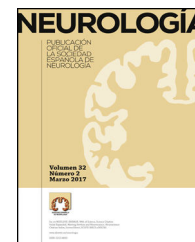




NEUROLOGÍA

www.elsevier.es/neurologia



ORIGINAL

Estudio comparativo de melatonina contra los tratamientos inmunomoduladores (interferón beta y acetato de glatirámico) en un modelo murino de esclerosis múltiple

E.J. Ramos González^{a, b}, L.J. Ramirez Jirano^b, D.Z. García Martínez^c,
G. G. Ortiz^b, L.F. Jave Suárez^d, C.A. Leal Cortes^c y O.K. Bitzer Quintero^{b,*}

^a Departamento de Fisiología, Centro Universitario Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México

^b División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México

^c División de Investigación Quirúrgica, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México

^d División de Inmunología, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México

Recibido el 16 de diciembre de 2017; aceptado el 6 de enero de 2018

PALABRAS CLAVE

Encefalitis autoinmune experimental;
Esclerosis múltiple;
Melatonina;
Interferón beta;
Acetato de glatirámico;
Inmunomoduladores

Resumen

Introducción: La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica desmielinizante autoinmune del sistema nervioso central (SNC) que produce neuroinflamación; un modelo es la encefalitis autoinmune experimental (EAE). La EM ha sido tratada con interferón beta (IFN- β) y acetato de glatirámico (AG). Se ha descrito que la melatonina (MLT) modula la respuesta del sistema inmune. El objetivo de este estudio fue observar el efecto de la administración de MLT contra los tratamientos de primera línea utilizados en la EM (IFN- β y AG).

Métodos: Se indujo EAE a ratas macho Sprague Dawley y se les administró IFN- β , AG o MLT. Se colectó líquido cefalorraquídeo (LCR) y se midieron citocinas proinflamatorias por multiplex, además del registro de la evaluación neurológica de la EAE.

Resultados: Todos los animales inmunizados establecieron la EAE. Se evaluó el primer ciclo de recaída-remisión, observando que IFN- β y AG tienen mejores resultados que MLT en la evaluación clínica. La concentración en el LCR tanto de IL-1 β como de IL-12p70 no se vio modificada por el modelo o por los tratamientos administrados. EL TNF- α se vio disminuido en el LCR por el IFN- β y la MLT bajo el modelo de EM.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: neuronim26@yahoo.com (O.K. Bitzer Quintero).

<https://doi.org/10.1016/j.nrl.2018.01.007>

0213-4853/© 2018 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: Ramos González EJ, et al. Estudio comparativo de melatonina contra los tratamientos inmunomoduladores (interferón beta y acetato de glatirámico) en un modelo murino de esclerosis múltiple. Neurología. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2018.01.007>

KEYWORDS

EAE;
Multiple sclerosis;
Melatonin;
Interferon beta;
Glatiramer acetate;
Immunomodulators

Conclusiones: Es necesario realizar estudios posteriores para evaluar los mecanismos moleculares involucrados en el comportamiento de la MLT en la EAE, así como la cuantificación de otras citocinas en diferentes matrices biológicas para poder considerar la MLT como un agente antiinflamatorio regulador de la EM.

© 2018 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

A comparative study of melatonin and immunomodulatory therapy with interferon beta and glatiramer acetate in a mouse model of multiple sclerosis

Abstract

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is a chronic, demyelinating, autoimmune disease of the central nervous system causing neuroinflammation. Experimental autoimmune encephalitis (EAE) is a model of the disease. MS is classically treated with interferon beta (IFN- β) and glatiramer acetate (GA). Melatonin (MLT) has been reported to modulate immune system responses. The aim of the present study is to analyse the effects of MLT administration in comparison with the first-line treatments for MS (IFN- β and GA).

Methods: EAE was induced in male Sprague-Dawley rats; the animals subsequently received either IFN- β , GA, or MLT. Cerebrospinal fluid (CSF) samples were analysed by multiplex assay to determine the levels of proinflammatory cytokines. The neurological evaluation of EAE was also recorded.

Results: All immunised animals developed EAE. We evaluated the first relapse-remission cycle, observing that IFN- β and GA had better results than MLT in the clinical evaluation. Neither EAE nor any of the treatments administered modified CSF IL-1 β and IL-12p70 concentrations. However, IFN- β and MLT did decrease CSF TNF- α concentrations.

Conclusions: Further studies are needed to evaluate the molecular mechanisms involved in the behaviour of MLT in EAE, and to quantify other cytokines in different biological media in order for MLT to be considered an anti-inflammatory agent capable of regulating MS.

© 2018 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica desmielinizante autoinmune del sistema nervioso central (SNC), caracterizada por desmielinización, daño axonal y pérdida neuronal¹⁻⁴. La EM representa la principal causa de discapacidad neurobiológica en adultos jóvenes y tiene consecuencias psicológicas, económicas, sociales y en la salud³. En México se estima que la prevalencia de esta enfermedad es de 15:100.000 habitantes y se presenta con mayor frecuencia en mujeres⁵.

Diferentes estudios establecen la encefalitis autoinmune experimental (EAE) como un modelo adecuado para estudiar muchos aspectos de la EM. Se trata de un trastorno autoinmune del SNC inducido experimentalmente⁶, caracterizado por la disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE), por infiltración perivascular de linfocitos dentro del SNC, activación de la microglía y parálisis de miembros inferiores⁶⁻⁸. Las moléculas proinflamatorias secretadas por los macrófagos infiltrados, células T y células de la glía activadas interactúan con el SNC para determinar el proceso inflamatorio que conduce a la destrucción de la mielina y de los oligodendrocitos⁶. El curso clínico de la EAE se caracteriza por pérdida de peso, parálisis ascendente y recuperación espontánea⁸.

El tratamiento de primera línea de la EM incluye al interferón beta (IFN- β) y al acetato de glatirámico (AG)⁹. El IFN- β es una citocina con actividad antiviral y potentes efectos antiinflamatorios^{10,11}. Se ha demostrado que es efectivo en la esclerosis múltiple de recaída-remisión (EM-RR), ya que puede reducir la tasa de recaídas, la severidad de la enfermedad y el desarrollo de lesiones cerebrales, así como retardar la progresión de la enfermedad¹². El AG es un copolímero sintético aleatorio basado en la composición de la proteína básica de mielina (MBP)¹³⁻¹⁵, que también reduce la tasa de recaídas de la EM-RR¹⁶; su mecanismo de acción es aún desconocido¹⁷.

Por otro lado, la melatonina (MLT), o N-acetil-5-metoxitriptamina, es un neuromodulador sintetizado en la glándula pineal. Se ha reportado que los receptores de MLT se expresan sobre la membrana de las células T CD4+, células T CD8+, células B y monocitos^{18,19}. Los mecanismos moleculares responsables por los efectos pleiotrópicos de la MLT involucran la unión de alta afinidad de los receptores acoplados a proteínas G a nivel membranal, y/ o la interacción con blancos intracelulares que modulan las señales de transducción de las vías de señalización, los procesos redox, o el barrido de radicales libres²⁰.

La MLT ha sido asociada con la supresión de enfermedades autoinmunes, incluida la EAE⁸, por lo que su utilización

puede proporcionar una solución alternativa en el tratamiento de la EM previniendo el desarrollo de la fisiopatología de la EM y de su modelo, la EAE. Hasta la fecha, no se han realizado estudios comparativos entre los tratamientos inmunomoduladores (IFN- β y AG) para tratar la EM y la MLT en el modelo de EAE en función de su curso clínico. Por ello, el objetivo de este estudio fue observar el efecto de la administración de MLT contra los tratamientos de primera línea utilizados en la EM (IFN- β y AG), en el desarrollo de la EAE.

Material y métodos

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Animales

Se utilizaron un total de 128 ratas adultas macho de la cepa Sprague Dawley, de 60 días de edad posnatal, obtenidas de Harlam Laboratories SA de cV (México), las cuales se mantuvieron bajo condiciones de bioterio, con ciclos de luz-oscuridad de 12 por 12 h, con comida y agua a libre demanda.

Todos los cuidados de los animales, así como los experimentos, fueron llevados a cabo bajo lo que dicta la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El proyecto de investigación fue aprobado por el Comité Local de Investigación y Ética de la Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social con número de registro 2013-1305-3.

Inducción de la encefalitis autoinmune experimental

La EAE fue inducida por la administración de 150 μ L del homogenado de inducción, el cual fue conformado por 25 μ L de homogenado de médula espinal de cerdo, 25 μ L de homogenado de cerebro de cerdo y 100 μ L de adyuvante completo de Freund (Sigma & Aldrich). La administración del homogenado de inducción se realizó por vía subcutánea en uno de los miembros posteriores de la rata. El tejido para realizar los homogenados de médula espinal y cerebro de cerdo fue obtenido de animales sanos y sin ninguna intervención previa; la homogeneización se realizó en buffer de fosfatos (100 mM de fosfato dibásico de sodio (JT Baker), 50 mM de sacarosa (JT Baker) y 0,5 mM de EDTA (JT Baker), pH 7.4, de la siguiente manera: se coloca 1 g de tejido cerebral en 1 mL de buffer de fosfatos, se pasa por el homogeneizador hasta desintegrar por completo el tejido, se centrifuga a 1.000 g por 15 min, se recupera el sobrenadante para volver a centrifugarlo a 14.000 rpm durante 20 min, se recupera el sobrenadante para guardarlo en congelación hasta su uso; a este último sobrenadante recuperado se le llama homogenado de cerebro. Para elaborar el homogenado de médula espinal lo que se hace es en red fría pesar el tejido y homogeneizar con buffer de fosfatos en una relación 1:10 tejido:buffer, se homogeneiza hasta conseguir la desintegración total del tejido, posteriormente se centrifuga a 1.000 g durante 5 min, se recupera el sobrenadante y se conserva en

congelación; al sobrenadante recuperado se le llama homogenado de médula espinal.

Evaluación neurológica de la encefalitis autoinmune experimental

La severidad de la enfermedad fue evaluada desde el día 0 hasta el día 12 postinducción a través de la escala clínica descrita por Fang et al.⁷, según la cual grado 0 = rata normal, grado 1 = pérdida parcial de la tonicidad de la cola, grado 2 = pérdida de la tonicidad de la cola, grado 3 = marcha inestable y parálisis leve, grado 4 = parálisis de miembros posteriores, y grado 5 = estado moribundo o muerte. El modelo de EAE se considera exitoso cuando la evaluación neurológica supera el grado 2.

Grupos experimentales y tratamientos

El total de animales fue distribuido en 8 grupos de 16 animales cada uno; los grupos son los siguientes: 1) grupo control (CTRL), sin tratamiento ni manipulación; 2) grupo EAE, sin tratamiento con EAE; 3) grupo IFN- β , con tratamiento de IFN- β 1b (dosis de 8.000 U, cada tercer día, vía intramuscular), sin EAE; 4) grupo AG, con tratamiento de AG (dosis de 0,50 mg/kg/día, vía subcutánea) sin EAE; 5) grupo MLT, con tratamiento de MLT (dosis de 10 mg/kg/día, vía intraperitoneal), sin EAE; 6) grupo EAE-IFN β , con tratamiento de IFN- β 1b (dosis de 8.000 U, vía intramuscular, cada tercer día), con EAE; 7) grupo EAE-AG, con tratamiento de AG (dosis de 0,50 mg/kg/día, vía subcutánea), con EAE; y 8) grupo EAE-MLT, con tratamiento de MLT (dosis de 10 mg/kg/día, vía intraperitoneal), con EAE.

El IFN- β 1b (Uri β ®) fue reconstituido con solución salina fisiológica al 0,9%. El AG (Copaxone®) fue administrado directamente de su presentación farmacéutica comercial. La MLT (Sigma) fue disuelta, con condiciones de aislamiento de luz, en alcohol absoluto para después completar con solución salina al 0,9%. Todos los tratamientos fueron administrados desde el día de inducción (día 0) hasta el día 12 postinducción.

Recolección de líquido cefalorraquídeo

Al día 12 postinducción se realiza la recolección de las muestras de LCR. Se anestesia la rata mediante administración de 50 μ g/kg de peso de dexmedetomidina por vía intramuscular y 80 mg/kg de peso de ketamina vía intramuscular. Una vez anestesiada, se depila la parte superior del cuello y la nuca. Posteriormente, se inmoviliza al animal en el aparato estereotáxico para roedores donde se fija la cabeza a 90° ventralmente, de tal manera que quedan separadas las primeras vértebras cervicales. Se procede a realizar antisepsia con solución de yodo. Posteriormente, se administran 100 μ L de articaína-epinefrina (1:100.000) vía subcutánea en la zona de punción.

Por otro lado, se marca 1 cm a partir de la punta del bisel de la aguja calibre 22 G, de tal manera que se cuente con una referencia visual. Se palpa la cresta occipital y la parte craneal del atlas; en la parte media de estas estructuras se introduce una aguja marcada calibre 22 G con el bisel

hacia arriba en un ángulo de 30° del plano horizontal unos 3 a 4 mm para luego corregir a un ángulo de 0° y continuar introduciendo la aguja otros 3 a 4 mm de profundidad. El LCR comienza a fluir por presión positiva.

Para recuperar el LCR se emplea una jeringa de 1 mL con aguja calibre 25 G con la que se aspira el LCR contenido en el cono de la aguja que ha puncionado a la rata, la cual permanece en su sitio hasta aspirar todo el LCR que ha fluido desde la cisterna magna. El LCR recuperado (50 μ L) se transfiere a un tubo Eppendorf inmediatamente después de su extracción y se congela a -80° hasta su uso.

Cuantificación de citocinas

Para la determinación de las citocinas IL-1 β , IL-12p70 y TNF- α en el LCR se utilizó el kit de Milliplex map (cat. RECYTMAG-65K, Merck, EE. UU.), y se siguieron las especificaciones del proveedor. Se añade el buffer de ensayo a cada pozo para acondicionar la placa y se desecha este buffer. Después, se agrega el estándar, el blanco, las muestras y las perlas a los pozos respectivos. Se deja incubando por 2 h a temperatura ambiente. Se remueve el contenido y se realizan lavados, luego se añade el anticuerpo de detección y la estreptavidina-ficoeritrina. Finalmente, se remueve todo el contenido, se realizan lavados, y se agrega el fluido de lectura. Se utilizó el equipo Luminex 200 (Texas, EE. UU.) donde se registraron 50 eventos por perla. Las concentraciones de cada citocina en el LCR fueron determinadas a partir de curvas estándar preparadas en la placa. Los datos se adquirieron en el programa xPONENT (Luminex, EE. UU.), se analizaron en el software Milliplex Analyst 5.1 y se reportan como pg/mL.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo con los programas IBM® SPSS® Statistics V21 (EE. UU.) y GraphPad Prism 5.0 (EE. UU.). Los datos fueron expresados como media + error estándar de la media (SEM). Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y el post hoc U de Mann-Whitney para comparar entre grupos. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0,05$.

Resultados

Establecimiento y evaluación clínica de la encefalitis autoinmune experimental

Se implementó y estandarizó el modelo de EAE de recaída-remisión, inmunizando ratas machos Sprague Dawley de 60 días de edad posnatal con el homogenado de inducción acompañado con adyuvante completo de Freund, alcanzando como máximo el grado 3 de la escala de evaluación clínica de la EAE. El modelo de EAE de recaída-remisión es el más adecuado para evaluar tratamientos ya que recrea la EM más común, la de recaída-remisión; además de que los tratamientos evaluados en este estudio son los utilizados para este tipo de EM (fig. 1). Se evaluó solo el primer ciclo de recaída-remisión el cual abarcó 12 días experimentales. El

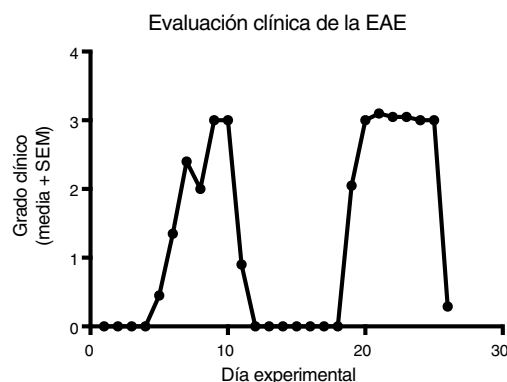


Figura 1 Establecimiento del modelo de EAE recaída-remisión inducido con homogenado de inducción en ratas adultas Sprague Dawley. El grado 3 es el grado clínico máximo que desarrollan los animales inducidos.

EAE: encefalitis autoinmune experimental; SEM: error estándar de la media.

100% de los animales inmunizados establecieron el modelo, alcanzando el grado 2 de la enfermedad, considerado como exitoso (fig. 2A-E).

En los animales tratados con IFN- β , AG y MLT a los que se les indujo EAE, esta aparece de manera más temprana en comparación con el grupo sin tratamiento. Además, la administración con IFN- β aminora la severidad y la duración de los signos y síntomas clínicos, mientras que el tratamiento con AG establece una meseta en el grado clínico 3 durante varios días para después mostrar una recuperación de los animales inducidos con EAE. Por otro lado, el tratamiento con MLT actúa mejorando los síntomas de manera más rápida que el AG, logrando la recuperación total de los animales. Sin embargo, al final del periodo experimental sufren una recaída (fig. 2E).

Cuantificación de citocinas proinflamatorias en el líquido cefalorraquídeo

La concentración de la IL-1 β entre los grupos experimentales osciló entre $0,55 \pm 0,13$ y $1,59 \pm 0,34$ pg/mL (media \pm SEM) en el LCR obtenido de ratas a las cuales se les indujo o no el modelo y en las que se administraron o no los tratamientos de IFN- β , AG y MLT, resultando estadísticamente no significativas las diferencias entre los grupos ($p > 0,0618$, IC 95%). La concentración de la IL-12p70 para los grupos experimentales osciló entre $1,87 \pm 0,63$ y $4,52 \pm 0,73$ pg/mL (media \pm SEM), sin embargo, estadísticamente no son significativas estas variaciones en la concentración de la citocina ($p > 0,3948$, IC 95%). Por lo que la concentración en el LCR tanto para IL-1 β como para IL-12p70 no se vio modificada por el modelo o por los tratamientos a los que fueron sometidos los animales. Por otro lado, la concentración del TNF- α entre los grupos registró valores entre $0,0 \pm 0,0$ y $0,27 \pm 0,05$ pg/mL (media \pm SEM), siendo estadísticamente significativa con una $p < 0,0015$, IC 95%, por lo que el TNF- α fue afectado por el modelo y por los tratamientos administrados en diferentes grados, incluso por debajo del límite inferior de detección del equipo, lo que supondría un importante efecto de los tratamientos de IFN- β y MLT en el modelo

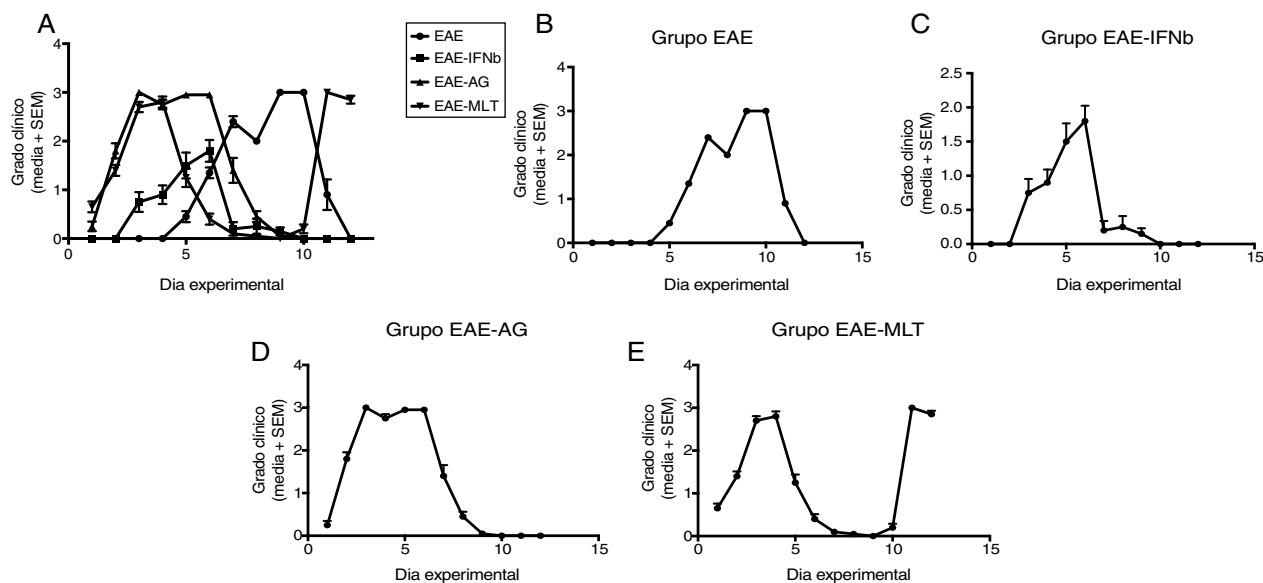


Figura 2 Evaluación clínica de la EAE (media + SEM) de los grupos experimentales EAE, EAE-IFN β , EAE-AG, EAE-MLT en 12 días experimentales. A) Comparación de la evaluación clínica de la EAE en los grupos experimentales. B) Evaluación clínica del grupo EAE. C) Evaluación clínica del grupo EAE-IFN β . D) Evaluación clínica del grupo experimental EAE-AG. E) Evaluación clínica del grupo experimental EAE-MLT.

EAE: encefalitis autoinmune experimental; EAE-AG: encefalitis autoinmune experimental tratada con acetato de glatirámico; EAE-IFN β : encefalitis autoinmune experimental tratada con interferón beta; EAE-MLT: encefalitis autoinmune experimental tratada con melatonina; IFN β : interferón beta; MLT: melatonina; SEM: error estándar de la media.

de EAE (tabla 1 y fig. 3A-C). Cabe resaltar que las concentraciones en el LCR de estas citocinas se encuentran por debajo de lo que otros estudios han reportado en suero.

En relación con la concentración de TNF- α se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y EAE-IFN β , control y EAE-MLT, IFN- β y AG, IFN- β y EAE-IFN β , IFN- β y EAE-MLT, AG y MLT, MLT y EAE-IFN β , MLT y EAE-MLT ($p < 0,030$, IC 95%) (fig. 4).

Discusión

En el presente estudio se realizó una comparación del efecto entre los fármacos de primera línea utilizados en la clínica (IFN- β y AG) contra el uso de MLT en un modelo murino de EM, la EAE, el cual se ha reportado como el modelo más utilizado para la evaluación de fármacos potenciales para el tratamiento de la EM²¹, por lo que es el adecuado para llevar a cabo nuestro objetivo de comparar entre los fármacos IFN- β , AG y MLT. Nuestro modelo alcanza como máximo el grado 3 de la escala clínica establecida, así pues podemos considerarlo como un modelo no agresivo de la EAE, por lo menos en el primer ciclo de la enfermedad. Es probable que, si la enfermedad evoluciona, en cada ciclo se observará un aumento significativo hacia el grado clínico máximo, lo que se correspondería con la EM-RR, en la que el curso natural de las exacerbaciones es completado con un periodo de reparación, lo cual conduce a la remisión clínica. Sin embargo, el déficit residual después de una recaída pudiera persistir y contribuir al progreso escalonado de la discapacidad²².

El efecto del IFN- β sobre el AG y la MLT en la evaluación clínica de la EAE fue superior; de esta manera queda

demostrado por qué es considerado como un estándar de oro en el tratamiento de la EM, ya que logra suprimir la EAE de manera más rápida y eficiente, debido a que impide que la severidad se incremente más allá del grado 2, que el resto de los tratamientos evaluados. El mecanismo de acción del IFN- β es complejo, involucra efectos a diferentes niveles de la función celular²³. Los mecanismos de acción más relevantes incluyen la inhibición de citocinas proinflamatorias y la regulación de las citocinas Th2 por las células T de los pacientes tratados con IFN- β ²⁴. Sin embargo, ningún estudio había evaluado el efecto del IFN- β en el LCR. En nuestro estudio observamos que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto a la concentración de las citocinas IL-1 β e IL-12p70, por lo que su concentración permanece estable al momento de la recolección del LCR. Esto no sucede en el caso del TNF- α , el cual se observa depletado o por debajo del límite de detección de la técnica metodológica. Lo anterior coincide con otros estudios en los cuales el IFN- β reduce la expresión de TNF- α en células T y macrófagos^{25,26}; este efecto promovería la inhibición de su producción y por lo tanto su ausencia en la cuantificación en el LCR.

Por otro lado, en nuestro modelo, el AG, comparado con los otros tratamientos, no resultó tan eficaz ya que no disminuye la severidad de la enfermedad ni acelera el proceso de recuperación, pero sí logra una meseta por un periodo de 4 días en un grado elevado de severidad. En cuanto a la concentración de las citocinas en el LCR, se puede observar una tendencia a disminuir la IL-1 β , IL-12p70 y el TNF- α en el grupo al que solo se le administró AG, lo que nos habla de la regulación del sistema inmune a pesar de no existir un proceso inflamatorio.

Tabla 1 Concentración media de las citocinas IL-1 β , IL-12p70 y TNF- α en el LCR de ratas macho Sprague Dawley

Citocina	Control (media \pm SEM)	EAE (media \pm SEM)	IFN- β (media \pm SEM)	AG (media \pm SEM)	MLT (media \pm SEM)	EAE-IFN β (media \pm SEM)	EAE-AG (media \pm SEM)	EAE-MLT (media \pm SEM)	Valor de p
IL-1 β (pg/mL)	1,17 \pm 0,28	1,27 \pm 0,23	1,21 \pm 0,20	0,55 \pm 0,13	1,45 \pm 0,29	1,22 \pm 0,17	1,07 \pm 0,13	1,59 \pm 0,34	0,062
IL-12p70 (pg/mL)	2,85 \pm 0,92	4,04 \pm 1,19	4,06 \pm 1,10	2,30 \pm 0,59	3,08 \pm 0,87	3,78 \pm 1,19	1,87 \pm 0,63	4,52 \pm 0,73	0,395
TNF- α (pg/mL)	0,19 \pm 0,06	0,13 \pm 0,07	0,24 \pm 0,06	0,06 \pm 0,04	0,27 \pm 0,05	0	0,18 \pm 0,05	0	0,002*

AG: acetato de glatirámico; EAE: encefalitis autoinmune experimental; EAE-AG: encefalitis autoinmune experimental tratada con acetato de glatirámico; EAE-IFN β : encefalitis autoinmune experimental tratada con interferón beta; EAE-MLT: encefalitis autoinmune experimental tratada con melatonina; IFN- β : interferón beta; IL: interleucina; LCR: líquido cefalorraquídeo; MLT: melatonina; SEM: error estándar de la media; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa .

* Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales con la prueba Kruskal-Wallis.

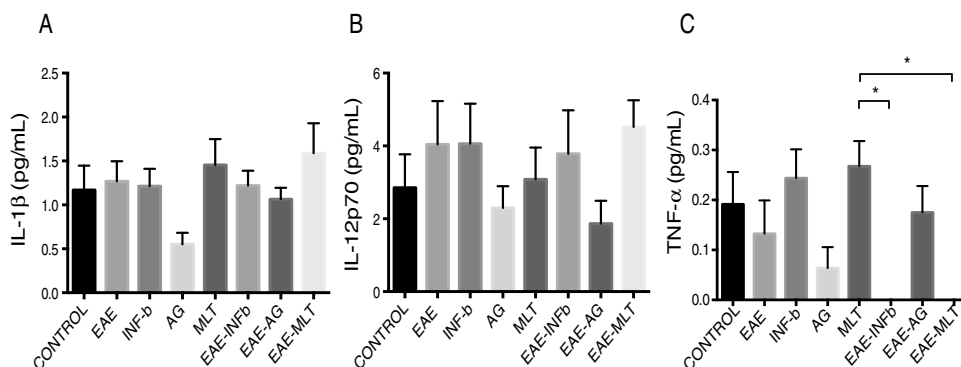


Figura 3 Concentración de IL-1 β , IL-12p70 y TNF- α (media \pm SEM) en LCR de los grupos experimentales; control, EAE, IFN- β , AG, MLT, EAE-IFN β , EAE-AG y EAE-MLT. A) Concentración de IL-1 β en el LCR de los diferentes grupos. B) Concentración de IL-12p70 en el LCR de los diferentes grupos. C) Concentración de TNF- α en el LCR de los diferentes grupos.

AG: acetato de glatirámero; EAE: encefalitis autoinmune experimental; EAE-AG: encefalitis autoinmune experimental tratada con acetato de glatirámero; EAE-IFN β : encefalitis autoinmune experimental tratada con interferón beta; EAE-MLT: encefalitis autoinmune experimental tratada con melatonina; IL: interleucina; INF-b: interferón beta; LCR: líquido cefalorraquídeo; MLT: melatonina; SEM: error estándar de la media; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

* Prueba Kruskal-Wallis con un post hoc de Dunn.

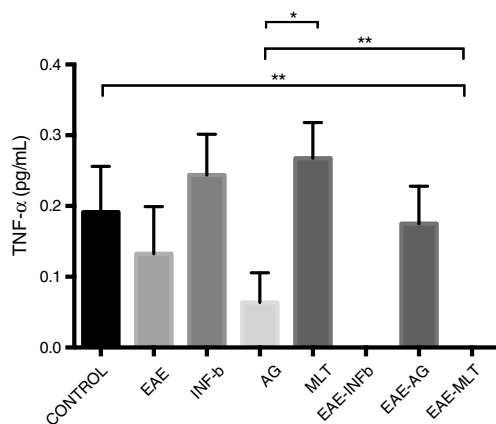


Figura 4 Concentración de TNF- α en LCR obtenido de los grupos experimentales; control, EAE, INF- β , AG, MLT, EAE-IFN β , EAE-AG y EAE-MLT.

AG: acetato de glatirámero; EAE: encefalitis autoinmune experimental; EAE-AG: encefalitis autoinmune experimental tratada con acetato de glatirámero; EAE-IFN β : encefalitis autoinmune experimental tratada con interferón beta; EAE-MLT: encefalitis autoinmune experimental tratada con melatonina; INF-b: interferón beta; LCR: líquido cefalorraquídeo; MLT: melatonina; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

* $p < 0,030$; ** $p < 0,010$, IC 95%. Prueba Kruskal-Wallis, con un post hoc de U de Mann-Whitney.

La MLT logra suprimir la EAE acortando el tiempo de la fase de recaída y promoviendo la fase de remisión en un menor tiempo, comparado con lo observado en el grupo de EAE. Sin embargo, durante el tiempo de evaluación, los animales sufrieron una segunda recaída. Al parecer la MLT promovió el proceso inflamatorio debido a que exhibe un papel dual, es decir, actúa de manera antiinflamatoria así como proinflamatoria dependiendo del contexto del microambiente celular; Franco y Markus describen este papel evaluando células cerebelares estimuladas

con lipopolisacárido (LPS) y tratadas con MLT. Observaron que aquellas células estimuladas con LPS y tratadas con MLT resultan con un mayor grado de protección ante la citotoxicidad del LPS, mientras que en aquellas que no han sido estimuladas, pero sí tratadas con MLT, se promovía la muerte celular²⁷. Otros grupos han descrito cómo actúa la MLT de manera antiinflamatoria; tal es el caso del ensayo publicado por Chen et al., en un modelo de EAE; se administran altas dosis de MLT, lo que promueve la inhibición de las células Th17 en el SNC, este efecto induce la reducción de la migración celular y la inhibición de la proliferación celular dentro del SNC²⁸⁻³⁰. Otros grupos de investigación han descrito diversos modelos y estirpes celulares en las que el efecto antiinflamatorio de MLT se presenta por la inhibición de la expresión y la activación de NF κ B³¹, factor de transcripción involucrado en el desarrollo de la respuesta inmune y en procesos inflamatorios³². Por otra parte, se ha descrito que la MLT juega un papel proinflamatorio importante debido a la sobrerregulación de la expresión del MHC clase II³³, además de que promueve la respuesta inmune tipo Th1^{34,35}. Se ha demostrado que el impacto negativo de la MLT exógena en la recuperación del modelo agudo de EAE se presenta por el incremento del IFN- γ en el suero y la activación de astrocitos e infiltración de células T al SNC³⁶. Este comportamiento dual de la MLT ha sido denominado como «buffer del sistema inmune», actuando como un estimulante bajo condiciones basales o inmunosupresoras, o como un supresor antiinflamatorio en presencia de una respuesta inmune exacerbada como la inflamación aguda²⁰. En este modelo de EAE fue posible observar que en un microambiente proinflamatorio ejerce un efecto benéfico, reduciendo la severidad de la EAE, mientras que en un ambiente controlado exhibe un efecto de tipo negativo, ya que promueve el proceso inflamatorio, exacerbando los síntomas de la EAE.

La inhibición de las citocinas proinflamatorias (TNF- α) por la MLT se debe a que suprime los mediadores inflamatorios por medio de la señalización de diferentes vías, tales como ERK/p38 MAPK, c/EBP β , NF κ B y p300³⁷. No fue posible observar diferencias significativas en la concentración de las

citocinas IL-1 β e IL-12p70 bajo ninguno de los tratamientos en este modelo debido a la matriz donde fueron medidas, ya que se ha reportado en otros modelos de EAE que la IL-1 β se encuentra localizada en los infiltrados perivasculares de células MHC clase II, en los bordes de las lesiones desmielinizantes o en la microglía residente o macrófagos diferenciados, lo que sugiere que la expresión de IL-1 β es inducida dentro del SNC³⁸, mientras que la expresión de IL-12 ha sido identificada en secciones de tejido cerebral afectado por la EAE³⁹. Por ello la concentración de las citocinas se mantiene constante en el LCR, sin la necesidad de realizar una estimulación desde sitios lejanos que aumente la concentración de estas en el LCR.

En conclusión, este modelo permite el estudio y la comparación de tratamientos alternativos para la EM. El IFN- β demuestra un mayor efecto inmunomodulador del proceso inflamatorio de la EAE. El AG no controla tan eficazmente la EAE, pero sí demuestra un efecto antiinflamatorio por medio de otros mecanismos no evaluados en este estudio. Se ha demostrado que la MLT presenta un efecto de tipo proinflamatorio así como antiinflamatorio, dependiendo del microambiente celular en el que se encuentre. Es necesario realizar estudios posteriores para evaluar los mecanismos moleculares involucrados en el comportamiento de la MLT en la EAE, así como la cuantificación de estas y otras citocinas en otras matrices biológicas para poder considerar la MLT como un agente antiinflamatorio eficaz en el tratamiento de la EM.

Financiación

Este trabajo fue financiado por el Fondo en Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social, con número de registro FIS/IMSS/PROT/G13/123.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses .

Bibliografía

1. Loma I, Heyman R. Multiple sclerosis: Pathogenesis and treatment. *Curr Neuropharmacol*. 2011;9:409–16, <http://dx.doi.org/10.2174/157015911796557911>.
2. Korn T. Pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2008;255:2–6, <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-008-6001-2>.
3. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B, Brien KO, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*. 2011;164:1079–106, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x>.
4. Dillingham BC, Knobloch SM, Many GM, Harmon BT, Mullen AM, Heier CR, et al. VBP15, a novel anti-inflammatory, is effective at reducing the severity of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Mol Neurobiol*. 2015;35:377–87, <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-014-0133-y>.
5. MS International Federation. Atlas of MS [consultado 26 Ene 2016]. Disponible en: <http://www.msif.org/about-us/advocacy/atlas/>.
6. Pahan K. Neuroimmune pharmacological control of EAE. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2010;5:165–7, <http://dx.doi.org/10.1007/s11481-010-9219-6>.
7. Fang M, He D, Zhang F, Hu Z, Yang J, Jiang H, et al. Antineuroinflammatory and neurotrophic effects of CNTF and C16 peptide in an acute experimental autoimmune encephalomyelitis rat model. *Front Neuroanat*. 2013;7:1–17, <http://dx.doi.org/10.3389/fnana.2013.00044>.
8. Kang J, Ahn M, Kim Y-S, Moon C, Lee Y, Wie M-B, et al. Melatonin ameliorates autoimmune encephalomyelitis through suppression of intercellular adhesion molecule-1. *J Vet Sci*. 2001;2:85–9.
9. Secretaria de Salud. Guía de práctica clínica. Tratamiento modificador de enfermedad en pacientes con diagnóstico de esclerosis múltiple [consultado 16 Oct 2017]. Disponible en: www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html.
10. Kieseier BC. The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2011;25:491–502, <http://dx.doi.org/10.2165/11591110-000000000-00000>.
11. Fitzgerald DC, Fonseca-kelly Z, Melissa L, Safabakhsh P, Saris CJM, Cullimore ML, et al. Independent and Interdependent Immunoregulatory Effects of IL-27, IFN- β and IL-10 in the suppression of human Th17 cells and murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2013;190:3225–34, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1200141>.
12. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon- β mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;74(Suppl. 1):S17–24, <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c97d99>.
13. Racke MK, Lovett-Racke AE. Glatiramer acetate treatment of multiple sclerosis: An immunological perspective. *J Immunol*. 2011;186:1887–90, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1090138>.
14. Jalilian B, Einarsson HB, Vorup-Jensen T. Glatiramer acetate in treatment of multiple sclerosis: A toolbox of random co-polymers for targeting inflammatory mechanisms of both the innate and adaptive immune system? *Int J Mol Sci*. 2012;13:14579–605, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms131114579>.
15. Perumal J, Filippi M, Ford C, Johnson K, Lisak R, Metz L, et al. Glatiramer acetate therapy for multiple sclerosis: A review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2006;2:1019–29, <http://dx.doi.org/10.1517/17425255.2.6.1019>.
16. Aharoni R. The mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and beyond. *Autoimmun Rev*. 2013;12:543–53, <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2012.09.005>.
17. Izquierdo G, García-Agua Soler N, Rus M, García-Ruiz AJ. Effectiveness of glatiramer acetate compared to other multiple sclerosis therapies. *Brain Behav*. 2015;5:1–9, <http://dx.doi.org/10.1002/brb3.337>.
18. Lin G, Huang S, Chen S, Wang C. Modulation by melatonin of the pathogenesis of inflammatory autoimmune diseases. *Int J Mol Sci*. 2013;14:11742–66, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140611742>.
19. Shafer LL, McNulty JA, Young MRI. Assessment of melatonin's ability to regulate cytokine production by macrophage and microglia cell types. *J Neuroimmunol*. 2001;120:84–93, [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5728\(01\)00419-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5728(01)00419-2).
20. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Álvarez-Sánchez N, Rodríguez-Rodríguez A, Guerrero JM. Melatonin: Buffering the immune system. *Int J Mol Sci*. 2013;14:8638–83, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14048638>.
21. Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of

- MS: Utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol*. 2014;122:173–89, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00008-X>.
22. Berkovich R. Treatment of acute relapses in multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2013;10:97–105, <http://dx.doi.org/10.1007/s13311-012-0160-7>.
 23. Madsen C. The innovative development in interferon beta treatments of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain Behav*. 2017;7:e00696, <http://dx.doi.org/10.1002/brb3.696>.
 24. Martin R, Sospedra M, Rosito M, Engelhardt B. Current multiple sclerosis treatments have improved our understanding of MS autoimmune pathogenesis. *Eur J Immunol*. 2016;46:2078–90, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201646485>.
 25. Schmidt J, Stu S, Toyka KV, Gold R, Stürzebecher S, Toyka KV, et al. Interferon- β treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis leads to rapid nonapoptotic termination of T cell infiltration. *J Neurosci Res*. 2001;65:59–67, <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.1128>.
 26. Teige I, Liu Y, Issazadeh-Navikas S. IFN- β inhibits T cell activation capacity of central nervous system APCs. *J Immunol*. 2006;177:3542–53, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3542>.
 27. Franco DG, Markus RP. The cellular state determines the effect of melatonin on the survival of mixed cerebellar cell culture. *PLoS One*. 2014;9:25–7, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0106332>.
 28. Chen S, Huang S, Chen J-W, Wang K-C, Yang Y-R, Liu P, et al. Melatonin enhances interleukin-10 expression and suppresses chemotaxis to inhibit inflammation in situ and reduce the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunopharmacol*. 2016;31(Suppl. C):169–77, <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.12.020>.
 29. Lardone PJ, Guerrero JM, Fernández-Santos JM, Rubio A, Martín-Lacave I, Carrillo-Vico A. Melatonin synthesized by T lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor. *J Pineal Res*. 2011;51:454–62, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00909.x>.
 30. Yang XO, Pappu B, Nurieva R, Akimzhanov A, Soon H, Chung Y, et al. TH helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity*. 2008;28:29–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.016>.
 31. Markus RP, Cecon E, Pires-Lapa MA. Immune-pineal axis: Nuclear factor κ B (NF- κ B) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. *Int J Mol Sci*. 2013;14:10979–97, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140610979>.
 32. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016;8:227–41, <http://dx.doi.org/10.1002/wsbm.1331>.
 33. Kaur C, Ling EA, Ea L, Res P. Effects of melatonin on macrophages/microglia in postnatal rat brain. *J Pineal Res*. 1999;26:158–68, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-079X.1999.tb00578.x>.
 34. García-Mauriño S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci*. 1999;65:2143–50, [http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00479-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00479-8).
 35. Pioli C, Caroleo M, Nistico G, Doria G. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. *Int J Immunopharmacol*. 1993;15:463–8.
 36. Ghareghani M, Dokoohaki S, Ghanbari A, Farhadi N, Zibara K, Khodadoust S, et al. Melatonin exacerbates acute experimental autoimmune encephalomyelitis by enhancing the serum levels of lactate: A potential biomarker of multiple sclerosis progression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017;44:52–61, <http://dx.doi.org/10.1111/1440-1681.12678>.
 37. Shi D, Wang J, Liu L, Xiao X, Wang J, Liu L, et al. Melatonin suppresses proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated CRL1999 cells via targeting MAPK, NF- κ B, c/EBP β , and p300 signaling. *J Pineal Res*. 2012;53:154–65, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.00982.x>.
 38. Burm SM, Peferoen LAN, Zuiderwijk-Sick EA, Haanstra KG, 't Hart BA, van der Valk P, et al. Expression of IL-1 β in rhesus EAE and MS lesions is mainly induced in the CNS itself. *J Neuroinflammation*. 2016;13:138, <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-016-0605-8>.
 39. Diab A, Zhu J, Xiao B, Mustafa M, Link H. High IL-6 and low IL-10 in the central nervous system are associated with protracted relapsing EAE in DA rats. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;56:641–50.