaciones del bioterio y a los chicos que me soportaron tantos días y tan temprano por la mañana.

Quiero darle las gracias al equipo de investigación en el CIM-LIAN de FLENI Escobar, especialmente a Charly Luzzani y Leo Romorini quienes con muy buena predisposición me facilitaron el uso de sus equipos y enseñaron los secretitos de las técnicas de biología molecular.

También quiero agradecer al laboratorio de Neuropatología de FLENI, a Marcelo Schulz, quien con mucha paciencia me introdujo y enseñó las técnicas de histología.

Por último, quiero mencionar y agradecer la participación del IBYME, particularmente a Santiago Méndez Huergo quien nos facilitó algunos reactivos para llevar a cabo este trabajo.

# Índice

## Índice

Resumen .....	6
Abstract .....	9
Introducción.....	12
1. Esclerosis múltiple .....	13
1.1. Epidemiología .....	14
1.1.1. Patrones estacionales .....	16
1.2. Fisiopatología de la EM .....	19
1.3. Formas clínicas de EM .....	23
1.4. Síntomas .....	25
1.5. Diagnóstico.....	25
1.6. Tratamiento .....	25
2. Melatonina.....	26
2.1. Receptores y vías de señalización .....	27
2.2. Melatonina y su relación con la EM.....	28
2.2.1. La melatonina suprime la generación de células Th17.....	28
2.2.2. La melatonina aumenta los niveles de células Tr1 productoras de IL-10 .....	29
Hipótesis.....	31
Objetivos .....	33
Materiales y métodos.....	35
1. Análisis <i>in vitro</i> .....	36
1.1. Obtención de células .....	36
1.2. Recuento de células .....	36
1.3. Diferenciación celular .....	36
1.4. Análisis de expresión mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real ...	37
1.4.1. Extracción de RNA.....	37
1.4.2. Síntesis de cDNA .....	37
1.4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR en tiempo real.....	38
2. Análisis <i>in vivo</i> .....	39
2.1. Animales experimentales.....	39
2.2. Modelo experimental de EM: Encefalitis Autoinmune Experimental .....	39
2.2.1. Inducción .....	39
2.2.2. Tratamiento .....	40

---

2.2.3.	Evaluación clínica .....	40
2.3.	Pesaje de órganos .....	41
2.4.	Análisis histológico .....	41
2.4.1.	Tinción hematoxilina-eosina .....	41
2.4.2.	Tinción con azul Luxol rápido .....	41
2.4.3.	Tinción de plata de Bielschowsky .....	42
2.5.	Análisis de proliferación.....	42
2.5.1.	Activación periférica <i>in vivo</i> .....	42
2.5.2.	Extracción de muestras .....	42
2.5.3.	Marcación con CFSE.....	43
2.5.4.	Reestimulación de linfocitos .....	43
2.5.5.	Marcación extracelular .....	43
2.6.	Análisis de infiltración del SNC.....	44
2.6.1.	Extracción de muestras .....	44
2.6.2.	Obtención de linfocitos T .....	44
2.6.3.	Análisis de expresión por RT-qPCR .....	44
2.7.	Análisis estadístico .....	45
Resultados .....		46
1.	Efecto del SR8278 <i>in vitro</i> .....	47
1.1.	Expresión de citoquinas pro-inflamatorias .....	47
1.2.	Expresión de citoquinas anti-inflamatorias .....	48
2.	Efecto del SR8278 en la severidad clínica de la Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE)...	49
2.1.	Efecto clínico.....	49
2.2.	Pesaje de órganos .....	50
2.3.	Análisis histológico .....	52
2.4.	Efecto <i>in vivo</i> de SR8278 a nivel periférico .....	53
2.4.1.	Proliferación de linfocitos T .....	53
Conclusión.....		60
Perspectivas futuras .....		62
Abreviaturas .....		64
Bibliografía.....		67

# Resumen

## **Resumen**

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad crónica autoinmune inflamatoria y neurodegenerativa que afecta al sistema nervioso central (SNC). 38,2 de cada 100.000 habitantes en Buenos Aires padecen de EM y aproximadamente 2,5 millones a nivel mundial. Esta enfermedad se caracteriza por un desbalance del sistema inmune, en el que células de dicho sistema infiltran en el SNC y atacan a la mielina que recubre los axones de las neuronas. De esta forma, se genera desmielinización, daño y pérdida axonal, provocando la interrupción de la normal señalización entre neuronas, ocasionando la aparición de síntomas neurológicos y discapacidad física en adultos jóvenes.

Las causas de esta enfermedad aún son desconocidas, aunque se ha demostrado que resulta de un desbalance entre linfocitos T CD4+ patogénicos (Th1/Th17) y linfocitos T reguladores (Foxp3+/Tr1). Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la melatonina, cuyos niveles alcanzan su pico máximo en otoño-invierno, muestra una correlación inversa con la actividad clínica de la enfermedad en pacientes con EM. Dichos estudios sugirieron que esta hormona disminuye el desarrollo de la enfermedad controlando el balance entre células efectoras y reguladoras a través de vías de señalización específicas. La melatonina bloquea la diferenciación de células Th17 patogénicas a través de un mecanismo mediado por su receptor de membrana MTNR1A y REV-ERB $\alpha$ , y a su vez, aumenta la generación de células T reguladoras.

Basándonos en estas observaciones, nos propusimos estudiar el rol que cumple el modulador de REV-ERB $\alpha$  en el control de la inflamación, así como su potencial como agente terapéutico en la EM.

Con el fin de evaluar la relevancia del receptor REV-ERB $\alpha$  en la diferenciación de células Th17 murinas *in vitro*, utilizamos como tratamiento a un inhibidor de este receptor, el SR8278. Pudimos demostrar que el SR8278 interfirió *in vitro* con la diferenciación de los linfocitos Th17 mediante la disminución en la expresión de las citoquinas IL-17 e IFN $\gamma$ , y el aumento en la expresión de la citoquina IL-10, vinculada con linfocitos no patogénicos.

Por otro lado, con el propósito de evaluar la relevancia del receptor REV-ERB $\alpha$  en el desarrollo de la EM *in vivo*, utilizamos el SR8278, como tratamiento en el modelo de la EAE. Aquí demostramos el efecto terapéutico de este represor al disminuir la severidad de la

enfermedad en el modelo animal de la EM, y además observamos un menor porcentaje de desmielinización y pérdida axonal en el SNC respecto de aquellos animales control, a través de su análisis histológico. A su vez, evaluamos a nivel periférico la presencia de linfocitos autorreactivos donde pudimos demostrar la inhibición de su expansión luego de su tratamiento con SR8278.

De esta manera, demostramos en este trabajo que el receptor REV-ERB $\alpha$  tiene relevancia en el desarrollo de la EM mediante la regulación de la diferenciación de linfocitos T patogénicos. Su acción inhibitoria sobre NFIL3 promueve la diferenciación de linfocitos T CD4+ en células Th17 responsables de la inflamación y neurodegeneración en el SNC.

Con estos resultados, creemos que una terapia dirigida hacia la vía de señalización de la melatonina aquí descripta podría ser útil para tratar la EM. Consideramos que las vías involucradas son complejas y probablemente reguladas de forma cruzada; por lo tanto, más estudios deben ser llevados a cabo para terminar de dilucidar el potencial traslacional de estos hallazgos.



# Abstract

**Abstract**

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic inflammatory and neurodegenerative autoimmune disease that affects the central nervous system (CNS). 38,2 of every 100,000 habitants in Buenos Aires suffer from MS and approximately 2.5 million worldwide. This disease is characterized by an imbalance of the immune system, in which cells from this system infiltrate the CNS and attack the myelin that covers the axons of neurons. In this way, demyelination, axonal damage and loss are generated, causing the interruption of normal signaling between neurons, which causes the appearance of neurological symptoms and physical disability in young adults.

The causes of this disease are still unknown, although it has been shown to result from an imbalance between pathogenic CD4+ T cells (Th1 / Th17) and regulatory T cells (Foxp3+/Tr1). Previous studies from our laboratory showed that melatonin, whose levels reach their peak in autumn-winter, shows an inverse correlation with the clinical activity of the disease in patients with MS. These studies suggested that this hormone decreases the development of the disease by controlling the balance between effector and regulatory cells through specific signaling pathways. Melatonin blocks the differentiation of pathogenic Th17 cells through a mechanism mediated by its membrane receptor MTNR1A and REV-ERB $\alpha$ , and as well, increases the generation of regulatory T cells.

Based on these observations, we set out to study the role of REV-ERB $\alpha$  modulator in the control of inflammation, as well as its potential as a therapeutic agent in MS.

In order to evaluate the relevance of REV-ERB $\alpha$  receptor in the differentiation of murine Th17 cells *in vitro*, we used an inhibitor of this receptor, SR8278, as a treatment. We were able to demonstrate that SR8278 interfered *in vitro* with the differentiation of Th17 cells by decreasing the expression of IL-17 and IFN $\gamma$  cytokines and increasing the expression of the IL-10 cytokine associated with nonpathogenic cells.

On the other hand, in order to assess the relevance of REV-ERB $\alpha$  receptor in the development of MS *in vivo*, we used SR8278 as a treatment in the EAE model. Here we demonstrate the therapeutic effect of this repressor by the decrease of the disease severity in the animal model of MS, where we also observed a lower percentage of demyelination and axonal loss in the CNS compared to those control animals, through its histological analysis. In

turn, we evaluated the presence of autoreactive lymphocytes at a peripheral level where we were able to demonstrate the inhibition of their expansion after their treatment with SR8278.

In this way, we demonstrate in this work that REV-ERB $\alpha$  receptor has relevance in the development of MS disease by regulating the differentiation of pathogenic T cells. Its inhibitory action on NFIL3 promotes the differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells in Th17 cells responsible for inflammation and neurodegeneration in the CNS.

With these results, we believe that a therapy directed towards the melatonin signaling pathway described here could be useful for treating MS. We consider that the involved pathways are complex and probably cross-regulated; therefore, more studies must be carried out to finish elucidating the translational potential of these findings.

# Introducción

## **Introducción**

### **1. Esclerosis múltiple**

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inmunomediada del sistema nervioso central (SNC) en la cual la interacción entre los procesos inflamatorios y neurodegenerativos resulta en una perturbación neurológica intermitente seguida de acumulación progresiva de discapacidad (Sawcer et al., 2011).

El comienzo de la enfermedad es en promedio alrededor de los 30 años de edad, y luego de 25 años desde el diagnóstico, el 50% de los pacientes se encuentran incapacitados para transportarse por sus propios medios (Compston y Coles, 2008).

La EM se caracteriza por episodios de discapacidad neurológica, total o parcialmente reversibles, que generalmente duran días o semanas (Reich, *et al.*, 2018). Los síntomas, son el resultado de la aparición sucesiva de lesiones inflamatorias que causan desmielinización y daño axonal, conduciendo a la desaceleración o bloqueo de la conducción en la sustancia blanca del SNC, expresándose clínicamente de diversas formas (Noseworthy et al., 2000). El cuadro clínico de aquellos pacientes con EM es muy variado; dentro de los distintos síntomas, nos encontramos con trastornos visuales y sensoriales, alteraciones motoras y de coordinación, así como espasticidad, dolor, fatiga y disfunciones cognitivas (Dendrou *et al.*, 2015).

Dichos síntomas, pueden ocurrir en episodios súbitos o de modo insidioso y progresivo. Habitualmente, después de 10 a 20 años del inicio de la enfermedad, se desarrolla un curso clínico progresivo en muchas de las personas afectadas, mientras que, aproximadamente el 15% de los pacientes tienen un curso progresivo desde el inicio (Reich, *et al.*, 2018).

Varios fármacos inmunomoduladores han sido desarrollados en las últimas dos décadas para el tratamiento de la EM (Abad *et al.*, 2014). Sin embargo, ningún medicamento revierte o previene completamente el deterioro neurológico progresivo causado por la enfermedad (Reich, Lucchinetti & Calabresi, 2018).

### 1.1. Epidemiología

Las zonas de alta prevalencia de EM (>30 casos por cada 100.000 habitantes) son Europa, América del Norte, Nueva Zelanda y Australia; en el sur de Europa y Estados Unidos la prevalencia es media (5-30 por 100.000 habitantes); mientras que en Asia es baja (<5 por 100.000 habitantes). Sudamérica presenta un rango entre bajo y medio. Dentro de las regiones de clima templado, se cree que la incidencia y prevalencia de EM aumenta con la latitud, tanto al norte como al sur del ecuador (Figura 1) (Ascherio et al., 2008).



**Figura 1. Prevalencia de la EM en el mundo.** Adaptado de *The Multiple Sclerosis Trust*, 2012.

La edad de inicio de la EM sigue un patrón similar, con una baja incidencia en la infancia, que aumenta rápidamente después de la adolescencia, alcanza un pico entre 25 y 35 años, y luego disminuye lentamente (Ascherio et al., 2008). Se puede observar una mayor prevalencia en mujeres que en hombres y también en individuos de raza blanca respecto de afroamericanos (Hurwitz, 2009; Abad *et al.*, 2014).

La migración desde regiones de alto riesgo hacia regiones de bajo riesgo en la niñez, se asocia con una reducción del riesgo, mientras que aquellas de baja a alta prevalencia se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar EM en comparación con la población de origen (Compston & Coles, 2008).

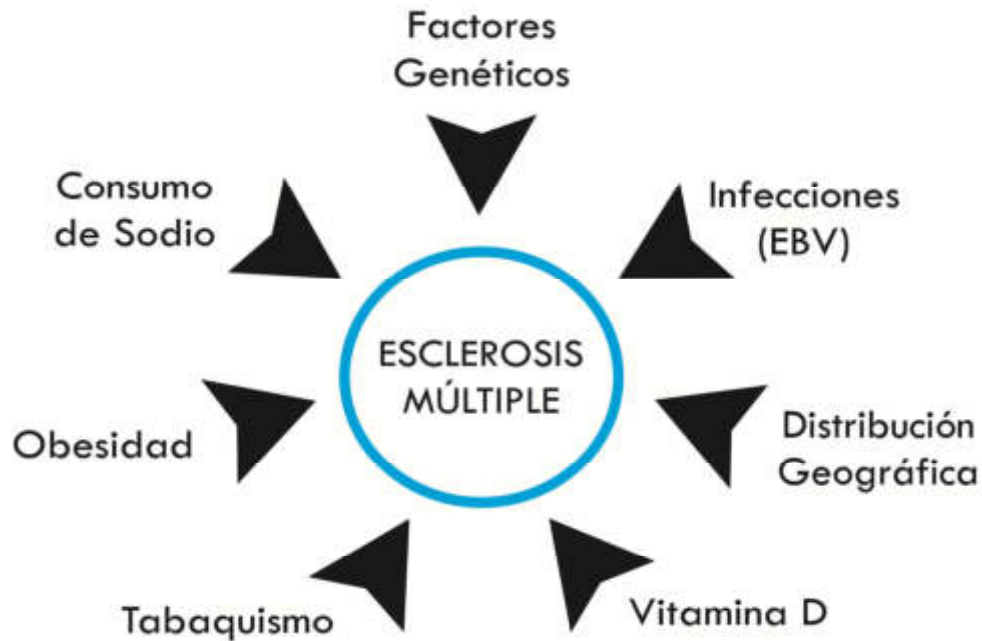
Las causas de la variación en la prevalencia e incidencia de la EM alrededor del mundo aún se desconocen en gran medida; sin embargo, se han postulado factores de riesgo

tanto ambientales como genéticos, los cuales probablemente tengan un papel importante (Noseworthy et al., 2000). A pesar de que se han identificado más de 100 genes relacionados con la EM, hay fuertes evidencias de que los factores ambientales poseen una mayor contribución al riesgo de la enfermedad (Ascherio et al., 2008; Leray et al., 2016).

Estudios epidemiológicos reportan que el riesgo de adquirir EM es más alto entre hermanos, padres o hijos de los pacientes que la población general (Farez et al., 2014) Abad *et al.*, 2014). Esto demuestra que los factores genéticos tienen implicancia en la incidencia de la enfermedad. Dentro de los factores genéticos a mencionar, se cree que el alelo de riesgo principal de la EM es el HLA-DRB1\* 15:01. A partir del avance de la tecnología y el surgimiento de los estudios de asociación de genoma completo (GWAS), se lograron identificar asociaciones de polimorfismos de único nucleótido (SNPs) en varios genes implicados en vías inmunológicas relevantes como receptores de IL7 e IL2, utilizados actualmente como marcadores inmunogenéticos (Dendrou *et al.*, 2015; Leray *et al.*, 2016; Reich *et al.*, 2018).

Por otra parte, nos encontramos con factores ambientales probablemente implicados tales como la latitud, bajos niveles de vitamina D (Ascherio et al., 2014), consumo de sal (Farez *et al.*, 2015), obesidad, hábito de fumar (Ascherio et al., 2008) e infecciones, siendo la de mayor sustento epidemiológico en su relación con el riesgo a desarrollar EM, la infección con el virus de Epstein-Barr (VEB) (Figura 2) (Leray et al., 2016).

Aunque las causas específicas de la EM aún no se conocen, estudios epidemiológicos sugieren que la enfermedad se desarrolla en sujetos genéticamente predispuestos, sobre los que actuaría un factor ambiental en la infancia (Abad *et al.*, 2014). Es probable que los estudios de las interacciones entre estos dos tipos de factores y sus efectos combinados sean útiles y conduzcan a una mejor comprensión de la etiología de la EM. A pesar de que los estudios de cambios epigenéticos en EM son muy recientes, un creciente cuerpo de literatura sugiere que estos cambios epigenéticos pueden estar involucrados en el desarrollo de la enfermedad, posiblemente mediando los efectos de los factores de riesgo ambientales (Leray et al., 2016).



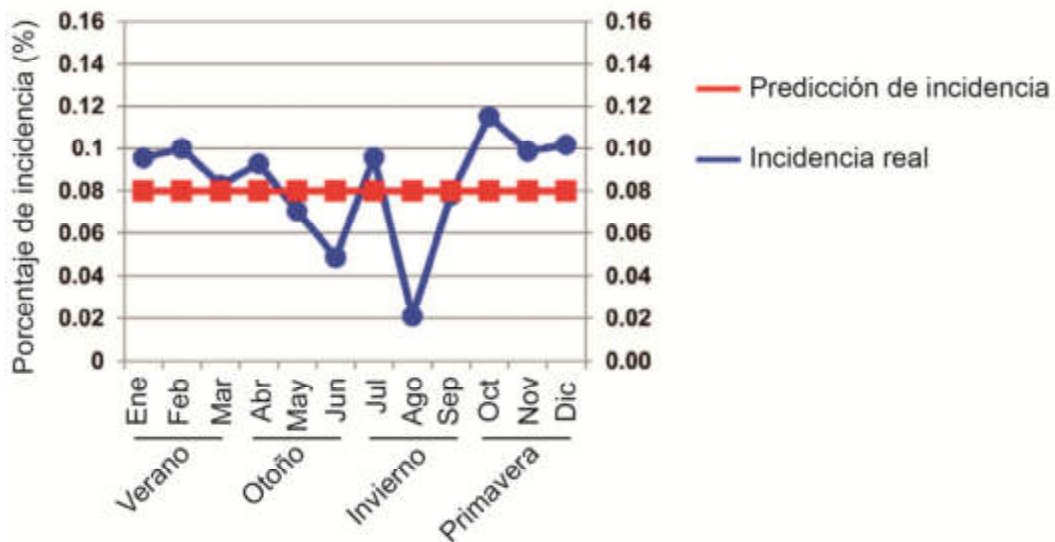
**Figura 2. Factores implicados en el desarrollo de la EM.**

### 1.1.1. Patrones estacionales

En un escenario teórico, donde la incidencia de la EM ocurre solo por azar, se debe esperar una distribución discreta uniforme a lo largo del año (la cual representa la probabilidad de que un número finito de valores sean igualmente probables de ser observados). En este escenario, para analizar la ocurrencia de recaídas durante un año, la probabilidad de tener una recaída debe ser  $1/12$ , o el 8.3% de probabilidades de tener una recaída en un mes dado.

Sin embargo, luego de analizarse en varios estudios los datos sobre la incidencia de la EM, las recaídas no siguieron una distribución discreta uniforme: de hecho se observó una estacionalidad constante de incidencia de la enfermedad, donde ocurren menos recaídas durante el otoño y el invierno, y hay un pico durante la primavera y el verano (Figura 3) (Pedro-cuesta & Soderstrom, 2000; Farez et al., 2016).

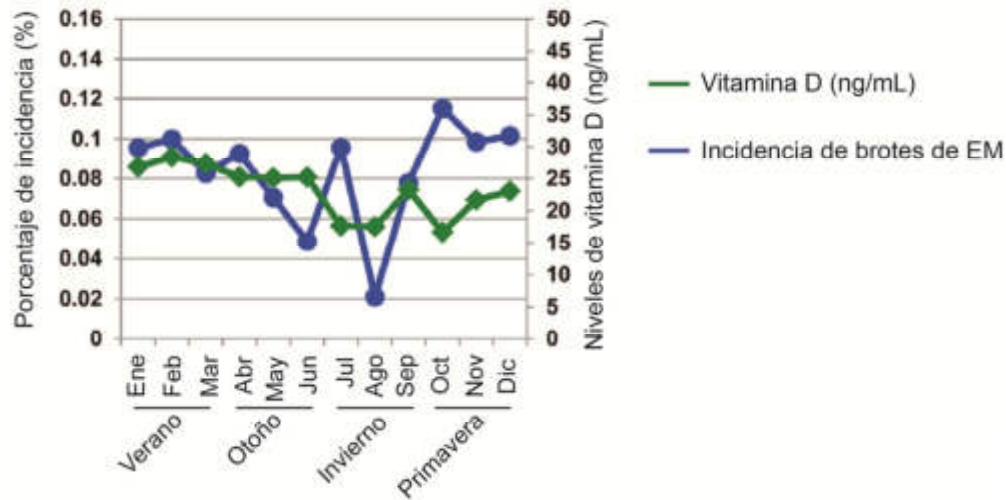




**Figura 3. Patrón estacional de la EM a lo largo del año.** Se observa una distribución de la incidencia de la enfermedad con pico en primavera y verano, y bajas en otoño e invierno en contraste con las recaídas predichas. Adaptado de Farez *et al.*, BioEssays, 2016.

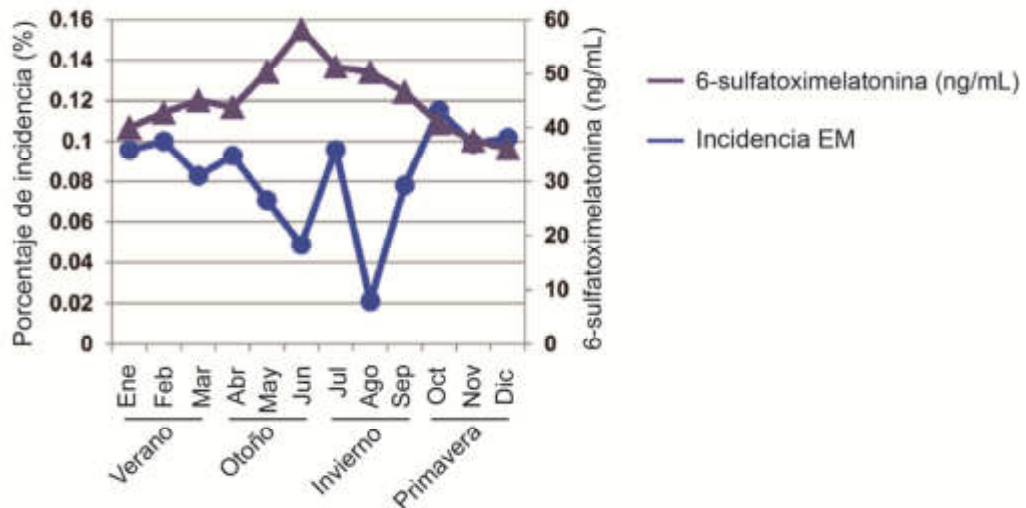
A su vez, se han observado diferencias en la incidencia y prevalencia de la EM según la latitud geográfica de los individuos. Este postulado, podría ser explicado por la exposición al sol y por ende a los niveles de vitamina D a distintas latitudes. En efecto, una mayor concentración de vitamina D se asocia con una menor incidencia de EM (Leray et al., 2016). Como resultado de la regulación de su síntesis en base a la exposición solar, se observan cambios estacionales en los niveles de vitamina D que tienen su pico en primavera-verano.

En base a esto, y a los efectos antiinflamatorios reportados de la vitamina D, se esperaría que en otoño e invierno haya un pico en la incidencia de la EM; sin embargo, se observa lo contrario, se reporta una mayor actividad de la enfermedad durante primavera y verano, sugiriendo que hay otros factores adicionales implicados en su incidencia (Figura 4) (Farez *et al.*, 2015).



**Figura 4. Paradoja estacional de la vitamina D.** A lo largo del año, los niveles de vitamina D con efectos antiinflamatorios, no explican la estacionalidad observada de la incidencia de la EM. Adaptado de Farez *et al.*, BioEssays, 2016.

Estudios recientes de nuestro laboratorio, propusieron a la melatonina como un posible factor implicado en el efecto terapéutico de la EM; al considerar que los niveles de dicha hormona tienen su pico máximo en otoño e invierno y mostrando una correlación inversa con la actividad clínica de la enfermedad (Figura 5).



**Figura 5. Los niveles de melatonina muestran una correlación inversa con la incidencia de la EM.** Adaptado de Farez *et al.*, BioEssays, 2016.

De hecho se ha demostrado que la melatonina limita el avance de la encefalitis autoinmune experimental (EAE), el modelo animal de la EM, e interviene en los mecanismos inflamatorios mediante el control de la diferenciación celular en  $T_H1$  y  $T_H17$  (Farez *et al.*, 2015).

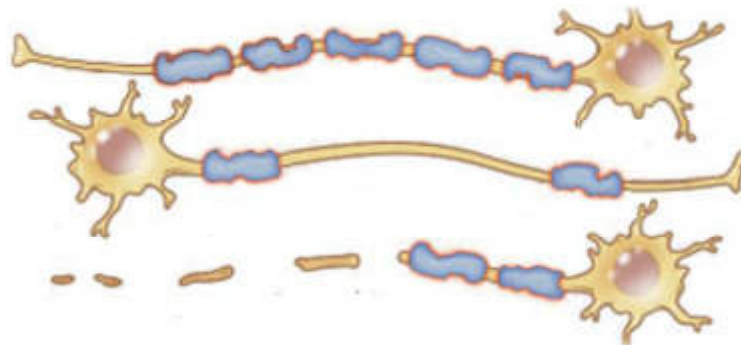
### 1.2. Fisiopatología de la EM

El SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal. En ambas estructuras, los axones de las neuronas que los componen se encuentran recubiertos por una vaina de mielina. Las células gliales responsables de la formación de esta mielina en el SNC, son las células de oligodendroglia.

La integridad de la mielina permite que exista una correcta conducción del impulso nervioso a través del SNC y una adecuada respuesta efectora por parte del sistema nervioso periférico (SNP) (Abad *et al.*, 2014).

En la EM se desarrollan cuatro características patológicas clave: (a) inflamación, que es el principal desencadenante que conduce al daño tisular del SNC; (b) desmielinización, el sello distintivo de la EM, en la que el proceso inflamatorio destruye la vaina de mielina o el cuerpo celular de los oligodendrocitos; (c) pérdida o daño axonal; y (d) gliosis, reacción astrocítica al daño del SNC, donde existe un cierto grado de remielinización, pero es parcial y su eficacia es limitada (Constantinescu *et al.*, 2011).

Esta destrucción progresiva, crónica e inmunomediada de la mielina con pérdida y destrucción de oligodendrocitos y daño axonal temprano, se denomina placa desmielinizante, y genera que los impulsos eléctricos no sean conducidos adecuadamente a través del SNC (Figura 6).



**Figura 6. Desmielinización en la EM.** Axón con pérdida de mielina y posterior pérdida axonal. Adaptado de Reich *et al.*, The New England Journal of Medicine, 2018.

Dichas lesiones, supuestamente guiadas por moléculas de adhesión celular y citoquinas proinflamatorias, ocurren luego de que células inmunes autoreactivas cruzan la barrera hematoencefálica (BHE) y entran en el SNC. Estas células invasoras incluyen un grupo de diferenciación CD4 + linfocitos derivados del timo (linfocitos T), CD20 + linfocitos derivados de médula ósea (linfocitos B), linfocitos citotóxicos CD8 + y macrófagos CD68 + (Goodin, 2016).

### ***Linfocitos T CD4+***

Entre las células T CD4+ efectoras más importantes involucradas en la patología de la EM nos encontramos con las células Th1 y Th17. Las células Th1 se diferencian en respuesta a la activación en presencia de la interleuquina 12 (IL-12), y se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Tbet, el cual controla un programa de expresión génica que resulta en la producción de interferón gamma (IFN $\gamma$ ) y otras moléculas efectoras. Por su parte, las células Th17 se diferencian en respuesta a la activación en presencia del factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1), IL-6 o IL-21 e IL-23, y se caracterizan por la expresión del factor de transcripción ROR $\gamma$ t, que controla un programa de expresión génica que resulta en la expresión de IL-17 y otras moléculas efectoras.

Además, cabe destacar que las células Th1 y Th17 también promueven la activación de microglia, macrófagos, astrocitos y linfocitos B a través de la producción de citoquinas y factores de crecimiento, activando consecuentemente mecanismos adicionales neurodegenerativos (Figura 7) (Quintana et al., 2014).

### ***Linfocitos T CD8+***

Las células CD8+ son de 3 a 10 veces más abundantes que las CD4+ en placas crónicamente inflamadas en el CNS de enfermos con EM.

Diversos mecanismos están involucrados en la destrucción de neuronas por células T CD8+. Principalmente, la citotoxicidad por células T CD8+ es mediada *in vivo* por dos mecanismos: 1) La secreción de gránulos líticos que contienen perforina y granzimas, las cuales pueden disparar la ruptura de la membrana celular y/o apoptosis. 2) La interacción de FasL con Fas expresado en neuronas.

Teniendo en cuenta la neuroinflamación, es importante considerar que las células T CD8+ también producen grandes cantidades de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . El TNF $\alpha$  altera directamente la estructura y funcionalidad de la membrana neuronal, interfiriendo con la funcionalidad de las neuronas e induciendo su apoptosis; y por otro lado, el IFN $\gamma$  modula la actividad del receptor AMPA GluR1, incrementando la muerte neuronal por excitotoxicidad.

Además, han sido identificadas células T CD8+ que producen IL-17 en el SNC de pacientes con EM, sugiriendo que la IL-17 producida por estas poblaciones celulares también participa en la patogenia de la enfermedad (Quintana et al., 2014).

### ***Linfocitos T reguladores***

Las células reguladoras FoxP3+ (Tregs) y las células reguladoras de tipo 1 secretoras de IL-10 (Tr1) juegan un papel importante al regular la actividad de células T efectoras; de hecho, en la EM, se ha descrito un déficit de estas células reguladoras. De esta forma, el balance entre células T efectoras y reguladoras controla la actividad de la enfermedad (Farez et al., 2015).

La activación de células B y T en la periferia de personas sin EM, puede llevar a la expansión clonal y proliferación de células efectoras, pero el proceso se encuentra controlado en forma efectiva por células T reguladoras. En pacientes con EM, sin embargo, las células T reguladoras no son capaces de controlar los clones activados de células B y T, permitiendo su migración a través de la BHE e inducción de la reacción inmune (Grigoriadis y van Pesch, 2015).

### ***Linfocitos B***

Se cree que los linfocitos B participan en la patología de la EM, en parte, por medio de la producción de autoanticuerpos reactivos dirigidos contra epítopes conformacionales de proteínas de mielina del SNC, los cuales son detectados en pacientes con EM inclusive en etapas muy tempranas de la enfermedad. Por otro lado, se considera que dichas células intervienen en la patología de la enfermedad a través de la activación de células T y su capacidad de generar una respuesta inflamatoria.

A su vez, se observó que determinado tratamiento que reduce el número de células B pero no la concentración de anticuerpos generó efectos beneficiosos en los pacientes,

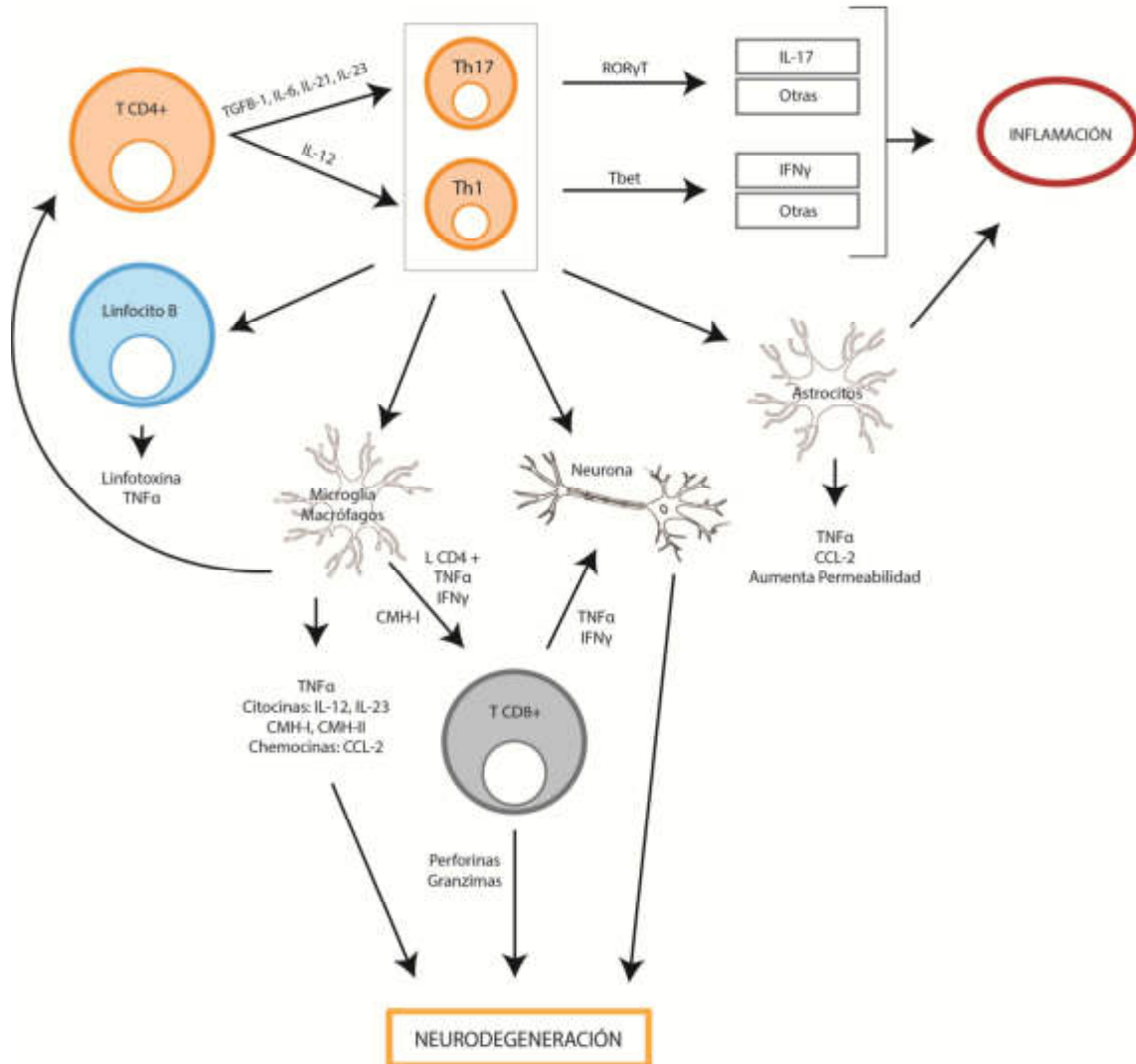
sugiriendo que los mismos están asociados a la depleción de linfocitos B y no a la modificación de los niveles de autoanticuerpos. Con lo cual, se considera que el principal aporte de las células B a la patología de la EM es a través de su capacidad de actuar como células presentadoras de antígeno para activar células T, y mediante la producción de citoquinas pro-inflamatorias como la linfotoxina y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Quintana et al., 2014).

### ***Microglia y macrófagos***

La microglia, los macrófagos residentes del SNC, constituyen aproximadamente el 10% de las células del SNC. Al activarse en respuesta a lesiones, inflamación o infecciones, la microglia cambia su aspecto morfológico; de acuerdo al estímulo específico involucrado, se va a determinar el fenotipo funcional que toma la microglia luego de su activación: este fenotipo puede ser pro-inflamatorio (fenotipo M1) o anti-inflamatorio y asociado al remodelado de tejidos y cicatrización (fenotipo M2).

En los estadios tempranos de la EM, grupos de microglia activada y macrófagos periféricos reclutados al SNC pueden identificarse en las lesiones co-localizados con daño axonal y neuronal. La microglia y los macrófagos son activados por citoquinas producidas por las células T y también por productos de la degradación de mielina. Dicha activación resulta en la producción de citoquinas, quemoquinas y metabolitos que regulan directa e indirectamente la neurodegeneración en la EM. Es el caso de la quemoquina CCL2 generada por la microglia activada, y de las citoquinas IL-12 y IL-23 por parte de los macrófagos M1.

A su vez, la microglia y macrófagos producen también moléculas con directa actividad neurotóxica, como por ejemplo el TNF $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  (Quintana et al., 2014).



**Figura 7. Vías inmunológicas en la inflamación y neurodegeneración de la EM.** La activación de células T CD4+ por las células presentadoras de antígenos y en presencia de diversas citoquinas, lleva a su diferenciación a varios subtipos, entre ellos las células Th1 y Th17, que a través de la secreción de citoquinas, estimulación de microglía y astrocitos, llevan a la formación de la placa desmielinizante. A su vez, la activación de microglía y astrocitos, junto con la activación de las células T CD8+ a través de varios mecanismos, llevan a un mayor daño axonal y eventualmente contribuyen con la neurodegeneración observada en la EM. Adaptado de Quintana *et al.*, Medicina, 2014.

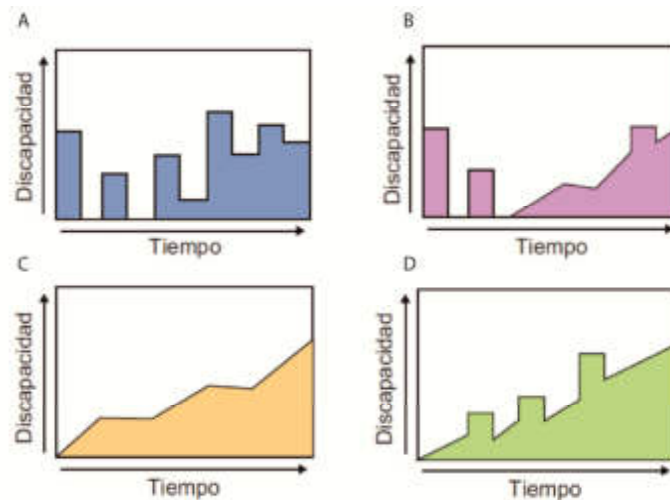
### 1.3. Formas clínicas de EM

Teniendo en cuenta el curso clínico de la EM, es posible clasificar la enfermedad en distintos subtipos.



Aproximadamente el 85% de los pacientes presentan inicialmente un curso de enfermedad remitente-recurrente (EMRR), en el que definidos y repetidos ataques (recaídas o brotes) son seguidos de remisiones. En este caso, puede haber o no déficit neurológico acumulativo tras la remisión, y este patrón puede durar años. Sin embargo, de estos pacientes, aproximadamente el 50% pasará a una forma secundaria-progresiva (EMSP) donde un deterioro neurológico gradual se acumule. Aproximadamente el 15% del total de pacientes presenta un curso primario-progresivo (EMPP) en el que la enfermedad empeora progresivamente después del ataque inicial, sin remisión. Otro subtipo más atípico es el progresivo-recurrente (EMPR) donde se presenta una progresión desde el comienzo, pero a diferencia de los pacientes con EMPP, éstos muestran brotes agudos claros, con o sin recuperación completa. Los períodos entre brotes se caracterizan por una progresión continua (Figura 8) (Hurwitz, 2009).

Aquellas personas que han experimentado un único episodio de desmielinización inflamatoria que sugiere ser el primer ataque de la EM pero que no han tenido un segundo evento, presentan un síndrome clínico aislado (SCA) (Constantinescu *et al.*, 2011; Rangachari y Kuchroo, 2013).



**Figura 8. Formas clínicas de la EM.** Evolución de la discapacidad en función del tiempo en (A) Esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR), (B) Esclerosis múltiple secundaria progresiva (EMSP), (C) Esclerosis múltiple primaria progresiva (EMPP), (D) Esclerosis múltiple progresiva recurrente (EMPR). Adaptado de Arrieta-Antón *et al.*, Semergen, 2015.



#### **1.4. Síntomas**

Los procesos inflamatorios que conducen a la desmielinización y daño axonal en la EM, generan en consecuencia la aparición de lesiones en la materia blanca que se manifiestan como síntomas y signos. La naturaleza de los mismos, va a depender de la localización de las lesiones en el SNC (Hurwitz, 2009). Cada paciente posee un conjunto diferente de síntomas, que pueden cambiar en gravedad y duración, incluso en la misma persona.

Los síntomas más frecuentes al inicio de la enfermedad son sensitivos, debilidad en uno o más miembros, fatiga, neuritis óptica, ataxia (descoordinación), diplopía (visión doble), vértigo y trastornos de la micción. A medida que transcurre la EM, pueden comenzar a aparecer trastornos en el habla, en la audición, de la memoria, cefaleas, disfagia (dificultad para tragar), calambres, dolor facial, parálisis facial, disfunción sexual y síndrome Lhermitte (sensación eléctrica que se extiende de la base del cráneo a las piernas) (Abad *et al.*, 2014).

#### **1.5. Diagnóstico**

A partir de su creación en el 2001, la detección de la EM se realiza con los criterios de diagnóstico de McDonald, los cuales permiten un diagnóstico temprano y a menudo más preciso, manteniendo una alta sensibilidad y especificidad. Para este diagnóstico, se necesitan demostrar eventos separados en el tiempo (DIT) y en el espacio (DIS) sin que exista una mejor posibilidad diagnóstica. Con el objetivo de cumplir dichos criterios de diseminación en el espacio y el tiempo, se utilizan las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), potenciales evocados y cambios inmunológicos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Hurwitz, 2009; Thompson et al., 2018).

Debido a que la presencia de lesiones en la materia blanca, de naturaleza similar a la de la EM es frecuente en la población, el diagnóstico de la enfermedad puede resultarse difícil. Para evitar confusiones en el diagnóstico, se propuso la utilización de la determinación de bandas oligoclonales, ya que es el único método de laboratorio reconocido como sensible para la detección de la EM (Thompson et al., 2018).

#### **1.6. Tratamiento**

Actualmente, los medicamentos para la EM se enfocan en reducir las recaídas, los síntomas y la actividad de la enfermedad a través de un tratamiento sintomático y modificador

de la EM, modulando principalmente los aspectos inmunológicos de la enfermedad, y dentro de ellos solo aquellos relacionados con la respuesta inmune adaptativa (células B y T); siendo las terapias inmunomoduladoras las más utilizadas en los últimos años. Estos fármacos modificadores de la enfermedad, se dividen en dos categorías: terapias inmunomoduladoras de primera y segunda línea.

Los fármacos inmunomoduladores de primera línea con efectos antiinflamatorios reducen significativamente la frecuencia y la gravedad de las recaídas clínicas y la actividad de la enfermedad, así como el grado de discapacidad; son de administración vía intramuscular o vía subcutánea, siendo generalmente bien tolerados. Dentro de este grupo, las drogas más comunes son el interferón beta-1a, interferón beta-1b y el acetato de glatiramer.

Alrededor del 30% de los pacientes no responden a las terapias de primera línea, por lo cual deben recurrir a terapias inmunomoduladoras de segunda línea. Dentro de estos fármacos, podemos mencionar el Natalizumab, Mitoxantrone, Fingolimod, Teriflunomide, Azathioprine, Rituximab, dimetil fumarato, Daclizumab, Alemtuzumab y Ocrelizumab.

Además de los fármacos inmunomoduladores, el tratamiento de las recaídas también implica el uso de altas dosis intravenosas de corticosteroides, la administración de inmunoglobulinas intravenosas y la plasmaféresis (Jančić *et al.*, 2017).

El reto para nuevas terapias de la EM es la inducción de tolerancia inmune antígeno-específica, por ejemplo a través del uso de protocolos de tolerización con péptidos, vacunas de ADN o nanopartículas. Además, las futuras terapias para la EM deben estar dirigidas también a controlar los componentes innatos del sistema inmune (microglia, macrófagos, astrocitos) y a promover la remielinización (Quintana *et al.*, 2014).

## **2. Melatonina**

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina, es una hormona sintetizada y secretada por la glándula pineal durante la noche bajo condiciones normales de luz/oscuridad (Claustrat y Leston, 2015). Es sintetizada a partir de la serotonina y su secreción aumenta a partir del inicio de la oscuridad y tiene su pico mayor en el medio de la noche; además, muestra fluctuaciones estacionales que reflejan el acortamiento de la luz del día durante el otoño e

invierno. Dicho ritmo de síntesis, está generado por un reloj endógeno localizado en el núcleo supraquiasmático (SNC) del hipotálamo.

La glándula pineal no es la única fuente de síntesis de melatonina; a su vez existen otras fuentes periféricas de esta hormona, tales como las células de la médula ósea, astrocitos, macrófagos, células T, fibroblastos y células de la piel (Farez et al., 2016).

La función fisiológica primaria de la melatonina es transmitir información sobre el ciclo diario de luz y oscuridad a las estructuras corporales, para la organización de funciones que responden a estos cambios en el fotoperíodo, tales como la regulación de la temperatura central y los ritmos de sueño y vigilia. Además, se encarga de la organización circadiana de otras funciones fisiológicas como la inmunidad, defensas antioxidantes, hemostasia y regulación de la glucosa (Claustrat y Leston, 2015).

En cuanto a su relación con la inmunidad, se sabe que la melatonina es un regulador positivo de la respuesta inmune y que puede activar tanto aquella innata como adaptativa en el momento de la inflamación. La pinealectomía reduce la proliferación tímica y hace que la glándula del timo se encoja, lo que resulta en un número reducido de linfocitos, eritrocitos y leucocitos. A su vez, tiene la capacidad de llegar a todos los tejidos del cuerpo siendo posible su paso por la BHE para modular la actividad cerebral. De hecho, varios estudios han demostrado que la melatonina tiene un papel en la neuroinmunomodulación (Singh y Jadhav, 2014).

### **2.1. Receptores y vías de señalización**

La melatonina activa dos receptores de membrana: MT1 (codificado por MTNR1A) y MT2 (codificado por MTNR1B). Estos receptores difieren en su conformación y en su localización. MT1 es altamente expresado en el núcleo supraquiasmático, hipocampo, núcleo accumbens, amígdala, sustancia negra, hipotálamo, cerebelo y en sitios periféricos tales como la médula ósea y el sistema inmune; mientras que el MT2 es expresado en la retina y en menor medida en el hipocampo y corteza cerebral.

La activación del receptor MT1 mediada por la melatonina, modula un gran número de vías de señalización. Esta hormona, bloquea la síntesis de AMPc, la actividad de la proteína

quinasa A (PKA), y la unión de elementos de respuesta a AMPc. Además, la activación de MT1 lleva a la fosforilación de ERK1/2, MEK1/2 y JNK (Farez et al., 2016).

## 2.2. Melatonina y su relación con la EM

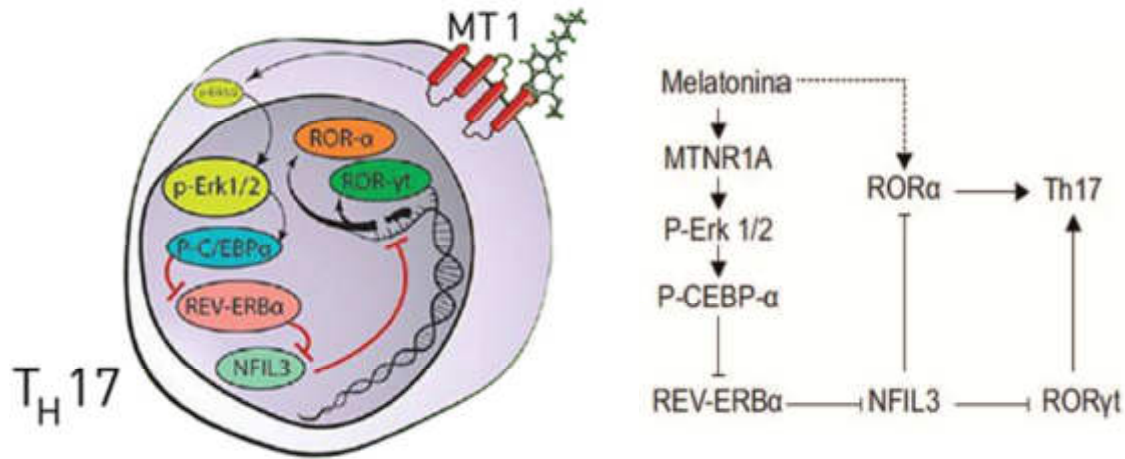
Los niveles de melatonina muestran una variabilidad estacional, aumentando en otoño e invierno, y disminuyendo en primavera y verano debido a la duración de la luz diaria. Luego de observar que este patrón muestra una correlación inversa con la incidencia de la EM (que tiene su pico en primavera y verano), se determinó que la melatonina interviene sobre determinados tipos celulares que afectan la actividad de dicha enfermedad.

La interacción entre células pro-inflamatorias y reguladoras controla el desarrollo de enfermedades autoinmunes tales como la EM; y la melatonina es responsable del control del balance entre estas células T patogénicas (Th17) y reguladoras (Tr1) a través de distintos mecanismos moleculares (Farez *et al.*, 2015; Farez *et al.*, 2016).

### 2.2.1. La melatonina suprime la generación de células Th17

La melatonina se une al receptor de membrana MTNR1A y activa a Erk1/2. Luego de su activación, Erk1/2 se fosforila y transloca hacia el núcleo de la célula, donde activa a la proteína  $\alpha$  de unión al activador CAAT (C/EBP $\alpha$ ), un factor de transcripción involucrado en la regulación de la diferenciación celular. En consecuencia, C/EBP $\alpha$  reprime la expresión de REV-ERB $\alpha$ . REV-ERB $\alpha$ , codificado por el gen *nrl1*, es un componente del reloj circadiano que promueve la diferenciación celular en Th17, limitando la expresión de NFIL3, un inhibidor directo de la transcripción de ROR $\gamma$ t. Luego de que la melatonina inhibe la expresión de REV-ERB $\alpha$ , NFIL3 queda habilitado para bloquear la expresión de ROR $\alpha$  y ROR $\gamma$ t, limitando la diferenciación y función de células Th17 (Figura 9).

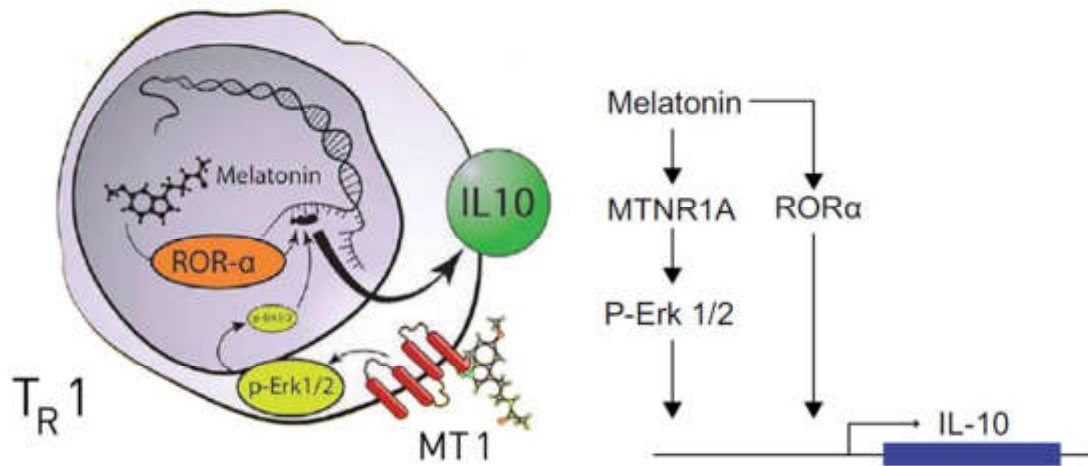
Como resultado, la melatonina activa componentes del reloj circadiano que generan la disminución de la diferenciación de células Th17 y de sus citoquinas IL-17 (Farez, Mascanfroni, et al., 2015).



**Figura 9. La melatonina suprime la generación de células Th17 a través del receptor de membrana MTNR1A (MT1).** Esquema de los mecanismos moleculares que median los efectos de la melatonina en la diferenciación de células Th17. Adaptado de Farez *et al.*, Cell, 2015; Farez *et al.*, BioEssays, 2016.

**2.2.2. La melatonina aumenta los niveles de células Tr1 productoras de IL-10**

La melatonina promueve la diferenciación en Tr1 a través de la unión con el receptor de membrana MTNR1A y la activación de Erk1/2, el cual induce la expresión de IL-10 en células T y células dendríticas. A su vez, se identificó a RORα como mediador de los efectos de la melatonina en las células Tr1. Es decir, que la melatonina utiliza múltiples vías para impulsar la diferenciación de células Tr1 (Figura 10).



**Figura 10.** La melatonina aumenta la diferenciación celular de Tr1 a través de la activación de MTNR1A-Erk1/2 y ROR $\alpha$ , los cuales promueven la producción de IL-10. Diagrama esquemático representando los efectos de la melatonina sobre las células Tr1. Adaptado de Farez *et al.*, Cell, 2015; Farez *et al.*, BioEssays, 2016.

# Hipótesis

### **Hipótesis**

Los niveles de melatonina tienen una correlación inversa con la actividad clínica de la EM, demostrado a través de la administración de la misma en el modelo animal de la enfermedad, conocida como Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE). La melatonina suprime la diferenciación y función de los linfocitos  $T_H17$ , y a su vez potencia las mismas en células reguladoras  $T_R1$  tanto en ratones como en humanos a través de MTNR1A y REV-ERB $\alpha$ . En base a estas observaciones, se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

*“Las vías de señalización de la melatonina actúan sobre el sistema inmune y el sistema nervioso central (SNC) controlando la inflamación en la Esclerosis Múltiple”.*



# Objetivos

## **Objetivos**

El objetivo general de este proyecto es caracterizar el rol de las vías de señalización de la melatonina en el curso de la Esclerosis Múltiple (EM), así como el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad.

Para alcanzar el objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- a. Investigar el efecto del modulador de REV-ERB $\alpha$  en la diferenciación de linfocitos T patogénicos y reguladores.
- b. Analizar la relevancia del modulador del eje MTNR1A/REV-ERB $\alpha$  en la severidad clínica del modelo animal de EM.

# **Materiales y métodos**

## **Materiales y métodos**

### **1. Análisis *in vitro***

#### **1.1. Obtención de células**

Se extrajeron células del bazo y ganglios linfáticos de ratones C57BL/6 de 6 semanas de edad. A continuación se aislaron las células de dichos tejidos mediante la utilización de un colador celular de 70µm de poro en presencia de PBS, las cuales fueron luego centrifugadas a 300 G durante 10min.

Se retiró el sobrenadante y se prosiguió a aislar aquellas células T CD4+ mediante la utilización del Kit EasySep (Stemcell) siguiendo su protocolo correspondiente. Brevemente, se resuspendieron  $1 \times 10^8$  células/ml en Buffer EasySep, se adicionó 50µl de suero de rata y 50µl de cocktail de aislamiento EasySep por cada ml de muestra y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se agregaron 75µl de esferas magnéticas EasySep por cada ml de muestra, se incubó nuevamente por 2,5 minutos y se adicionó medio RPMI seguido de su incubación en magneto EasySep por 2,5 minutos. Por último se volcó el contenido del tubo conteniendo los linfocitos T CD4+ en uno nuevo.

#### **1.2. Recuento de células**

Para el recuento de células, se tomó una alícuota de 10µl de la suspensión celular y se realizó una dilución 1:1 con 10µl de azul de Tripán. A continuación, se sembró y contabilizó en una cámara de Neubauer.

#### **1.3. Diferenciación celular**

Se prosiguió a plaquear 500 000 células por pocillo en medio RPMI (FBS 10%, Pen/strep 1%, L-Glutamina 1%, NEAA 1X, β mercaptoetanol 1X y piruvato de sodio 1X) en una placa de 96 well previamente incubada con anti-CD3 (2µg/ml) y anti-CD28 (2µg/ml) durante 3 horas a 37°C para la posterior activación de las células.

Dichas células fueron a su vez plaqueadas e incubadas en presencia de factores estimulantes de su diferenciación en células Th0 y Th17 y en presencia o ausencia de SR8278 (1µM y 10µM) durante 5 días.

Para la diferenciación de las células TCD4<sup>+</sup> se adicionaron las citoquinas y anticuerpos correspondientes: para la diferenciación en células Th0 se agregó anti-IFN $\gamma$  (2  $\mu$ g/ml) y anti-IL4 (1 $\mu$ g/ml); y para la diferenciación en Th17 anti-IFN $\gamma$  (2  $\mu$ g/ml), anti-IL4 (1  $\mu$ g/ml), TGF $\beta$ 1 (15 ng/ml), IL6 (30 ng/ml) y al día 2 de incubación se adicionó IL23 (30 ng/ml).

Las condiciones de incubación fueron mantenidas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>.

#### **1.4. Análisis de expresión mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real**

##### **1.4.1. Extracción de RNA**

Trascurridos los 5 días de incubación, se centrifugaron las células y se resuspendieron en 750 $\mu$ l de TRIzol por condición y a continuación se agregaron 150 $\mu$ l de cloroformo por tubo para la separación del RNA. Luego de una centrifugación de 15 minutos a 12000g a 4°C, se extrajo la fase acuosa conteniendo el RNA.

Para la precipitación del RNA, se utilizaron 450 $\mu$ l (1 vol) de isopropanol y se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 12000g y 4°C. A continuación, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 75%, seguido del secado del pellet en un termobloque a 50°C durante 5 minutos. Por último se resuspendió dicho pellet en 20 $\mu$ l de agua libre de nucleasas.

Posteriormente se determinó la concentración y pureza del ARN mediante el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

##### **1.4.2. Síntesis de cDNA**

Se utilizó 800 ng de ARN total de cada muestra, se lo llevó a 10 $\mu$ l con agua y luego calentó en una termocicladora por 5 minutos a 105°C para eliminar cualquier estructura secundaria.

A continuación se sintetizó la primera hebra del ADN copia (cDNA) adicionando por tubo: 1 $\mu$ l de retrotranscriptasa del M-MLV (Maloney Murine Leukemia Virus), 4 $\mu$ l de buffer

correspondiente, 1µl de dNTPs, 1µl de hexámeros de secuencia variable (random primers) y 3µl de agua libre de nucleasas para llegar a un volumen final de 20µl por tubo.

Posteriormente se realizó la segunda parte de la PCR detallada en la Tabla I.

Proceso	Tiempo	Temperatura
Alineado de primers	10 min	25°C
Elongación	50 min	37°C
Inactivación de la enzima	10 min	70°C

**Tabla I. Segunda etapa de la reacción en cadena de la polimerasa.**

### 1.4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR en tiempo real

Para cada microtubo a correr, se tomaron 5µl de SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Thermo Fisher Scientific), 0,2µl de ROX dye, 0,4µl de cada oligonucleotido correspondiente (5µM), 2µl de cDNA y 2µl de agua libre de nucleasas para llegar a un volumen final de 10µl por tubo. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se encuentran detalladas en la Tabla II.

Posteriormente se inició el programa de PCR con las temperaturas y tiempos de incubación indicados en la Tabla III.

Gen	Secuencia forward 5'-3'	Secuencia reverse 5'-3'
nr1d1	GCAAGGCAACACCAAGAATG	GCGTGAAGCTCATAGAGAAG
il10	ATAACTGCACCCACTTCCCA	GGGCATCACTTCTACCAGGT
il17	TCTCCACCGCAATGAAGACC	CACACCCACCAGCATCTTCT
ifng	TTCTTCAGCAACAGCAAGGC	TCAGCAGCGACTCCTTTTCC
gapdh	GCCATCAACGACCCCTTCATT	GCTCCTGGAAGATGGTGATGG

**Tabla II. Secuencias de oligonucleótidos utilizados.**

Proceso	Tiempo	Temperatura	Numero de ciclos
Incubación de la uracil-DNA-glicosilasa (UDG)	2 min	50°C	1
Inactivación de la UDG y activación de la polimerasa	10 min	95°C	1
Desnaturalización	15 seg	95°C	40
Alineado de primers	1 min	55°C	
Curva de melting	15 seg	95°C	1
	1 min	70°C	
	15 seg	90°C	

**Tabla III. Programa utilizado de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.**

## 2. Análisis *in vivo*

### 2.1. Animales experimentales

Se utilizaron ratones C57BL/6 hembras de 4 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en condiciones estándares recibiendo agua y comida *ad libitum* con un ciclo 12:12 hs. de luz/oscuridad y temperatura ambiente controlada de 22-24°C, en el bioterio de la Fundación Instituto Leloir.

### 2.2. Modelo experimental de EM: Encefalitis Autoinmune Experimental

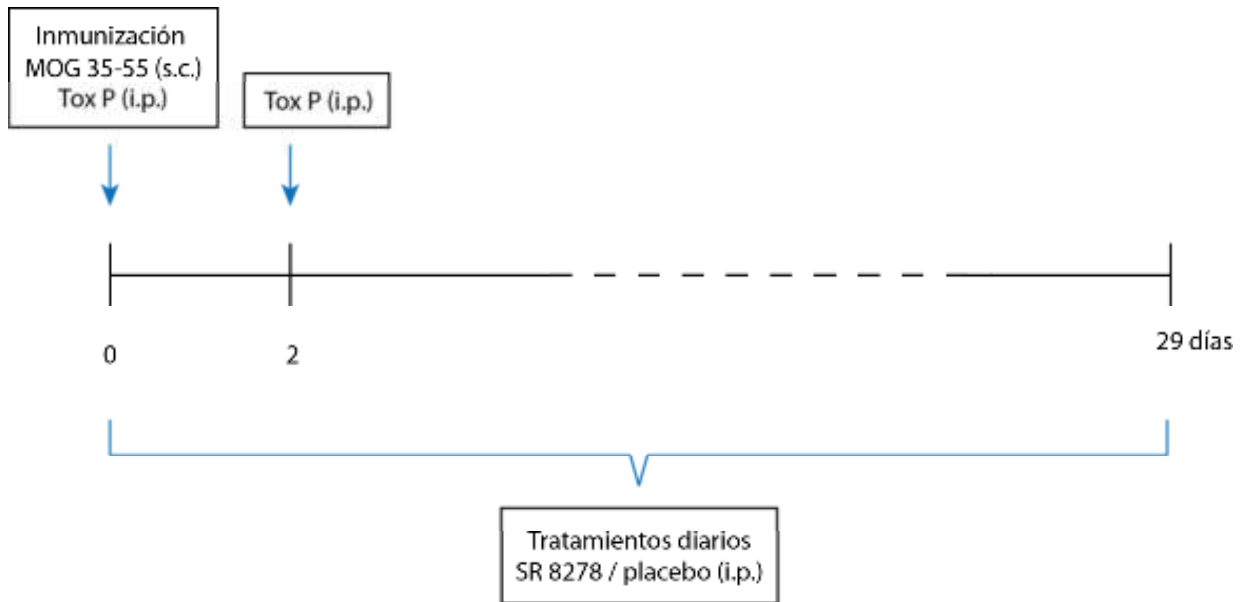
#### 2.2.1. Inducción

Se indujo Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE) (Constantinescu et al., 2011) en 20 ratones C57BL/6 hembra de 4 semanas de edad mediante inmunización subcutánea (s.c.) con 200µl de MOG 35-55 (2mg/ml) emulsificado en Adyuvante Completo de Freund (CFA) suplementado con *Mycobacterium tuberculosis* inactivado por calor (*M. tuberculosis*,

cepa H37Ra) (5mg/ml). Así mismo, los animales recibieron 200ng de toxina Pertussis (ToxP) purificada de la bacteria *Bordetella pertussis* vía intraperitoneal (i.p.) los días 0 y 2 (Figura 11).

### 2.2.2. Tratamiento

Se les administró a los grupos experimentales desde el día cero vía intraperitoneal y diariamente los correspondientes tratamientos. Los grupos experimentales tratados durante 28 días fueron: grupo control (n=10) quien recibió 100µl de solución salina estéril con 0,33% de dimetilsulfóxido (DMSO); y el grupo tratamiento (n=10) 10µg de SR8278 (antagonista de REV-ERB $\alpha$ ).



**Figura 11. Inducción y tratamiento del modelo de EAE.**

### 2.2.3. Evaluación clínica

Se examinaron de forma diaria los signos clínicos de los ratones a partir del día 10 y se les asignó un puntaje del 0-5 según su estado: 0, asintomático; 1, parálisis de la cola; 2, parálisis en patas traseras; 3, parálisis en cuatro miembros; 4, moribundo; 5, muerte.



### **2.3. Pesaje de órganos**

El día 29 post inmunización, se sacrificaron los animales y se extrajeron hígado y bazo para determinar su peso en una balanza digital de precisión. El pesaje se realizó inmediatamente después de su extracción.

### **2.4. Análisis histológico**

Para el análisis histológico, se sacrificaron los ratones al día 29 post inmunización y se les extrajo la médula espinal. Se fijaron los tejidos con paraformaldehído (PFA) 4%, con su posterior inclusión en parafina y corte de 6µm de espesor con un micrótopo (Leica RM2235). A continuación, se realizaron tinciones de dichos cortes con la técnica hematoxilina-eosina para ver infiltrados inflamatorios; tinción con azul Luxol rápido para ver el grado de desmielinización; y por último, una tinción de plata de Bielschowsky para la determinación de pérdida axonal.

#### **2.4.1. Tinción hematoxilina-eosina**

Se expusieron los portaobjetos, con los cortes correspondientes, a una batería de hidratación conteniendo xilol, etanol 100°, etanol 96° y agua. Se los sumergió en dicho orden por 5 minutos en cada uno, seguido de un minuto en hematoxilina con su posterior lavado en agua tibia y final tinción con eosina por tres minutos. Por último, se expusieron a una batería de deshidratación, esta vez en orden creciente: etanol 96°, etanol 100° y xilol.

#### **2.4.2. Tinción con azul Luxol rápido**

Para generar la solución de tinción de azul Luxol rápido (LFB) al 0,1%, se tomaron 200mg de LFB, 200ml de etanol 96° y 10ml de ácido acético glacial al 10%. Luego de la hidratación de las muestras, se sumergieron las mismas por 24hrs en la solución de tinción LFB. Transcurrido el tiempo de tinción, se realizaron los enjuagues correspondientes con etanol 96°, carbonato de litio y etanol 70° para retirar excedentes del colorante.

Esta tinción se puede realizar en combinación con otras, proporcionando un método más útil y confiable para la demostración de procesos patológicos en el SNC. En nuestro caso realizamos posteriormente una tinción de hematoxilina-eosina tal como fue descripta anteriormente (2.4.1.).

### **2.4.3. Tinción de plata de Bielschowsky**

Se preparó la solución de nitrato de plata al 20% con agua destilada y se calentó por 15 minutos a 37°C. Además, se utilizaron 30ml de dicha solución junto con 20ml de etanol 96° y el agregado gota a gota de amoníaco, para la generación de una solución de lavado Glees.

Para la tinción de las muestras, luego de pasar por la batería de hidratación, se sumergieron los portaobjetos en la solución previamente preparada de nitrato de plata por 45 minutos a 37°C. Se realizó un lavado con formol al 10% con agua corriente y otro lavado con la solución Glees, con el posterior agregado de solución de formol 10% para frenar la reacción. Por último se enjuagaron las muestras con tiosulfato de sodio para eliminar la plata excedente y finalmente se deshidrataron utilizando los alcoholes ya mencionados.

## **2.5. Análisis de proliferación**

### **2.5.1. Activación periférica *in vivo***

Para la activación periférica de linfocitos, se indujo EAE en ratones hembra C57BL/6 mediante inmunización con MOG 35-55 y CFA como fue anteriormente descrito, pero evitando la inyección con toxina Pertussis.

Se dividieron los animales en grupo control (n=2) y grupo tratamiento (n=3) y se los trató siguiendo las mismas dosis ya descriptas (2.2.2.).

### **2.5.2. Extracción de muestras**

Al día 7 post inmunización se sacrificaron los ratones y se les extrajo bazo y ganglios linfáticos para la extracción de esplenocitos mediante la utilización de un colador celular de 70µm. Se centrifugaron las células durante 5 minutos a 1500 rpm, seguido de una incubación con 3ml de buffer de lisis de Amonio-Cloruro-Potasio (ACK) durante 3 minutos a temperatura ambiente. Para neutralizar dicho buffer, se adicionaron 10ml de medio (RPMI suplementado con L-glutamina, 10% de suero fetal bovino, 0,1% 2βmercaptoetanol y 0,02% de gentamicina).

### 2.5.3. Marcación con CFSE

Para medir la proliferación celular de linfocitos periféricos de ratones tratados con SR8278 o placebo, se realizó una marcación con éster de succinimidil de carboxifluoresceína (CFSE) (5 $\mu$ M). Cuando las células marcadas de este modo se dividen, el colorante fluorescente se divide por igual en cada una de las células hijas, de modo que cada hija tiene solo la mitad del colorante que la célula progenitora. La disminución de la fluoresceína se puede evaluar mediante la medición por citometría de flujo.

Para esto, se centrifugaron las células por 5 minutos a 1500rpm y se resuspendió el pellet en 10ml de solución de tinción Celltrace (5 $\mu$ M) seguido de una incubación a 37°C durante 20 minutos. Se llevó a un volumen final de 25ml con medio RPMI, se incubó nuevamente durante 5 minutos a 37°C y centrifugó. Finalmente se resuspendió el pellet en medio RPMI (suplementado con L-glutamina, 10% suero fetal bovino, 0,1% 2 $\beta$ mercaptoetanol y 0,02% gentamicina).

### 2.5.4. Reestimulación de linfocitos

Dichas células fueron incubadas por duplicado para reestimulación *in vitro* durante tres días en presencia de MOG 35-55 (100 $\mu$ g/ml). Para lo cual se plaquearon 500 000 células por pocillo.

Las condiciones de incubación fueron mantenidas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>, en medio RPMI suplementado con L-glutamina, 10% de suero fetal bovino, 0,1% 2 $\beta$ mercaptoetanol y 0,02% de gentamicina.

Luego de tres días, se centrifugaron las células placebo incubadas en presencia y ausencia de SR8278, y se aislaron sus sobrenadantes para futuros ensayos de citoquinas. El precipitado fue aislado y resuspendido en TRIzol (Thermo Fisher Scientific) para ensayos de PCR en tiempo real.

### 2.5.5. Marcación extracelular

Aquellas células tratadas *in vivo* con placebo o con SR8278, luego de su incubación en presencia de MOG 35-55, fueron centrifugadas y resuspendidas en 50 $\mu$ l de tampón fosfato salino (PBS) y 0,25 $\mu$ l de anticuerpo anti CD4+ (concentración 1:200) por pocillo. Las mismas

se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad seguido de un lavado con PBS y medición por citometría en un citómetro de flujo Guava® easyCyte (Merck Millipore).

## **2.6. Análisis de infiltración del SNC**

Se indujo EAE en ratones C57BL/6 tal como fue descrito en el punto 2.2.1. seguido de la extracción de muestras al día 14 post inmunización.

### **2.6.1. Extracción de muestras**

Se anestesiaron los animales y perfundieron con PBS frío para la extracción de cerebro y médula espinal. Estos tejidos fueron homogeneizados en presencia de medio RPMI utilizando un mortero y llevados luego a 10ml con más medio.

### **2.6.2. Obtención de linfocitos T**

Con el fin de separar los linfocitos de la muestra obtenida, se realizó un gradiente de percoll. Para esto, se adicionaron 3ml de solución isotónica de percoll (SIP)(90% percoll en HBSS 10X) en la muestra homogeneizada alcanzando un 30% de SIP, la cual se volcó suavemente en un tubo conteniendo 2ml de SIP al 70% en HBSS 1X, evitando la mezcla de ambas fases. A continuación, se centrifugaron dichos tubos a 500G durante 30 minutos y cuidadosamente se recolectó mediante pipeta la interfase 70%-30% sin perturbar el gradiente obtenido. Esta interfase conteniendo los linfocitos, fue transferida a un tubo conteniendo 8ml de HBSS 1X. Se mezcló por inversión y centrifugó durante 7 minutos a 500G. Finalmente se retiró el sobrenadante y resuspendió el pellet en buffer EasySep (EasySeP Mouse CD4+ T Cell Isolation Kit, Stemcell) seguido de su protocolo correspondiente para la separación de linfocitos T.

### **2.6.3. Análisis de expresión por RT-qPCR**

Una vez obtenidos los linfocitos T, se resuspendieron en TRIzol para la correspondiente extracción de RNA seguido de la síntesis de cDNA y corrida de PCR en tiempo real, tal como fue anteriormente descrito (1.4.).

### **2.7. Análisis estadístico**

Los resultados se han expresado como los valores de la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) cuando corresponde. El análisis estadístico se realizó aplicando el test *t* de Student para dos grupos. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados significativos. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando GraphPad Prism 6.

# Resultados

## **Resultados**

### **1. Efecto del SR8278 *in vitro***

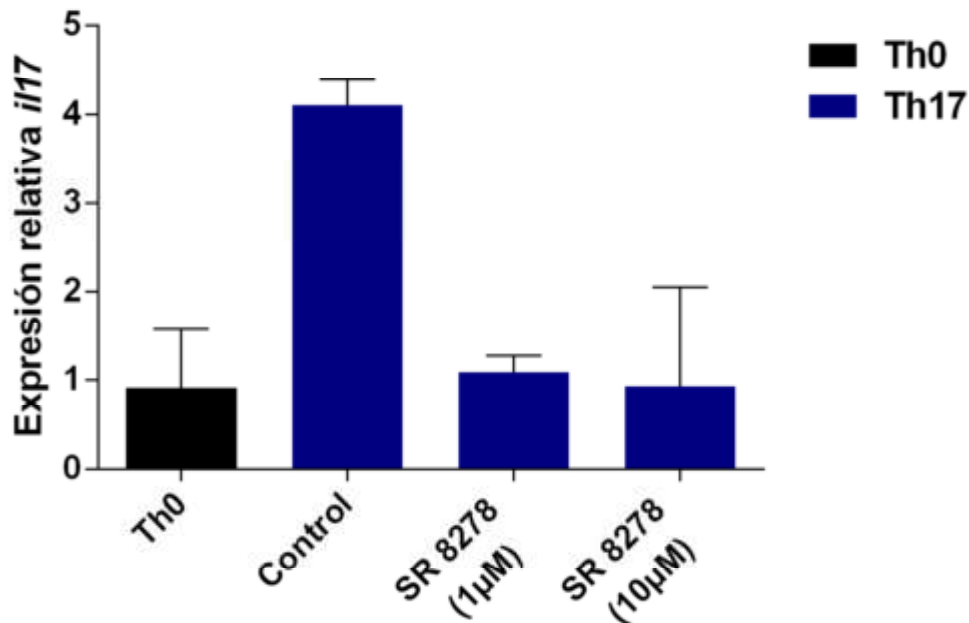
Para estudiar la relevancia del modulador de REV-ERB $\alpha$  en la vía de señalización de la melatonina *in vitro*, determinamos el perfil de mediadores inflamatorios a través de la técnica de PCR en tiempo real.

#### **1.1. Expresión de citoquinas pro-inflamatorias**

Para determinar el efecto del antagonista SR8278 sobre la diferenciación en linfocitos Th17, evaluamos la expresión de los genes *il17* e *ifng* implicados en la respuesta inflamatoria.

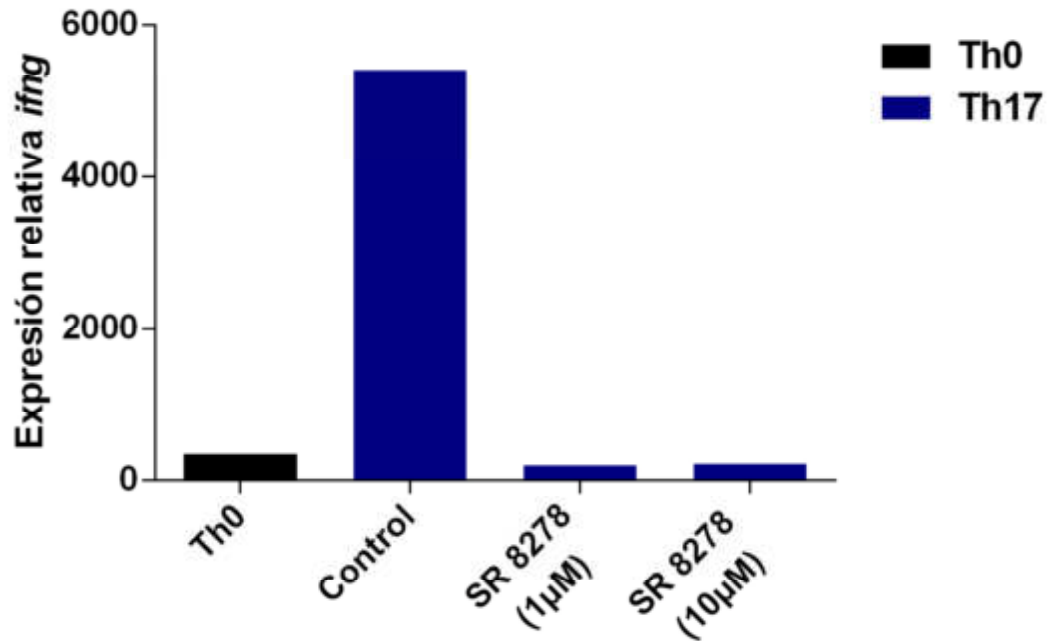
En este ensayo, diferenciamos linfocitos T CD4+ en células Th0 y Th17 y los incubamos durante 5 días en ausencia o presencia de SR8278 (1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M). Posteriormente, se realizó un análisis por PCR en tiempo real.

En el análisis de expresión de la citoquina IL-17 pudimos observar una disminución de la misma en células Th17 tratadas con SR8278 1 $\mu$ M, y una disminución aún mayor en aquellas tratadas con 10 $\mu$ M del inhibidor respecto del control (Figura 12).



**Figura 12. Expresión de citoquina pro-inflamatoria *il17*.** Linfocitos T CD4+ fueron diferenciados en células Th0 y Th17 en presencia o ausencia de SR8278 y analizados por RT-qPCR. Los datos son representativos de dos experimentos independientes (media y SEM).

Posteriormente, en el análisis por RT-qPCR de la citoquina IFN $\gamma$ , vimos una disminución en la expresión en células Th17 tratadas con SR8278 10 $\mu$ M y levemente menor en las tratadas con 1 $\mu$ M del modulador respecto del control (Figura 13).



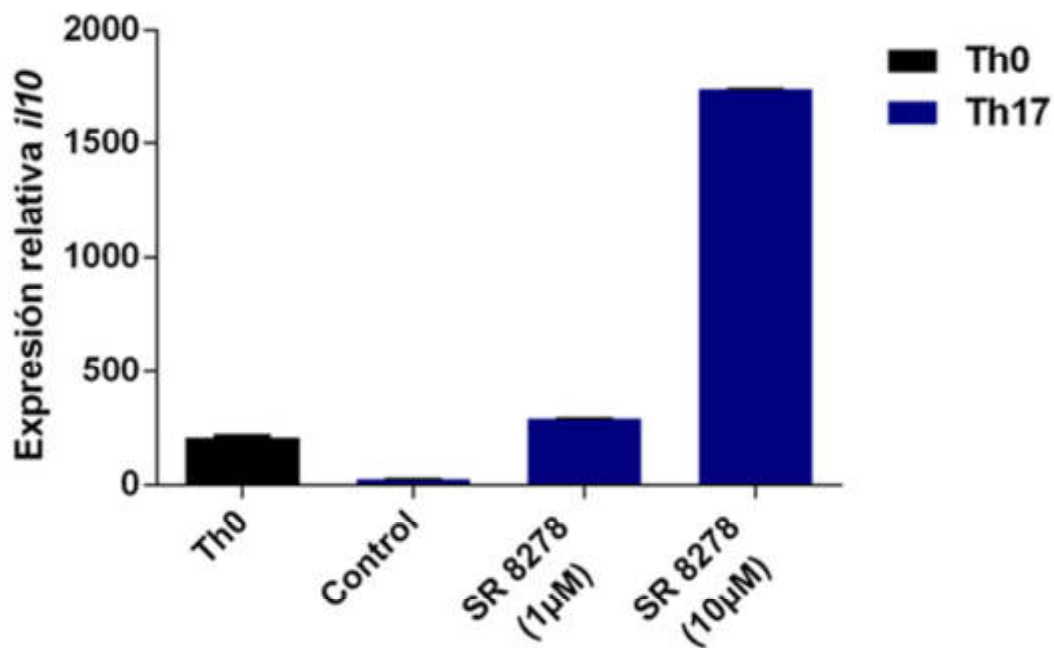
**Figura 13. Expresión de citoquina pro-inflamatoria *ifng*.** Linfocitos T CD4+ fueron diferenciados en células Th0 y Th17 en presencia o ausencia de SR8278 y analizados por RT-qPCR. Los datos son representativos de dos experimentos independientes (media y SEM).

### 1.2. Expresión de citoquinas anti-inflamatorias

Además de evaluar el impacto del antagonista SR8278 en la expresión de genes pro-inflamatorios, analizamos la expresión de la citoquina IL-10 implicada en una respuesta anti-inflamatoria.

Para esto, se diferenciaron nuevamente los linfocitos T CD4+ en células Th0 y Th17, se las incubó en ausencia y presencia de SR8278 (1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M) y luego analizó su expresión por RT-qPCR. Aquí pudimos observar un aumento en la expresión de *il10* en aquellos linfocitos T CD4+ tratados con 1 $\mu$ M del modulador, y una expresión aún mayor en aquellas tratadas con 10 $\mu$ M respecto del control (Figura 14).





**Figura 14. Expresión de citoquina anti-inflamatoria *i10*.** Linfocitos T CD4+ fueron diferenciados en células Th0 y Th17 en presencia o ausencia de SR8278 y analizados por RT-qPCR. Los datos son representativos de dos experimentos independientes (media y SEM).

## 2. Efecto del SR8278 en la severidad clínica de la Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE)

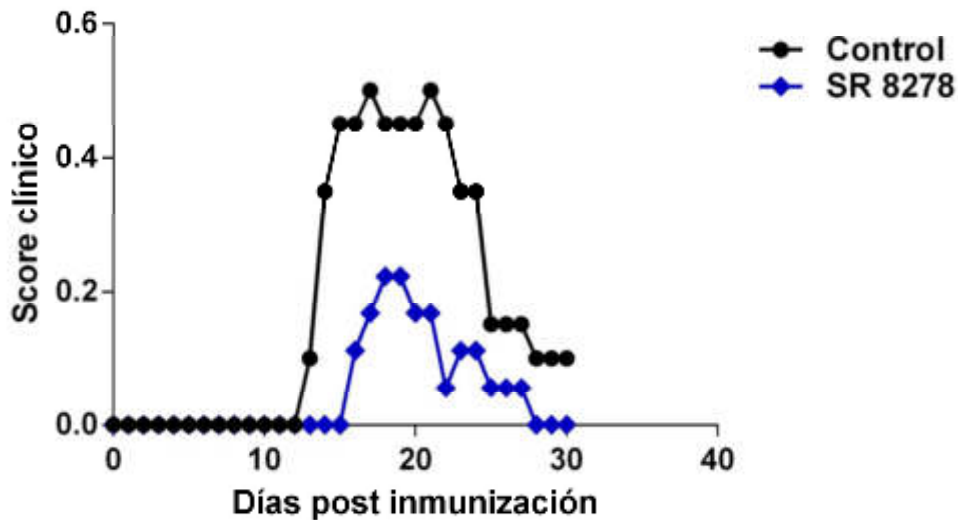
Para estudiar la relevancia del modulador de REV-ERB $\alpha$  en la vía de señalización de la melatonina *in vivo*, se utilizó el modelo murino de Encefalitis Autoinmune Experimental. Se evaluaron los efectos de la inflamación en el SNC mediante el tratamiento con el compuesto SR8278, un antagonista de REV-ERB $\alpha$ .

### 2.1. Efecto clínico

Se indujo EAE en 20 ratones C57BL/6 mediante la inmunización con el péptido MOG 35-55. Para estudiar los efectos del antagonista de REV-ERB $\alpha$  en la inflamación del SNC, se trataron a los animales con el modulador SR8278 diariamente durante 29 días a partir de la inmunización. A su vez, desde el día 10 post inmunización, se evaluaron los signos clínicos de los ratones y se les asignó un puntaje numérico según su estado.

El tratamiento con SR8278 resultó en un retraso en la aparición de los signos clínicos junto con una inhibición en el desarrollo de la EAE y una disminución de la severidad de la

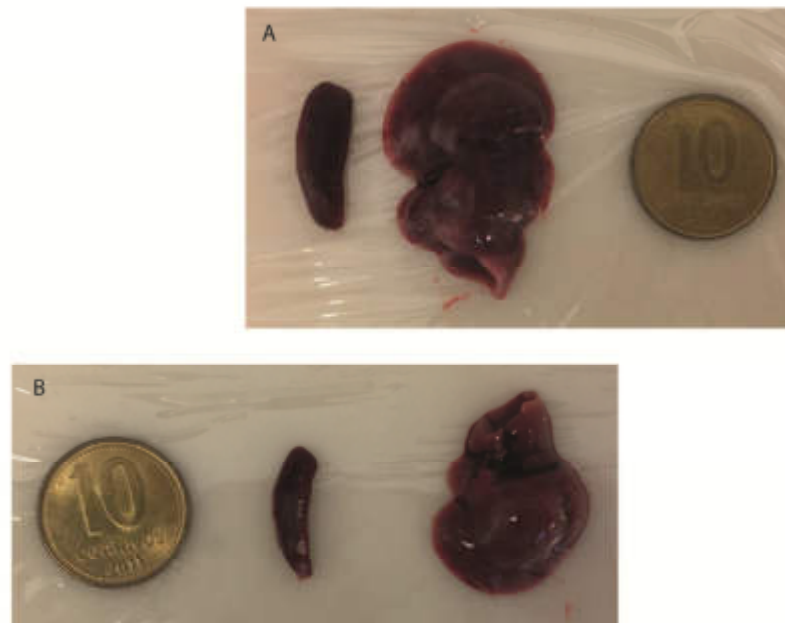
enfermedad en comparación con el grupo control (tratado con DMSO) (Figura 15). Además, pudimos observar una recuperación de los síntomas en los ratones tratados con SR8278, que no se detectó en el grupo control.



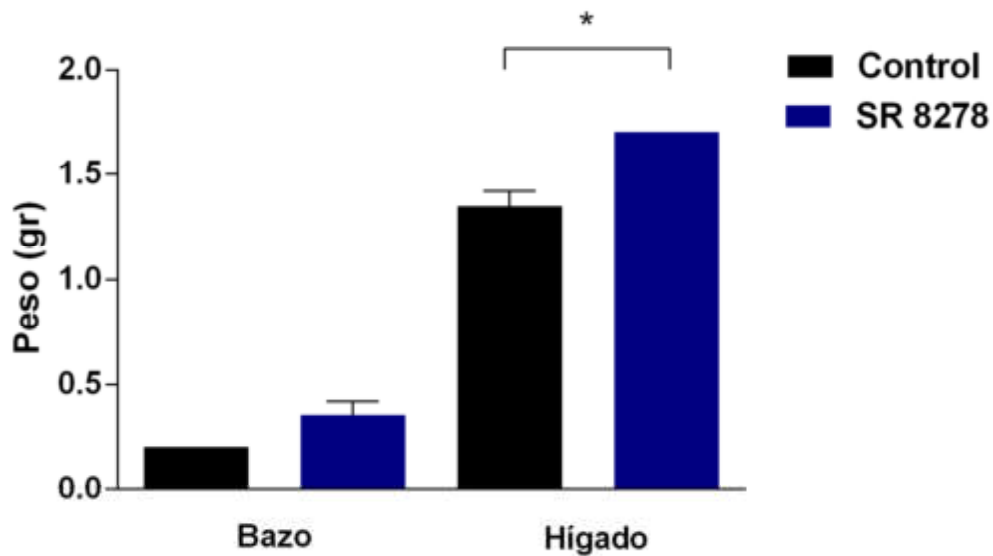
**Figura 15. Efecto de SR8278 en la severidad clínica de EAE.** Se indujo EAE por inmunización con MOG 35-55 en ratones C57BL/6 y se trataron diariamente vía intraperitoneal con SR8278 o DMSO (placebo). Los signos clínicos de la enfermedad se evaluaron como fue descrito previamente (Materiales y métodos 1.2.3.).

## 2.2. Pesaje de órganos

Luego de 30 días de tratamiento, se sacrificaron los animales y se extrajeron hígado y bazo (Figura 16). Inmediatamente luego de su extracción, se pesaron ambos órganos de aquellos ratones tratados con SR8278 o placebo (Figura 17). Aquí pudimos observar un aumento en el peso y tamaño del bazo de aquellos ratones tratados con SR8278 respecto de los controles, y un aumento significativo del peso y tamaño del hígado del grupo tratado también respecto del grupo control.



**Figura 16. Hígado y bazo de ratones tratados *in vivo*.** Órganos de ratones C57BL/6 con inducción de EAE, extraídos luego de 29 días de tratamiento con (A) SR8278 y (B) placebo (DMSO).



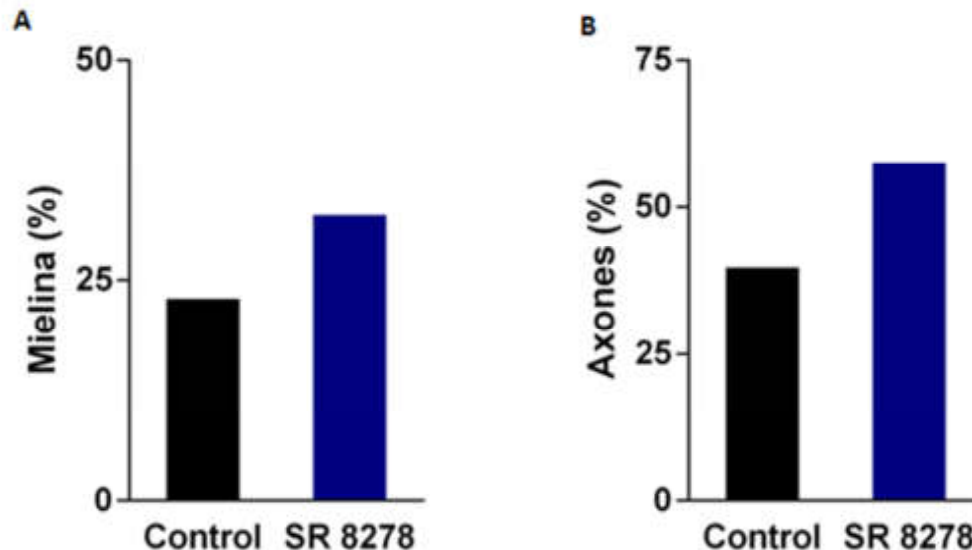
**Figura 17. Peso de hígado y bazo de ratones tratados *in vivo*.** Peso en gramos de ambos órganos de ratones C57BL/6 tratados con SR8278 o placebo (DMSO). Los datos son representativos de dos experimentos independientes (media y SEM). \* $p < 0,05$ ; test-t no apareado.

### 2.3. Análisis histológico

Los procesos inflamatorios de la EAE así como también de la EM, conducen desde un punto de vista neuropatológico a la generación de característicos infiltrados inflamatorios, placas desmielinizantes y daño axonal en el SNC.

Para determinar los mecanismos por los cuales el modulador SR8278 ejerce un efecto terapéutico sobre la EAE, analizamos las características histopatológicas del SNC de los animales. A este efecto, luego de su eutanasia, se extrajeron las médulas espinales de ambos grupos para su análisis histológico. Luego de su fijación, inclusión y corte, se realizaron distintas tinciones: una tinción con azul Luxol rápido seguida de una tinción hematoxilina-eosina para poder determinar la desmielinización, y una tinción de plata de Bielschowsky para observar el daño axonal. Se tomaron imágenes de ambas tinciones y se comparó mediante la herramienta ImageJ su grado de desmielinización y pérdida axonal.

Luego de la cuantificación de mielina en los cortes teñidos con azul Luxol rápido, pudimos observar una disminución de la misma en aquellos animales control respecto de los tratados con SR8278 (Figura 18A). De la misma manera, en los preparados que recibieron la tinción de plata, pudimos ver un mayor porcentaje de axones en el grupo tratado con el modulador respecto de aquellos control (Figura 18B).



**Figura 18. Cuantificación de preparados histológicos de médulas de ratones C57BL/6 tratados *in vivo*.** Luego de 29 días de tratamiento con SR8278 o placebo se extrajo la médula espinal. Se realizaron cortes axiales de las médulas y se tiñeron con azul Luxol rápido para

determinar (A) desmielinización y plata con el método de Bielschowsky para determinar (B) daño axonal.

#### **2.4. Efecto *in vivo* de SR8278 a nivel periférico**

Luego de la evaluación del efecto terapéutico del SR8278 en el SNC mediante histología, analizamos su relevancia a nivel periférico.

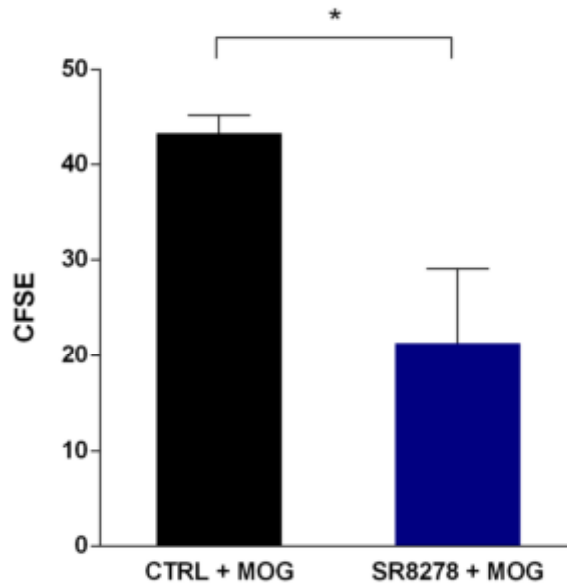
Para esto, se realizó una nueva inducción de EAE en ratones C57BL/6 y se trataron durante una semana con SR8278 o placebo (DMSO). Transcurrido este tiempo, se sacrificaron los animales y se les extrajo el bazo y ganglios linfáticos para el aislamiento de linfocitos T periféricos mediante la utilización de un colador celular y una incubación con buffer ACK para la lisis de glóbulos rojos.

##### **2.4.1. Proliferación de linfocitos T**

Con el fin de entender si el efecto terapéutico del SR8278 deriva de su acción sobre los linfocitos a nivel periférico, realizamos un ensayo de proliferación de linfocitos T periféricos.

A este efecto, luego de aislar los esplenocitos, se les realizó una marcación con CFSE para observar su proliferación. Posteriormente, los linfocitos fueron reestimulados *in vitro* con MOG 33-35 (100µg/ml) durante tres días, seguido de una tinción extracelular con anticuerpos anti CD4+ previo a su cuantificación por citometría de flujo (Figura 19).

Luego del análisis *ex-vivo*, pudimos observar que las células aisladas de ratones tratados *in vivo* con placebo proliferan de forma específica en respuesta al antígeno, mientras que aquellas células aisladas de ratones tratados con SR8278, disminuyen significativamente la capacidad de proliferación frente al antígeno MOG.



**Figura 19. Proliferación de linfocitos T periféricos.** 7 días luego de la inducción de EAE y tratamiento con SR8278 o placebo (DMSO) en ratones C57BL/6, se aislaron células del bazo y ganglios linfáticos, se marcaron con CFSE y reestimularon *in vitro* con MOG 35-55 (100µg/ml). Se determinó la proliferación luego de 3 días de estimulación mediante cuantificación por citometría de flujo. Los datos son representativos de dos experimentos independientes (media y SEM). \* $p < 0,05$ ; test-t no apareado.

### 2.5. Efecto *in vivo* de SR8278 a nivel del SNC

Luego de observar el efecto antiinflamatorio del modulador SR8278 sobre los linfocitos T CD4+ en el modelo de la EAE *in vivo*, quisimos observar su impacto a nivel del SNC.

Con este fin, luego de inducir EAE y tratar con SR8278 o placebo desde el día 0, extrajimos cerebro y médula espinal de los animales en el pico de la enfermedad (día 14), y aislamos los linfocitos T CD4+ de dichos tejidos. A continuación realizamos un análisis de expresión de los genes *il10*, *il17* y *nr1d1* a través de la técnica de RT-qPCR.

Desafortunadamente, no obtuvimos producto de expresión en los genes de interés, sin embargo observamos expresión del gen housekeeping en todas las muestras a partir de un ciclo tardío para tratarse del gen *gapdh*. Este resultado nos sugiere que contábamos con poca muestra de cDNA para la detección de dichos genes.

De esta forma, podemos concluir que es necesario repetir este ensayo con una modificación en la cantidad de células iniciales, por ejemplo, pooleando los duplicados

biológicos de cada muestra con el fin de obtener mayor cantidad de RNA en la purificación para la posterior síntesis de cDNA.

# Discusión



## **Discusión**

Las causas de la EM todavía se mantienen desconocidas, sin embargo se cree que hay una predisposición genética influenciada por factores ambientales que afectan el curso de la misma (Compston y Coles, 2008). Estudios previos reportaron una estacionalidad en la actividad de la EM, donde se observó que la incidencia de la enfermedad es mayor durante las estaciones de primavera y verano.

Teniendo en cuenta los cambios estacionales en el curso de la enfermedad, nuestro equipo previamente propuso a la hormona melatonina como un agente involucrado en su patología. Los niveles de melatonina, cuya producción es modulada en base a las variaciones estacionales de acuerdo a la duración de la luz del día, correlacionan inversamente con la actividad de la EM en los humanos. De hecho, se demostró que la melatonina disminuye la evolución de la EAE en ratones C57BL/6 mediante el control del balance entre células efectoras y reguladoras. Esto sugiere que la melatonina está involucrada en determinadas vías de señalización relevantes en la diferenciación celular, en las que disminuye la respuesta Th17 y aumenta la respuesta Tr1 (Farez *et al.*, 2015).

La vía de señalización de la melatonina involucrada en la diferenciación de células Th17 en la EM previamente descrita (Farez *et al.*, 2015), señala al represor REV-ERB $\alpha$  como uno de los responsables de estimular esta respuesta inflamatoria (Th17). Con el objetivo de caracterizar esta vía, elegimos al compuesto modulador SR8278, un antagonista de REV-ERB $\alpha$  (Kojetin *et al.*, 2011), para observar su efecto sobre la diferenciación en Th17.

El tratamiento de linfocitos T CD4+ con SR8278 *in vitro* redujo la producción de los mediadores pro-inflamatorios IL-17 y IFN $\gamma$ , y a su vez aumentó la de la citoquina IL-10 anti-inflamatoria; sugiriendo que el antagonista de REV-ERB $\alpha$  genera una desactivación de la diferenciación de linfocitos T CD4+ en Th17 y aumenta la diferenciación en Tr1.

De esta forma demostramos que el modulador SR8278 produce *in vitro* un balance favorable de diferenciación entre Th17 y Tr1 que se traduciría en una disminución y regulación de la respuesta inflamatoria, reduciendo de esta forma la patogenia de la EM.

A su vez, a fin de alcanzar el objetivo general de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la EM, analizamos el efecto terapéutico del SR8278, sobre el modelo experimental de esta enfermedad: la EAE.

Para el estudio de las características patológicas de la EM, se considera a la EAE un modelo muy adecuado debido a sus similitudes histopatológicas e inmunológicas con esta enfermedad (Robinson et al., 2014). Es por esto, que uno de los objetivos específicos de esta tesina fue evaluar los efectos del modulador en este modelo experimental de la EM. En este trabajo, demostramos el efecto terapéutico del SR8278 sobre la EAE, al reducir su severidad, retrasando su aparición y permitiendo la recuperación total respecto del control. De esta forma demostramos que el tratamiento con SR8278 disminuye la inflamación y supone una terapia efectiva para la EM.

La EAE así como también la EM, se caracterizan por la presencia de placas desmielinizantes en el SNC generadas debido a la inflamación. Mediante el análisis histológico pudimos observar una disminución en el porcentaje de mielina de aquellos animales control respecto de los tratados con el modulador SR8278. De la misma manera, vimos una modificación en el porcentaje axones, donde nos encontramos con una mayor pérdida axonal en el SNC de animales control respecto de los tratados. De esta forma demostramos que el tratamiento con SR8278 disminuyó la generación de placas desmielinizantes en el modelo de EAE *in vivo*.

Posteriormente, al analizar el peso de los órganos de los animales, observamos un aumento significativo del hígado de aquellos ratones tratados con SR8278, respecto de aquellos animales control. Esta diferencia de tamaño demuestra una menor concentración de células en el hígado de animales control, pudiendo explicarse por la migración de células inmunológicas desde dicho órgano hacia el SNC donde finalizaron induciendo la generación de placas desmielinizantes. Contrariamente, en los animales tratados con el modulador, el mayor tamaño del hígado se explicaría por la concentración de células inmunológicas alojadas en él, las cuales no intervendrían en el ataque al SNC, disminuyendo la respuesta inflamatoria.

Esta diferencia también se observó en los bazo de los animales, sugiriendo que el mayor tamaño de los órganos linfoides en ratones tratados con SR8278 se debe a una retención de células inmunológicas en periferia, mientras que aquellos ratones control presentan una migración de estas células hacia el SNC.

Luego de observar estos resultados, quisimos evaluar mediante un estudio de proliferación la capacidad autorreactiva de las células T CD4<sup>+</sup> periféricas aisladas de bazo y ganglios linfáticos frente a un estímulo específico con el péptido MOG. Aquí pudimos demostrar que el tratamiento con SR8278 inhibió de manera significativa la proliferación de células T autorreactivas frente a MOG respecto de los tratados con placebo; es decir que la administración del antagonista de REV-ERB $\alpha$  durante la progresión de la EAE inhibe parcialmente la expansión clonal de células T autorreactivas.

Viendo estos resultados, evidenciamos que la inhibición *in vitro* del receptor REV-ERB $\alpha$  disminuye la expresión de IL-17 e IFN $\gamma$ , citoquinas pro-inflamatorias responsables de generar una respuesta inflamatoria que provoca las placas desmielinizantes en el SNC; y a su vez, produce el aumento de IL-10, citoquina anti-inflamatoria cuyos niveles son cruciales en la regulación de la autoinmunidad.

Basándonos en estudios previos de nuestro laboratorio (Farez *et al.*, 2015), consideramos que el aumento en los niveles de expresión de la citoquina IL-17 surge de la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en células Th17 a través de la inhibición de REV-ERB $\alpha$  sobre NFIL3, cuya acción inhibitoria sobre los receptores nucleares ROR $\alpha$  y ROR $\gamma$ t ahora se ve comprometida, permitiéndose de esta forma la diferenciación en células patogénicas Th17. A su vez, la acción del receptor ROR $\alpha$  estimula la expresión de *il10*, cuya acción regulatoria suprime la producción de IFN $\gamma$ .

En cuanto a los ensayos *in vivo*, demostramos que la inhibición de REV-ERB $\alpha$  produce un efecto terapéutico sobre el modelo experimental de la EM, donde pudimos observar a nivel del SNC una disminución de la formación de placas desmielinizantes que se reflejan en una mejor progresión de la enfermedad al reducir su severidad; y a nivel periférico una disminución de células T CD4<sup>+</sup> autorreactivas. Estos resultados sugieren que REV-ERB $\alpha$  aumenta la patogenia de la enfermedad mediante la estimulación de la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en células efectoras Th17.

# Conclusión

## **Conclusión**

Nuestros resultados nos permiten concluir que el receptor REV-ERB $\alpha$  afecta al desarrollo del modelo experimental EAE a través de la estimulación de la diferenciación de linfocitos T CD4+ en células patogénicas Th17 responsables de la generación de la inflamación en el SNC; y a su vez inhibe la producción de IL-10 responsable de regular la autoinmunidad.

De esta forma logramos esclarecer la relevancia del receptor REV-ERB $\alpha$  dentro de la vía de señalización de la melatonina involucrada en el desarrollo de la enfermedad de la EM.

### **Perspectivas futuras**

Para continuar con nuestro proyecto, proponemos el desarrollo de distintos experimentos para seguir validando que el modulador de REV-ERB $\alpha$  (SR8278) reduce la inflamación al disminuir la respuesta Th17 y aumentando la Tr1; A su vez también analizaremos la relevancia de las vías de señalización de la melatonina en humanos con EM. Para esto, proponemos los siguientes ensayos:

- **El análisis del efecto de los moduladores de REV-ERB $\alpha$  en la diferenciación de linfocitos T reguladores *in vitro*.** Donde se extraerán y aislarán linfocitos T CD4+ vírgenes de bazo y ganglios de ratones C57BL/6. Se activarán y diferenciarán dichas células en Tr1 mediante la incubación con IL-27. Posteriormente, se agregará a las células el tratamiento (SR8278) o placebo y se evaluarán los efectos generados mediante la medición del nivel de expresión por RT-qPCR, y la secreción de citoquinas y expresión de factores de transcripción mediante la técnica de citometría de flujo.

- **Análisis del efecto de los moduladores de REV-ERB $\alpha$  *in vivo* a nivel del SNC.** Aquí se tratará a un grupo de ratones C57BL/6 *in vivo* con SR8278. Se removerá el cerebro y médula espinal, se homogeneizarán y enriquecerán con un gradiente de Percoll y finalmente evaluarán dichas células por las técnicas de RT-qPCR y citometría de flujo.

- **Análisis de RNaseq en linfocitos T CD4+ periféricos tratados *in vivo*.** Para este ensayo, se realizó una activación periférica de linfocitos en ratones C57BL/6 y se aislaron sus esplenocitos como fue anteriormente descrito (Materiales y métodos 2.5.2.). Se reactivaron con MOG 35-55 *in vitro* e incubaron en presencia o ausencia de SR8278. Luego de la separación de los linfocitos T CD4+, y de su posterior reestimulación con PMA, ionomicina y GolgiStop, se realizó una tinción intracelular con anticuerpos (IFN $\gamma$ , IL-17) mediante el Método para analizar RNA luego de un sorting intracelular (MARIS) (Hrvatín et al., 2014).

Posteriormente, se realizó una citometría de flujo, seguido de un sorting celular para aquellas células CD4+IFN $\gamma$ +IL-17+ tanto tratadas con SR8278 como placebo. A estas células se les realizó una secuenciación de su RNA el cual debe ser analizado correspondientemente. Donde veremos los perfiles transcripcionales implicados en el tipo de respuesta y de los actores involucrados en las vías de señalización de la melatonina.

- **Análisis de citoquinas secretadas por linfocitos T periféricos.** En este ensayo analizaremos mediante el método de ELISA los sobrenadantes de linfocitos TCD4+ periféricos de ratones C57BL/6 tratados *in vivo* y reestimulados *in vitro* en presencia y ausencia de SR8278. De esta forma podremos determinar el tipo de diferenciación celular de los mismos.

- **Análisis *in vitro* de linfocitos T con KO de genes implicados en la vía de la melatonina.** Aquí, se analizará la relevancia de los actores *mntn1a*, *nr1d1*, *nfil3*, *rora* y *rorc* de la vía de la melatonina y de los componentes *arntl* y *clock* del reloj circadiano en la diferenciación de Th17 y Tr1 mediante la generación de linfocitos KO para cada uno de estos genes a través de la técnica de CRISPR Cas9.

- **Evaluación de la relevancia de los niveles de melatonina en humanos con EM.** Se analizarán los niveles de la hormona melatonina en suero de pacientes humanos con EM mediante la medición de la misma con el kit de ELISA Melatonina (GenWay Biotech).

Mediante estas técnicas propuestas, lograremos continuar con nuestro proyecto de caracterización del rol de las vías de señalización de la melatonina en el curso de la EM y proyectar el desarrollo de nuevas terapias alternativas para el tratamiento de esta enfermedad.

# Abreviaturas



**Abreviaturas**

ACK: Amonio cloruro potasio

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

BHE: Barrera hematoencefálica

C/EBP $\alpha$ : Proteína  $\alpha$  de unión al activador CAAT

cDNA: ADN copia

CFA: Adyuvante completo de Freund

CFSE: Éster de succinimidil de carboxifluoresceína

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

DMSO: Dimetilsulfóxido

EAE: Encefalitis autoinmune experimental

EM: Esclerosis múltiple

EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva

EMPR: Esclerosis múltiple progresiva recurrente

EMRR: Esclerosis múltiple remitente recurrente

EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva

GWAS: Estudios de asociación de genoma completo

H&E: Hematoxilina-eosina

IFN $\gamma$ : Interferón gamma

IL: Interleuquina

KO: Knock Out

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LFB: Azul Luxol rápido

M-MLV: Maloney murine leukemia virus

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFA: Paraformaldehído

RMN: Resonancia magnética nuclear

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

SCA: síndrome clínico aislado

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

SNPs: Polimorfismos de único nucleótido

TGF $\beta$ 1: Factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1

TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

ToxP: Toxina Pertussis

UDG: Uracil DNA glicosilasa

VEB: Virus de Epstein-Barr

# Bibliografía

**Bibliografía**

- Abad Herrera P., Correale J., Barahona J. y col. Esclerosis Múltiple para el Médico en la Práctica Diaria – 14ª Edición. PLM – Ecuador - 2014
- Arrieta-Antón, E., Luna-Calcaño, I., Martínez-Altarrriba, M. & Ramos-Campoy, O. 2015. Revisión de la esclerosis múltiple (1). A propósito de un caso. *Semergen*. 41(5):261–265.
- Ascherio, A., Munger, K., Sc, M. & others. 2008. Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention. *Seminars in neurology*. 28(1):17–28. DOI: 10.1055/s-2007-1019126.
- Ascherio, A., Munger, K.L., White, R., Köchert, K., Simon, K.C., Polman, C.H., Freedman, M.S., Hartung, H.P., et al. 2014. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurology*. 71(3):306–314. DOI: 10.1001/jamaneurol.2013.5993.
- Claustrat, B. & Leston, J. 2015. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*. 61(2–3):77–84. DOI: 10.1016/j.neuchi.2015.03.002.
- Compston, A. & Coles, A. 2008. Multiple sclerosis. *The Lancet*. 372(9648):1502–1517. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7.
- Constantinescu, C.S., Farooqi, N., O'Brien, K. & Gran, B. 2011. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x.
- Dendrou, C.A., Fugger, L. & Friese, M.A. 2015. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*. 15(9):545–558. DOI: 10.1038/nri3871.
- Farez, M.F., Balbuena Aguirre, M.E., Varela, F., Köhler, A.A., Nagel, V. & Correale, J. 2014. Low familial risks for multiple sclerosis in Buenos Aires, Argentina. *Journal of the Neurological Sciences*. 346(1–2):268–270. DOI: 10.1016/j.jns.2014.09.004.
- Farez, M.F., Fiol, M.P., Gaitán, M.I., Quintana, F.J. & Correale, J. 2015. Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 86(1):26–31. DOI: 10.1136/jnnp-2014-307928.
- Farez, M.F., Mascanfroni, I.D., Méndez-Huergo, S.P., Yeste, A., Murugaiyan, G., Garo, L.P., Balbuena Aguirre, M.E., Patel, B., et al. 2015. Melatonin Contributes to the Seasonality of Multiple Sclerosis Relapses. *Cell*. 162(6):1338–1352. DOI: 10.1016/j.cell.2015.08.025.

- Farez, M.F., Calandri, I.L., Correale, J. & Quintana, F.J. 2016. Anti-inflammatory effects of melatonin in multiple sclerosis. *BioEssays*. 38(10):1016–1026. DOI: 10.1002/bies.201600018.
- Goodin, D.S. 2016. *The epidemiology of multiple sclerosis: insights to a causal cascade*. 1st ed. V. 138. Elsevier B.V. DOI: 10.1016/B978-0-12-802973-2.00011-2.
- Grigoriadis, N. & van Pesch, V. 2015. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *European Journal of Neurology*. 22:3–13. DOI: 10.1111/ene.12798.
- Hrvatin, S., Deng, F., O'Donnell, C.W., Gifford, D.K. & Melton, D.A. 2014. MARIS: Method for analyzing RNA following intracellular sorting. *PLoS ONE*. 9(3):1–6. DOI: 10.1371/journal.pone.0089459.
- Hurwitz, B. 2009. The diagnosis of multiple sclerosis and the clinical subtypes. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 12(4):226. DOI: 10.4103/0972-2327.58276.
- Jančić J, Nikolić B, Ivančević N, et al. Multiple Sclerosis Therapies in Pediatric Patients: Challenges and Opportunities. In: Zagon IS, McLaughlin PJ, editors. *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Nov 27. Chapter 3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470149/> doi: 10.15586/codon.multiplesclerosis.2017.ch3
- Kojetin, D., Wang, Y., Kamenecka, T.M. & Burris, T.P. 2011. Identification of SR8278, a synthetic antagonist of the nuclear heme receptor REV-ERB. *ACS Chemical Biology*. 6(2):131–134. DOI: 10.1021/cb1002575.
- Leray, E., Moreau, T., Fromont, A. & Edan, G. 2016. Epidemiology of multiple sclerosis. *Revue Neurologique*. 172(1):3–13. DOI: 10.1016/j.neurol.2015.10.006.
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C.F., Rodriguez, M. & Weinshenker, B.G. 2000. Clinical course and diagnosis. *The New England Journal of Medicine*. 343:938–952. DOI: 10.1056/NEJM200009283431307.
- Pedro-cuesta, D. & Soderstrom, M. 2000. Seasonal patterns in optic neuritis and multiple sclerosis : a meta-analysis. 181:56–64.
- Quintana, F.J., Especial, A., Pérez-Sánchez, S. & Farez, M.F. 2014. Inmunopatología de la Esclerosis Múltiple. *MEDICINA (Buenos Aires)*. 74(1):404–410. Available:

<http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v74n5/v74n5a12.pdf>.

Rangachari, M. & Kuchroo, V.K. 2013. DOI: 10.1016/j.jaut.2013.06.008.

Reich, D.S., Lucchinetti, C.F. & Calabresi, P.A. 2018. Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 378(2):169–180. DOI: 10.1056/NEJMra1401483.

Robinson, A.P., Harp, C.T., Noronha, A. & Miller, S.D. 2014. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS. utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handbook of Clinical Neurology*. DOI: 10.1016/B978-0-444-52001-2.00008-X.

Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C.A., Patsopoulos, N.A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., et al. 2011. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 476(7359):214–219. DOI: 10.1038/nature10251.

Singh, M. & Jadhav, H.R. 2014. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.04.014.

Thompson, A.J., Banwell, B.L., Barkhof, F., Carroll, W.M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., et al. 2018. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*. 17(2):162–173. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.