

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
Ciencias de la Vida
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Relación entre el dolor neuropático y la producción de
citocinas, durante la encefalomiелitis experimental
autoinmune**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Miryam Ochoa Agredano

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Miryam Ochoa Agredano

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Marco Antonio De León Nava
Co-director de Tesis

Dra. Nadia Lizeth Caram Salas
Co-directora de Tesis

Miembros del comité

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña

Dra. Patricia Juárez Camacho

Dra. María del Carmen Maya Sánchez



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Miryam Ochoa Agredano © 2022

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Miryam Ochoa Agredano** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina Bionanotecnología

Relación entre el dolor neuropático y la producción de citocinas, durante la encefalomielitis experimental autoinmune

Resumen aprobado por:

Dr. Marco Antonio De León Nava
Co-director de Tesis

Dra. Nadia Lizeth Caram Salas
Co-directora de Tesis

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurológica, autoinmune, inflamatoria, crónica y discapacitante, que se asocia con el daño a la capa de mielina, proteína que recubre las fibras nerviosas y que participa en la transmisión del estímulo eléctrico hacia la médula espinal y el cerebro. Hasta la fecha, se desconoce su etiología. Sus síntomas son diversos: alteraciones motrices, visuales, metabólicas y sensoriales. Aproximadamente, un 92% de los pacientes con EM desarrollan dolor neuropático (DN). Esta alteración se caracteriza porque las personas perciben una respuesta dolorosa ante estímulos, que normalmente no generan dolor, provocando en ellas ansiedad y depresión. El tratamiento actual de la EM-DN es paliativo, escaso, riesgoso y provoca efectos secundarios severos. Dada la complejidad de esta patología, existen aún muchas interrogantes sobre su fisiología, entre ellas la relación del DN, la severidad de la EM y la producción de factores humorales de la inmunidad. Se sabe que el sistema inmunológico tiene un papel preponderante, al generar un proceso inflamatorio, que implica la participación de distintos leucocitos, y que desencadena un daño constante al tejido propio. En el presente trabajo se evaluó la producción de diferentes citocinas implicadas en neuroinflamación, tales como: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ y TNF- α , en líquido cefalorraquídeo (LCF) y suero. Así como su correlación en el desarrollo de ambas patologías. Para cumplir con este objetivo, se estableció un curso temporal en un modelo *in vivo*, en la especie *Rattus norvegicus*, de encefalomielitis experimental autoinmune (EAE), que refleja los signos y síntomas más comunes e importantes de la EM que se manifiestan en los humanos que la padecen. Por ejemplo: dificultad para caminar, alteración de la sensibilidad en las extremidades y alodinia, es decir una respuesta dolorosa ante estímulos, como el principal síntoma del DN. Por ello, para ponderar el desarrollo del DN, se evaluó la nocicepción mecánica en ratas Lewis con EAE, utilizando la metodología “up and down”. Los resultados de este trabajo indican que el desarrollo de la alodinia se da antes de la sintomatología clínica (parálisis). Identificamos un desbalance en la expresión de las citocinas tanto en el sistema nervioso central SNC (LCF) como en la periferia (suero), predominando las citocinas proinflamatorias durante los tres estadios. Esta alteración se correlaciona con la disminución del umbral del dolor, es decir, con el inicio del dolor neuropático y la pérdida de peso. Demostrando que la cascada inflamatoria es la principal responsable de los procesos neurodegenerativos que conllevan al desarrollo de la EAE en estos animales.

Palabras clave: Esclerosis múltiple, encefalomielitis, inflamación, citocinas.

Abstract of the thesis presented by **Miryam Ochoa Agredano** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology

Relationship between neuropathic pain and cytokine production during experimental autoimmune encephalomyelitis

Abstract approved by:

Dr. Marco Antonio De León Nava
Co-director de Tesis

Dra. Nadia Lizeth Caram Salas
Co-directora de Tesis

Multiple sclerosis (MS) is a neurological, autoimmune, inflammatory, chronic and disabling disease, which is associated with damage to the myelin layer, a protein that covers nerve fibers and is involved in the transmission of electrical stimulation to the spinal cord and the brain. To date, its etiology is unknown. Its symptoms are diverse: motor, visual, metabolic and sensory alterations. Approximately 92% of MS patients develop neuropathic pain (NP). This alteration is characterized because people perceive a painful response to stimuli, which normally do not generate pain, causing them anxiety and depression. The current treatment of EM-ND is palliative, limited, risky and causes severe side effects. Given the complexity of this pathology, there are still many questions about its physiology, including the relationship of NP, the severity of MS and the production of humoral factors of immunity. It is known that the immune system plays a predominant role, by generating an inflammatory process, which involves the participation of different leukocytes, and which triggers constant damage to the tissue itself. In the present work, the production of different cytokines involved in neuroinflammation, such as: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ and TNF- α , in cerebrospinal fluid (CSF) and serum. As well as its correlation in the development of both pathologies. To meet this objective, a time course was established in an in vivo model, in the species *Rattus norvegicus*, of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), which reflects the most common and important signs and symptoms of MS that manifest in humans who suffer from it. For example: difficulty walking, altered sensitivity in the extremities and allodynia, that is, a painful response to stimuli, as the main symptom of NP. Therefore, to assess the development of DN, mechanical nociception was evaluated in Lewis rats with EAE, using the "up and down" methodology. The results of this work indicate that the development of allodynia occurs before the clinical symptoms (paralysis). We identified an imbalance in the expression of cytokines both in the central nervous system (CNS) and in the periphery (serum), proinflammatory cytokines predominating during the three stages. This alteration correlates with a decrease in the pain threshold, that is, with the onset of neuropathic pain and weight loss. Demonstrating that the inflammatory cascade is the main responsible for the neurodegenerative processes that lead to the development of EAE in these animals.

Keywords: Multiple sclerosis, Encephalomyelitis, Inflammation, Cytokines

Dedicatoria

A Dios y a mis padres, quienes nunca me han dejado de apoyar.

“Pon en manos del Señor tus obras, y tus proyectos se cumplirán” Prov. 16:3

Agradecimientos

Principalmente a mis padres, Martin Ochoa Montes y María Luisa Agredano Martínez, quienes nunca dejaron de creer en mí. Al resto de mi familia, por su incondicional apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado para la realización de este posgrado mediante la beca al CVU 971235.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), al Posgrado en Ciencias de la Vida y al Departamento de Innovación Biomédica por el apoyo en mi formación como persona en la investigación.

A mis directores de tesis, el Dr. Marco De León Nava y la Dra. Nadia Lizeth Caram Salas, por la confianza, paciencia, tiempo y motivación para crecer de forma personal y profesional.

A los miembros de mi comité, la Dra. Ana Bertha Castro Ceseña, la Dra. Patricia Juárez Camacho y la Dra. María del Carmen Maya Sánchez, por sus comentarios y aportaciones en la realización de este trabajo.

Al Dr. Andrés Quintanar Stephano, al M.C. Fernando Urías y al laboratorio de Neuroinmunoendocrinología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), por que, sin su valiosa ayuda y aportaciones, no hubiese sido posible esta tesis.

Al Dr. Julio Enrique Castañeda Delgado y a su equipo, parte de la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas, Instituto Mexicano del Seguro Social (UIBMZ-IMSS), ya que, sin gran ayuda en los análisis por citometría de flujo, la parte experimental no se hubiera logrado.

Al Instituto de Ecología por los equipos que fueron utilizados en este proyecto.

A mis compañeros que poco a poco pasaron de ser amigos a ser familia, Joaquín López Carrillo, Erick Fernando Huerta Romero, Alan Gerardo Hernández Melgar, Paloma Stephanie Almeida Luna, Cesar Carreón, Sebastián Álvarez Costes, Angy Hernández González, David Laín, Martha Mayela Manzano Mora, Tonatzin Zertuche, Karla Carballo, Blanca Valdovinos e Isaí Flores Acosta, personas en las que encontré un lugar especial y un punto de apoyo en los momentos difíciles.

A mis amigos de toda la vida Mónica Ledesma Luis, Aylin Medina Díaz y Carlos Alberto Loera López, por siempre estar presente y nunca soltarme a pesar de la distancia.

Y finalmente al M.C. Gustavo Enrique Ramos Alcaraz, por su apoyo incondicional en los momentos de mayor dificultad.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Esclerosis múltiple (EM).....	1
1.2 Antecedentes.....	10
1.3 Justificación	12
1.4 Hipótesis	13
1.5 Objetivos.....	13
1.5.1 Objetivo general	13
1.5.2 Objetivos específicos.....	14
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Modelo de estudio.....	15
2.2 Pie de cría.....	15
2.3 Modelo de EAE	16
2.4 Evaluación del efecto alodínico en EAE.....	18
2.5 Colecta del líquido cefalorraquídeo (LCR o CFL) y extracción de suero de las ratas.....	20
2.6 Cuantificación de citocinas solubles mediante citometría de flujo.....	20
2.7 Análisis estadístico.....	23
Capítulo 3. Resultados	
3.1 Modelo en rata: encefalomiелitis autoinmune experimental.....	24
3.2 Desarrollo de la alodinia (DN).....	26
3.3 Citocinas en suero y LCR	27

Capítulo 4. Discusión	
4.1 EAE: modelo para el estudio de EM.....	30
4.2 Dolor neuropático en EAE.....	31
4.3 Las citocinas en el desarrollo de la neuroinflamación en EAE.....	32
Capítulo 5. Conclusiones.....	40
Literatura citada.....	41
Anexo.....	51

Lista de figuras

Figura		Página
1	Ilustración esquemática de la red de células secretoras de citocinas en EM.....	6
2	Filamentos de von Frey que utilizados durante la prueba de umbral de retiro.....	18
3	Cambios en la expresión facial de las ratas al sentir dolor.....	19
4	Diagrama que muestra la temporalidad en días, de la administración de la emulsión encefalitogénica, la evaluación de los síntomas clínicos y la cuantificación de las citocinas.....	21
5	Disposición en placa de 96 pozos de las muestras utilizadas en citometría de flujo.....	22
6	Representación gráfica del peso registrados durante el desarrollo de la EAE.....	24
7	Desarrollo de los estadios durante la EAE.....	25
8	50% de umbral de retiro de las patas derecha e izquierda durante el desarrollo de la EAE.....	26
9	Porcentaje de variación de intensidad media de fluorescencia de TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-17A e IL-10; en el estadio clínico 1 de EAE.....	27
10	Porcentaje de variación de intensidad media de fluorescencia de TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-17A e IL-10; en el puntaje clínico 5 de EAE.....	28
11	Porcentaje de variación de intensidad media de fluorescencia de TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-17A e IL-10; en el puntaje clínico 0 (recuperación) de EAE.....	29
12	Ilustración esquemática de la migración celular por la BHE en EM.....	32
13	Ilustración esquemática de la tendencia encontrada en los niveles, de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, en las muestras de de LCR y suero de los animales con EAE.....	34

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Formas clínicas de la esclerosis múltiple.....	1
2	Sintomatología clínica en el desarrollo de la EAE.....	17
3	Evaluación de los signos clínicos en ratas con EAE.....	25
4	Análisis de la varianza en muestras de suero. Cada fila expone un análisis realizado para cada citocina en los diferentes estadios clínicos.....	51
5	Análisis de la varianza en muestras de LCR. Cada fila expone un análisis realizado para cada citocina en los diferentes estadios clínicos.....	51

Capítulo 1. Introducción

1.1 Esclerosis múltiple (EM)

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, progresiva y autoinmune del sistema nervioso central (SNC) (Machado-Santos *et al.*, 2018; Frischer *et al.*, 2009). Actualmente, se mantiene como una enfermedad incurable y paulatinamente se ha convertido en la enfermedad crónica inflamatoria del SNC con mayor prevalencia, afecta aproximadamente a 2.3 millones de personas alrededor del mundo (Filippi *et al.*, 2018). Etiológicamente, la EM se considera multifactorial, ya que involucra tanto factores genéticos como ambientales. Se exhiben en diferentes formas y la más común es la recurrente remitente, o RRMS (Tabla 1) (Dendrou *et al.*, 2015).

Tabla 1. Formas clínicas de la esclerosis múltiple

<i>Forma clínica</i>	<i>Porcentaje de pacientes que la presentan</i>	<i>Características</i>
<i>Recurrente-remitente (EMRR o RRMS)</i>	85%	Exacerbaciones periódicas imprevisibles de disfunción neurológica (ataques o brotes) con duración de semanas o meses, alternadas por períodos de resolución completa o parcial de los síntomas (remisiones).
<i>Secundaria progresiva (EMSP o SPMS)</i>	30-50% de los pacientes con RRMS o EMRR	Consiste en un empeoramiento progresivo y gradual de la discapacidad con o sin exacerbaciones agudas.
<i>Primaria progresiva (EMPP o PPMS)</i>	10-15%	No aparecen ataques o brotes, comienza de manera insidiosa y empeora gradualmente desde el inicio de la enfermedad, progresando más rápido en su incapacidad respecto de los otros subtipos.
<i>Progresiva-recurrente (EMPR o PRMS)</i>	3-5%	Progresiva en forma continua desde el inicio de la enfermedad, indicando exacerbaciones severas periódicas. Este subtipo se considera una forma más severa de la EMPP.

En la EM, uno de los síntomas más comunes es el dolor neuropático (DN), el cual se asocia a la inflamación y la presencia de lesiones en el SNC. El DN, es el síndrome más complicado de tratar en

pacientes con EM, y se estima que está presente en aproximadamente entre el 50-80% de la población con esta enfermedad (Olechowski *et al.*, 2009).

¿Qué es el dolor?

El dolor es una respuesta del organismo ante estímulos físicos, químicos o mecánicos que ponen en riesgo su integridad. Se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a daño tisular real o potencial y que puede ser descrita en términos de la magnitud de dicho daño (Merskey, 1986). Por lo tanto, el dolor es una sensación multidimensional con fuertes componentes cognitivos y emocionales que puede variar en intensidad (leve, moderado o severo), calidad (agudo, quemante, continuo), duración (transitorio, intermitente o persistente) y referencia (superficial, profundo, localizado o difuso) (Woolf, 2004).

El dolor es un problema de salud pública que afecta a toda la población independientemente de la edad, género o etnia. Se calcula que alrededor del 20% de la población adulta en el mundo sufre algún tipo de dolor (Goldberg y McGee, 2011). En México, no existen estudios epidemiológicos oficiales, pero se estima que alrededor de 28 millones de personas desarrollaron dolor crónico en el 2010 (Covarrubias-Gómez *et al.*, 2010).

Descripción general de los nociceptores

La nocicepción, es el proceso mediante el cual los organismos detectan estímulos intensos (térmicos, mecánicos o químicos) a través de una subpoblación de fibras nerviosas periféricas denominadas nociceptores (Basbaum y Jessell, 2000). Los cuerpos celulares de los nociceptores se localizan en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) o en el ganglio trigeminal (Basbaum *et al.*, 2009; Woolf y Ma, 2007). Los nociceptores son capaces de diferenciar entre estímulos inocuos y nocivos, ya que tienen un alto umbral de activación, que les permite decodificar la intensidad de un estímulo, hasta considerarlo perjudicial gracias a sus propiedades biofísicas y moleculares (Basbaum *et al.* 2009; Woolf y Ma, 2007; Cervero y Laird, 1999). La velocidad de transmisión de los estímulos nociceptivos está directamente relacionada con el diámetro de los axones de los nociceptores, y con la presencia o ausencia de mielina.

Clasificación del dolor

En condiciones normales, el dolor funciona como un sistema de protección que detecta estímulos nocivos y minimiza el contacto con estos. Sin embargo, en condiciones patológicas el dolor pierde su capacidad protectora; es decir, los procesos y las estructuras sensoriales que lo conforman se ven afectados (Woolf y Ma, 2007). Se clasifica de acuerdo con la duración y características fisiopatológicas que lo producen (Woolf y Ma, 2007; Woolf, 2004):

- **Dolor nociceptivo:** Este tipo de dolor se produce por la activación de los nociceptores cutáneos de alto umbral en ausencia de daño tisular y es esencial para detectar y minimizar, el contacto con estímulos potencialmente dañinos, por lo que implica una respuesta autonómica y un reflejo de retirada.
- **Dolor inflamatorio:** El dolor inflamatorio se produce en presencia de daño tisular que estimula la activación del sistema inmune y la subsecuente disminución del umbral de activación de las fibras aferentes primarias. La sensibilidad de la parte afectada aumenta y de esta manera se previene el contacto físico o movimiento hasta su recuperación.
- **Dolor neuropático:** Se define como un dolor constante que perdura por más de 12 semanas en humanos y afecta aproximadamente al 25% de la población mundial. La forma más conocida del dolor crónico es la variante neuropática, y es definido como el dolor que es iniciado o causado por una lesión primaria o una disfunción en el SNC.

Presencia de dolor neuropático en esclerosis múltiple

En la EM, el DN es uno de los síntomas más frecuentes, reduciendo dramáticamente la calidad de vida de las personas con esta enfermedad (Khan y Smith, 2014). El dolor se transforma en un cuadro crónico patológico principalmente bilateral, de naturaleza continua, caracterizado por ardor, pinchazos y sensación de apuñalamiento. Se manifiesta durante el inicio de la EM y persiste a lo largo de la enfermedad (Khan y Smith, 2014). Los síndromes de dolor asociado a la EM pueden ser divididos en niveles o grados; son comúnmente relacionados al desarrollo de ansiedad y depresión (Wu y Alvarez, 2012). En el primario, se encuentra al dolor causado directamente por la desmielinización, neuroinflamación y el daño axonal.

Por otro lado, el secundario engloba al dolor provocado, resultado de las lesiones del SNC (Zagon y McLaughlin, 2017). En la forma clínica de EM-DN, se categoriza al dolor como independiente o estímulo dependiente, el primero se caracteriza por ser perseverante y severo, mientras que el segundo por hiperalgesia y alodinia.

Modelos animales de esclerosis múltiple

El nivel de complejidad para acceder al tejido del SNC, en el periodo previo a la aparición de las lesiones neurológicas, aunado a los mecanismos involucrados en la enfermedad, ha significado un gran reto para la identificación de biomarcadores, de la progresión de esta patología. En la actualidad, solo la imagen por resonancia magnética (MRI) permite obtener información parcial del grado de desmielinización y disfunción de la barrera hematoencefálica (Bennet *et al.*, 2010).

A pesar de décadas de extensas investigaciones que han llevado al desarrollo de varios tratamientos parcialmente efectivos, todavía no se conoce bien toda su fisiopatología. Además, los investigadores tienen acceso limitado a muestras de tejido y biopsias de pacientes con esta enfermedad en estadios tempranos. Solo tienen acceso cuando el paciente ha fallecido (post-mortem), limitando el progreso en nuevas terapias farmacológicas y diagnósticas. Ante la restricción de investigación en humanos, se han desarrollado modelos en animales, principalmente roedores, que permiten entender de mejor manera los mecanismos inmunopatológicos subyacentes, probar nuevos enfoques terapéuticos e identificar biomarcadores para su diagnóstico y tratamiento (Denic *et al.*, 2011).

1. Modelos inducidos por virus, principalmente infección por el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV) y la consiguiente desmielinización crónica
2. Modelos de desmielinización inducida por toxinas, incluido el modelo de cuprizona y desmielinización focal inducida por lisofosfatidilcolina (lisolecitina).
3. Modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).

El modelo de EAE, es la variante más utilizada para simular la enfermedad inflamatoria autoinmune (con más de 8000 publicaciones en el PubMed hasta 2019). Éste refleja los signos y síntomas de la

enfermedad en humanos, facilita la comprensión de los procesos y alteraciones que se están llevando a cabo, permitiendo estudiar la fisiopatología de la enfermedad y desarrollar nuevas terapias farmacológicas (Arnon y Aharoni, 2009). Así mismo, en este modelo se ha buscado definir nuevos biomarcadores, que deben ofrecer potencial en el diagnóstico y desarrollo de terapias inmunomoduladoras. Por ello, la investigación de los estudios de la relación EM-DN junto con la respuesta inmunológica mediada por citocinas, es relevante para revelar la importancia de esta interacción y conocer mejor la fisiopatología de esta patología autoinmune (Denic *et al.*, 2011).

Descripción general de las citocinas

Las citocinas son moléculas de origen proteico y bajo peso molecular (por lo general menor a 30 kDa). Participan en procesos de diferenciación y comunicación celular, así como de migración dirigida. Sin embargo, una de sus funciones principales es la de regular la respuesta inflamatoria (Filella y Ballesta, 2002). Son producidas por distintos tipos de células, principalmente las pertenecientes al sistema inmunológico como las distintas subpoblaciones de linfocitos Th, incluyendo a los T reguladores (Treg) y a los macrófagos (Sánchez *et al.*, 2005)

El efecto ejercido por las citocinas se da mediante su unión con un receptor de alta afinidad, mismo que está expresado en la superficie de las células diana. Así mismo, tienen distintos modos de acción; autocrino, es decir sobre la misma célula que secreta la citocina; paracrino, sobre células cercanas; y endocrino, cuando el efecto es sobre células lejanas. Una vez unida, la citocina con el receptor de la célula diana, se genera una cascada de señalización intracelular. Estas señales provocan una alteración en la expresión génica de la célula, que resulta en alteraciones de procesos biológicos, tales como diferenciación, proliferación o activación celular (Filella y Ballesta 2002; Navikas y Link 1996)

De igual manera las citocinas tienen distintas formas de afectar a la célula. Entre ellas, encontramos al pleiotropismo, que se refiere cuando una misma citocina tiene distintos efectos en varios tipos celulares; la redundancia, se da cuando múltiples citocinas conllevan al mismo efecto; la sinergia, cuando existe un efecto cooperativo entre diferentes citocinas; antagonismo, referente a la inhibición del efecto de una citocina por otra; e inducción de una cascada de amplificación, lo que significa un mecanismo por el cual se amplifica la producción de una citocina en particular. Estos procesos permiten que, con solo unos pocos tipos de citocinas, producidas por un tipo celular como macrófagos o linfocitos T colaboradores

(Th), recluten y activan una red completa de células inmunológicas, para generar una respuesta (Duque y Descoteaux 2014; Oliveira *et al.* 2011; Filella y Ballesta 2002).

Clasificación de las citocinas

Dentro del grupo de las citocinas se incorporan a las interleucinas (IL), los interferones (IFN), a los factores de necrosis tumoral (TNF), los factores estimulantes de colonias (CSF) y finalmente a las quimiocinas (Filella y Ballesta 2002).

El papel que desempeñan las citocinas en la respuesta inflamatoria es clave y está definido por el balance entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Fig 1). Entre las proinflamatorias destacan la interleucina IL-2, IL-1, que junto al factor de necrosis tumoral (TNF)- α , tienen un efecto sinérgico sobre el inicio de la inflamación, mismo que es promovido en conjunto con el IFN- γ , ya que este induce la secreción de TNF- α . Así mismo, existe una variedad de citocinas antiinflamatorias, como la IL-4 e IL-10. Por su parte, citocinas como TNF- α , IL-6, IL-17 e IFN- γ , presentan propiedades pro y antiinflamatorias (pleiotropismo) (Gallart, 1998).

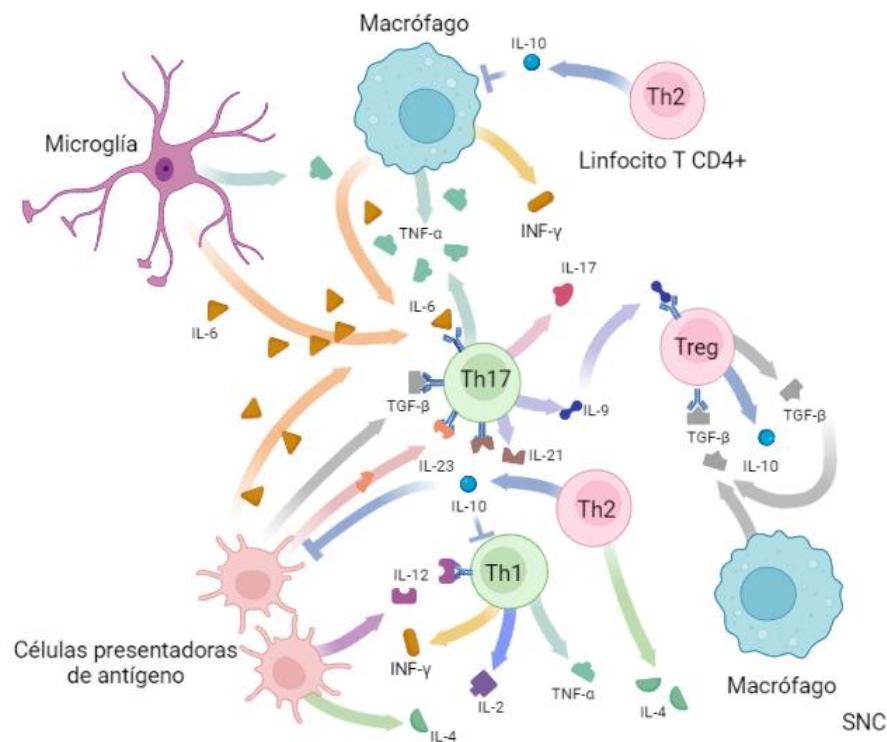


Figura. 1 Ilustración esquemática de la red de células, en el sistema nervioso central, secretoras de citocinas en un cuadro de la esclerosis múltiple remitente recurrente. Se exhibe la secreción de citocinas e interacciones entre células presentadoras de antígeno, macrófagos, microglía y las subpoblaciones de linfocitos T. Tomado y modificado de de Taekyun *et al.*, 2012.

Interleucina 2 (IL-2)

Esta citocina es secretada principalmente por linfocitos T activados y forma parte de la respuesta tipo Th1 se une a un receptor de membrana (IL-2R), con el fin de llevar a cabo su acción biológica. Actúa promoviendo la proliferación de linfocitos T y B. Induce la liberación de TNF- α e IL-1, citocinas de carácter proinflamatorio. La IL-2 es necesaria para el correcto funcionamiento de la memoria inmunitaria, reconocimiento de autoantígenos y de antígenos externos. En individuos sanos, existen niveles de IL-2R, por lo que niveles superiores obedecen a numerosas patologías autoinmunes, tales como artritis reumatoide y esclerosis múltiple (Peerlings *et al.* 2021; Zhou *et al.* 2021).

Interleucina 4 (IL-4)

La IL-4 es secretada principalmente por linfocitos Th2, eosinófilos, basófilos y mastocitos. Ésta, junto a la IL-2 es un factor de crecimiento autocrino de los linfocitos TCD4+ activados y de los precursores de linfocitos TCD8+. La respuesta celular de IL-4 se da mediante la unión a un receptor IL-4R α , mismo que se encuentra expresado en la mayoría de las células. Al unirse a su ligando, IL-4R α se dimeriza con la cadena γ común, lo que produce un complejo de señalización de tipo 1. Este complejo de tipo 1 es fundamental para la diferenciación de linfocitos T hacia Th2 y el desarrollo de macrófagos activados (Zhou *et al.* 2021; Gadani *et al.* 2012).

Interleucina 10 (IL-10)

También conocida como factor de inhibición de la síntesis de citocinas, la IL-10 es una citocina de perfil antiinflamatorio, secretada principalmente por linfocitos Th2 y Treg. Entre sus funciones, inhibe la expresión de moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor tipo II (MHC-II), por lo que es capaz de atenuar la síntesis de citocinas proinflamatorias, secretadas por macrófagos y linfocitos Th1 (IFN- γ , IL-2, TNF- α (Ozenci *et al.* 2000; Gallart 1998).

Interleucina 17 (IL-17)

La IL-17 es secretada principalmente por los linfocitos Th17, sin embargo, existen otras fuentes de IL-17, tales como los linfocitos $T\gamma/\delta$, células NK y las células TCD8+. Se reconoce como una citocina proinflamatoria, ya que ejerce su función al unirse al receptor IL-17RA. Una vez unidos, la IL-17 propicia la respuesta inflamatoria, al estimular la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-6 y TNF- α , entre otras. Citocinas que, a su vez, pueden incrementar las funciones de IL-17 por estimulación en conjunto (Duffy *et al.* 2019; Koenders *et al.* 2006)

Interleucina 6 (IL-6)

La IL-6 es producida por diversos tipos celulares, tales como macrófagos, linfocitos T y B, células endoteliales y células de la glía, entre otros. Se le conoce como el principal mediador de la respuesta inflamatoria, en la fase aguda. También, interviene regulando la respuesta inmunológica y exhiben funciones pleiotrópicas, es decir, efectos proinflamatorios y antiinflamatorios (Stampanoni *et al.* 2020; Codarri *et al.* 2010). A su vez, ejerce un control parcial sobre la producción de IL-1 y TNF- α , mismos, que poseen funciones proinflamatorias. En contraste, los efectos de la IL-6 dependen del contexto y de su concentración local, así como de la presencia o ausencia de otras proteínas reguladoras, que participan en la vía de transducción de señales (Filella y Ballesta, 2002).

La IL-6 produce sus efectos biológicos a través de la activación del receptor IL-6R, compuesto por dos subunidades denominadas R-IL-6 y gp-130, ambas subunidades se solubilizan una vez que se une la IL-6. Cuando la IL-6 se une a la R-IL-6, exterioriza efectos antiinflamatorios y cuando se une al gp-130 proinflamatorios. Por ello, la concentración de su receptor soluble también influye en los efectos producidos por esta citocina (Codarri *et al.*, 2010; Stampanoni *et al.*, 2020).

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

El TNF- α es una citocina pleiotrópica, producida en mayor medida por macrófagos y linfocitos T, principalmente las subpoblaciones Th1 y Th17. Actualmente, se conoce que tanto la forma soluble de TNF-

α como la unida a la membrana, pueden ejercer un papel biológico inflamatorio. La forma soluble a nivel celular (endocrina), favorece el reclutamiento de linfocitos y neutrófilos, así también, regula otros mediadores de la inflamación como la IL-1 e IL-6 (Koenders *et al.* 2006; Filella y Ballesta 2002). También, la forma unida a la membrana a nivel tisular (paracrina), promueve la remodelación y recuperación de los tejidos dañados. Su señalización se da a través de dos receptores, TNFR1 y TNFR2, mismos que desencadenan patologías o resultados protectores, respectivamente (Zahid *et al.*, 2021; Sedgwick *et al.*, 2000). Por ello, cuando el sistema inmune funciona de manera correcta, el TNF- α tiene un papel benéfico, con el fin de proteger al organismo. Sin embargo, alteraciones en los niveles de TNF- α fomentan el lugar a patologías importantes como la EM (Fragoso *et al.*, 2014).

Interferón gamma (IFN- γ)

El IFN- γ o de tipo II, es producido fundamentalmente por los linfocitos $T\gamma/\delta$, CD4+ y CD8+, y las células asesinas naturales (NK), ante un estímulo inflamatorio. Sin embargo, se ha demostrado que las células mieloides también son capaces de producirlo. Su expresión se inhibe por la acción de la IL-10 y el TGF β (Ding *et al.* 2015)

Al ser el único interferón de su tipo, no comparte receptores con los interferón de tipo I y III. No obstante, potencia los efectos de los interferones tipo I. El IFN- γ al ser secretado por los linfocitos Th1 tiene efecto en la regulación de la respuesta de los linfocitos Th2. Además, se encuentra implicado en la regulación de la respuesta inmunológica e inflamatoria, pues se encarga de activar los macrófagos y reclutar los leucocitos al sitio de infección, aumentando con esto el cuadro inflamatorio. Es importante recordar que, a pesar de su papel indispensable para la respuesta inmunitaria, su producción excesiva también puede contribuir al desarrollo de enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, EM, entre otras (Wagner *et al.* 2020; Ding *et al.* 2015; Gallart 1998).

1.2 Antecedentes

Respuesta inmunológica en EM

En la EM se asocia a la presencia de infiltrados celulares con la desmielinización, inflamación y daño axonal en las neuronas. Debido a que la cascada de señales en la respuesta inmunitaria de esta patología parece estar iniciada por la activación de los linfocitos T colaboradores (Th) en los ganglios linfáticos, mediante la interacción con los antígenos (antígenos de la mielina o propios que comparten epítomos similares a la mielina) que son conducidos por las células presentadoras de antígeno (APC). Siguiendo con la activación y diferenciación de linfocitos T, reactivos a la mielina, que al culminar su maduración migran hacia la circulación sanguínea, facilitando con ello su entrada a estructuras como el SNC (Garza *et al.*, 2020; McIntyre *et al.*, 2020; Olechowski *et al.*, 2009).

Por su parte, en el SNC existen células residentes denominadas neuroglías, entre las que se encuentran a los oligodendrocitos, los astrocitos, la microglía y las células ependimarias que también participan en la respuesta inmunológica. Entre las anteriores mencionadas, se destaca la microglía, definida como células sumamente sensibles a cambios en el microambiente neuronal. Estas células, son capaces de secretar mediadores solubles y de presentar antígenos, por lo que al reclutar linfocitos T y B, así como monocitos, existe una acción en conjunto de estos con la microglía, lo que conlleva a un aumento de citocinas y quimiocinas, que exacerban el cuadro inflamatorio observado en la EM (Torre-Fuentes *et al.*, 2020; Rommer *et al.*, 2019; Lassman y Horssen, 2011).

La desregulación de las citocinas en la esclerosis múltiple

El análisis de la relación entre las subpoblaciones de linfocitos Th y la expresión de citocinas, implícitas en la heterogeneidad de la EM, es de gran importancia para entender mejor su fisiopatología (Olesen *et al.*, 2019). Observaciones con análisis de microarreglos, evidenciaron un aumento en la transcripción de genes codificadores para las citocinas proinflamatorias, donde la IL-6, IL-17 e IFN- γ , tuvieron la mayor prevalencia en el modelo de EAE. Así mismo, revelaron que la subpoblación de Th1, secretora de la IL-2 e IFN- γ , se encontró en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) (Lock *et al.*, 2002, Ando *et al.*, 1989).

En los trabajos realizados por Murphy *et al.* (2010), se detectaron células secretoras, tanto de IL-17 como de IFN- γ , a las que se les denominó células Th1/Th17. Es decir, los linfocitos Th17 se comportaban como Th1, y se infiltraban en el SNC en una etapa previa a la aparición de los síntomas clínicos de la EAE. Estos resultados concordaron con la investigación de Gagliani *et al.* (2015), donde se muestra que debido a la plasticidad de los linfocitos Th17 se pueden comportar como una célula Th1 o diferenciarse a un linfocito Treg.

En diversas investigaciones en modelos de EAE, se ha encontrado una relación entre la participación de los linfocitos Tregs, y la supresión de la respuesta ejercida por las células T CD4+. Por lo que, al perder su funcionalidad inmunorreguladora, los linfocitos Treg aumentan indirectamente la respuesta inflamatoria (Ciccocioppo *et al.* 2019; Ruiz *et al.*, 2019; Danikowski *et al.* 2017). Así mismo, los linfocitos Treg son afectados por factores del huésped, por ejemplo, la microbiota. De acuerdo con Cekanaviciute *et al.* (2017), al estudiar el microbioma de 71 pacientes con EM, encontraron que la presencia de poblaciones bacterianas específicas, como *Parabacteroides distansonis* era baja. Sin embargo, experimentos realizados con transfusión de microbiota en animales con EAE, encontraron una relación entre el aumento de *Parabacteroides distansonis* y la actividad antiinflamatoria de los linfocitos Treg.

Función de las citocinas en dolor neuropático

Se conoce que en el modelo de EAE en ratones hay un influjo de linfocitos T en el LCR (medula espinal), lo que lleva a una desregulación de citocinas, incrementando la reactividad de los macrófagos y la microglía en el asta dorsal de la médula espinal, área importante para la transmisión de los procesos dolorosos (Olechowski *et al.*, 2009). Es así como M. Dubois-Dalcq *et al.*, en 1995 aseveraron que la microglía tenía una participación en el desarrollo de la EM, ya que observó la presencia de la microglía y astrocitos en las placas de desmielinización. Sugiriendo que la inflamación, la gliosis y la desmielinización son mediadores claves en el desarrollo de la alodinia (dolor neuropático) en animales con EAE. Así mismo, la activación de las células gliales libera sustancias pro-inflamatorias como citocinas, glutamato y óxido nítrico durante la gliosis, por lo que amplifican la hiperexcitabilidad (transmisión nociceptiva), contribuyendo al desarrollo y al mantenimiento del DN en EM (Scholz y Woolf, 2007).

Estudios realizados por Gilman-Sachs *et al.* (1989) en humanos con EM, encontraron en los pacientes con síntomas de fibromialgia (DN), una proporción anormal de linfocitos T CD4+/CD8+. La proporción de linfocitos T CD4+ fue mayor en pacientes enfermos, en comparación con individuos sanos. Estos resultados fueron sustanciales para el estudio de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+, implicados en el desarrollo del DN. Los resultados de los estudios en pacientes con EM-DN permitieron observar la desregulación entre las subpoblaciones Th1/Th2 y Th17/Treg, lo que genera una alteración en las citocinas secretadas (Luchting *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2013; Mangiacavalli *et al.*, 2010; Bi *et al.*, 2006). Complementario a estos resultados en múltiples estudios, realizados en pacientes con síndrome del dolor regional complejo (dolor neuropático), se encontró indicios del perfil antiinflamatorio de los linfocitos Th2 y Treg (Heyn *et al.*, 2019; Haas *et al.*, 2011). En contraste, Diederich *et al.* (2018) observaron un aumento de linfocitos Th1 y citocinas proinflamatorias como la IL-1, IL-2 e IFN- γ , pacientes con polineuropatía distal adquirida desmielinizante (DN). Derivado de la estimulación de estos receptores, se liberan moléculas como glutamato, péptido relacionado con el gen CGRP y la sustancia P (SP). Estos neuropéptidos y neurotransmisores activan neuronas para señalar el dolor en el SNC. Sin embargo, juegan un papel extra en los órganos periféricos, pues regulan la actividad de las células locales incluyendo a los linfocitos Th (Szkpany *et al.*, 2016; Ohtake *et al.*, 2015; Mikami *et al.*, 2011; Talme *et al.*, 2008).

1.3 Justificación

La relevancia de la participación de las citocinas, en la respuesta inflamatoria de la EM, es sustentada por el hecho de que la mayoría de las terapias aprobadas para el tratamiento de EM se basan en la inmunomodulación de células T (Rommer *et al.*, 2019). Tal es el caso de IFN- β (Mirandola *et al.*, 2009), una citocina antiviral con efecto inmunosupresor. Así mismo, tratamientos inmunomoduladores como el acetato de glatiramer (GA), han sido ampliamente utilizados, sin embargo, su mecanismo de acción no ha sido completamente elucidado, por lo que no se conoce en totalidad las posibles interacciones con otras moléculas que pudiesen afectar a la persona con la enfermedad (Weber *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2003). A pesar de disminuir la severidad de EM en los pacientes, tanto el IFN- β como el GA, no son efectivos en el tratamiento de la inhabilidad muscular provocada en EM (Dominguez-Villar *et al.*, 2019; Ford *et al.*, 2010). Existen otros medicamentos recientemente aprobados que se han dedicado a la modificación de la enfermedad, como Nataluzimab (2004), Alemtuzab (2013) y Daclizumab (2018); anticuerpos monoclonales que son utilizados para impedir el paso de linfocitos T a través de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, en un tratamiento prolongado, se han asociado con leuco-encefalopatías

y el aumento de riesgo a reacciones inmunes fatales, como hepatitis y desordenes cerebrales inflamatorios (Rommer *et al.*, 2019; Gueguen *et al.*, 2014; Ruck *et al.*, 2015; Milo *et al.*, 2014).

A pesar de los avances en investigación de la EM, hasta la fecha no se ha determinado la contribución ni la participación de diversas citocinas pro y antiinflamatorias, evaluadas en el SNC y la periferia, es decir, en líquido cefalorraquídeo y suero: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ y TNF- α , sobre el desarrollo de la EM y su relación con el DN en el modelo de EAE propuesto. Se ha establecido un modelo *in vivo* (*Rattus norvegicus*) de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), que refleja los signos y síntomas más comunes e importantes de la EM, en su forma clínica recurrente-remitente (EMRR o RRMS), como son: dificultades para caminar, alteración de la sensibilidad en las extremidades y alodinia como el principal síntoma del DN. Por ello, el propósito de esta investigación es realizar un modelo de esclerosis múltiple en animales, conocido como encefalomiелitis autoinmune experimental en el que se pueda correlacionar el desarrollo del dolor neuropático, con la progresión de los síntomas clínicos de la patología.

1.4 Hipótesis

Los cambios en los niveles de citocinas presentes en el suero y en el líquido cefalorraquídeo de *Rattus norvegicus* en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (MBP), está relacionada con la progresión y el mantenimiento del dolor neuropático.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar el desarrollo del dolor neuropático durante el curso de la EAE en un modelo en ratas, y su relación con los niveles de citocinas pro y antiinflamatorias.

1.5.2. Objetivos específicos

1. Establecer un modelo de EAE en la cepa Lewis de la especie *Rattus norvegicus*
2. Evaluar el DN durante el desarrollo y mantenimiento de la EAE.
3. Determinar la producción de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ y TNF- α presentes en el SNC, así como sus niveles en suero, durante el desarrollo y mantenimiento del DN-EAE.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Modelo de estudio

Para este estudio, se emplearon ratas hembra de la cepa Lewis, de la especie *Rattus Novergicus*, con una edad de entre 11-12 semanas de vida y peso aproximado de 180-220g. Los animales se mantuvieron en confinamiento en cajas de policarbonato, en cama de aserrín, proporcionándoles agua y alimento *ad libitum* y manteniendo un número de individuos no mayor a 5 por caja. Las condiciones de temperatura controlada fueron de 21-22°C, con un ciclo de luz/oscuridad de 12h/ 12h respectivamente, humedad relativa de 55-60% (Fuentes *et al.*, 2008). Todos los procedimientos siguieron las indicaciones de desarrollo, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, que indica las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Además, el protocolo fue sometido al comité de ética interno del CICESE en octubre del 2021 con numero BIOETICA.ANIM.TERR.2020.05.

2.2 Pie de cría

Se recibió, como una donación del Dr. Andrés Quintanar Stephano, investigador responsable del laboratorio de Neuroinmunoendocrinología del departamento de Fisiología y Farmacología del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, el número de animales necesarios para establecer un apropiado pie de cría. Es decir, cinco machos y nueve hembras de la cepa Lewis; con edades de 11 y 10 semanas, respectivamente. Es necesario como primer paso colocar al macho, previamente marcado, dentro de una caja. Con ello, el animal marcó su territorio. Un día después de haber realizado el paso previo, se colocó a la hembra dentro de la caja. Una vez finalizada esta acción, se evitó mover la caja o alterar el ambiente.

Una semana después de la colocación de la primera hembra, se colocó una segunda dentro de la caja, dejando el harén sin cambios. A la tercera semana, se retiró a la primera hembra, misma con altas probabilidades de estar preñada y se colocó en una caja aparte. Esa misma semana, después de la retirada de la primera hembra, se colocó una tercera hembra. Siguiendo con este patrón, la segunda hembra se retiró en la cuarta semana y la tercera hembra, en la quinta semana. Una vez nacidas las crías se realizó el destete, determinación de sexo y separación, cuando las crías cumplieron 21 días de edad.

2.3 Modelo de EAE

Preparación del antígeno encefalitógeno con cerebro de cobayo

Para inducir la EAE, se preparó un encefalitógeno con cerebro de un cobayo adulto, con un peso aproximado de 700g. Inicialmente, se colocó el cerebro en un vaso de precipitado de 50 ml, añadiendo a su vez 5 ml de solución salina isotónica. Con la ayuda de unas tijeras, se cortó finamente el tejido nervioso, quedando una mezcla heterogénea y acuosa. Esta mezcla, se pasó a un homogeneizador de aproximadamente 15 ml. Se homogeneizó el tejido por aproximadamente 5 minutos, hasta que se observó una mezcla homogénea. Para remover los detritus tisulares, se filtró la mezcla con un matraz Kitazato (50 ml) y un embudo Buchner con filtro. Después, se dividió el filtrado en dos tubos de 15 ml y se centrifugó a 1300 rpm por 7 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el tejido, re-suspendiendo la pastilla en 10 ml de solución salina, se agitó y repitió el lavado y centrifugado, tres veces. En el último centrifugado, se descartó el sobrenadante y se adicionó un volumen de solución salina, igual al de la pastilla, con el fin de re-suspender. Posteriormente, se hicieron alícuotas de 5 ml y se congelaron a -80°C , para su conservación (Quintanar-Stephano *et al.*, 2012).

Preparación del adyuvante completo de Freund (CFA)

Se pesó 1mg de *Mycobacterium tuberculosis* inactivado por calor (H37RA, Difco), por cada ml de adyuvante completo de Freund (SIGMA, GIBCO), se virtió en un mortero en donde se pulverizó finamente, y se prosiguió a mezclarlo con unas gotas de CFA. Una vez homogeneizado, se aspiró con la punta de la aguja, en la jeringa de vidrio con la cual se tomó el CFA (1mg/ml), logrando con ello la concentración necesaria de CFA (2mg/ml) (Quintanar-Stephano *et al.*, 2012).

Preparación de la emulsión encefalitogénica.

Se tomó con una jeringa de vidrio de 5 ml, la cantidad de 3 ml del homogeneizado cerebral, evitando las burbujas de aire. Después, utilizando una llave de tres vías, se conectó con la otra jeringa contenedora del CFA. La emulsión se preparó en frío, cubriendo con hielo las jeringas ensambladas en un recipiente con hielo. El contenido de las jeringas se logró emulsificar pasando alternadamente el contenido de una jeringa a la otra. Para comprobar que la emulsión se realizó correctamente, se colocó una pequeña

gota de la emulsión en el agua, observando que ésta flotaba y no lograba disolverse (Quintanar-Stephano *et al.*, 2012).

Inyección del inóculo

Para la inoculación correcta de las ratas, se rasuró previamente la parte baja del dorso del animal hasta la base de la cola; después, con una aguja 23G se inyectaron subcutáneamente 200 μ l de la emulsión en la base de la cola (Quintanar-Stephano *et al.*, 2012).

Inicio de la parálisis y evaluación de los signos clínicos de la EAE

Las ratas inmunizadas desarrollaron parálisis paulatina, la cual inició con la debilidad de la cola, progresando en sentido caudo-rostral, es decir de manera ascendente, a los miembros posteriores. La enfermedad inició entre los días 11-13 después de la inmunización. Por ello, se determinaron los síntomas clínicos de EAE (flacidez, debilidad muscular y parálisis) a diferentes días (tabla 2), como lo describen Barthelmes *et al.*, 2016, con la finalidad de establecer el curso temporal del desarrollo de la EAE.

La progresión de los signos tarda de 2-3 días para desarrollarse completamente, para luego recuperarse, de tal manera que a los 5-6 días de la aparición de los signos, la parálisis prácticamente desaparece.

Tabla 2. Sintomatología clínica en el desarrollo de la EAE

Puntuación	Síntomas clínicos
0	Sin signos
1	Parálisis completa de la cola
2	Parálisis completa de la cola y debilidad de los miembros posteriores, caracterizado por marcha claudicante.
3	Cola flácida y parálisis total de una pata
4	Cola flácida, parálisis de una pata y claudicación del miembro opuesto.
5	Parálisis total de ambos miembros posteriores

De acuerdo con los puntos establecidos en el protocolo de desarrollo de EAE en ratas, los puntos por encima del 5, es decir la parálisis de los miembros anteriores, se considerarán síntomas clínicos severos y estarán sujetos a mayor cuidado, consideración la eutanasia, en caso de ser necesario (Liu y Duff, 2008; Wiley, 2007). Con el fin de evitar muertes espontáneas y sufrimiento innecesario de los animales, se establecen puntos de finalización del experimento en los individuos, con letargia, inmovilización total, problemas severos para respirar y cuadros de anorexia (disminución del 20 % del peso inicial) (Zagon y McLaughlin, 2017; Quintanar-Stephano *et al.*, 2012; Wiley, 2007).

2.4 Evaluación del efecto alodínico en EAE

Para estudiar el desarrollo del DN en la EM, se evaluó la alodinia táctil. La prueba de umbral de retiro se basa en inducir el retiro de las patas traseras del animal a estímulos mecánicos ligeros; para ello, se estimulan las extremidades traseras, por medio de la aplicación de diferentes filamentos de von Frey (**Fig. 2**) con un rango de 0.4 gramos (g) (3.61 milinewtons (mN)) a 180 g (6.10 mN); a menor grosor del filamento, menor fuerza aplicada, y viceversa. Se comienza utilizando el filamento intermedio 1.4 g (4.17 mN), se cuentan 10 s; si el animal retira la pata (umbral de retiro), se toma como una respuesta positiva y se aplica un estímulo con menor fuerza, utilizando un filamento de menor calibre; sin embargo, si el animal no retira la pata, se toma como una respuesta negativa y se aplica un estímulo mayor con el siguiente filamento, hasta que el animal manifieste una respuesta al estímulo. En esta prueba, también se toman en cuenta otros factores como cambios en la expresión facial del animal (**Fig. 3**).

Después de la respuesta al estímulo, ya sea positiva o negativa, se toman 4 mediciones más, para tener en total una serie de 6 patrones de respuestas positivas y negativas. Los valores entre 15-20g se toman como normales y se entiende como alodinia a los valores menores a 4g. Los patrones de respuestas fueron tabulados y el 50% de umbral de retiro se calculó utilizando la fórmula de Dixon Ec. 1 (Gonzales-Cano *et al.*, 2018).



Figura 2. Filamentos de von Frey que utilizados durante la prueba de umbral de retiro. Son monofilamentos que deben presionarse contra la piel con la fuerza suficiente para causar su flexión.

$$Q = \frac{Xn - (Xn-1)}{Xn - X1} \quad (1)$$

Donde:

Xn: Es el valor atípico

Xn-1: Es el valor vecino más cercano

X1: Es el valor más pequeño

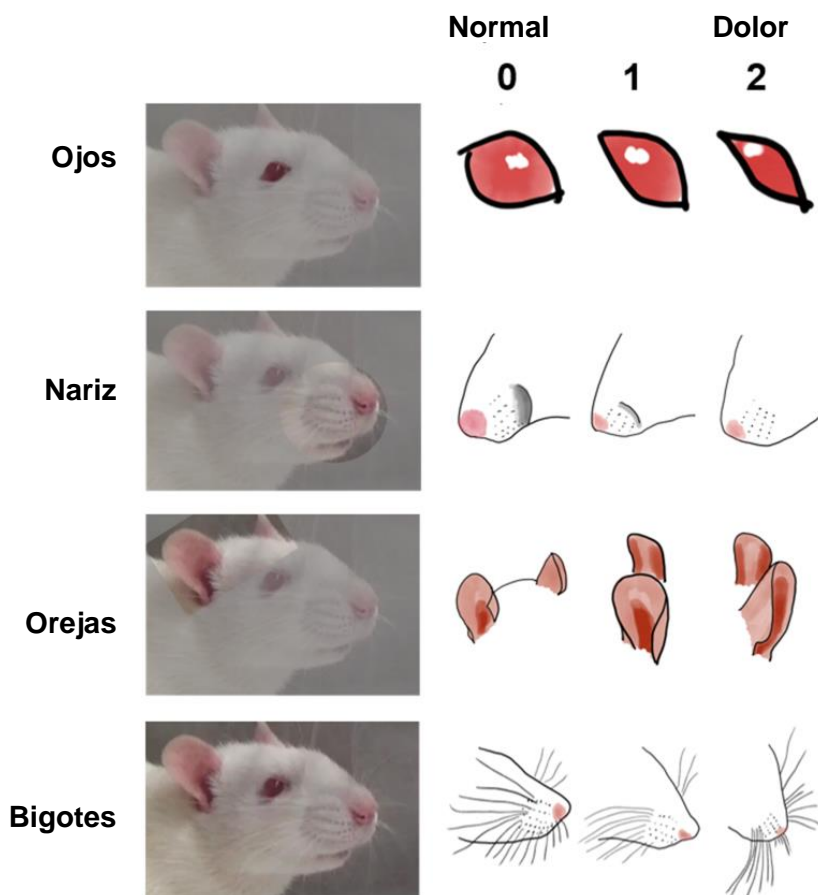


Figura 3. Cambios en la expresión facial de las ratas con dolor. La imagen muestra los cambios en las distintos componentes faciales, en correlación con los grados de dolor.

2.5 Colecta del líquido cefalorraquídeo (LCR o CFL) y extracción de suero de las ratas

Para llevar a cabo una correcta recolección de LCR se debe modificar una jeringa, transformándola en una jeringa de recolección. Para ello, se toma una aguja de 23G y un tubo de PE-50 de 10 pulgadas de longitud, a la aguja se le deja al descubierto alrededor de 5 mm del extremo biselado y el resto de la aguja se cubre con el tubo, con el fin de evitar la penetración profunda de la aguja durante la recolección; finalmente por el otro extremo del tubo, se coloca una jeringa de insulina 100 μ l.

Una vez realizado el material, se continuó al anestesiado de los animales, administrando una dosis de ketamina/xilazina de 100 mg/kg y 10 mg/kg (Wiley, 2007). Posteriormente, se rasuró la piel del cuello y cabeza para colocarla en un estereotáxico, fijando la cabeza del animal en un ángulo de 45 grados aproximadamente (Liu y Duff, 2008). Esto, hace palpable la superficie depresible que tiene la apariencia de un rombo y que lleva a la cisterna magna (se hace más visible al pasar una torunda con alcohol 70%), ubicada entre la protuberancia occipital y la columna vertebral. Se continuó con la inserción de la jeringa modificada, de manera horizontal, para posteriormente centralizar hacia la cisterna magna y recolectar LCR. Posteriormente, con una gentil aspiración el LCR fluyó a través de la aguja, subiendo por el tubo lentamente, por consiguiente, se evitó cualquier posible contaminación con sangre (Nirogui *et al.*, 2009). Después de la extracción del LCR, las ratas se sacrificaron mediante dislocación cervical y se continuó con la extracción de la sangre total, colectándola en tubos eppendorf. Una vez recolectadas, las muestras de sangre se centrifugaron a 2500 rpm por 15 min, para la separación del suero.

2.6 Cuantificación de citocinas solubles mediante citometría de flujo

Desarrollo Experimental

La cuantificación de las citocinas se realizó en el suero y LCR de ratas a los días correspondientes a los estadios clínicos, mismos que en promedio fueron los días 12 (P.C. 1), 15 (P.C. 5) y 21 (P.C. 0), después de la inmunización. Los signos y síntomas de la EM, así como, la alodinia se evaluaron cada 2 días, también después de la inmunización (**Fig. 4**).

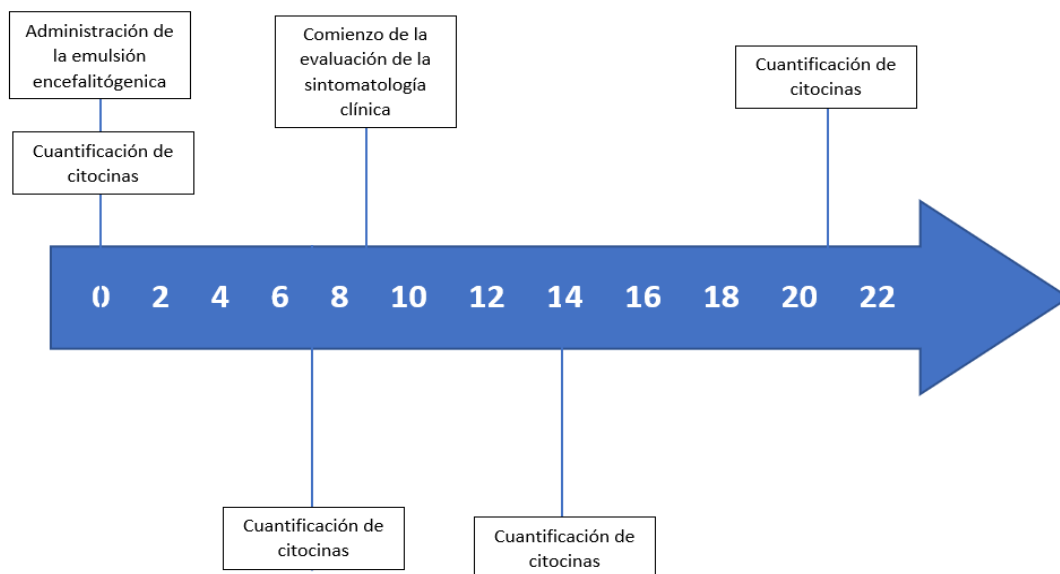


Figura 4. Diagrama que muestra la temporalidad en días, de la administración de la emulsión encefalitogénica, la evaluación de los síntomas clínicos y la cuantificación de las citocinas. El gráfico es representativo del diseño experimental utilizado en este estudio.

La cuantificación de citocinas se llevó a cabo mediante citometría de flujo, en suero y LCR, haciendo uso de un kit fenotípico de rata que contiene un coctel de anticuerpos fluorescentes específicos para IL-2, IL-4, IL-6, IL10, IL-17A, IFN- γ y TNF- α . Este kit utiliza perlas (no magnéticas) de diferentes tamaño y nivel de intensidad de fluorescencia. Estas características, se evaluaron en un citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson, país), mismo que cuenta con un láser de excitación, con una longitud de onda de 488 nm y mide las concentraciones de analito en función de la emisión medida de R-ficoeritrina. La concentración de los analitos en la muestra se determinó por comparación con las concentraciones encontradas en una curva estándar. Primer se realizó la preparación de una solución amortiguadora de lectura, la solución amortiguadora de lavado, y la mezcla de perlas de captura; cada una siguiendo las indicaciones del protocolo de ensayo, proporcionadas por el kit.

El análisis se llevó a cabo en una placa de 96 pozos, utilizando un volumen de 45 μ l, donde se depositaron 44 muestras, incluyendo las soluciones estándar, la muestra blanco y las muestras problema.

Se comenzó con la adición de la solución que contenía las perlas, cubiertas con el anticuerpo de detección para IL-2, IL-4, IL-6, IL10, IL-17A, IFN- γ y TNF- α ; a la cual, se le removió la solución amortiguadora filtrando al vacío. Seguido de la adición de la solución estándar y las muestras a cada uno de los pozos

correspondientes (**Fig. 5**), se colocó una tapa de aluminio y se incubó a temperatura ambiente, en un agitador a 700 rpm por 60 minutos. Una vez pasado el tiempo, se hizo un lavado por triplicado con 100 μ l de solución wash-buffer 1x. Se agregó a cada pocillo 25 μ l de la solución de trabajo, contenedora de anticuerpos marcados con biotina (biotinilado) y se incubó en la oscuridad, agitando a 700 rpm por 30 minutos. Se lavó una vez más con 100 μ l de solución wash-buffer 1x y se le añadieron 25 μ l de la solución streptavidina-PE, para continuar con la incubación de la placa en la oscuridad, agitando a 700 rpm por 20 minutos. Posteriormente, se removió el remanente de la solución, lavando dos veces con 100 μ l de la solución wash-buffer 1x y se le añadieron 150 μ l de la solución amortiguadora de lectura, con el fin de re-suspender las perlas. Finalmente, la placa se cubrió de la oscuridad, se mantuvo en incubación por 30 segundos a 700 rpm y se llevó a leer en el citómetro de flujo.

En cada uno de los pozos correspondientes (azul, verde, violeta y marrón) se agregaron 15 μ l de las muestras de suero y LCR, y 30 μ l de la mezcla de perlas cubiertas con el anticuerpo de detección.

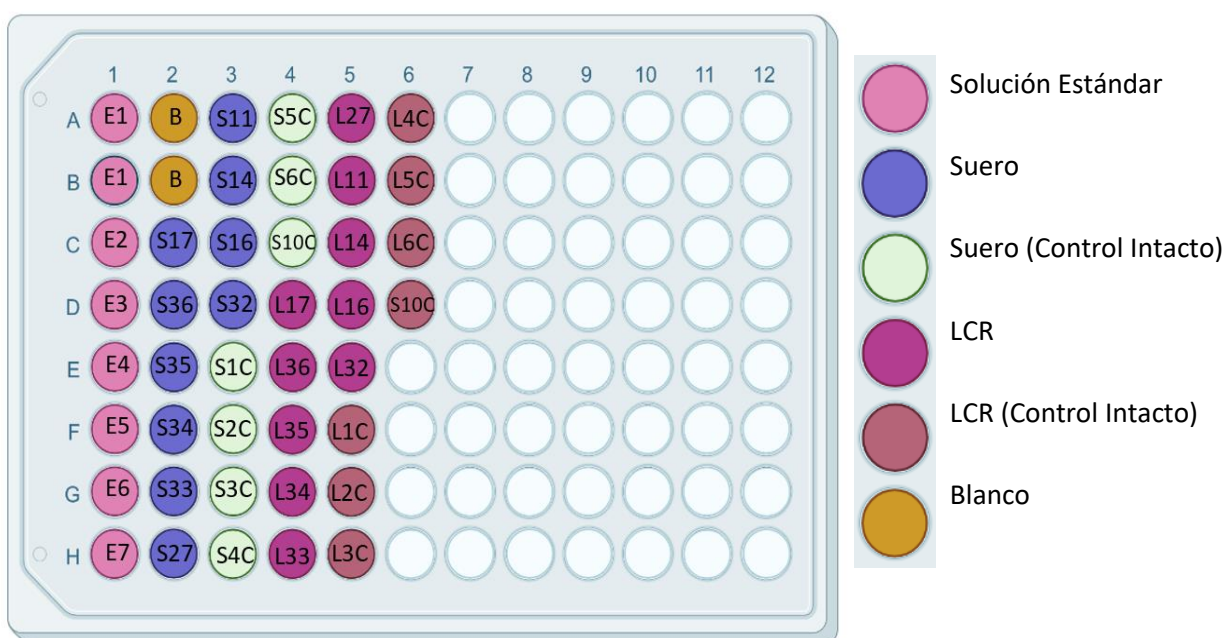


Figura 5. Disposición en placa de 96 pozos de las muestras utilizadas en citometría de flujo, los círculos rosas corresponden a las soluciones estándar, los naranjas al blanco, los azules y verde a las muestras de suero, problema y control respectivamente. Las muestras de LCR problema y control corresponden a los pocillos violeta y marrón, respectivamente.

2.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la evaluación de síntomas producidos por la EAE, se elaboró una gráfica que relaciona el tiempo de progresión de cada síntoma y otra con el nivel de parálisis. Para conferirles naturaleza cuantitativa se los denominó en puntuaciones clínicas, anteriormente mencionadas en la metodología.

En la evaluación del desarrollo del DN, se realizaron gráficas del 50 % de umbral de retiro (g) vs tiempo (días), según la Ec. 2. Todos los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar de cada grupo experimental de 5 animales.

$$50\% \text{ Umbral de retiro } (g) = \frac{(10[Xf+K\delta])}{10,000} \text{ (Ec. 2)}$$

Donde:

Xf: es el valor del último filamento de Von Frey utilizado (unidades log)

K: es el factor de corrección basado en valor tabulado de respuestas positivas y negativas

δ : es la diferencia de promedio entre estímulos (unidades log).

Para el tratamiento de los resultados de la citometría de flujo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, en donde se compararon la intensidad media de fluorescencia (FMI) de las citocinas en las diferentes muestras analizadas \pm el error estándar de cada grupo experimental ($n=4$ animales). Debido a que los resultados fueron menores a 10 pg/ml se expresaron en FMI, ya que no se lograron detectar como concentración por el software FACS Diva. Además, se realizó una prueba de comparación múltiple de Dunnett. El análisis se llevó a cabo con ayuda del software GraphPad Prism 8.01

Capítulo 3. Resultados

En este trabajo se estableció un modelo de EAE en ratas Lewis con el fin de evaluar el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad y los comportamientos similares al dolor. Así mismo, se determinaron los niveles de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ y TNF- α , en LCR y suero, para relacionarlas con la neuroinflamación y la alodinia.

3.1 Modelo en rata: encefalomiелitis autoinmune experimental

Se inmunizaron un total de 10 ratas con la emulsión encefalitogénica, de las cuales 5 desarrollaron Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE). Además, se evaluaron el peso y los días en los que se presentó la parálisis en cada animal a lo largo del curso temporal (21 días). En la **Fig. 7**, se muestran los días en los que se desarrollaron los diferentes estadios de la EAE, el estadio inicial (P.C. 1 = parálisis de la cola) se desarrolló al día 13, el estadio más activo (P.C. 5= parálisis de la cola y patas traseras) se presentó al día 15, mientras que el estadio de remisión se alcanzó al día 21, posterior a la inmunización. Este estudio nos permitió establecer el tiempo adecuado para el análisis de las citocinas, tanto en suero como en LCR.

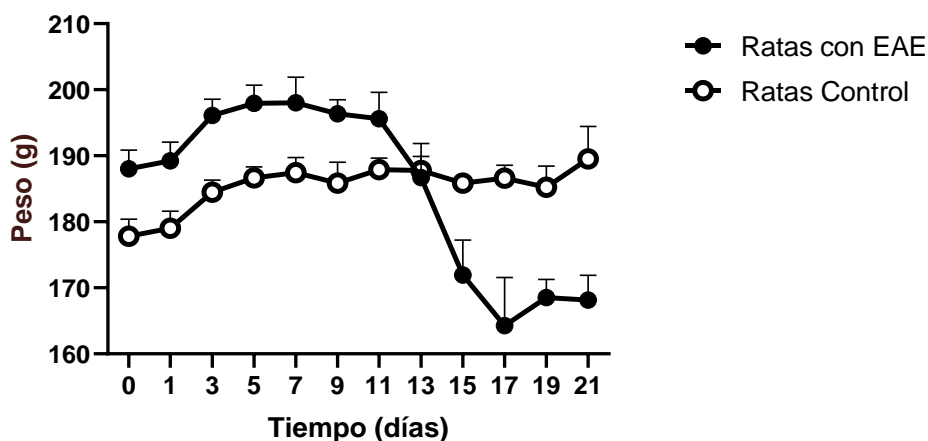


Figura 6. Representación gráfica del peso registrados durante el desarrollo de la EAE. Las ratas con EAE, se representan con círculos rellenos y las ratas control con círculos abiertos. Los resultados representan el promedio \pm error estándar (n=5).

En la **Fig. 6** se muestra que las ratas con EAE tuvieron una ganancia de peso en los primeros días, después de la administración encefalitogénica, el peso se mantuvo constante durante aproximadamente 5 días. Sin embargo, al día 11 posterior a la administración disminuyó 16% en un periodo de 2 días. Por el contrario, el grupo de las ratas control aumentaron de peso conforme a lo esperado. Es importante señalar que una rata con EAE se tuvo que eutanizar para evitar que sufriera.

Tabla 3. Evaluación de los signos clínicos en ratas con EAE

RATA	DIAS POST-INOCULACIÓN												
	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
2	0	0	0	0	1	4	5	4	3	2	0	0	0
6	0	0	0	0	0	2	3	5	1	1	0.5	0	0
7	0	0	0	0	1	3	5	5	3	3	3	2	1.5
10	0	0	1	1	2	3	5	5	2	0	-	-	-
11	0	0	3	3	5	2	1	1	1	1	0.5	0	0

Donde, 0= sin signos; 1=parálisis completa de la cola; 2= parálisis completa de la cola y debilidad de los miembros posteriores (claudicación); 3= cola flácida y parálisis total de una pata; 4= cola flácida, parálisis de una pata y claudicación del miembro opuesto y; 5= parálisis total de ambos miembros posteriores.

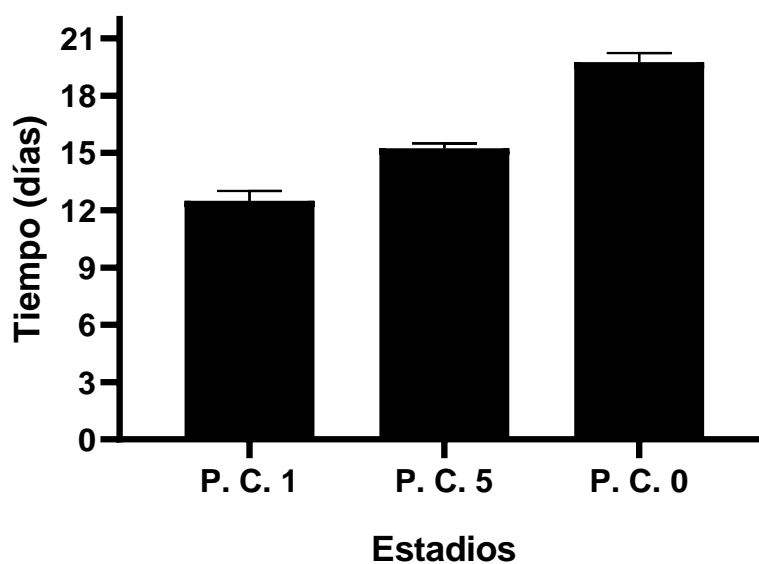


Figura 7. Desarrollo de los estadios durante la EAE. P.C. 1 se refiere al estadio inicial (parálisis de la cola); P.C. 5 corresponde al estadio máximo de la patología (parálisis total de ambos miembros posteriores) y; P.C. 0 indica un estadio de remisión (no hay signos de parálisis). Los resultados son el promedio \pm error estándar. (n=5).

3.2 Desarrollo de la alodinia (DN)

El dolor en animales no se puede medir directamente, por lo que se puede evaluar a partir de su conducta. Por consiguiente, para evaluar el dolor neuropático en las ratas, se calculó el 50% de umbral de retiro (alodinia táctil), mismo que fue obtenido mediante el método “up and down” y calculado por la ecuación de Dixon (detalles en la metodología). También se tomaron en cuenta otros factores como los cambios en la expresión facial y sonidos alusivos a malestar (chillidos). Las mediciones se realizaron cada dos días, siguiendo el curso temporal de la EAE. Ilustrado en las **Figs. 7 y 8**, mismas que corresponden a los resultados de las patas derechas e izquierdas, respectivamente.

En la gráfica 7 se observa el desarrollo de la alodinia en animales con EAE. El umbral de retiro empezó a disminuir a partir del día 9, llegando a valores menores a 4 g entre los días 11 y 21, indicando el desarrollo del DN. En contraste, el grupo control siempre se mantuvo en valores de 18 a 20 g, considerados como una respuesta nociceptiva normal (ausencia de dolor). Estos resultados se correlacionan con la pérdida de peso y con el desarrollo del estadio de parálisis (P.C. 5), manteniéndose hasta el estadio de remisión.

Es importante señalar que la alodinia táctil se desarrolló antes (9 días) que los primeros signos clínicos de la EAE (11 días = P.C. 1)

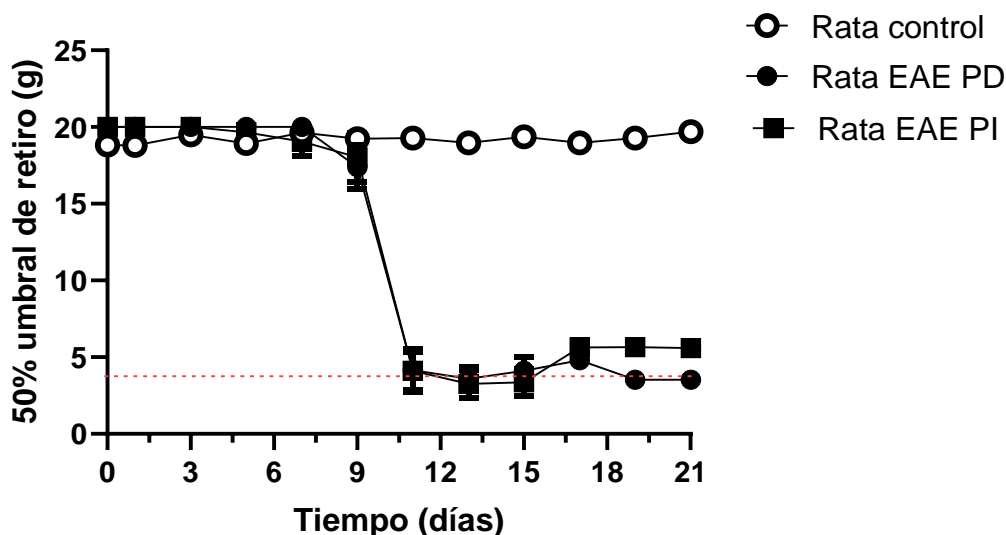


Figura 8. 50% de umbral de retiro de las patas derecha (PD) e izquierda (PI) durante el desarrollo de la EAE. Los círculos abiertos muestran los resultados de las ratas control y los símbolos cerrados muestran el desarrollo de la alodinia de las ratas con EAE. La línea roja punteada indica el límite para considerar alodinia (4g) Los resultados son el promedio \pm error estándar (n=5).

3.3 Citocinas en suero y LCR

Con base en estudios previos, sobre la aparición de los signos clínicos y el desarrollo del DN en la EAE, se decidió tomar muestras de suero y LCR en los estadios 1 (parálisis de la cola), estadio 5 (parálisis de la cola y las patas traseras) y estadio 0 (remisión) para conocer la participación de las citocinas involucradas en la neuroinflamación. Las interleucinas analizadas fueron: IL-2, IL-4, IL-6, IL10, IL-17A, IFN- γ y TNF- α .

En el primer estadio (P.C. 1), cuando las ratas muestran parálisis en la cola, se observó que existe una sobreexpresión de todas las citocinas, tanto proinflamatorias, como antiinflamatorias. En la **Fig. 9** se aprecia un aumento en el porcentaje de fluorescencia media, indicativo de los niveles relativos de las citocinas en suero (A) y LCR (B), con respecto al grupo control, destacando que las citocinas proinflamatorias como el IFN- γ , la IL-6 y el TNF- α aumentaron entre 5 y 6 veces en orden de magnitud en el LCR, en comparación con las muestras séricas. Por otra parte, la IL-4, la IL-17 y la IL-10 solo aumentaron entre 1-2 veces en orden de magnitud en el LCR versus el suero, mientras que la IL-2 solo aumentó 4 veces en orden de magnitud en el suero, pero no en el LCR. Además, en este estadio también se observó el inicio del desarrollo del DN con la disminución del umbral del dolor.

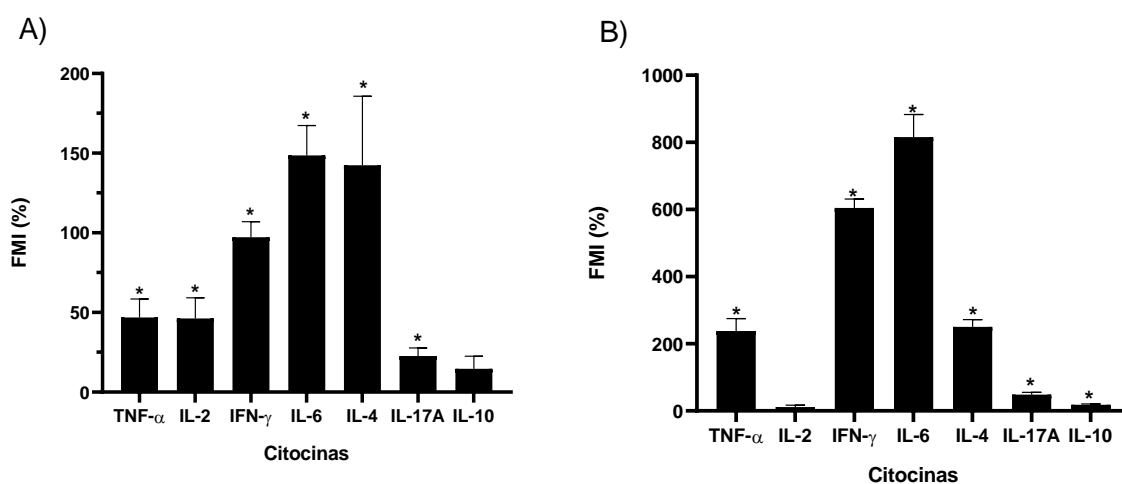


Figura 9. Porcentaje de variación de intensidad media de fluorescencia de TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-17A e IL-10; en el estadio clínico 1 de EAE. A) Suero. B) LCR. Los datos muestran el promedio \pm error estándar (n=4). Los resultados se analizaron con un ANOVA de una vía, seguido de por la prueba post hoc de Dunnett. * (≤ 0.05 con respecto al grupo control).

En la **Fig. 10** se puede observar el porcentaje de fluorescencia media, indicativo de los niveles de las citocinas en suero (A) y LCR (B), con respecto al grupo control, en el estadio de mayor grado de la

parálisis (cola y las patas traseras, P.C. 5). En esta fase, el TNF- α , el IFN- γ y la IL-17 se mantuvieron aumentadas, en el mismo orden de magnitud en el LCR. Mientras que, la IL-4 y la IL-10 (antiinflamatorias) disminuyeron tanto en el LCR como en el suero. En cuanto a la IL-4, los niveles en LCR siguieron aumentados en comparación con el suero, mientras que la IL-10 disminuyó en el LCR a niveles menores al control. Al contrario, los niveles de la IL-6 aumentaron casi el doble en el LCR en comparación con el estadio inicial (P.C. 1), en tanto que los niveles séricos disminuyeron a la mitad. Con respecto a la IL-2, los niveles séricos aumentaron casi el doble, pero se mantuvieron constantes en el LCR, en comparación con el estadio anterior (P.C. 1).

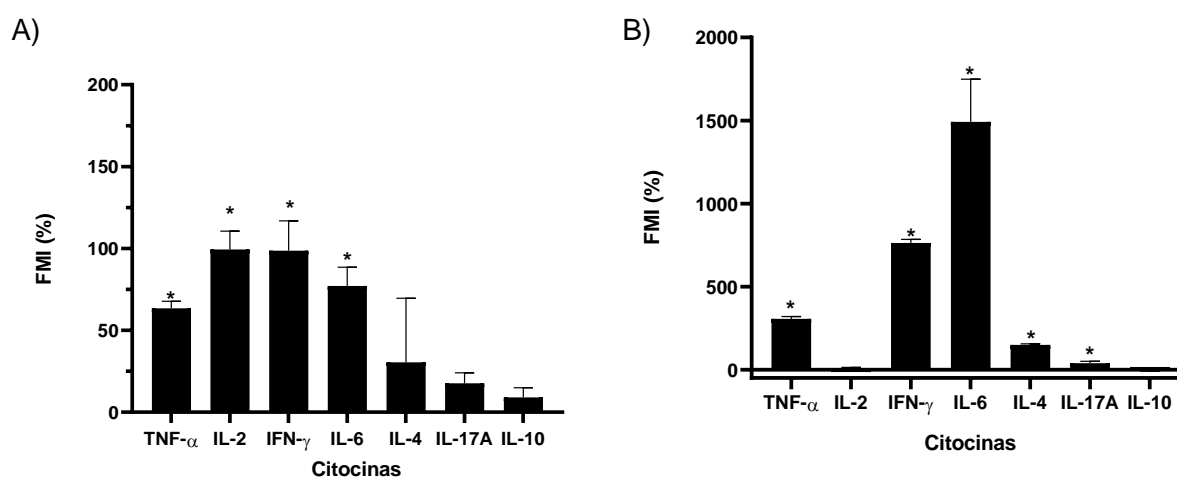


Figura 10. Porcentaje de variación de intensidad media de fluorescencia de TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-17A e IL-10; en el puntaje clínico 5 de EAE. A) Suero. B) LCR. Los datos representan el promedio \pm error estándar (n=4). Los resultados se analizaron con un ANOVA de una vía, seguido de por la prueba post hoc de Dunnett. * (≤ 0.05 con respecto al grupo control).

Así también, en la **Fig. 11**, que corresponde al estadio de remisión (P.C. 0), se puede observar en el porcentaje de fluorescencia media cuantificado en suero A) y LCR B), que tanto, el TNF- α como la IL-10 regresaron a los valores del estadio inicial en ambas muestras (P.C. 1). La IL-17 se mantuvo constante en los tres estadios en LCR y suero. El IFN- γ y la IL-6 en LCR, regresaron a niveles cercanos mostrados en el estadio 1. Sin embargo, los niveles séricos disminuyeron en un 80% en comparación con el estadio inicial. En contraste la IL-2 disminuyó considerablemente a valores cercanos o menores al control. La IL-4, presentó un aumento en LCR y suero en comparación con el estadio anterior (P.C. 5).

La significancia de los resultados fue analizada, mediante el uso de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Se compararon, la intensidad media de fluorescencia (FMI) de las citocinas en las muestras de

suero (Tabla 3, Anexo 1) y LCR (Tabla 4, Anexo 1), en los tres estadios clínicos \pm el error estándar de cada grupo experimental (n=4 animales).

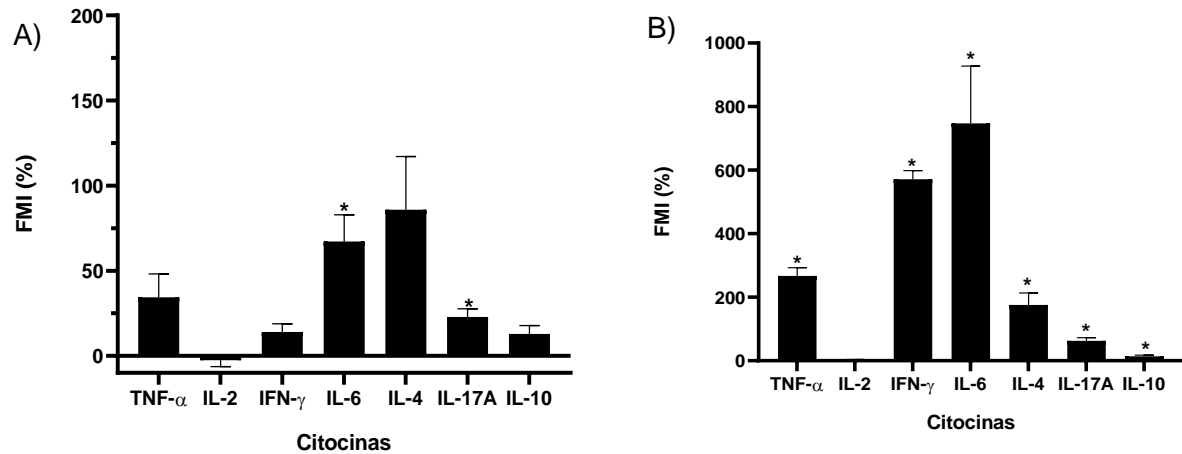


Figura 11. Porcentaje de variación de intensidad media de fluorescencia de TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-17A e IL-10; en el puntaje clínico 0 (recuperación) de EAE. A) Suero. B) LCR. Los datos exponen el promedio \pm SEM (n=4). Los resultados se analizaron con un ANOVA de una vía, seguido de por la prueba post hoc de Dunnett. * (≤ 0.05 con respecto al grupo control).

Capítulo 4. Discusión

4.1 EAE: modelo para el estudio de EM

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune de carácter crónico del SNC, distinguida por la existencia de neuroinflamación, desmielinización y daño neuronal. Como se ha mencionado en diversas ocasiones, uno de los mayores síntomas de la EM es la pérdida de movilidad (parálisis) y la presencia de dolor neuropático (DN), siendo la alodinia un síntoma del DN que aparece en la mayoría de los casos. La alodinia es la percepción anormal del dolor ante un estímulo inocuo (Olechowski *et al.*, 2009). Para el estudio de estas dos sintomatologías características de la EM, se utilizan modelos animales que permiten la recreación de los síntomas clínicos de la enfermedad en humanos. El modelo más utilizado es conocido como el modelo *in vivo* de EAE en roedores (Denic *et al.*, 2011; Arnon y Aharoni, 2009). Cabe recordar que existe una amplia gama de modelos de EAE, los cuales varían en la sintomatología presentada, lo que ayuda a entender mejor la heterogeneidad de la fisiopatología de la EM en humanos.

En esta investigación se realizó un modelo *in vivo* de EAE en ratas de la cepa Lewis, mismas que fueron inmunizadas con macerado de cerebro y médula espinal de cuyo, con el propósito de recrear una hipersensibilización neuronal e inflamación, misma que se manifiesta en la EMRR.

Los resultados obtenidos en la estandarización del modelo de EAE, muestran que el 50% de la población de estudio logró presentar parálisis de las patas traseras (P.C 5). Estos resultados, son semejantes a los reportados por Quintanar-Stephano *et. al* (2016), donde observaron que la aparición de los síntomas clínicos de EAE en ratas tiene una incidencia de entre el 50 y 80%. Mientras que, el porcentaje restante no desarrolla los síntomas, hecho que se asocia a la influencia de la variabilidad genética sobre el sistema inmune entre cada individuo de una misma población (Matta, 2011).

El desarrollo de los síntomas de la EAE, en el curso temporal (21 días), fue similar al reportado por Quintanar-Stephano y colaboradores (2016). De acuerdo con ese estudio, entre los días 12-13 se presentó la puntuación clínica 1, referente a la parálisis de la cola. Entre los días 15-17 aproximadamente, una puntuación clínica 5, referente a la parálisis total de la cola y de las patas traseras. Finalmente, el curso temporal culmina al día 21, en donde se presentó una remisión total de la parálisis en el animal. Estos cambios se pueden observar en la **Fig. 6**, donde se expone el comportamiento gaussiano en el 50% de los animales. Así mismo en la **Fig. 5**, se muestra la disminución de peso de los animales a lo largo del curso

temporal (comparación de gráficas). Las razones a las que se adjudica la baja en el peso en las ratas van desde un efecto secundario al dolor que experimentan, durante toda la patología, hasta la capacidad deficiente de comer debido a la parálisis.

La sintomatología clínica observada en los modelos de EAE es similar a la EM humana, exhibiendo picos de recaídas-remisión (EMRR). Sin embargo, a pesar de la existencia de varios modelos de EAE *in vivo*, podemos encontrar diferencias y similitudes con los resultados de este proyecto. Cabe destacar que, aunque este modelo de EAE fue el primero en utilizarse para el estudio de esclerosis múltiple, no se han realizado estudios concretos en relación con el desarrollo del dolor neuropático, uno de los síntomas más comunes que refieren los pacientes con EM (Pender 1988).

4.2 Dolor neuropático en EAE

En este estudio, entre el día 11-12 posteriores a la inmunización y con la puntuación clínica 1 de EAE, el 70% de los animales ya habían presentado una disminución en el 50% de umbral de retiro (5-7 g) que, aunque no llegaron a niveles considerados de alodinia (4 g), sí manifestaron otras conductas relacionadas al dolor, como falta de exploración, sociabilidad, etc. Estos resultados coinciden con diversos autores, quienes mencionan que se presenta un aumento de la hipersensibilidad mecánica antes de mostrar signos relacionados con los déficits neurológicos de la EAE (Duffy *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2014; Arnon y Aharoni, 2009; Olechowski *et al.*, 2009)

Posteriormente, en los días 15-17, se presentó la mayor puntuación clínica (5) y el desarrollo total del dolor neuropático (valores <4g). Al día 21, los animales entraron en un periodo de remisión, lo cual coincide también con una mejoría en el DN, indicando una relación entre los síntomas de la EAE y el desarrollo del DN. Sin embargo, cabe resaltar que el umbral de dolor se mantuvo por debajo de los valores control (5-7 g). Esta observación es importante, ya que un estado de neuroinflamación se relaciona con el desarrollo y mantenimiento de la EAE-DN.

El hallazgo más relevante en esta parte del estudio es que el desarrollo del dolor neuropático se da antes de la aparición de cualquier signo de alteración neuro-motora. Estos resultados coinciden con aquellos observados en pacientes donde aproximadamente el 80 % refiere síntomas de alodinia previos a la sintomatología clínica de la EM (Robinson *et al.*, 2014; Constantinescu *et al.*, 2011; Olechowski *et al.*,

2009). Similitudes como esta, resaltan la utilidad de este modelo de EAE para el estudio bidimensional de EM-DN.

4.3 Las citocinas en el desarrollo de la neuroinflamación en EAE

De acuerdo con la fisiopatología de la EM, la neuroinflamación se presenta cuando las células de la periferia migran hacia el SNC (Wagner *et al.*, 2020; Stys y Tsutsui, 2019), liberando citocinas durante este proceso (Fig. 12).

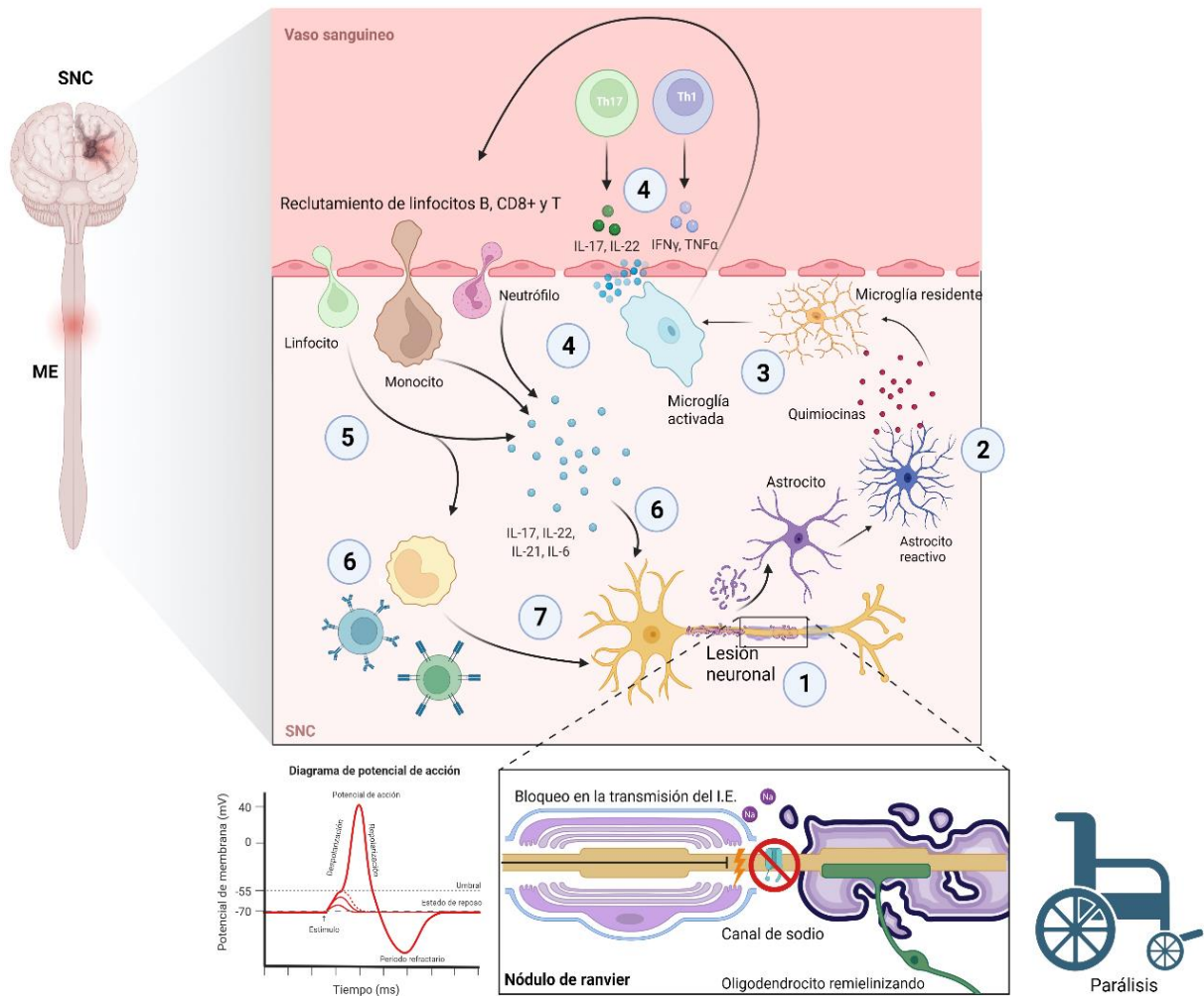


Figura. 12. Ilustración esquemática de la migración celular mediante la barrera hematoencefálica durante EM. En la esclerosis múltiple se han identificado infiltrados celulares, fenómeno promovido por una lesión neuronal (1) usualmente una depleción de los canales de sodio presentes en los nódulos de Ranvier (la razón permanece desconocida). Esta lesión neuronal, activa a los astrocitos (2) hacia un fenotipo reactivo, en el que se secretan quimiocinas señaladoras para la microglía (3) residente del sistema nervioso central, la cual adopta un fenotipo reactivo. Al suceder esto, se secretan quimiocinas y junto a la acción de los linfocitos T periféricos, se debilitan las uniones celulares en la barrera hematoencefálica, facilitando la entrada de células inmunes (4). Una vez dentro del sistema nervioso central estas células liberan interleucinas proinflamatorias (5), que activan a los monocitos residentes (6), exacerbando la reacción inflamatoria inicial (7). Tomado y modificado de Taekyun *et al.*, 2012

Citocinas como la IL-6 y el TNF- α actúan sobre las células residentes del SNC, como la microglía y los astrocitos, mismos que se encargan de producir más citocinas perpetuando, con ello, la inflamación, el daño tisular y el deterioro neurológico (Stampanoni *et al.*, 2020). Por esta razón, con el fin de evaluar los posibles mecanismos relacionados con el desarrollo y mantenimiento del DN en este modelo de EAE, se realizó un análisis de los niveles de TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-17A e IL-10, los cuales participan en la neuroinflamación. Los niveles de citocinas detectados en suero y LCR, fueron comparados durante el curso temporal, que comprendió tres estadios clínicos (puntuaciones clínicas de 1, 5 y 0 ó remisión).

Inicialmente, se observó en los animales con un P.C. 1, todas las citocinas analizadas estaban elevadas en suero (**Fig. 13**). Sin embargo, la IL-6 (148%), la IL-4 (142.4%) y el IFN- γ (97%) son las que tuvieron un mayor aumento con respecto al control. Los niveles más elevados corresponden a IL-6 (815%), IFN- γ (604%), IL-4 (250%) y TNF- α (238%).

Estos resultados concuerdan con la investigación de Stampanoni *et al.* (2020), donde sugieren que los niveles elevados de IL-6 en muestras de LCR de pacientes con RRMS presentan una correlación con la duración de la enfermedad; y la existencia de un intervalo de tiempo prolongado, entre el inicio de la sintomatología clínica y su diagnóstico. De modo que, podría asociarse a una respuesta inflamatoria exacerbada en el SNC y el tiempo en el que se presenta el daño de las neuronas motoras. Aunado a este hallazgo, se han reportado niveles elevados de IL-6 tanto en LCR como en muestras séricas de pacientes con otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso (Ramírez *et al.*, 2011).

En cuanto a nuestros resultados, encontramos que en el estadio más activo de la enfermedad (P.C. 5), los niveles séricos de la IL-6 aumentaron un 77%, permaneciendo elevado incluso en el estadio de remisión (67%). De igual manera, se presentó un aumento de la IL-6 en el LCR (**Fig. 13**), el cual fue casi el doble que lo registrado en suero (149%) en el mismo estadio, elevándose drásticamente en el periodo de remisión (747%). Lo cual es destacable, debido a que la IL-6 es una citocina con funciones pleiotrópicas, encargada de mediar un sinnúmero de actividades biológicas, incluyendo la regulación de la respuesta inmunológica (Wagner *et al.*, 2020; Navikas y Link, 1996; Fredrikson *et al.*, 1991). Además, esta citocina está involucrada con la respuesta inflamatoria aguda e implicada en la regulación de la apoptosis neuronal. También, se conoce que la IL-6 promueve la secreción de IL-17, a través de función en la diferenciación de células T hacia la subpoblación Th17 (Sánchez *et al.*, 2005). Es por ello por lo que, la desregulación de IL-6 puede alterar el balance de linfocitos Th17/Tregs, propiciando el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Duffy *et al.*, 2019; Koenders *et al.*, 2006).

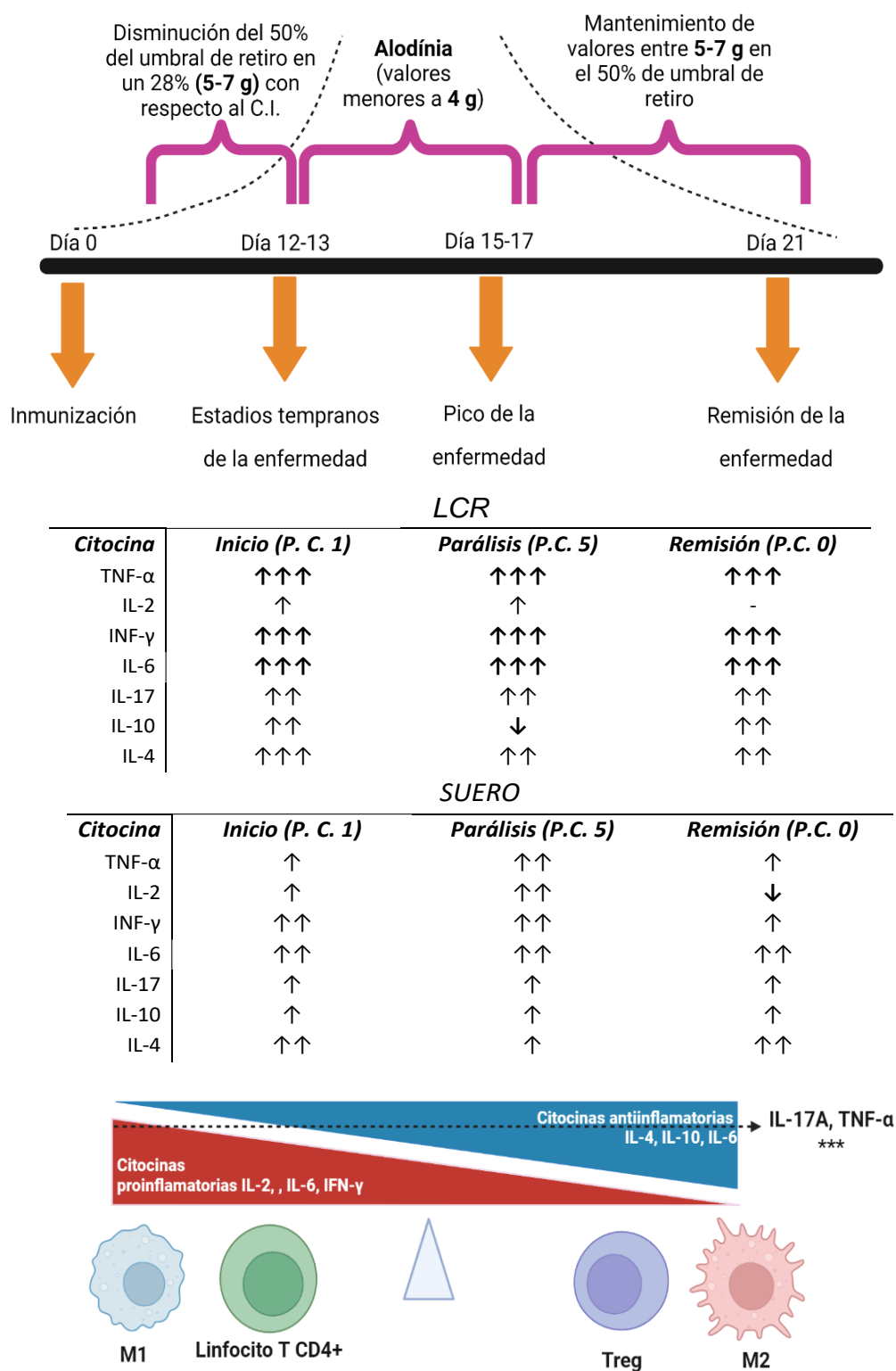


Figura. 13 ilustración esquemática de la tendencia encontrada en los niveles de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, en las muestras de líquido cefalorraquídeo y suero de los animales con EAE. Así también, el inicio, desarrollo y mantenimiento del DN. El número de flechas indica una variación baja (una), media (dos) o alta (tres). Tomado y modificado de de Taekyun *et al.*, 2012

Aunado a lo anterior, se ha encontrado que la IL-6 está profundamente relacionada a la plasticidad nociceptiva de las neuronas sensoriales y que colabora a la activación de las neuronas tipo C (nociceptores), así como a la sensibilización central y periférica. Por ello, la acción que efectúa la IL-6 es crucial en el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático (Vázquez *et al.*, 2012; Brenn *et al.*, 2007)

De igual manera, la IL-17 citocina producida principalmente por los linfocitos Th17, participa en el mantenimiento del dolor neuropático, debido a su capacidad de activar astrocitos y promover la secreción de citocinas proinflamatorias, como IL-6, IL-1 y el TNF- α (Koenders *et al.*, 2006; Fredrikson *et al.*, 1991). Así mismo, se ha encontrado que está involucrada en la destrucción de la barrera hematoencefálica, permitiendo la migración de células circulantes (linfocitos T, B y macrófagos) hacia el SNC. Lo anterior mencionado, podría explicar por qué los niveles de IL-17 son similares en los estadios de regresión y remisión, tanto en el suero (23%, 22% respectivamente) como en el LCR (48%, 62% respectivamente). En consecuencia, el patrón de variación en los resultados obtenidos se puede adjudicar al efecto de retroalimentación positiva en bucle, que ocurre entre la IL-6 y la IL-17 (Wagner *et al.*, 2020; Codarri *et al.*, 2010); ya que como se puede observar, la IL-6 se mantiene elevada con respecto a los valores del control, arriba del 50% en suero y 600% en LCR, aproximadamente en todo el curso temporal.

Con respecto al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), sus niveles indican un incremento del 46% en el suero al inicio de los síntomas (P.C. 1), mostrando el mayor aumento en el desarrollo de la parálisis (P.C. 5 = 63%). En cambio, los niveles de TNF- α en LCR, aumentaron considerablemente en todos los estadios de la enfermedad, con los valores en el inicio (P.C. 1 = 238%), el desarrollo de la parálisis (P.C. 5 = 306%) y la remisión (P.C. 0 = 267%). Este incremento constante, coincide con el trabajo realizado por Melanson *et al.* (2009), donde en un modelo de EAE en ratas Lewis encontraron que el TNF- α contribuye con la síntesis de péptidos como la sustancia P y CGRP, en el ganglio de la raíz dorsal de los nociceptores. A su vez, estimulan a los linfocitos para la producción de citocinas proinflamatorias, creando un círculo vicioso y la sensibilización central y periférica implicada en el desarrollo y mantenimiento del DN (Melanson *et al.*, 2009; Sedgwick *et al.*, 2000). Así mismo, la desmielinización y daño de la BHE generan la migración de linfocitos y liberación de citocinas proinflamatorias que activan a la microglía, lo que contribuye al daño neuronal en todas las etapas de la EM (Mandolesi *et al.*, 2015). Además, se ha encontrado la presencia de TNF- α en astrocitos, microglía y células endoteliales de lesiones cerebrales, así como en suero y LCR de pacientes con EM, durante el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad. (Selma *et al.*, 1991; Vladic *et al.*, 2002; Domingues *et al.*, 2017).

Referente a los resultados obtenidos para el IFN- γ , citocina secretada por las células gliales, las neuronas, los monocitos y linfocitos T infiltrantes que participan en la promoción de la neuroinflamación (Oliveira *et al.*, 2011), se encontró un aumento en los niveles séricos al inicio de la EAE (P.C. 1 = 97%), así como en LCR (P.C. 1 = 604%), siendo este último uno de los más notables. Sin embargo, en el estadio de regresión los niveles séricos disminuyeron a un 14%, mientras que en LCR se mantuvo aumentado con valores de 571%. No obstante, fue en el pico de la parálisis que se encontraron los valores más altos en suero (P.C. 5 = 98%) y en LCR (P.C. = 763%). De modo que lo anterior, concuerda con lo examinado en otros modelos de EAE, donde se ha observado que la administración de esta citocina, durante la inducción de la enfermedad, magnifica la parálisis, mientras que la administración antes de la inducción de la EAE reduce la gravedad de la sintomatología clínica (Robinson *et al.*, 2014; Constantinescu *et al.*, 2011; Bennett *et al.*, 2010; Arnon y Aharoni, 2009; Sloane *et al.*, 2009). Así pues, se asocia a la capacidad del IFN- γ para interrumpir las “tight junctions” e inhibir la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales de la BHE, comprometiendo la integridad de esta barrera, haciéndola permeable a las células del sistema inmunológico (Bennett *et al.*, 2010). Al igual que la IL-6 y la IL-17, el IFN- γ es pleiotrópica y promueve la transcripción de genes involucrados en actividades inmunomoduladoras (Ding *et al.* 2015). Es decir, tienen la capacidad de potenciar la actividad citotóxica y fagocítica en los macrófagos, así como, de aumentar la diferenciación de linfocitos T a un fenotipo Th1. Además de estimular las células inmunológicas efectoras para activar a los macrófagos residentes del SNC. De modo que, induce a una sobreexpresión de TNF- α , lo que potencia la inflamación en EAE, provoca un daño en las células epiteliales de la BHE y de los oligodendrocitos (Zahid *et al.* 2021). Por tanto, se relaciona también con el desarrollo y mantenimiento del DN en la EM. Considerando que estudios recientes han mostrado que la aplicación intratecal del IFN- γ , produce la activación de la microglía y el desarrollo de la alodinia táctil en roedores (Tsuda *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 1997), aumenta los reflejos nociceptivos espinales (Xu *et al.*, 1994) y provoca un comportamiento agresivo (mordedura inmediata) en ratas (Robertson *et al.*, 1997). De igual manera, se ha observado la expresión de IFN- γ en el asta dorsal de la ME, en un modelo de dolor neuropático en roedores (Chen *et al.*, 2015; Costigan *et al.*, 2009; Tanga *et al.*, 2005).

Con respecto a los resultados obtenidos para la IL-2, citocina pleiotrópica secretada principalmente por células asesinas naturales, dendríticas y linfocitos Th1, se puede apreciar un patrón peculiar, ya que los niveles de esta interleucina se encontraron aumentados en el LCR y en el suero. Esto se logró observar tanto en el estadio de inicio (P.C.1= 46% y 11%, respectivamente) como en el estadio pico de la EAE (P.C. 5= 99% y 30%, respectivamente). En el estadio de regresión, los niveles séricos de la IL-2 descendieron hasta alcanzar un nivel menor al del control (-2%). Mientras tanto, en el LCR también hubo un descenso en los niveles de la IL-2, manteniéndose similares a los obtenidos con el grupo control

(2%). Estos resultados, son similares a los obtenidos por, Sharief y Thompson (1993), quienes encontraron en muestras de LCR y suero de 63 pacientes con EMRR, niveles altos de IL-2 y su receptor IL-2R en los estadios activos de la enfermedad y niveles bajos en los estadios de remisión. Por lo que se sugiere que tanto la IL-2, como su receptor están participando en el desarrollo de la EMRR y en el daño a la barrera hematoencefálica. Es por ello, que se han desarrollado anticuerpos monoclonales en contra del IL-2R (Uribe y Nuñez en 2008). Las señales de la IL-2 optimizan las respuestas de linfocitos T CD4+ activadas, aumentando la producción de TNF- α e IFN- γ , e incrementando la toxicidad de las células asesinas naturales, aumentando la proliferación de las células B y la secreción de anticuerpos (Liao *et al.*, 2013; Morgan *et al.*, 1976), favoreciendo de esta manera, el desarrollo de la enfermedad. No obstante, la IL-2 es considerada como un agente potentemente antiinflamatorio, pues tiene la capacidad de impulsar la muerte celular, inducida por activación (mediada por Fas) (Refaeli *et al.*, 1998), a la vez que promueve la supervivencia de los linfocitos Treg (Chinen *et al.*, 2016). Estudios realizados por Zhou *et al.*, 2021, han demostrado que la administración conjunta, pero no separadas de IL-2 e IL-4 (1:1) en cultivos celulares de Treg, inducen la secreción de IL-10. De tal forma que podría asociarse a la disminución de Treg que ha sido encontrada en modelos de EAE por Buenafe *et al.*, 2012, ya que como se puede observar en este estudio, pese a que los niveles de IL-4 se mantienen aumentados a lo largo de todo el curso temporal de la EAE, la IL-2 se encuentra en niveles muy bajos en el estado de remisión y de inicio. Se sabe que la IL-2 tiene una actividad inhibitoria en el SNC, principalmente disminuye la actividad en el hipotálamo anterior, lo que a su vez suprime la potenciación a largo plazo en el hipocampo e induce la despolarización de las neuronas (Tancredi *et al.*, 1990; Bindoni *et al.*, 1988). Se ha reportado que genera un efecto antinociceptivo a nivel central y periférico (Wang *et al.*, 2000). En conjunto a lo anterior, se ha hipotetizado que este efecto podría ser mediado por la unión de la IL-2 a los receptores opioides (Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1996). Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos que los niveles de IL-2 hayan disminuido considerablemente en todas las fases de la EAE. Efecto que aparentemente contribuyó al mantenimiento del DN en todos los estadios de la enfermedad.

La IL-4 tiene un perfil pleiotrópico y es secretada principalmente por los linfocitos Th2. Es un factor clave para la diferenciación de los macrófagos, linfocitos Th2 y Treg, estimulando la producción de IL-10 (Peerlings *et al.* 2021; Zhou *et al.* 2021). Los resultados muestran que los niveles de IL-4 en el estadio de inicio de la EAE se encuentran elevados, tanto en el suero como en el LCR (P.C.1= 142% y 250%, respectivamente), siendo este último uno de los más notables. Continuando al estadio de mayor grado clínico (P.C.5), encontramos que los niveles de esta citocina fueron menores a los del control en suero, lo que sugiere una disminución en la secreción, o bien, cambios en el fenotipo de los macrófagos que la

secretan. Así como, una posible disminución en la producción de los linfocitos Th2. Mientras tanto, en el LCR, los niveles de la IL-4 disminuyeron un 50%.

En el estadio de remisión, podemos observar que existe un mecanismo compensatorio, ya que los niveles de la IL-4 vuelven a aumentar en el suero y en el LCR (P.C. 0 =85% y 175%).

Se sabe que la IL-4 puede inhibir la secreción IFN- γ y viceversa (inhibición recíproca), por ello es de vital importancia, ya que, junto a la IL-10 se encarga de inhibir la producción de otras citocinas pro-inflamatorias (Peerlings *et al.* 2021; Zhou *et al.* 2021).

La deficiencia de IL-4 en ratones, ha demostrado un aumento en la alodinia táctil. Sin embargo, esta citocina no puede utilizarse como terapia de remplazo, debido a su vida media corta. No obstante, se ha visto su función en la regulación del DN en el modelo de la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 (Yin *et al.*, 2014). De acuerdo con Hao *et al.*, 2006, la expresión de la IL-4 mediante el vector viral del herpes simple en el ganglio de la raíz dorsal produce analgesia durante un periodo de 5 semanas en un modelo de DN en ratones. Por otro lado, la administración de este vector previa al desarrollo del modelo de la ligadura de los nervios espinales L5 y L6, retrasa el desarrollo de DN.

Al analizar los resultados de la IL-10, pudimos observar que no hubo cambios estadísticamente significativos con respecto al control en las muestra de suero en los diferentes estadios. Sin embargo, en el LCR si hubo un aumento en el estadio inicial (P.C.1, 18%) y de remisión (P.C. 0, 14%), pero no, en el estadio de parálisis (P.C.5= -7%) de la EAE. Esta observación indica que esta citocina puede inhibir algunos procesos inmunológicos en el SNC pero no en la periferia (suero).

Como se mencionó anteriormente, la IL-2 y la IL-4 juegan un papel importante para la secreción de la IL-10. Es por ello, que al tener niveles bajos de IL-2, a pesar de que los niveles de IL-4 estén aumentados, la síntesis de IL-10 se encuentra disminuida.

La IL-10 participa en la regulación de la autoinmunidad en la EAE, como lo demostraron Bettelli *et al.* en 1998, de acuerdo con su trabajo, ratones deficientes de esta interleucina, fueron más propensos a desarrollar la enfermedad. Por otra parte, en el trabajo de Cua *et al.*, (1999), se determinó que los ratones que sobreexpresan la IL-10 son menos propensos a desarrollar la patología. Lo que concuerda con los estudios de Croxford *et al.*, 2001, en donde un aumento de los niveles de IL-10 en la médula espinal está relacionado con la remisión de la EAE. En humanos, una producción más baja de IL-10 se considera un

factor de riesgo para desarrollar la enfermedad, ya que, se ha observado que los pacientes con EM presentan una frecuencia de células secretoras de IL-10 más baja que las personas sanas (Matejuk *et al.*, 2002).

A la fecha, es el primer trabajo conocido sobre la participación de las citocinas inflamatorias y antiinflamatorias en este modelo, que comprende los tres estadios críticos de la EAE (P.C 1, P.C 5 y P.C 0). Además, el uso del LCR para correlacionar los niveles de citocinas en el SNC durante los diferentes estadios de la EAE, así mismo, el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático en esta patología, permite estudiar a los procesos que ocurren en un brote de EMRRR en humanos.

Capítulo 5. Conclusiones

- El modelo de EAE en este proyecto permitió observar en un curso temporal los distintos estadios clínicos que recrean un brote de la EMRR. Además, observamos una correlación entre la respuesta inflamatoria en el SNC y el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático (alodinia) como uno de los principales síntomas de la enfermedad.
- Hubo un desbalance en la expresión de las citocinas tanto en el suero como en el LCR, predominando las citocinas proinflamatorias durante los tres estadios. Esto, se correlaciona con la disminución del umbral del dolor, es decir con el inicio del dolor neuropático y la pérdida de peso. Demostrando, que la mezcla de mediadores inflamatorios es la principal responsable de los procesos neurodegenerativos que conlleva al desarrollo de la EAE en estos animales, fenómenos que también se presenta en los pacientes con EMRR.

Literatura citada

- Ando, D.G., Clayton, J., Kono, D., Urban, J.L., Sercarz, E.E., 1989. Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) is of the Th-1 lymphokine subtype. *Cell Immunology*, 124(1), 132–143. doi: 10.1016/0008-8749(89)90117-2.
- Arnon, R., y Aharoni, A. R. 2009. Neuroprotection and neurogeneration in MS and its animal model EAE effected by glatiramer acetate. *Journal of Neural Transmission*, 116(11), 1443–1449. doi: 10.1007/s00702-009-0272-3
- Barthelmes, J., Tafferter, N., Kurz, J., de Bruin, N., Parnham, M. J., Geisslinger, G., y Schiffmann, S. 2016. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice and evaluation of the disease-dependent distribution of immune cells in various tissues. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(111), 1–10. doi:10.3791/53933
- Basbaum, A. I. 2000. The perception of pain, *Principles of Neural Science*. Mc Graw-Hill, New York, pp. 472-491.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., y Julius, D. 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267-284. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028
- Bennett, J., Basivireddy, J., Kollar, A., Biron, K. E., Reickmann, P., Jefferies, W. A., y Mcquaid, S. 2010. Blood – brain barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE. *Journal of Neuroimmunology*, 229(1–2), 180–191. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.08.011
- Bettelli, E., Das, M. P., Howard, E. D., Weiner, H. L., Sobel, R. A., Kuchroo, V. K., Bettelli, E., Das, M. P., Howard, E. D., Weiner, H. L., Sobel, R. A. and Kuchroo, V. K. 2022. IL-10 Is Critical in the Regulation of Autoimmune Encephalomyelitis as Demonstrated by Studies of IL-10- and IL-4-Deficient and Transgenic Mice. *The Journal of Immunology*, 161(1), pp. 3299–3306.
- Bi, Y., Liu, G., y Yang, R. 2007. Th17 cell induction and immune regulatory effects. *Journal of cellular physiology*, 211(2), 273-278. doi: 10.1002/jcp.20973
- Bindoni, M., Perciavalle, V., Berretta, S., Belluardo, N. and Diamantstein, T. 1988. Interleukin 2 modifies the bioelectric activity of some neurosecretory nuclei in the rat hypothalamus. *Brain Research*, 462(1), pp. 10–14.
- Brenn, D., Richter, F. and Schaible, H. 2007. Sensitization of Unmyelinated Sensory Fibers of the Joint Nerve to Mechanical Stimuli by Interleukin-6 in the Rat an Inflammatory Mechanism of Joint Pain. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, 56(1), pp. 351–359. doi:10.1002/art.22282
- Buenafe, A. C., Offner, H. and Vandenbark, A. A. 2011. Regulatory T cells play a role in T-cell receptor CDR 2 peptide regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology*, 135(2), pp. 168–179. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03531.x
- Cekanaviciute, E., Yoo, B. B., Runia, T. F., Debelius, J. W., Singh, S., Nelson, C. A. y Baranzini, S. E. 2017. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(40), 10713-10718. doi: 10.1073/pnas.1711235114

- Cervero, F., y Laird, J. M. 1999. Visceral pain. *The Lancet*, 353(9170), 2145-2148. DOI:10.1016/S0140-6736(99)01306-9
- Chen, X., Xu, J., Song, J., Zheng, B. and Wang, X. 2014. Electroacupuncture inhibits excessive interferon- γ evoked up-regulation of P2X4 receptor in spinal microglia in a CCI rat model for neuropathic pain. *British Journal of Anesthesia*, 126(3), pp. 1–8. doi:10.1093/bja/aeu199
- Chinen, T., Kannan, A. K., Levine, A. G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J. D. and Rudensky, A. Y. 2016. An essential role for the IL-2 receptor in T reg cell function. *Nature Immunology*, Nature Publishing Group, September, pp. 1–14. doi:10.1038/ni.3540
- Ciccocioppo, F., Lanuti, P., Pierdomenico, L., Simeone, P., Bologna, G., Ercolino, E., y Centonze, D. 2019. The characterization of regulatory T-cell profiles in Alzheimer’s disease and multiple sclerosis. *Scientific reports*, 9(1), 1-9. doi:10.1038/s41598-019-45433-3
- Codarri, L., Fontana, A., & Becher, B. 2010. Cytokine networks in multiple sclerosis: Lost in translation. In *Current Opinion in Neurology* (Vol. 23, Issue 3, pp. 205–211). <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3283391feb>
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., Brien, K. O., & Gran, B. 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British Journal of Pharmacology Themed*, 164(4), 1079–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x>
- Costigan, M., Moss, A., Latremoliere, A., Johnston, C., Verma-gandhu, M., Herbert, T. A., Barrett, L., Brenner, G. J., Vardeh, D., Woolf, C. J. and Fitzgerald, M. 2009. T-Cell Infiltration and Signaling in the Adult Dorsal Spinal Cord Is a Major Contributor to Neuropathic Pain-Like Hypersensitivity. *Neurobiology*, 29(46), pp. 14415–14422. doi:10.1523/JNEUROSCI.4569-09.2009
- Covarrubias-Gómez, A., Guevara-López, U., Gutiérrez-Salmerón, C., Betancourt-Sandoval, J. A., y Córdova-Domínguez, J. A. 2010. Epidemiología del dolor crónico en México. *Revista mexicana de anestesiología*, 33(4), 207-213.
- Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y. and Murphy, C. A. 2003. autoimmune inflammation of the brain Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 42(3), pp. 744–748. doi:10.1038/nature01355
- Danikowski, K. M., Jayaraman, S., y Prabhakar, B. 2017. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *Journal of neuroinflammation*. 14(1), 117. doi: 10.1186/s12974-017-0892-8.
- Dendrou, C. A., Fugger, L., y Friese, M. A. 2015. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Publishing Group*, 15(9), 545–558. doi:10.1038/nri3871
- Denic, A., Johnson, A. J., Bieber, A. J., Warrington, A. E., Rodriguez, M., y Pirko, I. 2011. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*, 18(1), 21-29. doi: 10.1016/j.pathophys.2010.04.004
- Diederich, J. M., Staudt, M., Meisel, C., Hahn, K., Meinl, E., Meisel, A., y Klehmet, J. (2018). Neurofascin and compact myelin antigen-specific T cell response pattern in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy subtypes. *Frontiers in neurology*, 9, 171. doi: 10.3389/fneur.2018.00171

- Ding, X., Yan, Y., Li, X., Li, K., Ciric, B., Yang, J., Zhang, Y., Wu, S., Xu, H., Chen, W., Lovett-Racke, A. E., Zhang, G.-X., & Rostami, A. 2015. Silencing IFN- γ Binding/Signaling in Astrocytes versus Microglia Leads to Opposite Effects on Central Nervous System Autoimmunity. *The Journal of Immunology*, 194(9), 4251–4264. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303321>
- DOF. 1999. "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio." Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.
- Dominguez-Villar, M., Raddassi, K., Danielsen, A. C., Guarnaccia, J., y Hafler, D. A. 2019. Fingolimod modulates T cell phenotype and regulatory T cell plasticity in vivo. *Journal of Autoimmunity*, 96, 40-49. doi: 10.1016/j.jaut.2018.08.002.
- Dreesen, E. y G. Riedel. 2018. Comparison of mouse motor performance on different RotaRod systems. *Measuring Behavior* 2018.
- Dubois-dalcq, M., Altmeyer, R., Chiron, M. and Wilt, S. 1995. HIV interactions with cells of the nervous system. *Current Opinion in Neurology*, 5(1), pp. 647–655.
- Duffy, S. S., Keating, B. A., Perera, C. J., Lees, J. G., Tonkin, R. S., Makker, P. G. S., Carrive, P., Butovsky, O., & Moalem-Taylor, G. 2019. Regulatory T cells and their derived cytokine, interleukin-35, reduce pain in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience*, 39(12), 2326–2346. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1815-18.2019>
- Duque, G. A., & Descoteaux, A. 2014. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Issue OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>
- Elyaman, W., y Khoury, S. J. 2017. Th9 cells in the pathogenesis of EAE and multiple sclerosis. In *Seminars in immunopathology* 39(1), 79-87. doi: 10.1007/s00281-016-0604-y.
- Filippi, M., Bar-or, A., Piehl, F., Preziosa, P., Solari, A., Vukusic, S., y Rocca, M. A. 2018. Multiple sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(43), 1–27. doi:10.1038/s41572-018-0041-4
- Ford, C., Goodman, A. D., Johnson, K., Kachuck, N., Lindsey, J. W., Lisak, R., y Pruitt, A. 2010. Continuous long-term immunomodulatory therapy in relapsing multiple sclerosis: results from the 15-year analysis of the US prospective open-label study of glatiramer acetate. *Multiple Sclerosis Journal*, 16(3), 342-350. doi: 10.1177/1352458509358088.
- Fragoso, J. M., Vargas Alarcón, G., Morales, S. J., Daniel, O., Hernández, R., & Bello, J. R. 2014. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética ARTÍCULO DE REVISIÓN Correspondencia. In *Gac Med Mex* (Vol. 150).
- Fredrikson, S., Fontana, A., & Link, H. 1991. Interleukin-6 is elevated in plasma in multiple sclerosis. In *Journal of Neuroimmunology* (Vol. 31).
- Frischer, J.M., Bramow, S., Dal-Bianco, A., Lucchinetti, C.F., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P.S., Lassmann, H. 2009. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*, 132(5), 1175-1189. doi: 10.1093/brain/awp070

- Fuentes, F. M., Mendoza, R. A., Rosales, A.L., Cisneros, R. A. 2008. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Lima. Centro Nacional de Productos Biológicos Instituto Nacional de Salud. 23–39.
- Gadani, S. P., Cronk, J. C., Norris, G. T., & Kipnis, J. 2012. IL-4 in the Brain: A Cytokine to Remember. *The Journal of Immunology*, 189(9), 4213–4219. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202246>
- Gagliani, N., Amezcu Vesely, M.C., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N.W., de Zoete, M.R., Licona-Limon, P., Paiva, R.S., y Ching, T. 2015. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*. 523(7559), 221–225. doi: 10.1038/nature14452.
- Gallart, M. T. 1998. Interleuquinas y su papel en las respuestas inmunes.
- Garza, C., Joern, R. R., Rojano, E. M., y Forsthuber, T. 2020. T cell cooperation in the induction of autoimmunity in a murine model of multiple sclerosis.
- Gilman-Sachs, A., Robbins, L., y Baum, L. 1989. Flow cytometric analysis of lymphocyte subsets in peripheral blood of chronic headache patients. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 29(5), 290-294. doi: 10.1046/j.1468-2982.1998.1804197.x
- Goldberg, D. S., y McGee, S. J. (2011). Pain as a global public health priority. *BMC public health*, 11(1), 1-5. doi: 10.1186/1471-2458-11-770
- Gonzalez-Cano, R., Boivin, B., Bullock, D., Cornelissen, L., Andrews, N., y Costigan, M. 2018. Up–Down Reader: An Open-Source Program for Efficiently Processing 50% von Frey Thresholds. *Frontiers in pharmacology*, 9, 433. doi: 10.3389/fphar.2018.00433
- Gueguen, A., Roux, P., Deschamps, R., Moulignier, A., Bensa, C., Savatovsky, J., y Gout, O. 2014. Abnormal inflammatory activity returns after natalizumab cessation in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery y Psychiatry*, 85(9), 1038-1040. doi: 10.1136/jnnp-2014-307591
- Haas, J. D., Nistala, K., Petermann, F., Saran, N., Chennupati, V., Schmitz, S., y Prinz, I. 2011. Expression of miRNAs miR-133b and miR-206 in the *Il17a/f* locus is co-regulated with IL-17 production in $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells. *PloS one*, 6(5), e20171. doi: 10.1371/journal.pone.0020171
- Hao, J., Campagnolo, D., Ruolan, L., Wenhua, P. and Shi, S. 2012. IL-2/IL-2 Ab Therapy Induces Target Organ NK Cells that Inhibit CNS Inflammation. *NIH Public Access*, 69(4), pp. 721–734. doi:10.1002/ana.22339.IL-2/IL-2
- Heyn, J., Luchting, B., y Azad, S. C. 2020. Smoking associated T-Cell imbalance in patients with chronic pain. *Nicotine and Tobacco Research*, 22(1), 111-117. doi: 10.1093/ntr/nty199
- Jaimes, U., David, P. and Lilia, N. O. 2008. Alteraciones inmunológicas en la esclerosis múltiple. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 9(2), pp. 150–153.
- Khan, N., Woodruff, T. M., y Smith, M. T. 2014. Establishment and characterization of an optimized mouse model of multiple sclerosis-induced neuropathic pain using behavioral, pharmacologic, histologic and immunohistochemical methods. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 126, 13–27. doi: 10.1016/j.pbb.2014.09.003

- Koenders, M. I., Lubberts, E., Loo, F. A. J. Van De, Oppers-walgreen, B., Berselaar, L. Van Den, Helsen, M. M., Kolls, J. K., Padova, F. E. Di, Joosten, L. A. B. and Berg, W. B. Van Den. 2006. Interleukin-17 Acts Independently of TNF- α under Arthritic Conditions 1. *The Journal of Immunology*, 165(2), pp. 6262–6269.
- Lassmann, H., y Horssen, J. Van. 2011. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Letters*, 585(23), 3715–3723. doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.004
- Liu, L., y Duff, K. 2008. A Technique for Serial Collection of Cerebrospinal Fluid from the Cisterna Magna in Mouse. *Journal of Visualized Experiments*, 21(e960), 4–7. doi: 10.3791/960
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H. y Klonowski, P. 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature medicine*, 8(5), 500-508. doi: 10.1038/nm0502-500.
- Luchting, B., Rachinger-Adam, B., Zeitler, J., Egenberger, L., Möhnle, P., Kreth, S., y Azad, S. C. 2014. Disrupted TH17/Treg balance in patients with chronic low back pain. *PloS one*, 9(8), e104883. doi: 10.1371/journal.pone.0104883
- Machado-Santos, J., Saji, E., Tröscher, A. R., Paunovic, M., Liblau, R., Gabriely, G., y Lassmann, H. 2018. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain*, 141(7), 2066-2082. doi: 10.1093/brain/awy151.
- Mandolesi, G., Gentile, A., Musella, A., Fresegna, D., Vito, F. De, Bullitta, S., Sepman, H., Marfia, G. A. and Centonze, D. 2015. Synaptopathy connects inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Nature Publishing Group, Nature Publishing Group*, 11(12), pp. 711–724. doi:10.1038/nrneurol.2015.222
- Mangiacavalli, S., Corso, A., De Amici, M., Varettoni, M., Alfonsi, E., Lozza, A., y Lazzarino, M. 2010. Emergent T-helper 2 profile with high interleukin-6 levels correlates with the appearance of bortezomib-induced neuropathic pain. *British journal of haematology*, 149(6), 916-918. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08138.x
- Matta Camacho, N. E. 2011. SISTEMA INMUNE Y GENÉTICA: UN ABORDAJE DIFERENTE A LA DIVERSIDAD DE ANTICUERPOS. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 177-188.
- Matejuk, A., Dwyer, J., Ito, A., Bruender, Z., Vandenberg, A. A. and Offner, H. 2002. Effects of Cytokine Deficiency on Chemokine Expression in CNS of Mice With EAE. *Journal of Neuroscience Research*, 67(2), pp. 680–688. doi:10.1002/jnr.10156
- McIntyre, L. L., Greilach, S. A., Othy, S., Sears-Kraxberger, I., Wi, B., Ayala-Angulo, J., y Rezk, F. 2020. Regulatory T cells promote remyelination in the murine experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis following human neural stem cell transplant. *Neurobiology of Disease*, 104868. doi: 10.1016/j.nbd.2020.104868.
- Melanson, M., Miao, P., Eisenstat, D., Gong, Y., Gu, X., Au, K., Zhu, W., Begum, F., Frost, E. E., & Namaka, M. 2009. Experimental autoimmune encephalomyelitis-induced upregulation of tumor necrosis factor-alpha in the dorsal root ganglia. *Multiple Sclerosis*, 15(10), 1135–1145. <https://doi.org/10.1177/1352458509106856>

- Merskey, H. E. 1986. Classification of chronic pain: Descriptions of chronic pain syndromés and definitions of pain terms. *Pain*.
- Mikami, N., Matsushita, H., Kato, T., Kawasaki, R., Sawazaki, T., Kishimoto, T., y Fukada, S. I. 2011. Calcitonin gene-related peptide is an important regulator of cutaneous immunity: effect on dendritic cell and T cell functions. *The Journal of Immunology*, 186(12), 6886-6893. doi: 10.4049/jimmunol.1100028
- Milo, R. 2014. The efficacy and safety of daclizumab and its potential role in the treatment of multiple sclerosis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 7(1), 7-21. doi: 10.1177/1756285613504021
- Mirandola, S. R., Hallal, D. E., Farias, A. S., Oliveira, E. C., Brandão, C. O., Ruocco, H. H., y Santos, L. M. 2009. Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis. *International immunopharmacology*, 9(7-8), 824-830. doi: 10.1016/j.intimp.2009.03.004.
- Mousset, C. M., Hobo, W., Woestenenk, R., Preijers, F., Dolstra, H., y vans der Waart, A. B. 2019. Comprehensive phenotyping of T cells using flow cytometry. *Cytometry Part A*, 95(6), 647-654. doi: 10.1002/cyto.a.23724
- Murphy, A. C., Lalor, S. J., Lynch, M. A., y Mills, K. H. 2010. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain, behavior, and immunity*, 24(4), 641-651. doi: 10.1016/j.bbi.2010.01.014.
- Navikas, V., & Link, H. 1996. Review: Cytokines and the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 45).
- Ohtake, J., Kaneumi, S., Tanino, M., Kishikawa, T., Terada, S., Sumida, K., y Shinohara, T. 2015. Neuropeptide signaling through neurokinin-1 and neurokinin-2 receptors augments antigen presentation by human dendritic cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(6), 1690-1694. doi: 10.1016/j.jaci.2015.06.050
- Olechowski, C. J., Truong, J. J., y Kerr, B. J. 2009. Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain*, 141(1-2), 156-164. doi: 10.1016/j.pain.2008.11.002
- Olesen, M. N., Soelberg, K., Debrabant, B., Nilsson, A. C., Lillevang, S. T., Grauslund, J., y Jarius, S. 2019. Cerebrospinal fluid biomarkers for predicting development of multiple sclerosis in acute optic neuritis: a population-based prospective cohort study. *Journal of neuroinflammation*, 16(1), 59. doi: 10.1186/s12974-019-1440-5.
- Oliveira, Marcio Barros C., Kimiko Sakata, R., Machado Issy, A., Roberto Gerola, L., & Salomão, R. 2011. Citocinas y Dolor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 137(2).
- Ozenci, M. Kouwenhoven, Y.-M. Huang, P. KivisaKk &, & H. Link. 2000. Multiple sclerosis is associated with an imbalance between tumour necrosisfactor-alpha (TNF-a)- and IL-10-secreting blood cells that is corrected byinterferon-beta (IFN-b) treatment. *Clin Exp Immunology*, 120(1), 147-153.

- Peerlings, D., Mimpfen, M., & Damoiseaux, J. 2021. The IL-2 – IL-2 receptor pathway: Key to understanding multiple sclerosis. *Journal of Translational Autoimmunity*, 4, 100123. <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2021.100123>
- Pender, M. P. 1988. The pathophysiology of myelin basic protein-induced acute experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. In *Journal of the Neurological Sciences* (Vol. 86).
- Quintanar-Stephano, A., Organista-Esparza, A., Chavira-Ramírez, R., Kovacs, K. y Berczi, I. 2012. Effects of neurointermediate pituitary lobectomy and desmopressin on acute experimental autoimmune encephalomyelitis in lewis rats. *Neuroimmunomodulation*, 19(3), 148-157. doi: 10.1159/000330578
- Ramírez, Saavedra P. G., María Vásquez Duque, G., & Alonso González Naranjo, L. 2011. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. In *IATREIA* (Vol. 24(2)).
- Refaeli, Y., Parijs, L. Van and London, C. A. 1998. Biochemical Mechanisms of IL-2 – Regulated Fas-Mediated T Cell Apoptosis. *Cell Press*, 8(1), pp. 615–623.
- Robertson, B., Xu, X., Hao, J., Wiesenfeld-hallin, Z., Mhlanga, J. and Grant, G. 1997. Interferon- γ receptors in nociceptive pathways: role in neuropathic pain-related behaviour. *Neuroreport*, 8(5), pp. 1311–1316.
- 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. In *Multiple Sclerosis and Related Disorders* (1st ed., Vol. 122). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00008-X>
- Rommer, P. S., Milo, R., Han, M., Satyanarayan, S., Sellner, J., Hauer, L., y Zhang, Y. 2019. Immunological aspects of modern MS therapeutics. *Frontiers in immunology*, 10, 1564. doi: 0.3389/fimmu.2019.01564.
- Ruck, T., Bittner, S., Wiendl, H., y Meuth, S. G. 2015. Alemtuzumab in multiple sclerosis: mechanism of action and beyond. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 16414-16439. doi: 10.3390/ijms160716414.
- Ruiz, F., Vigne, S., y Pot, C. 2019. Resolution of inflammation during multiple sclerosis. In *Seminars in immunopathology* (pp. 1-16). Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/s00281-019-00765-0
- Sánchez, R., Monserrat Sanz, J., Prieto Martín, A., Reyes Martín, E., Alvarez De Mon Soto, M., & Sanchez Garcia, M. 2005. The balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in septic states. In *Medicina Intensiva* (Vol. 29, Issue 3, pp. 151–158). Ediciones Doyma, S.L. [https://doi.org/10.1016/s0210-5691\(05\)74222-4](https://doi.org/10.1016/s0210-5691(05)74222-4)
- Scholz, J., y Woolf, C. J. 2007. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nature neuroscience*, 10(11), 1361-1368. doi: 10.1038/nn1992
- Sedgwick, D., Jonathon D., Sean Riminton, Jason G. Cyster, & Heinrich Körner. 2000. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocytemovement. *Trends Immunology Today*, 21(3), 110–113. [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(99\)01573-x](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(99)01573-x)

- Selmaj, K., Raine, C. S., Cannella, B. and Brosnan, C. F. 1991. Identification of Lymphotoxin and Tumor Necrosis Factor in Multiple Sclerosis Lesions. *Journal Clinical Investigation*, 87(3), pp. 949–954.
- Shariff, M., Phil, M. and Hentges, R. 1991. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at RUTGERS UNIV ALEXANDER LIBRARY on July 2, 2014. For personal use only. No other uses without permission. Copyright © 1991 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. *The New England Journal of Medicine*, 325(7), pp. 467–472.
- Sloane, E., Ledebor, A., Seibert, W., Coats, B., van Strien, M., Maier, S. F., Johnson, K. W., Chavez, R., Watkins, L. R., Leinwand, L., Milligan, E. D., & van Dam, A. M. 2009. Anti-inflammatory cytokine gene therapy decreases sensory and motor dysfunction in experimental Multiple Sclerosis: MOG-EAE
- Stampanoni Bassi, M., Iezzi, E., Drulovic, J., Pekmezovic, T., Gilio, L., Furlan, R., Finardi, A., Marfia, G. A., Sica, F., Centonze, D., & Buttari, F. 2020. IL-6 in the Cerebrospinal Fluid Signals Disease Activity in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00120>
- Stys, P. K., & Tsutsui, S. 2019. Recent advances in understanding multiple sclerosis. *F1000Research*, 8, 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.12688/f1000research.20906.1>
- Szklany, K., Ruitter, E., Mian, F., Kunze, W., Bienenstock, J., Forsythe, P., y Karimi, K. 2016. Superior cervical ganglia neurons induce Foxp3+ regulatory T cells via calcitonin gene-related peptide. *PLoS one*, 11(3), e0152443. doi: 10.1371/journal.pone.0152443
- Taekyun, S., Ahn, M. and Matsumoto, Y. 2012. Mechanism of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: recent insights from macrophages. *Anatomy and Cell Biology*, 45(1), pp. 141–148.
- Talme, T., Liu, Z., y Sundqvist, K. G. 2008. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide (CGRP) stimulates T cell migration into collagen matrices. *Journal of neuroimmunology*, 196(1-2), 60-66. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.02.007
- Tancredi, V., Zona, C., Velotti, F., Eusebi, F. and Santoni, A. 1990. Interleukin-2 suppresses established long-term potentiation and inhibits its induction in the rat hippocampus. *Brain Research*, 525(1), pp. 149–151.
- Tang, X., Tian, X., Zhang, Y., Wu, W., Tian, J., Rui, K., y Wang, S. 2013. Correlation between the frequency of Th17 cell and the expression of microRNA-206 in patients with dermatomyositis. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013. doi: 10.1155/2013/345347
- Tanga, F. Y., Nutile-mcmenemy, N. and Deleo, J. A. 2005. The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *PNAS*, 102(16), pp. 5856–5861.
- Torre-Fuentes, L., Moreno-Jiménez, L., Pytel, V., Matías-Guiu, J. A., Gómez-Pinedo, U., y Matías-Guiu, J. 2020. Experimental models of demyelination and remyelination. *Neurología (English Edition)*, 35(1), 32–39. doi: 10.1016/j.nrleng.2019.03.007
- Tsuda, M., Masuda, T., Kitano, J., Shimoyama, H., Tozaki-saitoh, H. and Inoue, K. 2009. IFN- γ receptor signaling mediates spinal microglia activation driving neuropathic pain. *PNAS*, 106(19), pp. 8032–8037.

- Vazquez, E., Kahlenbach, J., Banchet, G. S. Von, Ko, C., Schaible, H. and Ebersberger, A. 2012. Spinal Interleukin-6 Is an Amplifier of Arthritic Pain in the Rat. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, 64(7), pp. 2233–2242. doi:10.1002/art.34384
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., y Stockinger, B. 2008. Transforming growth factor-beta ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology*. 9(12), 1341–1346. doi: 10.1038/ni.1659.
- Vieira, P. L., Heystek, H. C., Wormmeester, J., Wierenga, E. A., y Kapsenberg, M. L. 2003. Glatiramer acetate (copolymer-1, copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 170(9), 4483-4488. doi: 10.4049/jimmunol.170.9.4483.
- Vladic, A., Horvat, G., Vukadin, S. and Suc, Z. 2002. Cerebrospinal fluid and serum protein levels of tumour necrosis and soluble interleukin-6 receptor (sil-6r gp80) in multiple sclerosis patients. *CYTOKINE*, 20(2), pp. 86–89. doi:10.1006/cyto.2002.1984
- Wagner, C. A., Roqué, P. J., & Goverman, J. M. 2020. Pathogenic T cell cytokines in multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*, 217(1). <https://doi.org/10.1084/jem.20190460>
- Wang, Y., Jiang, C., Lu, C., Song, L. and You, Z. 2000. Distinct domains of IF- α mediate immune and analgesic effects. *Journal of Neuroimmunology*, 108(2000), pp. 64–67.
- Weber, M. S., Starck, M., Wagenpfeil, S., Meinl, E., Hohlfeld, R., y Farina, C. 2004. Multiple sclerosis: glatiramer acetate inhibits monocyte reactivity in vitro and in vivo. *Brain*, 127(6), 1370-1378. doi: 10.1093/brain/awh163.
- Wei, L., Lin, J.-X. and Warren, J. L. 2014. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy Wei. *NIH Public Access*, 38(1), pp. 13–25. doi: 10.1016/j.immuni.2013.01.004. Interleukin-2
- Wiley, J. 2007. Encephalomyelitis in the Mouse. *Current Protocols in Immunology*, 1–18.
- Woolf, C. J. 2004. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of internal medicine*, 140(6), 441-451. doi: 10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00010
- Woolf, C. J., y Ma, Q. 2007. Nociceptors—noxious stimulus detectors. *Neuron*, 55(3), 353-364. doi: 10.1016/j.neuron.2007.07.016
- Woolf, C. J., y Ma, Q. 2007. Nociceptors—noxious stimulus detectors. *Neuron*, 55(3), 353-364. doi: 10.1016/j.neuron.2007.07.016
- Wu, G. F., y Alvarez, E. 2012. The immuno-pathophysiology of multiple sclerosis. *Neurologic Clinics*, 29(2), 257–278. doi: 10.1016/j.ncl.2010.12.009
- Xu, X.-J., Hao, J.-X., Olsson, T. and Kristenson, K. 1994. Intrathecal interferon-7 facilitates the spinal nociceptive flexor reflex in the rat Xiao-Jun. *Neuroscience Letters*, 182(1), pp. 263–266.

- Yin, L., Chen, Y., Qu, Z., Zhang, L., Wang, Q., Zhang, Q. and Li, L. 2014. Involvement of JAK / STAT signaling in the effect of cornel iridoid glycoside on experimental autoimmune encephalomyelitis amelioration in rats. *Journal of Neuroimmunology*, Elsevier B.V., 274(1–2), pp. 28–37. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.06.022
- Zagon, I. S., y McLaughlin, P. J. 2017. *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis*. Codon Publications. doi:/10.15586/codon.multiplesclerosis.2017
- Zahid, M., Busmail, A., Penumetcha, S. S., Ahluwalia, S., Irfan, R., Khan, S. A., Rohit Reddy, S., Vasquez Lopez, M. E., & Mohammed, L. 2021. Tumor Necrosis Factor Alpha Blockade and Multiple Sclerosis: Exploring New Avenues. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.18847>
- Zheng, T., Peng, J., Pei, T., Shi, Y., Liu, L., Chen, K., Xiao, H. and Chen, Y. 2019. Cornel iridoid glycoside exerts a neuroprotective effect on neuroinflammation in rats with brain injury by inhibiting NF - κ B and STAT3. *Springer, Springer International Publishing*, 9(5), pp. 1–7. doi:10.1007/s13205-019-1697-5
- Zhou, J. Y., Alvarez, C. A., & Cobb, B. A. 2021. Integration of il-2 and il-4 signals coordinates divergent regulatory t cell responses and drives therapeutic efficacy. *ELife*, 10, 1–27. <https://doi.org/10.7554/eLife.57417>
- Zhu, J., y Paul, W. E. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 112(5), 1557-1569. doi: 10.1182/blood-2008-05-078154

ANEXO 1

Tabla 4. Análisis de la varianza en muestras de suero. Cada fila expone un análisis realizado para cada citocina en los diferentes estadios clínicos

<i>Suero</i>		
<i>Citocina</i>	F	p
<i>TNF-a</i>	5.291	0.0192
<i>IL-2</i>	24.05	<0.0001
<i>IFN-g</i>	43.37	<0.0001
<i>IL-6</i>	17.36	0.0003
<i>IL-4 *</i>	3.626	0.0528
<i>IL-17A *</i>	3.521	0.0567
<i>IL-10 *</i>	1.53	0.2666

*no se encontraron diferencias significativas

Tabla 5. Análisis de la varianza en muestras de LCR. Cada fila expone un análisis realizado para cada citocina en los diferentes estadios clínicos

<i>LCR</i>		
<i>Citocina</i>	F	p
<i>TNF-a</i>	27.33	<0.0001
<i>IL-2*</i>	2.064	0.1688
<i>IFN-g</i>	206.1	<0.0001
<i>IL-6</i>	18.72	0.0002
<i>IL-4</i>	19.28	0.0002
<i>IL-17A</i>	13.45	0.0008
<i>IL-10</i>	11.38	0.0015

*no se encontraron diferencias significativas