



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Medicina

Dpto. Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología

TESIS DOCTORAL:

**Caracterización de las acciones protectoras del  
ácido oleanólico en modelos experimentales de  
patologías con base inflamatoria**

Presentada por Cláudia Manuela Pereira  
Córdova Marcos para optar al grado de doctora  
por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

María Luisa Nieto Callejo

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de la Doctora María Luisa Nieto Callejo, de la Línea de Investigación de Enfermedades autoinmunes e inflamatorias - Inmunidad Innata e Inflamación, del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM-UVA), de la Facultad de Medicina de Valladolid. Durante este periodo, la licenciada Cláudia Manuela Pereira Córdova Marcos ha disfrutado de una Beca de la Junta de Castilla y León (Orden Edu/1204/2010, de 26 de Agosto) destinada a financiar la contratación de personal investigador de reciente titulación universitaria, en el marco de la Estrategia Regional de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e innovación 2007-2013, confinada por el Fondo Social Europeo; contrato (Abril 2011-Marzo 2015) predoctoral del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).



A mis padres y mi hermana

Si yo pudiera morder la tierra toda  
Y sentirle el sabor  
Sería más feliz por un momento.

Pero no siempre quiero ser feliz  
Es necesario ser de vez en cuando infeliz  
Para poder ser natural.

No todo es días de sol y la lluvia,  
Cuando falta mucho, se pide.

Por eso tomo la infelicidad con la felicidad  
Naturalmente, como quien no se extraña  
De que existan montañas y planicies  
De que haya rocas y hierbas.

Lo que es necesario es ser natural y calmado  
En la felicidad o en la infelicidad.

Sentir como quien mira  
Pensar como quien anda,  
Y, cuando se ha de morir,  
Recordar que el día muere  
Y que el poniente es bello  
Y es bella la noche que queda.

Así es y así sea.

**Fernando Pessoa**

No hay inversión más rentable que la del conocimiento

***Benjamin Franklin***

# **AGRADECIMIENTOS**

Y así termina una etapa más en mi vida, tras un largo camino recorrido en la elaboración de esta tesis que ha merecido la pena!

Una nueva ciudad conocí, Valladolid una ciudad que llevo en el corazón; y una nueva familia encontré en este laboratorio, que jamás la olvidaré y tanto echaré de menos. Con todas las cosas buenas y malas que aprendí fuera y dentro del laboratorio, hicieran de mí una mejor persona en el trabajo y en la vida!

Por todo ello quiero dar gracias a todos aquellos que de una forma o de otra estuvieran involucrados en este trabajo:

- En primero lugar quiero dar gracias a Marisa que me ha dado la oportunidad de realizar este trabajo bajo su tutoría, que sin ella no habría sido posible desarrollar todo el trabajo experimental y escribir esta tesis. Gracias por incluirme en tu equipo, por tu confianza y tu amistad! Gracias por haberme apoyado en TODO! Gracias por seres como eres!
- Gracias a las personas que más amo en esta vida: a mis padres y a mi hermana que aun estando lejos estuvieran siempre a mi lado. Horas habladas al teléfono que jamás me han dejado sentir sola y me han dado fuerza y confianza cuando todo lo demás me salía mal! Gracias por vuestra paciencia y haberme aguantado todos mis devaneos! Muchas gracias por TODO! Os QUIERO MUCHO! Por el orgullo que tenéis en mí, este regalo es para vosotros!
- Gracias a mis COMPAÑEROS y AMIGOS: Marita, Mabel, Isa, Bea, Rubén! Habéis sido más que amigos, habéis sido mi familia pucelana! Sin vosotros todo esto no sería posible! Me habéis aguantados todos mis cabreos, disparates, tonterías y torpezas... Gracias Marita por tu forma objetiva y positiva de verlo todo, un apoyo incondicional en el laboratorio, sin ti el laboratorio no sería lo mismo! Gracias Mabel por tu alegría, tus carcajadas, amistad y cariño eres la mejor "técnico"! Gracias Isa por tu fuerza amistad y tu alegría Soriana! Gracias Bea por todo, por tu amistad, cariño, apoyo, confianza... hemos pasado por



mucho, unos días mejores que otros, pero siempre juntas! Te quiero muchísimo! Gracias Ru por todo tu conocimiento, por tu amistad confianza, por seres como eres! No os puedo demostrar o cuanto os quiero, no hay tinción histológica ni citómetro que os pueda decir, pero os lo aseguro que os QUIERO MUCHO!

- Gracias a mi fiel amiga Soraia por todo! Gracias por tu amistad, por tu apoyo y tu afectación! Gracias por tus mensajes a medio de la noche que hicieran con que el día empezase mejor y la semana pareciese más corta!
- Gracias a las hermanas Lopes, Sofia y Joana, que más que amigas son como familia! Gracias por todo lo que me habéis soportado, todo el apoyo y amistad, sin vosotras no sería lo mismo!
- Gracias a Joana, Filipa, Mafa, Beka, Ana y Nelo que aún lejos habéis estado siempre a mi lado!
- Gracias a todos mis amigos y en especial: a Inês, Sonia, Andreia, Pedro, Nelson, Hugo, Mariana y Teixeira. Gracias a todos vosotros por toda la amistad el apoyo y la confianza que habéis depositado en mí!
- Gracias Nuria, mi médico particular, por todas las veces que me has recetado el antibiótico! Gracias por todo el apoyo y cariño!
- Gracias a mis amigos “españoles”: Luis, Laura, Jorge, Raúl, Diego, Héctor, por todo el cariño y por haberme acogido como vuestra amiga! Muy buenos momentos hemos pasado juntos... Muchas Gracias!
- Gracias a Miriam por todo tu apoyo y cariño a lo largo de estos años!

- Gracias a las “chicas de la cueva”: Patri y Maribel, que aún lejos os llevo en el corazón por la forma como me habéis acogido, todos los buenos momentos y amistad!
- Gracias a María por nuestras conversaciones y por tu amistad! Nuestros caminos se cruzaron en el CNIC y desde entonces hemos seguido juntas... Gracias!
- Gracias a todos con los que he compartido grandes risas, cafés y fiestas: Gema, Lucia, Clara, Carlos, Virginia, Tamara, Julio, Cris, Sarita, Etzel, Alma.
- Gracias a Carmen, Patri, y Roberto por habernos dado la oportunidad de trabajar y colaborar con vosotros “con los ojos” en conjuntivitis alérgica y esclerosis múltiple! Todos juntos hacemos un gran equipo!
- Gracias a las personas del IBGM que hacen más fácil el día-a-día y que va todo bien: a Álvaro, Cristina, Tere, Fernando que cuida de nuestros ratoncitos...
- Quiero agradecer también al Veterinario Ángel y a todo el personal del animalario de la Facultad de Medicina, por la gran profesionalidad con los animales suministrados.

**A todos, Muchas Gracias!!!**

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>1. SISTEMA INMUNE .....</b>	<b>10</b>
1.1 CLASIFICACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE: RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADAPTATIVA .....	10
1.1.1 <i>Inmunodeficiencia</i> .....	12
1.1.2 <i>Autoinmunidad y tolerancia</i> .....	13
1.1.3 <i>Hipersensibilidad: Respuesta alérgica</i> .....	15
1.2 RESPUESTA INFLAMATORIA .....	16
1.3 CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE .....	17
1.4 CITOQUINAS.....	19
<b>2. ENFERMEDADES AUTOINMUNES .....</b>	<b>20</b>
2.1 ESCLEROSIS MÚLTIPLE .....	21
2.1.1 <i>Etiología e Epidemiología</i> .....	21
2.1.2 <i>Aspectos Clínicos</i> .....	24
2.1.3 <i>Modelos animales</i> .....	34
2.2 MIOCARDITIS .....	37
2.2.1 <i>Etiología e clasificación</i> .....	37
2.2.2 <i>Aspectos Clínicos</i> .....	39
2.2.3 <i>Modelos animales</i> .....	43
<b>3. HIPERSENSIBILIDAD ALÉRGICA.....</b>	<b>45</b>
3.1 CONJUNTIVITIS ALÉRGICA.....	46
3.1.1 <i>Diagnóstico clínico</i> .....	46
3.1.2 <i>Clasificación</i> .....	47
3.1.3 <i>Fisiopatología de la conjuntivitis</i> .....	48
3.1.4 <i>Tratamiento</i> .....	50
3.1.5 <i>Modelo animal</i> .....	52
<b>4. TRITERPENOS .....</b>	<b>53</b>
4.1 EL ÁCIDO OLEANÓLICO .....	54
4.1.1 <i>Análogos sintéticos del ácido oleanólico</i> .....	56
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>58</b>
<i>Objetivos específicos:</i> .....	58
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>60</b>
<b>1. MATERIALES Y REACTIVOS .....</b>	<b>61</b>
1.1 MATERIALES .....	61
1.2 REACTIVOS GENERALES .....	62
1.3 COLORANTES.....	64
1.4 ANTICUERPOS.....	64
1.5 KITS COMERCIALES .....	65

APÉNDICE DE LAS CASAS COMERCIALES .....	66
<b>2. MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
2.1 MODELOS ANIMALES EXPERIMENTALES: ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .....	67
2.1.1 Modelo de encefalitis autoinmune experimental (EAE) .....	68
2.1.2 Modelo de miocarditis autoinmune experimental (MAE) .....	69
2.1.3 Modelo de conjuntivitis alérgica experimental (CAE) .....	71
2.2 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO .....	73
2.2.1 Histología .....	73
2.2.2 Inmunohistoquímica (IHQ) .....	76
2.2.3 Histofluorescencia .....	77
2.3 ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO .....	79
2.3.1 Cuantificación de marcadores de oxidación .....	79
2.3.2 Cuantificación de marcadores anti-oxidantes .....	80
2.4 DETERMINACIONES .....	81
2.4.1 Cuantificaciones séricas de auto-anticuerpos .....	81
2.4.2 Detección de citoquinas por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) .....	82
2.4.3 Cuantificación de los niveles de glutamato .....	82
2.4.4 Ensayo de la isoenzima Creatina-kinasa MB (CK-MB) .....	82
2.5 MODELOS CELULARES: ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....	83
2.5.1 Esclerosis Múltiple .....	85
2.5.2 Miocarditis .....	85
2.5.3 Conjuntivitis alérgica .....	87
2.5.4 Células linfoides – cultivos <i>ex vivo</i> .....	88
2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	90
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>91</b>
<b>1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE .....</b>	<b>92</b>
1.1 EFECTO DEL AO SOBRE UN MODELO MURINO DE ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE) .....	92
1.1.1 El tratamiento con AO protege en la clínica de animales EAE .....	92
1.1.2 El tratamiento con AO modula la respuesta inmune humoral en animales EAE .....	94
1.1.3 El tratamiento con AO modula la expresión de citoquinas en animales EAE .....	95
1.1.4 El tratamiento con AO modula los niveles de proliferación de células T en animales EAE .....	97
1.1.5 El tratamiento con AO protege del infiltrado inflamatorio y la desmielinización de la sustancia blanca en animales EAE .....	98
1.1.6 El tratamiento con AO protege los precursores de oligodendrocitos en animales EAE .....	101
1.1.7 El tratamiento con AO previene la muerte axonal en animales EAE .....	103
1.1.8 El tratamiento con AO protege frente a la acumulación de ROS en animales EAE .....	105
1.1.9 El tratamiento con AO disminuye los niveles del peróxido de hidrógeno en animales EAE .....	108
1.1.10 El tratamiento con AO disminuye los niveles de marcadores del estrés oxidativo en animales EAE .....	109
1.1.11 El tratamiento con AO aumenta los niveles de marcadores anti-oxidantes en animales EAE .....	110
1.1.12 El tratamiento con AO disminuye los niveles de glutamato en animales EAE .....	112
1.1.13 El tratamiento con AO previene la muerte celular de animales EAE .....	113
1.2 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> : CÉLULAS GANGLIONARES DE RETINA (RGC-5) .....	116
1.2.1 El tratamiento con AO inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	116
1.2.2 El tratamiento con AO protege de la muerte celular inducida por el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	118
<b>2. MIOCARDITIS .....</b>	<b>119</b>

2.1 EFECTOS BENEFICIOSOS DEL TRATAMIENTO CON AO EN UN MODELO EXPERIMENTAL AUTOINMUNE DE MIOCARDITIS:	
MAE.....	120
2.1.1 El tratamiento con AO mejora la severidad de la miocarditis en el modelo animal MAE .....	120
2.1.2 El tratamiento con AO reduce los niveles séricos de marcadores de daño cardiaco en animales MAE.....	122
2.1.3 El tratamiento con AO disminuye la severidad histopatológica en animales MAE.....	123
2.1.4 El tratamiento con AO reduce la presencia de auto-anticuerpos en ratones MAE .....	125
2.1.5 El tratamiento con AO modula los niveles de citoquinas relevantes en ratones MAE .....	127
2.1.6 El tratamiento con AO regula la respuesta de las células inmunes en ratones MAE .....	131
2.2 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> : EL EFECTO BENEFICIOSO DEL TRATAMIENTO CON AO SOBRE EL REMODELADO CARDIACO -	
CARDIOFIBROBLASTOS PRIMARIOS Y CARDIOMIOCITOS (HL-1 Y H9c2).....	135
2.2.1 El tratamiento con AO ejerce un efecto protector sobre las células cardiacas.....	135
<b>3. CONJUNTIVITIS ALÉRGICA .....</b>	<b>138</b>
3.1 EFECTOS BENEFICIOSOS DEL TRATAMIENTO CON AO EN UN MODELO DE CONJUNTIVITIS ALÉRGICA EXPERIMENTAL	
(CAE).....	139
3.1.1 El tratamiento con AO disminuye la producción de anticuerpos específicos RWP en animales CAE.....	139
3.1.2 El tratamiento con AO disminuye la infiltración celular en la conjuntiva de los animales CAE .....	140
3.1.3 El tratamiento con AO modula los niveles de citoquinas y quimiocinas en animales CAE .....	142
3.1.4 El tratamiento con AO regula la respuesta de células T en animales CAE .....	144
3.2 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> : EL TRATAMIENTO CON AO INHIBE LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS RELEVANTES EN PROCESOS	
ALÉRGICOS .....	147
<b>I. DISCUSIÓN .....</b>	<b>153</b>
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>171</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>174</b>

# **ABREVIATURAS**

<b>AG</b>	Acetato de Glatiramer
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>AO</b>	Ácido oleanólico
<b>AO<sub>0</sub></b>	Tratamiento con ácido oleanólico a partir del día de la inmunización
<b>AO<sub>10</sub></b>	Tratamiento terapéutico con ácido oleanólico desde el primer día de la sensibilización
<b>AO<sub>21</sub></b>	Tratamiento con ácido oleanólico a partir del día 21 post-inmunización
<b>AO<sub>5</sub></b>	Tratamiento con ácido oleanólico al día 5 post-sensibilización
<b>AOPP</b>	Productos de oxidación proteica, del inglés Advanced Oxidation Protein Products
<b>APCCy</b>	Allophycocyanin
<b>ARS</b>	Rojo de Alizarin S
<b>BBB</b>	Barrera hematoencefálica, del inglés blood-brain barrier
<b>BHT</b>	Butil Hidroxitolueno
<b>BNP</b>	Péptido natriurético cerebral o péptido natriurético tipo B del inglés Brain Natriuretic Peptide
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino deslipidada
<b>C.F.</b>	Cardiofibroblastos
<b>CA</b>	Conjuntivitis alérgica
<b>CAE</b>	Conjuntivitis alérgica experimental
<b>CAES</b>	Conjuntivitis alérgica estacional
<b>CAMS</b>	Moléculas de adhesión celular
<b>CAP</b>	Conjuntivitis alérgica perenne
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CD</b>	Clúster de diferenciación
<b>CDC</b>	Contacto dermató-conjuntivitis
<b>Células NK</b>	Células T Natural killer
<b>CFA</b>	Coadyuvante completo de Freund
<b>CIS</b>	Síndrome clínico aislado, del inglés Clinically Isolated Syndrome
<b>CK</b>	Creatina Kinasa
<b>CK-MB</b>	Creatina-kinasa MB
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus



<b>CNIC</b>	Centro Nacional de Investigaciones Cardiológicas
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>CPA</b>	Células presentadoras de antígeno
<b>CPG</b>	Conjuntivitis papilar gigante
<b>CRM</b>	Resonancia Magnética cardiaca o cardiorresonancia
<b>CTR</b>	Control
<b>CVB3</b>	Virus Coxsackie B3
<b>Cy</b>	Ciano
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DCFH-DA</b>	Diclorodihidro fluoresceín-Diacetato
<b>DHE</b>	Dihidroetidio
<b>DMEM</b>	Dublecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desiorribonucleico, del inglés deoxyribonucleic acid
<b>EAE</b>	Encefalitis autoinmune experimental
<b>EBV</b>	Virus de Epstein-Barr
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o Enzimoimmunoensayo, del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.
<b>EM</b>	Esclerosis múltiple
<b>EMA</b>	Agencia Europea del Medicamento
<b>EMEM</b>	Medio de cultivo mínimo esencial de Eagle
<b>ERK</b>	Kinasa regulada por señales extracelulares, del inglés
<b>FcRn</b>	Neonatal FC receptor
<b>FcγRII/III</b>	Receptor Fc gama
<b>FITC</b>	Isotiocianato de Fluoresceína
<b>FL-1</b>	Sensor FL-1, recibe longitudes de onda entre 505nm y 545nm
<b>FL-2</b>	Sensor FL-1, recibe longitudes de onda entre 560nm y 590nm
<b>FL-3</b>	Sensor FL-1, recibe longitudes de onda entre 605nm y 635nm
<b>FoxP3</b>	Factor regulador de la transcripción
<b>FRAP</b>	Poder antioxidante reductor del hierro del inglés Ferric ion Reducing Antioxidant Power

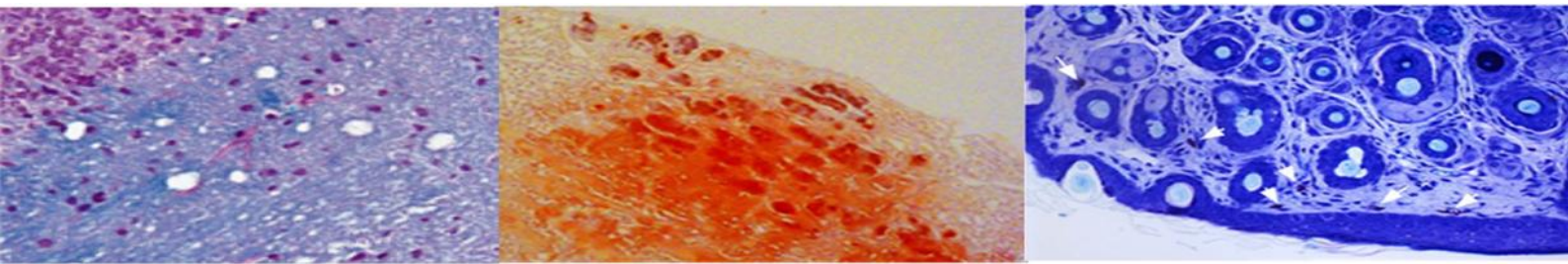
## Abreviaturas

<b>Gap43</b>	Proteína asociada al crecimiento 43 del inglés Growth Associated Protein 43
<b>G-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos
<b>Glut</b>	Glutamato
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina & Eosina
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogeno
<b>HDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>HIV</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana del inglés human immunodeficiency virus
<b>HLA II</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
<b>HPV</b>	Papilomavirus humano
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>HW/BW</b>	La relación peso corporal/peso del corazón, del inglés Heart weight (HW) to body weight (BW)
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular 1 o CD54
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	Interferón alfa
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	Interferón beta
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina total
<b>IgG1</b>	Inmunoglobulina isotipo 1
<b>IgG2a</b>	Inmunoglobulina isotipo 2a
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-3</b>	Interleucina 3
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-7</b>	Interleucina 7
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>IL-9</b>	Interleucina 9

<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-11</b>	Interleucina 11
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>IL-13</b>	Interleucina 13
<b>IL-16</b>	Interleucina 16
<b>IL-17</b>	Interleucina 17
<b>IL-18</b>	Interleucina 18
<b>IL-20</b>	Interleucina 20
<b>IL-22</b>	Interleucina 22
<b>IL-23</b>	Interleucina 23
<b>IL-25</b>	Interleucina 25
<b>IL-33</b>	Interleucina 33
<b>IL-35</b>	Interleucina 35
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintetasa inducible, del inglés Inducible nitric oxide synthase
<b>IOIS</b>	Sociedad Internacional de Inflamación ocular del inglés International Ocular Inflammation Society
<b>IVIG</b>	Administración intravenosa de inmunoglobulina
<b>KCA</b>	Queratoconjuntivitis atópica
<b>KCV</b>	Queratoconjuntivitis vernal
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>LES</b>	Lupus eritematoso sistémico
<b>LFA-1</b>	Antígeno 1 asociado a la función de linfocitos
<b>LFB- PAS</b>	Del inglés ILuxol Gast Blue – Periodic Acid- Schiff's.
<b>MAE</b>	Miocarditis autoinmune experimental
<b>MBP</b>	Proteína básica de la mielina
<b>MCP-1</b>	Proteína quemoatrayente de monocitos 1
<b>M-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de macrofagos
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MHC I</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I
<b>MHC II</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II

<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Proteína inflamatoria de macrófagos
<b>MMPs</b>	Metaloproteinasas de matriz
<b>MOG</b>	Glicoproteína de mielina de los oligodendrocitos
<b>N.O.</b>	Nervio Óptico
<b>NAAGA</b>	Ácido glutámico N-acetil-aspartil
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido del inglés nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear $\kappa$ B
<b>NG2</b>	Condroitina sulfato proteoglicano del inglés Chondroitin sulfate proteoglycan
<b>NK</b>	Células Natural Killer
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>Nrf2</b>	Factor Nuclear derivado de eritroide 2, del inglés Nuclear factor-erythroid 2
<b>O/N</b>	Toda la noche
<b>OPC</b>	Células progenitoras de oligodendrocitos
<b>PAF</b>	Factor de plaquetas
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PLP</b>	Proteína proteolípídica de la mielina
<b>PP</b>	Forma clínica primaria progresiva de la esclerosis múltiple
<b>PR</b>	Forma clínica progresiva recurrente de la esclerosis múltiple
<b>pSR</b>	Rojo picrosirio
<b>r.p.m.</b>	Rotaciones por minuto
<b>RM</b>	Resonancia Magnética
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RR</b>	Forma clínica remitente recurrente de la esclerosis múltiple
<b>RT</b>	Temperatura ambiente

<b>RW</b>	Polén Ragweed
<b>SCG</b>	Cromoglicato de sodio del inglés sodic cromoglicate
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico del inglés sodium dodecyl sulfate
<b>SEC</b>	Sociedad española de cardiología
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SNP</b>	Sistema Nervioso Periférico
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>SP</b>	Forma clínica secundaria progresiva de la esclerosis múltiple
<b>sPLA<sub>2</sub>-IIA</b>	Fosfolipasa A2 secretada
<b>STF</b>	Suero de ternera fetal
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico, del inglés thiobarbituric acid
<b>Tc</b>	Linfocitos T citotóxicos
<b>TCR</b>	Receptor de linfocitos T
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta 1
<b>Th1</b>	Respuesta inmune linfocitos T tipo 1
<b>Th17</b>	Respuesta inmune linfocitos T productores IL-17
<b>Th2</b>	Respuesta inmune linfocitos T tipo 2
<b>TMEV</b>	Encefalitis por infección por virus Theiler's, del inglés Theiler's murine encephalomyelitis virus
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	Factor de necrosis tumoral beta
<b>Treg</b>	Células T reguladoras
<b>TUNEL</b>	Del inglés Terminal dUTP Nick-End Labeling
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adhesión celular vascular 1 o CD106
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>VLA-4</b>	Antígeno 4 de activación tardía



# I. INTRODUCCIÓN

Desde siempre las plantas y los alimentos han sido la primera medicina en la humanidad. Ya en la antigua Grecia, siglo V a.C. - Siglo IV a.C., Hipócrates de Cos el padre de la medicina moderna, afirmó:

*“Que tu medicina sea tu alimento, y el alimento tu medicina”.*

En los últimos años muchos recursos naturales de origen vegetal se han tornado populares, llevando al estudio de sus propiedades bioactivas y los mecanismos de acción sobre la salud.

El término “Dieta Mediterránea” se inició en la década de los años 50 llevado con un estudio a cabo por Ancel Keys et al [1, 2], que refleja el patrón alimentario característico de diversos países de la cuenca mediterránea. Sus beneficios se asocian a una mayor longevidad y menor morbilidad por enfermedades cardiovasculares. Es un estilo de vida basado en una dieta equilibrada y variada en la que predominan los alimentos obtenidos de los cultivos tradicionales de esta zona geográfica bañada por el mediterráneo: el trigo, el olivo y la vid. Los alimentos que caracterizan esta alimentación son: el consumo elevado de vegetales, fruta, legumbres, cereales enteros y frutos secos, el consumo moderado de pescado, leche y productos lácteos, el bajo consumo de carne roja y productos cárnicos, el aceite de oliva como principal fuente de lípidos y la moderada ingesta de alcohol, preferentemente en forma de vino en las comidas [2-7].

Diversas enfermedades crónicas (obesidad, hipercolesterolemia, hipertensión, trastornos cardiovasculares, etc.) relacionadas con la alimentación y el ejercicio físico se pueden prevenir o mejorar mediante ciertos componentes de la dieta [3, 4]. Tras unas décadas en las que la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades estaban relacionados por el paradigma clásico centrado en dietas basadas en el bajo consumo en grasas, en los últimos años el concepto de dieta mediterránea es la alternativa más saludable a la dieta baja en grasas.

Los seres superiores están defendiendo constantemente su integridad biológica frente a agresiones, esencialmente externas. Esta defensa se lleva a cabo por el sistema inmune. Un fallo en el funcionamiento inmunológico de los mecanismos de control puede dar lugar a enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes.

En este trabajo hemos estudiado los efectos beneficiosos del ácido oleanólico, un compuesto natural presente en numerosas plantas como en las hojas del olivo y en la piel de su fruto, en modelos de enfermedades inflamatorias como: la esclerosis múltiple, la miocarditis y en la conjuntivitis alérgica.

## 1. Sistema Inmune

El sistema inmunológico es la defensa natural del cuerpo ante organismos infecciosos y otras sustancias extrañas no infecciosas que son capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria. La capacidad de defensa se adquiere antes de nacer y se madura y consolida en los primeros años de vida.

El sistema inmunológico es una red compleja de células, tejidos y órganos que funcionan en equipo, y está encargado de diferenciar lo propio de lo ajeno.

### 1.1 Clasificación de la respuesta inmune: Respuesta inmune innata y adaptativa

La función fisiológica del sistema inmune es proteger el individuo frente a agentes patógenos (microorganismos o macromoléculas como proteínas y polisacáridos) que son reconocidos como extraños. Para ello el sistema inmunitario consta de varias "líneas de defensa" principales: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa [8, 9].

#### Inmunidad innata:

La Inmunidad innata (llamada también de natural o inespecífica) es el sistema de defensa que permite controlar a mayor parte de los agentes patógenos que llegan



al organismo. El objetivo de la inmunidad innata es evitar la instalación del proceso al organismo. El objetivo de la inmunidad innata es evitar la instalación del proceso infeccioso; si éste se produce, dicho mecanismo inmunitario logra establecer un ambiente para que se desarrolle una respuesta adaptativa.

La respuesta inmunitaria inespecífica es la primera barrera de defensa del organismo. Los principales componentes de la inmunidad innata son las barreras epiteliales, que impiden a la entrada de microorganismos, las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células *Natural Killer* (NK) y factores solubles (citoquinas y quimioquinas, interferones, complemento) que controlan y destruyen los microorganismos que ingresan [8-11].

Los mecanismos internos de la inmunidad innata consisten en: 1) la activación del complemento; 2) el proceso de fagocitosis, y 3) la generación de una respuesta inflamatoria. Tras la activación del complemento, inmediatamente se inicia el proceso de fagocitosis, por el que se destruyen y eliminan los agentes extraños [9-11]. Simultáneamente, las células fagocíticas producen señales químicas (citoquinas, tales como el factor de necrosis tumoral) y otros mediadores, que también inducen inflamación. La inflamación a su vez, atrae y hay migración de células a los lugares de invasión, intentando erradicar la infección y reparar los tejidos dañados [12].

### Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa (llamada también de adquirida o específica) se desarrolla solo frente a la sustancia extraña que induce su iniciación. Cuando un microorganismo logra evadir los mecanismos de la respuesta inmune innata, y en el individuo se acumula una cantidad de antígeno mayor a un umbral determinado, se activan los mecanismos de la inmunidad adaptativa.

La respuesta específica proporciona al organismo una respuesta específica frente a cada agente infeccioso o célula tumoral. Se caracteriza por presentar memoria inmunológica específica, la cual evita que el mismo agente infeccioso provoque enfermedad en una segunda infección, siendo la segunda vez una respuesta más rápida y más eficiente. Este tipo de respuesta es mediada por linfocitos (linfocitos T y B) y otras células como células dendríticas, macrófagos etc.

La respuesta inmune adquirida se considera que puede ser de dos tipos: humoral y celular. De una manera general se considera que cuando los elementos implicados son los linfocitos B y sus productos secretados, los anticuerpos, se trata de una respuesta tipo humoral mientras que cuando participan los linfocitos T tanto colaboradores ( $CD4^+$ ) como citotóxicos ( $CD8^+$ ), se trata de una respuesta tipo celular [9, 11-13]. Existen varios tipos de linfocitos T colaboradas  $CD4^+$ , tales como: Th0, Th1, Th2 y Th17.

Inicialmente hay reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos y subsiguiente activación de los mismos. Las principales características de la respuesta adaptativa son: especificidad (diferentes sustancias provocan diferentes reacciones), diversidad (responde a gran variedad de antígenos), memoria (respuestas más enérgicas), especialización (genera respuestas óptimas frente a diferentes microorganismos), autolimitación (volver al estado de homeostasis), tolerancia a lo propio (no atacar al propio organismo) [9, 12].

Una respuesta inmune efectiva del huésped frente a organismos extraños requiere la acción coordinada y conjunta del sistema inmune innato y adaptativo. Ambas ramas del sistema inmune funcionan cooperativamente potenciándose mutuamente. La inmunidad inespecífica, no específica de antígeno tiene la ventaja de intervenir rápidamente durante una infección aguda y puede permitir la supervivencia del hospedero hasta que las respuestas específicas congreguen nuevas defensas. No obstante, a veces se producen fallos que pueden agruparse, de forma genérica, dentro de las tres siguientes categorías: inmunodeficiencia, autoinmunidad e hipersensibilidad.

### **1.1.1 Inmunodeficiencia**

La deficiencia de alguno de los componentes del sistema inmune lleva a la aparición de las llamadas inmunodeficiencias. Estas pueden ser divididas en inmunodeficiencias primarias que casi siempre tienen componente genético o inmunodeficiencias secundarias que pueden surgir como complicaciones de otra

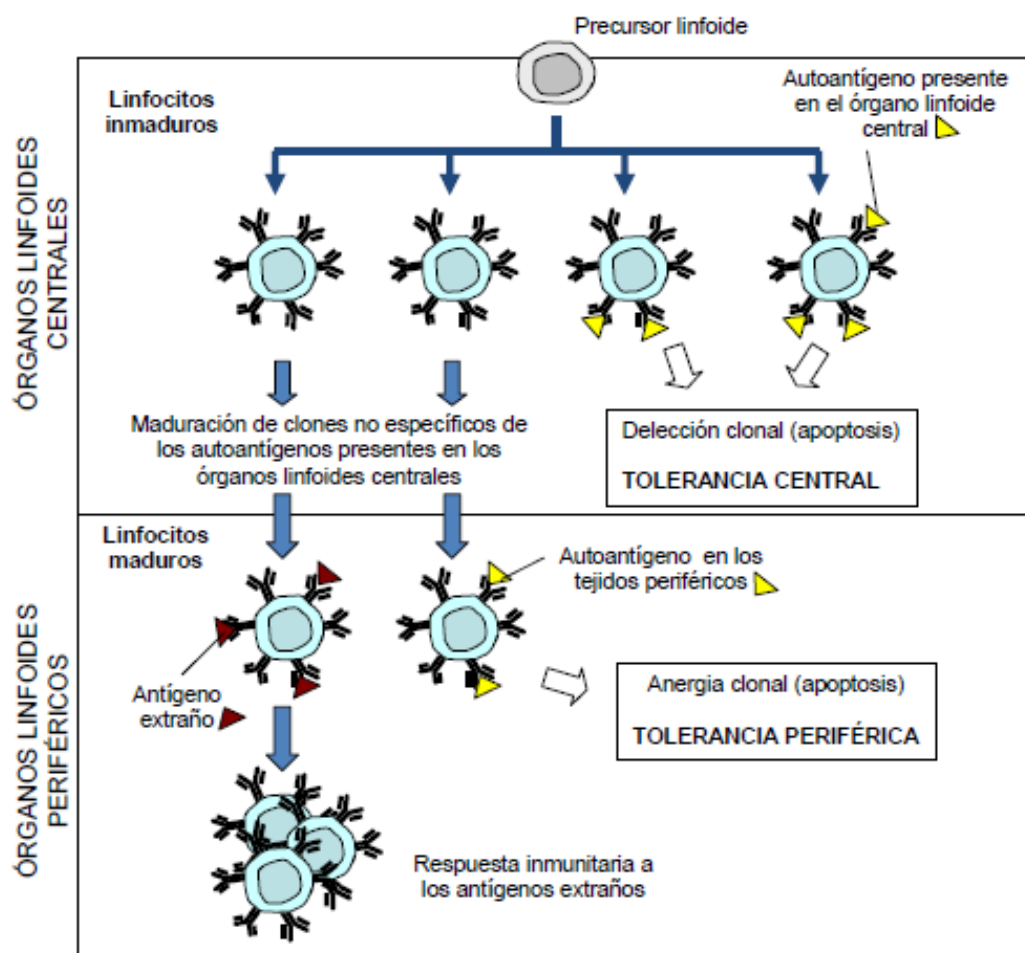
patología (cáncer, enfermedades metabólicas) o tras a la administración de drogas (drogas inmunosupresoras). Las inmunodeficiencias primarias se pueden clasificar en inmunodeficiencias específicas si afectan la respuesta inmunitaria específica, es decir a los linfocitos B y T; o en inmunodeficiencias inespecíficas si afecta a la respuesta inespecífica esto es a las células fagocíticas y al complemento. Tanto las inmunodeficiencias primarias como secundarias se manifiestan clínicamente por la aparición de infecciones crónicas persistentes o recurrentes. Numerosas infecciones provocan secundariamente una inmunodeficiencia como el sarampión y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA) [9, 11, 12].

### 1.1.2 Autoinmunidad y tolerancia

Las enfermedades auto-inmunes son el resultado de la respuesta inmune contra antígenos propios. Son una falla del sistema inmune en distinguir adecuadamente lo propio de lo extraño y ataca a partes del propio organismo.

Las enfermedades autoinmunes pueden ir desde el tipo de enfermedad dirigida contra un único tejido o órgano (enfermedad órgano-específica) hasta el tipo de enfermedad dirigida contra antígenos diseminados, llevando a una enfermedad generalizada o sistémica. Como ejemplo de enfermedades autoinmunes órgano-específica tenemos la esclerosis múltiple, Diabetes Mellitus tipo I. Como ejemplo de enfermedades autoinmune sistémicas está el Lupus eritematoso sistémico – LES [14].

La autoinmunidad resulta de la pérdida de tolerancia inmunológica. La tolerancia inmunológica es la capacidad de no responder ante un antígeno por parte del sistema inmunitario adaptativo. El estado tolerante se puede clasificar en: tolerancia central y tolerancia periférica. La tolerancia central evita la maduración de los linfocitos presentes en los órganos linfoides centrales donde se segregan los linfocitos inmaduros (timo para células T y médula ósea para células B) capaces de reconocer los auto-antígenos y son eliminados mediante un mecanismo de delección clonal (destrucción física de linfocitos) y eliminación por apoptosis (muerte celular) (Figura 1) [15].



**Figura 1 - Mecanismos generales de auto-tolerancia en linfocitos.**

<http://pendientedemigracion.ucm.es/info/saniiani/troncales/inmunologia/documentostemas/Tema%2019.pdf>

La tolerancia periférica provoca la inactivación o la muerte celular de los linfocitos B y T auto-reactivos en los órganos linfoides periféricos (bazo y nódulos linfáticos) que pasaron a la selección negativa intra-tímica, impidiendo que produzcan una respuesta inmune frente a un antígeno concreto. El proceso se lleva a cabo por un mecanismo de anergia clonal y eliminación por apoptosis. La anergia clonal es la inactivación funcional de linfocitos, dando lugar a la falta de respuesta tras el contacto con el antígeno. Otros controles implican la limitación de la presencia de factores de crecimiento esenciales y de mediadores pro-inflamatorios claves para el desarrollo eficiente de la respuesta inmunitaria [10, 16, 17]. Por último, un mecanismo fundamental de supresión inmunológica, ampliamente estudiado en las últimas décadas, es la supresión mediada por células T reguladoras (Treg), que limitan la

activación y expansión de linfocitos T autoreactivos [17, 18]. Las Treg tienen un papel crítico en la inducción y mantenimiento de la tolerancia periférica tanto frente a antígenos propios como no propios, controlando la respuesta inmunitaria, de tal forma que, la ausencia o mal funcionamiento de las Treg está asociado a procesos autoinmunes, como la EM [18].

La alteración de uno o más de los mecanismos de tolerancia puede desatar un ataque inmunológico sobre los tejidos que conduce al desarrollo de enfermedades autoinmunes. La alteración en la tolerancia por parte del sistema inmune, se relaciona con la herencia de genes, estímulos ambientales, principalmente infecciones que llevan a la activación de linfocitos auto-reactivos.

### **1.1.3 Hipersensibilidad: Respuesta alérgica**

La reacción alérgica es una respuesta del sistema inmune exagerada o mal dirigida a determinados antígenos, a la que se denominan alérgenos. La reacción alérgica o de hipersensibilidad puede ser de cuatro tipos: tipo I, tipo II, tipo III y tipo IV. Los 3 primeros tipos son reacciones en las que se ponen en funcionamiento respuestas mediadas por agentes humorales mientras que las respuestas inmunológicas de tipo IV que se desencadenan son preferentemente celulares. Nos centraremos en las reacciones de hipersensibilidad de tipo I por su importancia en este trabajo.

La hipersensibilidad de tipo I (o inmediata) es una respuesta inmune rápida que se produce en pacientes con producción amplificada de IgE específica. La reacción se produce, en general, tras el contacto con el antígeno al cual el individuo ya ha sido previamente sensibilizado.

En la reacción de hipersensibilidad de tipo I, un antígeno supuestamente inocuo opera con los anticuerpos IgE específicos localizados en los receptores de membrana, llevando a la degranulación de los mastocitos y basófilos. La reacción entre el antígeno y el anticuerpo conduce a la liberación de aminas vasoactivas y mediadores inflamatorios como la histamina y la triptase. Esta reacción lleva también a la producción de leucotrienos y prostaglandinas. La liberación de estas moléculas induce a la vasodilatación y contracción de los músculos lisos, aumento de la

permeabilidad vascular de los pequeños vasos y al aumento de la secreción pelo tejido glandular epitelial.

Muchas de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I presentan dos fases: la fase inicial o inmediata y la fase tardía. La respuesta inicial, es una respuesta rápida que se da a los 5-30 minutos tras la exposición al alérgeno y se caracteriza por la vasodilatación, extravasación vascular y dependiendo de la localización por espasmos del músculo liso o secreciones glandulares. La respuesta tardía se produce entre las 2 y 24h tras la exposición al alérgeno y puede durar varios días. Esta reacción se caracteriza por infiltraciones en los tejidos de eosinófilos, neutrófilos, basófilos, monocitos e células T CD4+ [9, 11, 12].

## 1.2 Respuesta inflamatoria

La inflamación es la respuesta del organismo frente a una infección o daño. Surge con el fin de aislar y eliminar al agente inflamatorio y también se encarga de reparar el tejido o el órgano que haya resultado dañado. Sin embargo el proceso de reparación puede ser perjudicial si no se controla y se cronifica [9, 19].

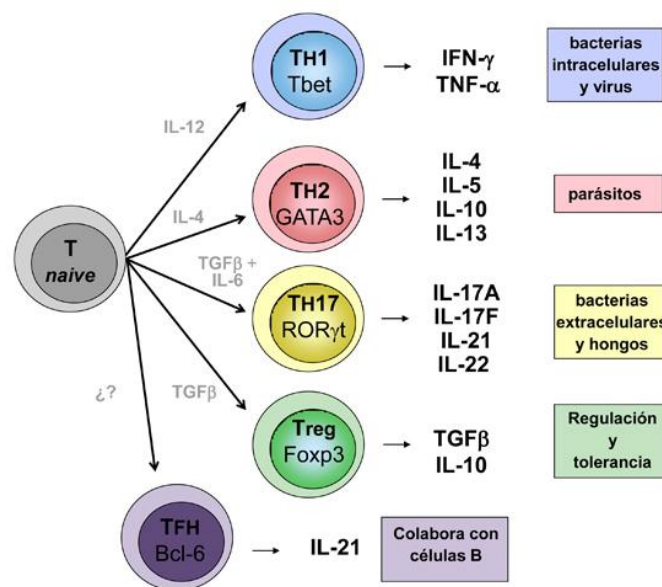
La respuesta inflamatoria está formada por plasma, células circulantes (neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y plaquetas), vasos sanguíneos y constituyentes celulares (mastocitos y fibroblastos) y extracelulares del tejido conectivo (proteínas fibrosas, glicoproteínas adherentes y proteoglicanos).

La inflamación, según su duración, se divide en inflamación aguda y crónica. La inflamación aguda es de una duración relativamente corta (varios días) y se caracteriza por exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos predominantemente neutrófilos. La inflamación crónica tiene una duración más larga, de semanas a meses e incluso indefinidamente y se caracteriza por el infiltrado celular compuesto por linfocitos, macrófagos y células plasmáticas y por la formación de tejido conectivo [9, 12].

### 1.3 Células del Sistema Inmune

La acción del sistema inmune es posible gracias a la participación e interacción de diferentes poblaciones celulares conocidas como células inmunocompetentes. Como células inmunocompetentes están: los linfocitos T y B, las células NK, las células dendríticas, macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares.

Los linfocitos T son sintetizados y producidos en la médula ósea y maduran en el timo. Tienen una función central en la regulación de la respuesta inmune y participan además directamente en la destrucción de los agentes agresores. Cada célula T es programada para reconocer un antígeno específico mediante el receptor de linfocitos T (TCR) [11, 19]. Existen tres tipos funcionalmente distintos de linfocitos T: células T colaboradoras (Th) (participan en la iniciación y desarrollo de la respuesta inmune); células T citotóxicas (Tc) (responsables de los procesos de citotoxicidad) y células T reguladoras (acción reguladora de la respuesta inmune). Dentro de los linfocitos colaboradores encontramos: Th0, Th1, Th2 y Th17 (Figura 2).



**Figura 2 – Esquema de la diferenciación de las células T helper CD4<sup>+</sup> hacia los distintos tipos de células T colaboradoras (Th), y respectivas citosinas secretadas al medio.**

<http://trasplantealdia.pulsointeractivo.com/modules.php?name=libro&op=viewCapNewVersion&idpublicacion=1&idedition=1&idcapitulo=7&idversion=&wordsearch=>

Los linfocitos B maduran en la médula ósea. Las células B maduras constituyen cerca de 10-20% de la población de linfocitos circulantes periféricos y están presentes también en los tejidos linfoides. Están especializadas en la síntesis y secreción de grandes cantidades de inmunoglobulinas, mediadores de la inmunidad humoral. Los linfocitos B reconocen al antígeno mediante inmunoglobulinas que están unidas a su membrana citoplasmática [11].

Las células NK se definen como linfocitos capaces de reconocer y destruir y presentar algunas células infectadas por virus y ciertas células tumorales, sin que exista sensibilización previa [11, 12].

Las células dendríticas son células importantes en la presentación del antígeno a los linfocitos de marcadores de superficie que contribuyen a su función y poseen en su membrana una gran cantidad de moléculas de histocompatibilidad de clase II. Son responsables por la destrucción de las células infectadas y la activación de macrófagos. Se localizan por debajo de los epitelios que es el local más común de entrada de microbios e antígenos extraños [11, 20, 21].

Los Monocitos/Macrófagos: Los monocitos son células maduras precursoras de los macrófagos, es decir, una vez que el monocito es activado este experimenta cambios morfológicos que lo adaptan para sus nuevas funciones como macrófagos. Los macrófagos son células que poseen capacidad fagocítica y de adherencia a los tejidos y reciben diferentes denominaciones según los diferentes tejidos donde se encuentren. Los Macrófagos constituyen la segunda “oleada” de células que acuden al sitio de la infección [9, 12].

Los Neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares: son los responsables de la primer “oleada” de células encargadas de la respuesta del huésped, alcanzan el sitio de la infección en pocas horas. Los neutrófilos presentan en su interior gránulos cuyo contenido es rico en lisozima, colagenasa y elastasa [9, 12].



### 1.4 Citoquinas

En la inducción y regulación de las respuestas inmunes están involucradas múltiples interacciones entre linfocitos, monocitos, células inflamatorias y células endoteliales. Muchas de esas interacciones dependen del contacto célula-célula y son mediados por mediadores de corta acción, las citoquinas. El término interleucina fue aplicado a las citoquinas porque median las comunicaciones entre los leucocitos. En general son moléculas que actúan a muy bajas concentraciones y pueden ejercer un efecto autocrino cuando se unen a receptores presentes en la propia célula productora. También pueden tener un efecto paracrino actuando sobre diferentes tipos celulares y aun en algunos casos pueden liberarse a la circulación sanguínea o linfática ejerciendo su efecto en otros órganos y tejidos actuando como hormonas.

Una de las importantes características de las citoquinas es que estas pueden ejercer diferentes efectos biológicos al actuar sobre distintos tipos celulares. Según la función más relevante de las citoquinas estas se pueden dividir en las siguientes secciones:

1) Citoquinas del desarrollo hematopoyético

Promueven el crecimiento y la diferenciación de las células sanguíneas maduras a partir de células madre hematopoyéticas. Son producidas por células del estroma de la médula ósea o por linfocitos maduros activados (IL-3, IL-5, IL-7, IL-9, IL-11 GM-CSF, G-CSF y M-CSF).

2) Citoquinas que median las respuestas inmunes innatas

Estas citoquinas son liberadas de forma inmediata tras el contacto con el agente extraño. Los monocitos y macrófagos activados son la principal fuente de estas moléculas, pero también pueden ser producidas por linfocitos activados, células endoteliales y fibroblastos (IL-1a, IL-1b, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-9, IL-20, IL-22, IL-12, IL-18, IL-23, IFN- $\gamma$  y IFN- $\alpha$ ).

3) Citoquinas que median las respuestas inmunes adaptativas

En respuesta a una estimulación antigénica, los linfocitos T se activan y proliferan y se diferencian hacia células efectoras específicas (IL-2, IFN-g, TNF, IL-4, IL-5, IL-10, IL13, IL16, IL-17, TGF-b, GM-CSF).

Los linfocitos T como consecuencia de la estimulación por citoquinas pueden diferenciarse en linfocitos T Th1 o Th2. En la presencia de IL-12 hay una diferenciación de los linfocitos T hacia Th1, mientras que en presencia de IL-4, esta diferenciación coordina el desarrollo de Th2. Los linfocitos Th1 en colaboración con los macrófagos están implicados en la respuesta inmune celular, mientras que los Th2 promueven la respuesta humoral [9, 11].

En relación a la respuesta inflamatoria, algunas citoquinas pueden favorecer el desarrollo de la misma – citoquinas pro-inflamatorias – mientras que otras ejercen en efecto supresor de la inflamación – citoquinas anti-inflamatorias. En el grupo de citoquinas pro-inflamatorias se incluyen las producidas por los monocitos y macrófagos activados durante la respuesta inmune innata, aunque también pueden ser producidas por linfocitos Th1. Las principales citoquinas pro-inflamatorias que participan en los acontecimientos celulares y moleculares son la IL-1, IL-6 y el TNF-  $\alpha$ . Otra importante citoquina pro-inflamatorias, producida por los linfocitos Th1 es el IFN-  $\gamma$ .

Las citoquinas anti-inflamatorias tienen la capacidad inmunosupresora e inhiben el crecimiento celular o suprimen la secreción de otras citoquinas. Entre ellas se encuentran la IL-4, la IL-13 y la IL-10 que activan las acciones de los linfocitos B e inhiben las respuestas inflamatorias. También se pueden considerar citoquinas anti-inflamatorias el TGF- $\beta$ , el IFN- $\gamma$  y el IFN- $\beta$  [11].

## 2. Enfermedades autoinmunes

El término “enfermedad autoinmune” engloba aquellas patologías crónicas de etiología desconocida que se originan por errores en el reconocimiento del agente

patógeno, es decir, nuestro sistema inmunológico identifica erróneamente a nuestras propias células como patógenos externo infeccioso y lo ataca.

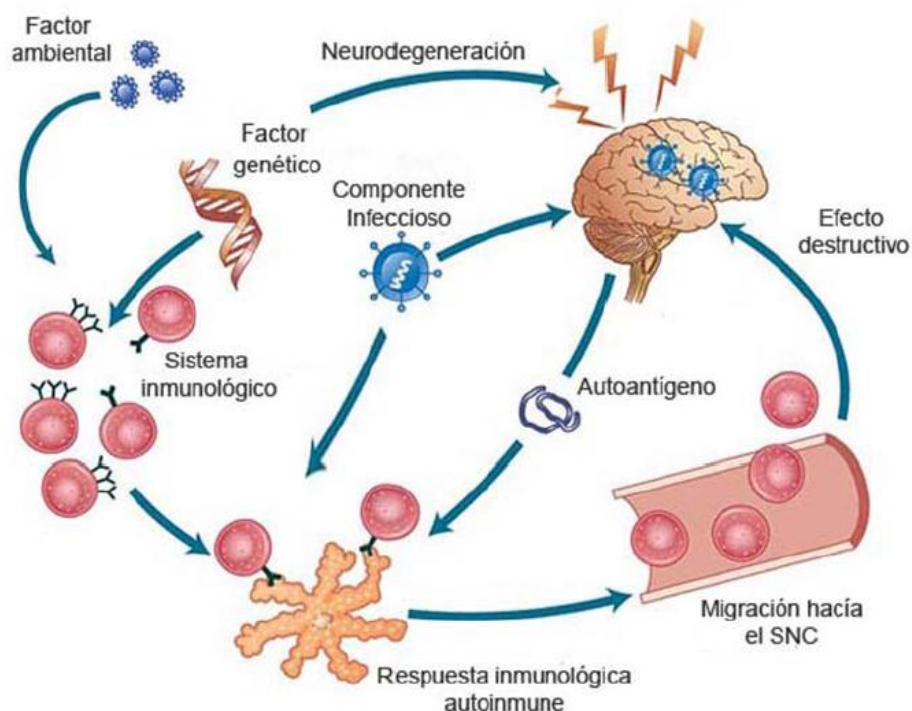
Las enfermedades autoinmunes son complejas y sus causas son múltiples, pueden ser medio ambientales y/o genéticas. Presentan manifestaciones muy diversas que se traducen en la afectación simultánea o necesaria de los diferentes órganos y sistemas del organismo y tienen como marcadores biológicos diversos anticuerpos.

## 2.1 Esclerosis Múltiple

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante, adquirida, crónica que afecta de forma específica al SNC [22-27]. Se encuentra entre las enfermedades autoinmunes más comunes, junto con la artritis reumatoide, el lupus la diabetes tipo I, la tiroiditis [14]. Se caracteriza por el ataque del sistema inmune, mediado por células T, contra antígenos del SNC. Hay destrucción o daño de la vaina de mielina (desmielinización), pérdida de oligodendrocitos y neuronas que da lugar a un aumento en la discapacidad neurológica [27-30].

### 2.1.1 Etiología e Epidemiología

Esta enfermedad afecta a personas jóvenes entre los 20 y los 40 años de edad. No se ha descubierto una causa o un marcador específico de la enfermedad, aunque las hipótesis apuntan a causas ambientales, genéticas y hormonales (Figura 3) [25, 28].



**Figura 3 – Etiología de la Esclerosis Múltiple.** Aunque su etiología no está todavía establecida, se piensa que la EM tiene atributos de enfermedad autoinmune, mediada por un ataque dirigido contra las vainas de mielina del SNC, considerando sus causas ambientales, genéticas y hormonales.

### *Ambientales*

Múltiples causas ambientales han sido asociadas al aumento del riesgo de EM. Los factores ambientales que se han estudiado en mayor profundidad son infecciones (por Epstein-Barr virus) y agentes físicos (radiación solar y humo de tabaco). La infección por el Epstein-Barr virus (EBV) o herpes virus humano 4 aumenta la susceptibilidad del individuo a EM y cuando individuos están también infectados por mononucleosis el riesgo aumenta más aún. Otros virus también relacionados con EM son el herpes virus tipo 6, el retrovirus y la *Chlamydia pneumoniae* [23, 31].

La exposición a la radiación solar aumenta la producción de vitamina D que presenta un efecto inmunomodulador [23, 24, 32, 33]. El elevado índice de masa corporal disminuye los niveles de vitamina D y está relacionado también con el carácter pro-inflamatorio de la inflamación crónica en obesos [33, 34].

El estrese físico y emocional y el humo de tabaco han sido asociados, también, con el aumento del riesgo de EM.

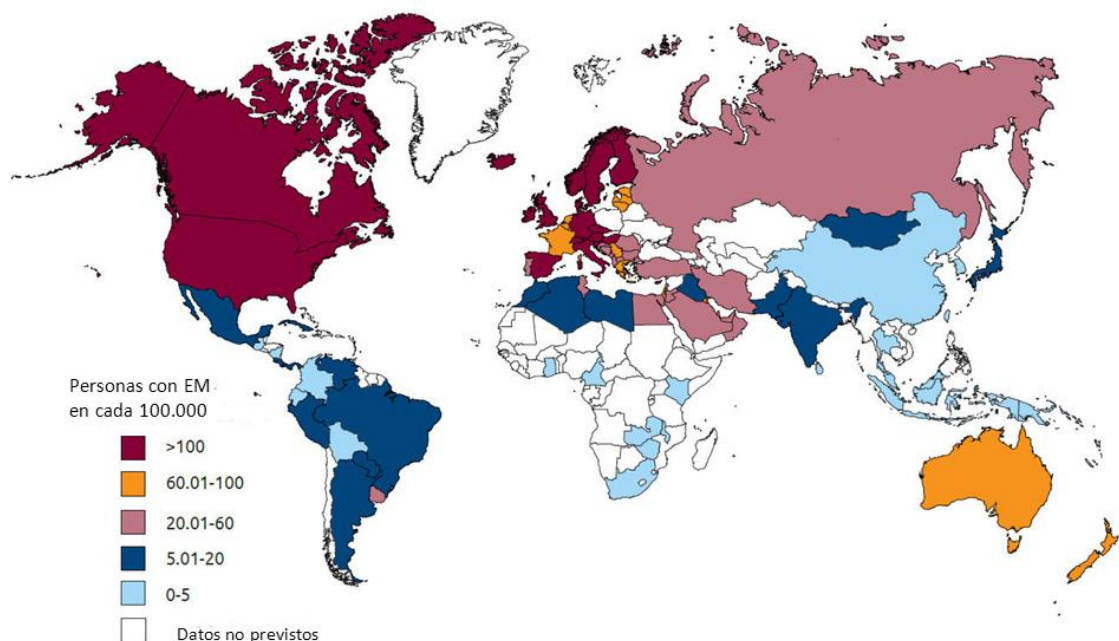
### *Genéticas*

La EM es considerada una enfermedad compleja de herencia poligenética. Sin embargo no se transmite con un patrón mendeliano clásico, solo en algunos genes se ha observado un aumento de susceptibilidad para la enfermedad. Este aumento de susceptibilidad está asociado con el cromosoma 6 y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC II) específicamente en los haplotipos HLA-DR15 y HLA-DQ6 y los genotipos correspondientes DRB1\*1501, DRB5\*0101, DQA1\*0102, y DQB2\*0602 [24].

### *Hormonales*

Puede que las hormonas que estén implicadas en la actividad de la enfermedad. Estudios epidemiológicos indican que las mujeres padecen de esta enfermedad en mayor proporción que los varones [35, 36]. Además, estudios realizados han demostrado que dosis elevadas de estrógenos, de testosterona o progesterona mejoran la sintomatología clínica, como se observa en casos de embarazo; sin embargo, después del parto la enfermedad vuelve a su actividad previa [36].

Por lo tanto la EM es considerada una enfermedad multifactorial donde múltiples factores pueden influir en el aumento de la susceptibilidad [34, 37-39]. Dado que no se conoce verdaderamente la etiología de EM, son fundamentales los estudios epidemiológicos, tanto en su vertiente analítica como descriptiva ya que nos pueden ayudar a hallar su etiología.



**Figura 4 – Distribución mundial de la prevalencia de la esclerosis múltiple (2013).**

<http://www.atlasofms.org/>

En los últimos 30 años se ha verificado un aumento global de la incidencia de EM (Figura 4). Esto se puede deber a un mejor diagnóstico, sobre todo desde la introducción de la resonancia magnética nuclear que permite catalogar de EM a pacientes con curso clínico atípico, cuando antes podrían pasar desapercibidos; también a la mayor accesibilidad a la atención socio-sanitaria así como al mejor y mayor conocimiento y alerta por parte de los médicos.

## 2.1.2 Aspectos Clínicos

La característica clínica más llamativa de la EM es su gran variabilidad. Sus síntomas y signos vienen determinados por la localización de las lesiones desmielinizantes.

### 2.1.2.1 Diagnóstico clínico

La sintomatología en esclerosis múltiple es muy variable y se solapa con la presentación de numerosas enfermedades neurológicas siendo difícil lograr un

diagnóstico en poco tiempo. Tras la sospecha clínica, es necesario descartar las enfermedades que pueden cursar de modo parecido. Los criterios de McDonald refuerzan la idea de la exclusión de otros procesos patológicos desmielinizantes [40].

Las lesiones desmielinizantes se encuentran con mayor frecuencia en el nervio óptico, tronco del encéfalo, médula espinal y en las regiones periventriculares del cerebro. Estas lesiones se manifiestan clínicamente con alteración de la visión, mareos, fatiga muscular, dolor y déficit sensorial (Figura 5). También pueden ocurrir síntomas psicológicos, como cambios en el estado de ánimo, depresión y suicidio [38].

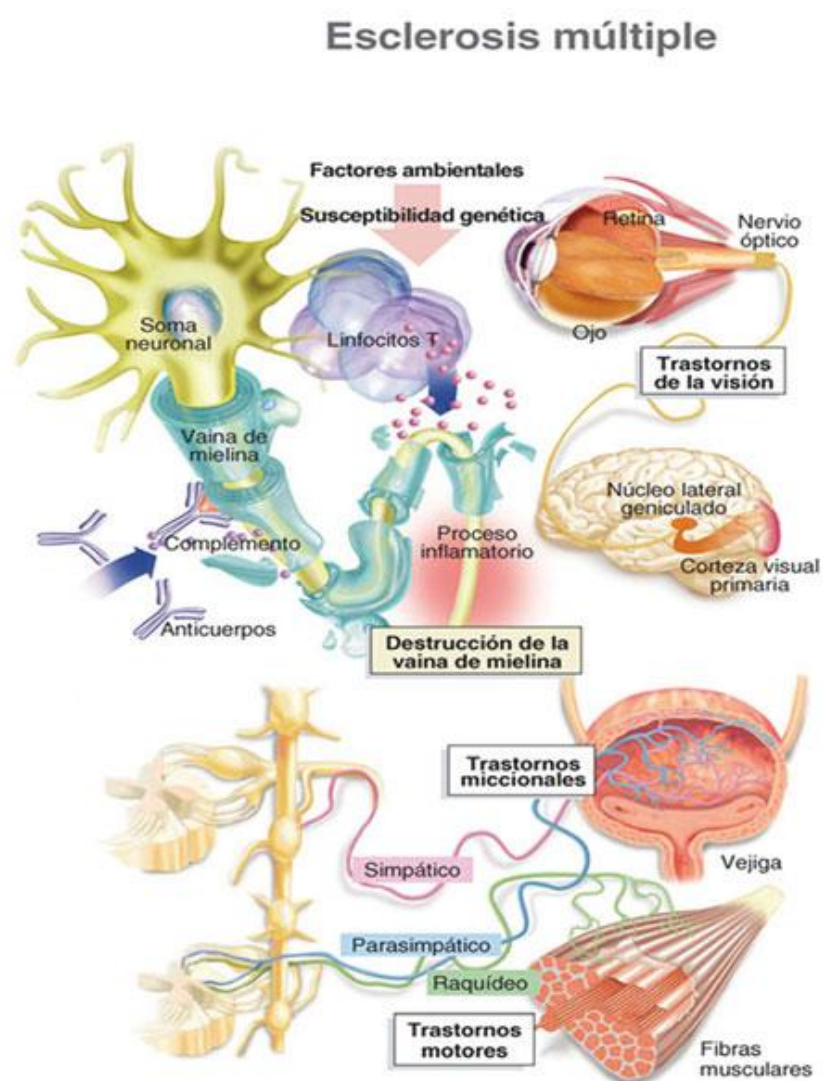


Figura 5 - Patogenia de la EM [41].

El diagnóstico clínico de la EM se basa en datos clínicos (participación de los sistemas motor, sensorial, visual y autonómico, aunque pueden aparecer otros

síntomas) y en el examen neurológico que encuadran cada uno de los síntomas en la patología de EM. El estudio de las imágenes de resonancia magnética (RM), el estudio de laboratorio (del líquido cefalorraquídeo – LCR), permiten el diagnóstico de EM.

El desafío del diagnóstico está en los casos de Síndrome Clínico Aislado (CIS) donde el proceso de desmielinización se traduce solo por síntomas neurológicos en un paciente adulto joven previamente saludable. Es un episodio agudo o sub-agudo que alcanza un pico rápidamente (dentro de 2 a 3 semanas) y debe durar por lo menos 24h. Se produce en ausencia de fiebre o infección, sin características clínicas de la encefalopatía. Los síntomas más frecuentes en CIS son: neuritis óptica, síndromes del tronco, síndromes hemisféricos y síndromes medulares [42].

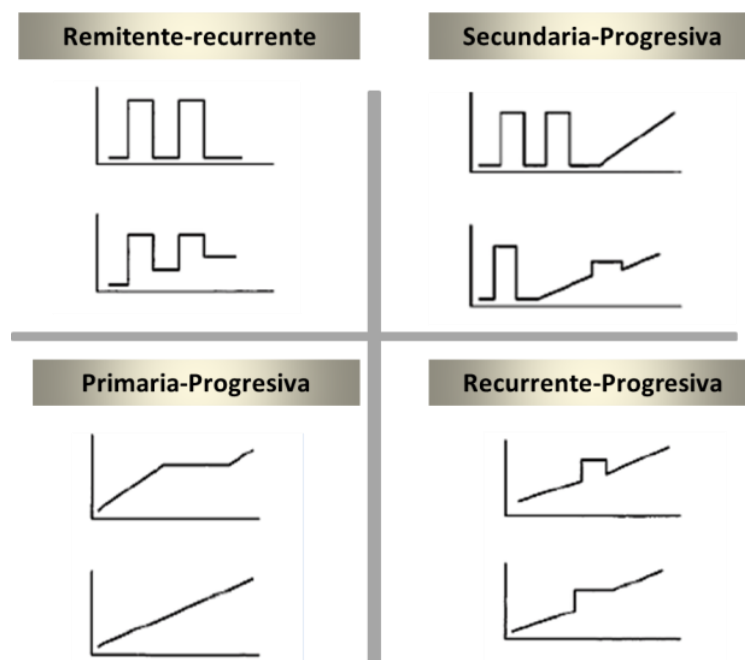
### **2.1.2.2 Formas clínicas y síntomas**

El curso de la enfermedad neurológica es variable. Según la evolución clínica, se pueden encontrar diferentes formas de EM. La más habitual es la forma en brotes o recurrente-remitente (RR) que puede evolucionar a una forma secundaria progresiva (SP) o bien puede iniciarse con progresión sin relación con los brotes desde el inicio, es la forma primaria progresiva (PP) (Figura 6).

- **Recurrente-remitente (RR):** En el 85% de los casos la enfermedad empieza por la aparición de brotes, con remisión parcial o completa [25, 36-38, 42, 43]. En el cuadro clínico se puede observar síntomas, de algunos días o semanas, como cambios en la visión, disfunción motora, urinaria e intestinal [38].
- **Secundaria-progresiva (SP):** Con el tiempo, los episodios recurrentes (50 - 60 % de los casos) de la inflamación conducen a la acumulación de daños en el SNC con la persistencia del deterioro neurológico. Esta forma clínica está caracterizada por una disminución en la actividad inflamatoria y subsecuente atrofia cerebral y pérdida neuronal progresiva [25, 37, 38, 43].
- **Primaria progresiva (PP):** Hay un deterioro gradual sin la presencia de brotes clínicos. Es la forma clínica más agresiva en la EM, presente en 10-15% de los casos y donde la incidencia es similar en mujeres y varones [24, 25, 36-38, 43].
- **Progresivo recurrente (PR):** Algunos autores defienden una cuarta forma clínica. con un curso caracterizado por un inicio progresivo con presencia de



brotos con o sin recuperación completa. Durante los periodos de brotes los pacientes presentan una progresión continua de los signos clínicos de la enfermedad [43, 44].



**Figura 6- Representación esquemática de las varias formas clínicas de EM.**

Según la clasificación de *Lublin y Reingold* (1996) se pueden diferenciar los subgrupos clínicos: Remitente-recurrente (RR), Secundaria progresiva (SP), Primaria Progresiva (PP) y Recurrente Progresiva (RP) [43].

### 2.1.2.3 Mecanismos Fisiopatológicos

La EM se ha considerado clásicamente como una enfermedad inflamatoria con la principal característica fisiopatológica la formación de placas desmielinizantes en el SNC, mediada por células T. La combinación de diversos factores ambientales con la predisposición genética individual, conduce a la aparición de clones de linfocitos T autorreactivos en la circulación sanguínea y una desregulación de los procesos inflamatorios. La intolerancia del sistema inmune y la formación de clones autorreactivos de linfocitos T frente a proteínas y lipoproteínas del SNC, varía para cada paciente e igualmente en el mismo paciente, en diferentes momentos de la enfermedad. Ante la infección se produce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias,

que de determinada manera llegan al cerebro y activan la microglía, acelerando el deterioro cognitivo.

La formación de la placa desmielinizante es el estadio final de varios procesos patológicos que incluyen: disrupción de la barrera hematoencefálica (BBB), inflamación multifocal, desmielinización, remielinización, pérdida y depleción de oligodendrocitos, gliosis reactiva y degeneración axonal y neuronal [45, 46].

### **Disrupción de la barrera hematoencefálica e inflamación multifocal:**

La BBB es impermeable a las macromoléculas. Su impermeabilidad no es absoluta y la mayoría de las sustancias que penetran al SNC son proteínas que pasan por transporte activo o facilitado [47].

Las células presentadoras de antígeno (APC) en el SNC, pueden ser células gliales (microglía o astrocitos) o bien macrófagos, que expresan antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I), funcionando como células presentadoras de antígeno de mielina a las células inmunomoduladoras, induciendo la liberación de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias. También inducen, a la proliferación clonal de células T que atraen a los macrófagos de la periferia, promoviendo y estimulando la inflamación en el SNC, aumentando así la permeabilidad de la BBB.

La migración de linfocitos T reactivos a través de la BBB supone una interacción entre las moléculas de adhesión (CAMs) de las células inflamatorias y de las células endoteliales de la pared vascular, así como la interacción de citoquinas y quimioquinas secretadas por el leucocito, la BBB y las células residentes en el cerebro.

Una vez activados, los linfocitos T autorreactivos se adhieren al endotelio a través del contacto entre las CAMs de los leucocitos, como las integrinas LFA-1 (antígeno 1 asociado a la función de linfocitos) y VLA-4 (antígeno 4 de activación tardía), que son células especializadas en la capilaridad del endotelio vascular. Para facilitar esta trans migración, las células T activadas expresan enzimas como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), responsables de la lisis de la lámina basal subendotelial. Esto hace que el linfocito se aplane y pueda atravesar entre las células endoteliales (primer componente de la BBB), pero sin romper su unión dirigiéndose al tejido perivascular [31, 36, 48, 49].

Una vez en el SNC, los linfocitos T autorreactivos se reactivan por mimetización molecular, a través de fragmentos antigénicos de mielina, y liberan citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$ ) iniciando una respuesta inflamatoria de tipo Th1 y Th17, y el reclutamiento de otras células inflamatorias como linfocitos B, macrófagos y células microgliales [25, 31, 36].

Las células T CD4+ son las primeras en expresar CD11c y a presentárselo a las APC en el espacio perivascular, antes de pasar al parénquima. La reactivación induce la liberación adicional de citoquinas pro-inflamatorias que estimulan CD11b en la microglía, a permeabilizar más la BBB y a estimular la quimiotaxis, resultando en el reclutamiento de más células inflamatorias y la infiltración celular en el SNC. Tanto CD11c como CD11b son miembros de la familia de las integrinas que se expresa en neutrófilos, monocitos, células NK, y células T y B activadas [31]. Las células activadas CD11b+ también contribuyen a la inflamación mediante la secreción de factores de activación de células T, tales como IL-12, IL-17, IL-23, y mediadores tóxicos tales como el óxido nítrico (NO) y los radicales libres de oxígeno (ROS). Todo ello genera una respuesta inflamatoria y el consecuente daño de mielina [31, 48, 49].

### **Mecanismos patogénicos del daño tisular:**

La inflamación y la desmielinización están estrechamente relacionadas, ya que son los mecanismos inflamatorios, como anticuerpos, células T y macrófagos y sus productos, los que conllevan al daño agudo axonal y a la desmielinización.

Una vez activada la microglía, ocurre desmielinización. El daño afecta a la mielina, a los oligodendrocitos y a los axones. Así, sus antígenos neuronales son reconocidos y fagocitados y pueden ser presentados a las células T y B, desencadenando una respuesta autoinmune donde los axones inductores de desmielinización pueden conducir al daño axonal secundario. Por lo tanto el daño axonal ha cerrado un círculo y el ciclo puede comenzar de nuevo [31, 50].

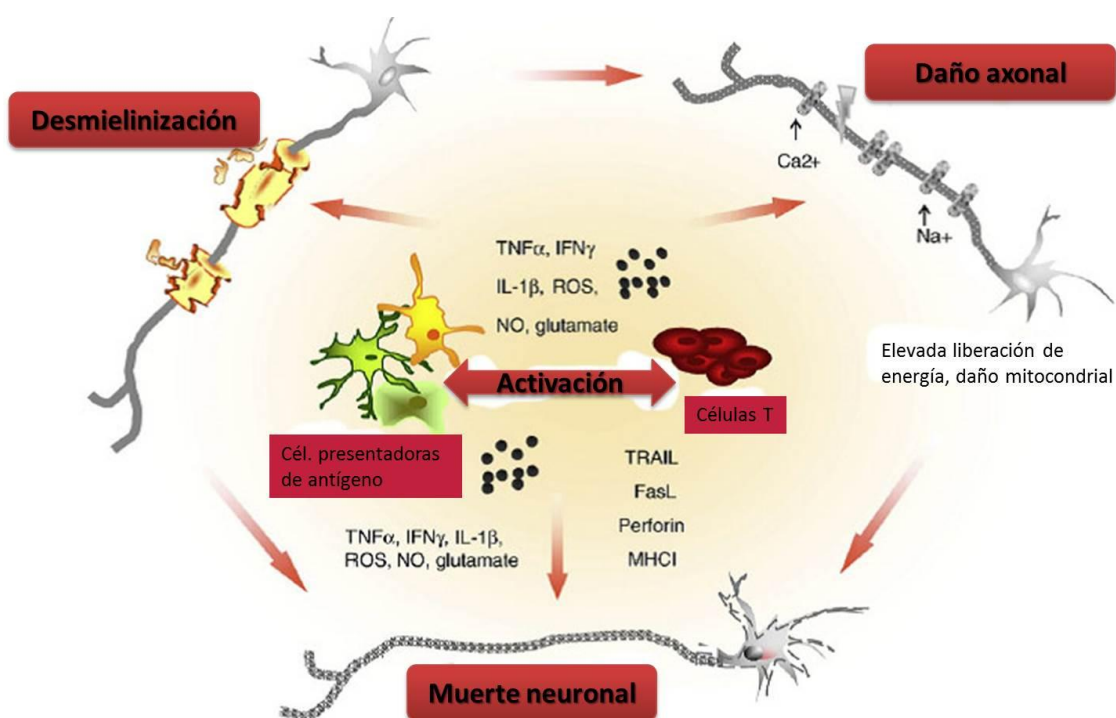
El daño axonal se considera la causa de que la enfermedad neurológica pueda ser progresiva e irreversible. La pérdida de axones y neuronas son responsables de la disfunción neuronal persistente que ocurre en pacientes con EM.

Las consecuencias de la desmielinización cortical en el deterioro dendrítico y sináptico, y la participación de la inmunidad innata/adaptativa pueden inducir a la

liberación de mediadores tóxicos inflamatorios y activar mecanismos de daño mitocondrial y oxidativo.

Así la inflamación y la desmielinización axonal en el SNC llevan al aumento de la energía liberada por las neuronas y por lo tanto al déficit de la conductancia de los nervios, existiendo un cambio en el mecanismo mitocondrial. Esta disfunción puede ser la causa del daño provocado por los factores del sistema inmune innato, como las especies reactivas de oxígeno (ROS), mediada por la deficiencia de los macrófagos y microglía, encontradas en las fases agudas de la enfermedad [25]. Excesivas cantidades de NO han sido asociadas a síntomas neuronales como daño de los oligodendrocitos y axones [25, 31].

La activación de la microglía y de los macrófagos en la EM, dañan indirectamente a los oligodendrocitos y a las neuronas mediante la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y del glutamato. El daño directo a las neuronas ocurre a través de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), producidas por la microglía, al producir disfunción mitocondrial. Todo esto y sumando al aumento de la energía liberada por los axones dañados, contribuye a la degeneración axonal y subsecuente muerte neuronal (Figura 7) [25].



**Figura 7 – Aspectos clave de la neurodegeneración.** La reactivación de las células T, incluyendo macrófagos activados y microglía, así como células dendríticas, resulta en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, así como moléculas citotóxicas, tales como ROS, NO, glutamato. Estas reacciones inflamatorias son requisitos fundamentales para el inicio de la neurodegeneración inflamatoria, es decir, la transección axonal y la pérdida de células neuronales, lo que no implica sólo la inflamación - desmielinización inducida, sino también a los procesos de daño directo. Adaptado de *J. Herz et al*, 2010 [49].

### Resolución de la inflamación y remielinización:

La progresión clínica de la enfermedad y las secuelas se deben a la degeneración axonal y neuronal secundaria, a la desmielinización e la inflamación crónica. La resolución del proceso inflamatorio en la EM puede explicarse, por la inhibición de los linfocitos Th1 pro-inflamatorios y por la apoptosis de los linfocitos T autorreactivos, así como la actuación de genes que controlan el balance en los programas de activación.

Se ha observado que las células Th2 presentan una respuesta anti-inflamatoria en función de la enfermedad, controlando la inflamación [31, 48].

Las células T *Natural Killer* (NK), están involucradas en el control de la inflamación. Cuando están activadas, pueden suprimir las respuestas Th1 y/o promover las respuestas celulares Th2 [25].

Las células T reguladoras (Treg) están también implicadas en la regulación del sistema inmune, manteniendo la tolerancia a los auto-antígenos y la vigilancia del sistema inmune. Las células Treg son especializadas en suprimir la respuesta inmune Th1, y secretar una gran variedad de citoquinas anti-inflamatorias como el TGF- $\beta$ , IL-10 y el IFN- $\gamma$ , así como activar el factor de transcripción FoxP3 para regular el organismo [31].

En los inicios de la EM, es posible la reparación de las placas desmielinizadas, pero cuando la enfermedad se hace crónica esta capacidad se pierde y falla la remielinización. La remielinización se lleva a cabo por las células progenitoras de oligodendrocitos (OPC). Las OPC son células gliales que dan lugar, como su nombre indica, a oligodendrocitos mielinizantes. Se distribuyen de manera uniforme entre la materia gris y blanca del sistema nervioso central. La remielinización ocurre en varias fases: la activación de las células precursoras de oligodendrocitos (OPC), su reclutamiento (proliferación y migración) y su diferenciación, en la que las OPC envuelven a los axones y forman la vaina de mielina [45, 46, 51].

### **2.1.2.4 Tratamiento**

En la actualidad no existe un tratamiento curativo de la enfermedad.

La inflamación, la disrupción de la barrera hematoencefálica (BBB), la desmielinización y el daño axonal son las características patológicas de la EM sobre las que se centran los tratamientos de la actualidad. Así, el tratamiento con anti-inflamatorios en la forma RR, han tenido efectos en la prevención del daño axonal. Existen diferentes clases de terapias utilizadas en el tratamiento de EMRR:

- El IFN- $\beta$ : su mecanismo de acción parece ser multifactorial: disminuye la actividad de células T inducida por mitógenos, disminuye la secreción de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y el TNF- $\alpha$  por células mononucleares, disminuye la producción de IgG, mejora la función supresora y disminuye la expresión de moléculas HLA de clase II sobre monocitos y células del SNC [31, 35, 37, 52, 53].

- El Acetato de glatirámico (AG): es un análogo sintético de la proteína de mielina que posee la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria específica Th2 de células T CD8+, que bloquea la reacción antígeno-anticuerpo, impidiendo de este modo el daño de la vaina de mielina [31, 35, 37].
- El Natalizumán: es un anticuerpo monoclonal contra la integrina  $\alpha$ -4, que inhibe la migración a través de la barrera hematoencefálica evitando la fijación celular a la pared vascular mediante la inhibición selectiva de moléculas de adhesión [35, 37, 54, 55].
- El Fingolimod: es un compuesto en estudio (fase II) que afecta al tráfico de leucocitos y que reduce el número de linfocitos T activados circulantes en el SNC al unirse al receptor 1 de la esfingosina 1-fosfato [56, 57].

Puesto que es una enfermedad autoinmune, también se utilizan inmunosupresores tales como azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina y mitoxantrona. Sin embargo, su uso está limitado por su toxicidad [35, 58].

Durante los brotes el tratamiento de elección utilizado para disminuir la duración y la gravedad son corticoides. En la siguiente tabla están detallados los fármacos aprobados por la Agencia Europea del Medicamento (EMA):

## Introducción

Principio activo	Nombre comercial	Año de aprobación (EMA)	Mecanismo de acción	Efectos adversos
<b>Fármacos de primera línea</b>				
Interferón beta	Avonex <sup>®</sup>	1997	↓ la actividad de células T; ↓ la secreción de IFN-γ y de TNF-α; ↓ la producción de IgG; mejora la función supresora y ↓ la expresión de moléculas HLA de clase II sobre monocitos y células del SNC.	Síndrome pseudogripal con fiebres, mialgias y fatiga.
	Betaferon <sup>®</sup>	1995		
	Rebif <sup>®</sup>	1998		
	Extavia <sup>®</sup>	2008		
Acetato de glatirámero	Copaxone <sup>®</sup>	1997	Bloquea la reacción antígeno-anticuerpo, impidiendo el daño de la vaina de mielina.	Capacidad para originar reacciones alérgicas.
<b>Fármacos de segunda línea</b>				
Natalizumab	Tysabri <sup>®</sup>	2006	Inhibe la migración a través de la barrera hematoencefálica	Más susceptibilidad a infecciones por virus
Fingolimod	Gilenya <sup>®</sup>	2011	↓ el número de linfocitos T activados circulantes y en el SNC.	

**Tabla 1 – Fármacos de primera y segunda línea, aprobados por EMA para el tratamiento de la esclerosis Múltiple.**

Actualmente la EM Primaria Progresiva constituye un reto terapéutico. Desafortunadamente, no existen fármacos que hayan demostrado eficacia en esta forma clínica. A lo largo de los años se han llevado a cabo varios estudios con interferón beta se han ensayado otros medicamentos, incluidos el Acetato de Glatirámero pero los resultados han sido negativos.

### 2.1.3 Modelos animales

No hay un único modelo animal capaz de representar todo el espectro de heterogeneidad de la enfermedad y en las últimas décadas se han desarrollado varios modelos que representan varios aspectos de la enfermedad.



Los modelos animales más comunes de EM son: el modelo de encefalitis autoinmune experimental/encefalitis alérgica experimental (EAE) [59-61], los modelos de inducción viral como la encefalomiелitis por infección con el virus de Theiler (TMEV) [61-64], y por último, el modelo de desmielinización inducido por toxinas como el modelo de cuprizona y el modelo de desmielinización local inducida por lisofosfatidicolina [60, 63].

### **2.1.3.1 Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE)**

El modelo EAE es el modelo animal más estudiado de las enfermedades autoinmunes. Se descubrió en los años 30 por Rivers et al [65]. Inicialmente, la EAE se indujo en monos y cobayas y posteriormente en varias otras especies incluyendo ratas y ratones [31, 60, 63].

La fracción proteica de la mielina del SNC contiene numerosos auto-antígenos potenciales que han sido utilizados para inducir el modelo animal de EAE [63]. El desarrollo del modelo se lleva a cabo en cepas susceptibles, por inmunización con péptidos que contienen secuencias concretas de derivados de la proteína de mielina básica (MBP), glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG) y la proteína proteolipídica de la mielina (PLP) [60, 61, 63, 66]. De los diferentes tipos de inducción de EAE, los más comunes se basan en la inyección de un péptido, MOG<sub>35-55</sub> o PLP<sub>139-151</sub>, emulsificado en adyuvante de Freund's (CFA) que contiene *Mycobacterium tuberculosis*, seguido de la administración intraperitoneal de *toxina pertussis*. En la EAE al igual que en la EM, la edad, el género, los factores ambientales y cambios hormonales también influyen en la susceptibilidad, en el desarrollar y en la severidad de la enfermedad [66-69].

### **Patogenia de la EAE**

#### La iniciación de la EAE: una respuesta Th1 mediada por células T CD4+:

El mecanismo de patogénesis de la EAE puede implicar a células T y/o a células B, dependiendo del antígeno empleado [70].

La EAE, como la EM, es una enfermedad autoinmune mediada por células T *helper* CD4+ [71]. La inmunización y expansión de las células Th1 reactivas a los

componentes de la vaina de mielina se infiltran en el parénquima del SNC, liberan citoquinas y quimoquinas pro-inflamatorias, y promueven la infiltración y activación de macrófagos [50, 72]. Aunque se requiera la infiltración de células T CD4+ al parénquima del SNC para el desarrollo de la lesión en la EAE, los macrófagos son las células efectoras causantes de la desmielinización y la muerte de los oligodendrocitos, que conduce a la pérdida de la función axonal [24, 50].

Los macrófagos activados por el IFN $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  producidos por las células de T, producen a su vez más citoquinas: IL-12, IL-23 y TNF- $\alpha$ , así como productos tóxicos como óxido nítrico [25, 63, 66, 73].

Sin embargo, la implicación directa de las células Th1 en la EAE no es cierta en todos los modelos de EAE, ya que clones de células Th2 reactivas al MBP que secretan IL-4 y niveles bajos de IFN- $\gamma$ , también causan EAE [63, 74].

### El paradigma Th1-Th17/Th2:

La EAE se ha considerado clásicamente como una enfermedad mediada por células T autorreactivas productoras de citoquinas pro-inflamatorias, como INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (respuesta Th1), frente a una respuesta anti-inflamatoria de tipo Th2 (IL-4, IL-10, IL-13) [75, 76]. Sin embargo, las células Th17 productoras de IFN- $\gamma$  (Th1) e IL-17 (Th17) tienen un papel importante en la EAE, ya que las células Th1 promueven la inflamación al SNC y facilitan la infiltración de las células Th17 a las zonas lesionadas [25, 63, 66, 77-80].

Por otro lado, la regulación del balance Th1/Th2 se le ha atribuido a la citoquina IL-12, que favorece una respuesta Th1 [81]. En contraste, durante la última década han demostrado la importancia de otros tipos celulares, como el Th17. Ratones deficientes de IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  poden desarrollar una forma severa de EAE, mientras que ratones deficientes de IL-23 (citoquina esencial para la producción de linfocitos Th17) fueron resistentes a la enfermedad [82-84].

### Citoquinas en la remisión de la EAE:

La recuperación de la EAE está asociada con la producción de citoquinas tipo Th2. La producción de IL-4 e IL-10 por células B es esencial para la recuperación de la EAE, ya que ratones en los que la deficiencia IL-10 está restringida a células B, y no a T,

no se recuperan [85]. La IL-10 se produce además en el SNC por la población de células T CD4+CD25+, que tienen un papel crítico en la resolución de la enfermedad. Por último, las células Treg tienen un papel crítico en la resolución de la enfermedad, controlando la inflamación [25, 63, 66, 79, 80]. *Sakaguchi et al* demostraron que la depleción de células Treg CD4+CD25+ en ratones normales inducía a enfermedades autoinmunes, mientras que la reconstitución de las mismas suprimía el desarrollo de estas enfermedades [86].

## 2.2 Miocarditis

La miocarditis fue definida en 1995 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad inflamatoria del músculo cardíaco, estableciéndose el diagnóstico mediante criterios histológicos, inmunológicos e inmunohistoquímicos [87]. Es el resultado de la exportación a agentes infecciosos, a fármacos o como resultado de una respuesta autoinmune.

Los criterios de diagnóstico de Dallas se basan en criterios histopatológicos con presencia de infiltrado linfocítico junto a necrosis de miocitos [88]. Su complejidad técnica, la falta de reproductibilidad y los avances en las técnicas de diagnóstico no invasivo, como la resonancia cardíaca, han hecho que estos criterios hayan sido criticados durante años, de tal forma que, por consenso, la biopsia miocárdica, a pesar de continuar siendo el *gold standard* para el diagnóstico de miocarditis, queda reservada para pacientes con sospecha de miocarditis y situación de inestabilidad hemodinámica.

### 2.2.1 Etiología e clasificación

La miocarditis y las miocardiopatías dilatadas son las principales causas de la insuficiencia cardíaca en pacientes menores de 40 años o atletas jóvenes [89]. Estas patologías se caracterizan por la infiltración de células en el miocardio que conlleva a

la necrosis, pérdida de miocitos, apoptosis y fibrosis [90, 91]. La miocarditis puede dar lugar a muerte súbita, y un 12% de los pacientes desarrollan miocardiopatía dilatada con disfunción contráctil del ventrículo izquierdo [89, 91, 92].

Su etiología puede ser de origen en agentes infecciosos (virus, bacterias, protozoos, hongos) y no infecciosos (tóxicos, enfermedades sistémicas, agentes físicos). De las múltiples clasificaciones de miocarditis la más extendida es la que las divide en primarias o secundarias. De las formas primarias no se conoce con certeza el mecanismo etiológico, mientras que las secundarias se producen como consecuencia de un agente específico o en el contexto de una enfermedad conocida [91].

Existen un gran número de agentes virales, toxinas y drogas inductores de la miocarditis. En los países desarrollados, la etiología más frecuente de la miocarditis secundaria es viral [90]. Los microorganismos mayoritariamente responsables son los enterovirus, como Coxsackie B3 (CVB3), y en menor medida los adenovirus. Además de estos virus, hay que referir el papel de otros microorganismos como el Cytomegalovirus (CMV), el virus de la hepatitis C, el virus zoster de la varicela, el Epstein-Barr y el HIV, o el parásito *Trypanosoma Cruzi*. Recientes estudios han demostrado que las bacterias como la *Chlamydia pneumoniae* y la *Borrelia burgdorferi* pueden tener un papel activo en el fallo cardíaco que se produce tras la miocarditis. Reacciones de hipersensibilidad a fármacos/vacunas y a tóxicos también pueden originar miocarditis [93, 94]. Numerosos fármacos (vacuna de la viruela, toxina tetánica, penicilina, ampicilina, cefalosporinas, tetraciclinas, sulfonamidas, etc) se han relacionado con la aparición miocarditis, por efecto directo tóxico o por inducir reacción de hipersensibilidad. Agentes físicos como la radioterapia en pacientes oncológicos, el golpe de calor y la hipotermia pueden ser causa de miocarditis. Una otra causa de miocarditis son enfermedades sistémicas y autoinmunes como la enfermedad celíaca, el lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, enfermedad mixta del tejido conectivo entre otras [95, 96].

### 2.2.2 Aspectos Clínicos

La miocarditis es una enfermedad inflamatoria del corazón y una de las principales causas de miocardiopatía dilatada, que a su vez es uno de los motivos más frecuentes de trasplante cardiaco.

#### 2.2.2.1 Diagnóstico clínico

El diagnóstico de la miocarditis no es fácil debido a la presencia de sintomatología similar a muchas otras enfermedades, siendo muy importante la historia clínica del paciente (consumo de alcohol y cocaína, medicamentos, hábitos nutricionales, estancias en zonas endémicas para infecciones, relación con animales, entre otras) [97]. Algunos de los síntomas frecuentes, pero no específicos, en casos de miocarditis son: disnea, dolor torácico o palpitaciones en los días siguientes a un episodio febril. La presentación clínica de la miocarditis es muy amplia y con poca especificidad de síntomas, habiendo incluso pacientes asintomáticos con anomalías electrocardiográficas y elevación de enzimas cardíacas. Los casos asintomáticos pueden no diagnosticarse hasta que la persona no presente una insuficiencia cardíaca, produciéndose daños permanentes e irreversibles en el músculo cardíaco [90, 98].

De entre las técnicas de diagnóstico de la miocarditis podemos encontrar: la biopsia endomiocárdica, los análisis de biomarcadores cardíacos, las imágenes de medicina Nuclear (galio 67 e indio 111), el electrocardiograma, la ecocardiografía y la resonancia Magnética cardíaca o cardioresonancia (CRM), presentando las cuatro últimas la ventaja de ser técnicas no invasivas.

La biopsia endomiocárdica es una técnica de diagnóstico invasiva para la miocarditis, basada en los criterios anatomopatológicos de Dallas, pudiendo darse algunos falsos negativos [97, 99]. Los criterios de Dallas se basan en la presencia de infiltración linfocitaria y necrosis de miocitos y con las nuevas técnicas inmunohistológicas y moleculares, se ha logrado mejorar la sensibilidad de su diagnóstico [99].

En los análisis de biomarcadores cardíacos en suero, se observan biomarcadores como la creatina kinasa (CK) y troponina I y T. Aunque algunos

marcadores carezcan de especificidad, pueden ayudar en el diagnóstico y en el caso de la troponina T, puede ser un buen marcador de pronóstico [91, 99].

Las imágenes de Medicina Nuclear se basan en la una inyección de un compuesto radioactivo, galio 67 e indio 111, y la posterior obtención de imágenes. La captación cardíaca por el radioisótopo galio 67 nos indica el grado de inflamación miocárdica reflejando la extensión de la necrosis en los miocitos. En el caso del radioisótopo indio 111, este nos indica la pérdida de integridad de los miocitos en sus membranas y sarcolema, exponiendo su miosina intracelular al espacio extracelular [91, 97, 99]. Debido a su disponibilidad limitada y el riesgo de exposición a la radiación, las técnicas nucleares no se recomiendan de forma rutinaria.

El electrocardiograma puede mostrar signos como la presencia de alteraciones del ST-T que se pueden confundir con una pericarditis, un infarto de miocardio, ectopías auricular y/o ventricular o trastornos de conducción auriculo-ventricular y/o ventricular [91, 99, 100].

La ecocardiografía permite ver el movimiento de la pared del corazón y su tamaño general. La cardioresonancia presenta la ventaja sobre la ecocardiografía de tener una excelente resolución anatómica y tisular y aporta la información completa de la afectación miocárdica (función ventricular, edema/inflamación y áreas de fibrosis miocárdica), presentando así características especiales para ser la técnica de imagen de elección [90, 91, 99, 100].

### ***2.2.2.2 Mecanismos Fisiopatológicos***

Diversas enfermedades autoinmunes han sido asociadas a una respuesta inmune tipo Th1 y el daño tisular puede estar mediado por una respuesta de tipo Th2. Recientemente se ha propuesto que en la miocarditis son las células Th17 las que colaboran con las células B para producir antígenos cardíacos [101-103].

Hallazgos histopatológicos han demostrado la presencia de infiltrados de eosinófilos, de macrófagos y de células gigantes, en las lesiones de miocarditis [91, 93]. Los eosinófilos asociados a respuestas Th2, están asociados a la producción de citoquinas como la IL-4, IL-5, IL-10, IgG1 e IgE, y a su vez la IL-4 induce la formación de células multinucleadas gigantes; mientras que las lesiones granulomatosas rodeadas

por linfocitos T, está asociada a monocitos/macrófagos que derivan de las células multinucleadas. Además, también se ha observado que las citoquinas Th1, TNF- $\alpha$  o IL-12, tienen un papel crucial en el desarrollo de la miocarditis [94].

Durante la fase aguda de la enfermedad, el patrón histopatológico se caracteriza por infiltración intersticial de células inflamatorias y expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), con la consiguiente necrosis de miocitos y desorganización de su citoesqueleto. Se ha observado un desequilibrio entre citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF- $\alpha$ , la IL-1, IL-12, IL-4, y anti-inflamatorias, como la IL-10, el INF- $\gamma$ , así como un aumento de expresión de moléculas de adhesión, como el ICAM1, VCAM1 y CD29, existiendo una íntima relación entre la severidad del cuadro clínico y los niveles humorales de las mismas [104, 105].

Con el progreso de la inflamación, la miocarditis pasa de aguda a subaguda o crónica donde hay deposición progresiva y difusa, en todo el miocardio, de tejido conectivo intersticial. Las células inflamatorias, incluyendo linfocitos y macrófagos no solo liberan citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, sino que también interactúan directamente con los fibroblastos durante la fase de inmuno-inflamatoria de la enfermedad. El aumento de citoquinas inflamatorias va a alterar el metabolismo de la matriz extracelular, aumentando su degradación a través de las metaloproteinasas y favoreciendo el remodelado. Las citoquinas o factores de crecimiento funcionan de manera coordinada para producir un microambiente de fibrosis, que conduce al desarrollo de una población profibrótica de fibroblastos [101, 106].

Unos de los componentes celulares mayoritarios en el corazón y fundamentales para la reparación del tejido dañado son los cardiofibroblastos. Estos juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural y de la función cardíaca normal [107, 108]. La característica de los cardiofibroblastos de ser del “tipo celular del músculo liso” está asociada al aumento de producción de la matriz extracelular que puede llevar al fallo cardíaco. La diferenciación de cardiofibroblastos a miofibroblastos está asociada con enfermedades cardíacas crónicas. Esta transformación está controlada por una gran variedad de estímulos, como factores de crecimiento y citoquinas, por la vasodilatación, y por estímulos mecánicos [106, 109].

Hallados de algunas autopsias, la inflamación continúa además de la fibrosis cardíaca puede dar lugar a la aparición de depósitos de calcio en el tejido cardíaco. La

calcificación distrófica del miocardio es una señal del daño celular y tisular. La acumulación de calcio puede convertir un potencial daño reversible a uno irreversible [93, 110].

### **2.2.2.3 Tratamiento**

El tratamiento de la miocarditis representa un gran desafío, principalmente debido a la complejidad clínica, fisiopatológica y diagnóstica que caracteriza esta patología, y puede clasificarse en sintomático y específico. El tratamiento sintomático es básicamente de soporte y se aplica en pacientes que cursan con insuficiencia cardíaca en cualquiera de sus grados [111, 112].

Recientemente, en la última actualización de la sociedad española de cardiología (SEC), se ha acordado que el tratamiento inicial debe de ser de la insuficiencia cardíaca, que incluye el tratamiento con moduladores de la angiotensina, betabloqueantes y diuréticos.

El tratamiento específico, estandarizado, es muy discutido y no está bien definido. El tratamiento específico es aplicado tras conocer el resultado de la biopsia endomiocárdica. Están incluidos tratamientos con anti-citoquinas, inmunosupresores, inmunoadsorción, administración intravenosa de inmunoglobulina (IVIG) y tratamientos antivirales cuando se identifica un agente infeccioso [99, 113]. En casos extremos se puede recurrir al trasplante cardíaco.

En cuanto al tratamiento con anti-citoquinas, existen inhibidores del TNF- $\alpha$  que actúan en la disminución de las metaloproteinasas disminuyendo por consiguiente el remodelado y la insuficiencia cardíaca, además de contrarrestar su acción pro-inflamatoria y depresora de la contractibilidad [104, 114-116].

El tratamiento inmunosupresor está relacionado con las consecuencias a largo plazo que puede producir la miocarditis a nivel de la inmunidad celular y humoral. Algunos autores consideran que la terapéutica inmunodepresora con corticosteroides mejora los resultados cuando el proceso es agudo [116]. No obstante, se han presentado resultados controvertidos, ya que se han publicado efectos tanto beneficiosos como nocivos [97]. El tratamiento con inmunosupresores ha demostrado eficacia y se recomienda en patologías específicas como la miocarditis por células



gigantes y la sarcoidosis cardiaca, y en miocarditis asociadas a enfermedades autoinmunes [116].

La presencia de auto-anticuerpos cardíacos circulantes demuestra un proceso humoral en la enfermedad. Estos perpetúan el proceso inflamatorio intramiocárdico provocando el remodelado intersticial y el déficit contráctil. Por este motivo, la inmunoadsorción puede tener un papel importante en la evolución de la miocardiopatía inflamatoria, pues a través de eféresis selectiva se van a eliminar inmunoglobulinas humanas de forma extracorpórea a través de adsorbentes específicos [117].

La terapia con IVIG ejerce un efecto anti-inflamatorio, modulando la síntesis de citoquinas y proteínas del complemento, así como la expresión intracelular de moléculas de adhesión y de antígenos del HLA. Sin embargo, una situación de hipergammaglobulinemia saturaría los receptores FcRn, con lo que aumentaría el número de inmunoglobulinas plasmáticas no “protegidas” y, por lo tanto, degradables [99, 117].

El tratamiento antiviral es independiente del tipo de virus y resulta en un bloqueo intracelular del ciclo de replicación viral. Esta acción ocurre en la célula infectada y las vecinas no comprometidas. Así, este tratamiento puede ser efectivo en las miocardiopatías virales. Los IFN juegan un papel fundamental en la defensa natural contra la infección viral, con lo que la disminución de su producción aumenta la severidad de la infección y el tratamiento con el mismo protege contra la infección viral [99, 118].

### 2.2.3 Modelos animales

Con el objetivo de estudiar a fondo los mecanismos de la miocarditis y sus posibles tratamientos, se han desarrollado diversos modelos animales, fundamentalmente en ratones. Los avances en el conocimiento de la fisiopatología de la miocarditis resultan mayoritariamente de modelos animales.

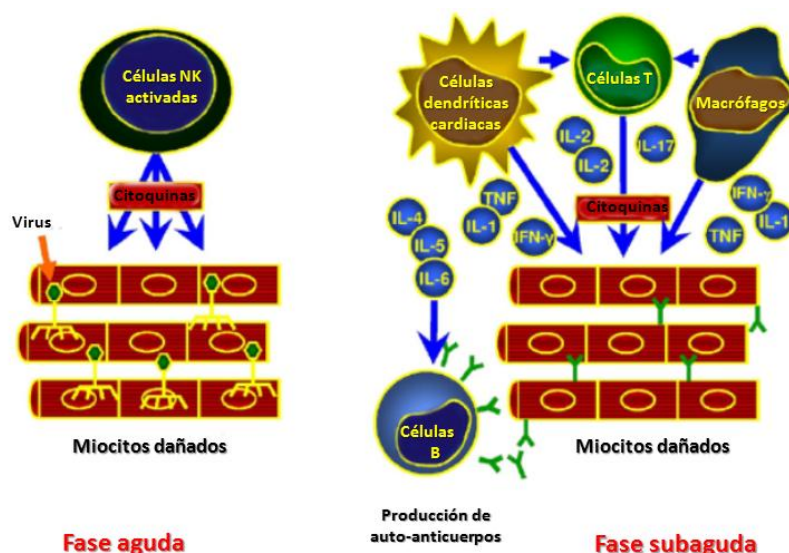
La miocarditis autoinmune experimental (del inglés *experimental autoimmune myocarditis*, EAM) puede ser inducida en algunas cepas de ratones mediante la

utilización del virus CVB3 y CMV o a través de la inmunización con auto-péptidos derivados de la cadena pesada de la  $\alpha$ -miosina cardíaca (MyHC- $\alpha$ ) [119-124].

Estudios anteriores han comprobado que la cadena  $\beta$ -miosina es un pobre inductor de inflamación cardíaca comparado con la isoforma  $\alpha$ -miosina. *Pummerer et al* ha descrito tres tipos de péptidos de la cadena pesada de  $\alpha$ -miosina cardíaca capaces de inducir la EAM, pero solo uno de ellos con una secuencia acetilada de aminoácidos de 614-643 de la región S2 de la miosina cardíaca, ha mostrado un *cluster* de diferenciación en el modelo animal BALB/c induciendo miocarditis con lesiones inflamatorias ventriculares severas [119, 123]. Una de las grandes ventajas de la inducción de la EAM por inmunización con miosina cardíaca o con su péptido es que nos proporciona un modelo animal libre de virus, que estimula la segunda fase de la enfermedad viral [94, 119].

La miosina cardíaca funciona como un autoantígeno en la patogénesis de la EAM. La miocarditis puede ser inducida en modelos animales de ratón de las cepas SJL/J, A/J, BALB/c y en ratas Lewis [94, 103, 125].

El curso de la enfermedad la miocarditis viral se caracteriza por tres fases. Según *Kindermemmann et al* estas tres fases son: fase aguda, fase subaguda y fase crónica [100]. La miocarditis es un continuo de los tres diferentes procesos de enfermedad, con periodos transicionales indistintos. La inmunización del animal por la entrada del virus conduce a la necrosis de los miocitos y la exposición de antígenos extracelulares activa al sistema inmune que se caracteriza por la infiltración de células *Natural killer*, macrófagos y linfocitos T. La fase aguda de la miocarditis tarda sólo unos días. Después de la fase aguda, la segunda fase se caracteriza por reacciones autoinmunes (Figura 8). Esta fase subaguda, tiene la duración de unas semanas a varios meses, y el daño es mediado por células T autorreactivas y citoquinas de la familia Th1. La liberación/activación de citoquinas como factor de necrosis tumoral alfa, IL-1 y IL-6, y activación de anticuerpos contra proteínas cardíacas puede llevar al daño cardíaco. El mecanismo final de daño miocárdico agudo y crónico está dado por espasmo coronario microvascular, lo cual produce necrosis, fibrosis y calcificación del miocito, esto es el remodelado cardíaco, y la consecuente cardiomiopatía dilatada [100, 124, 126].



**Figura 8 – Patofisiología de miocarditis viral.** Tras la entrada del virus, la replicación del virus conduce a la necrosis de los miocitos y activa al sistema inmune que se caracteriza por la infiltración de células *Natural killer*, macrófagos y linfocitos T. Adaptado de *Kindermemann et al* [100].

### 3. Hipersensibilidad alérgica

Las enfermedades alérgicas tienen su origen en una respuesta excesiva y alterada del sistema inmune ante determinados estímulos externos, por general inoocuos, llamados alérgenos. En las últimas décadas, la prevalencia de las enfermedades alérgicas ha aumentado considerablemente en los países desarrollados. La conjuntivitis alérgica es la enfermedad ocular más común [127, 128].

La alergia ocular representa una de las patologías más comunes en la práctica clínica diaria y este término incluye un amplio grupo de patologías en las que están involucrados diferentes mecanismos inmunológicos.

### 3.1 Conjuntivitis alérgica

La conjuntivitis alérgica es una patología ocular producida por la inflamación alérgica de la superficie ocular. Puede presentarse como una entidad aislada aunque con frecuencia se asocia a la rinitis alérgica. Engloba a varias entidades clínicas que tienen diferentes mecanismos patogénicos, criterios de diagnóstico de hipersensibilidad y tratamiento.

#### 3.1.1 Diagnóstico clínico

La primera manifestación subjetiva de conjuntivitis a tenerse en cuenta es la ausencia de confort en los ojos, pero casi siempre aparece desde el comienzo una sensación de calor o de picazón que lleva al frotar de los ojos.

Los signos fundamentales de la conjuntivitis son cuatro: la hiperemia, el edema, la hipersecreción y las alteraciones morfológicas tisulares (papilas, folículos).

La hiperemia de los vasos conjuntivales está presente en todas las formas de conjuntivitis, pero con intensidad variable. Sin embargo, la presencia de hiperemia, por sí sola, no demuestra la existencia de conjuntivitis.

El edema o quemosis, se define como la tumefacción de la conjuntiva y se caracteriza por hinchazón y engrosamiento de la conjuntiva. Se produce en la conjuntiva bulbar, siendo en el tejido subconjuntivo laxo que se acumula el transudado procedente de un aumento de la permeabilidad vascular.

La hipersecreción es muy característica y puede ser muy variable tanto en su aspecto (acuoso, seroso, hemorrágico y mucoso) como en su cantidad. Es producida a través del exudado del epitelio y del acumulo de restos y detritos epiteliales, mucus, lagrimas, linfocitos degenerados y la secreción de las diversas glándulas conjuntivales.

Las alteraciones morfológicas pueden observarse en los folículos (hiperplasia epitelial del tejido linfoide) y en las papilas (hiperplasia del epitelio conjuntival) [129, 130].

### 3.1.2 Clasificación

De acuerdo con la Sociedad Internacional de Inflamación ocular (IOIS), la clasificación de las alergias oculares propuesta en 2006, está basada en los mecanismos inmunopatológicos de alergias mediadas por IgE y no mediadas por IgE (Tabla 2). La conjuntivitis alérgica (CA) es un tipo de alergia ocular que a su vez puede ser subdividida en la conjuntivitis alérgica estacional (CAES) y la conjuntivitis alérgica perenne (CAP) [128]. Esta clasificación incluye también otras condiciones como queratoconjuntivitis atópica (KCA), queratoconjuntivitis vernal (KCV), conjuntivitis papilar gigante (CPG) y el contacto dermatconjuntivitis (CDC) - con diferentes manifestaciones, diferentes cursos clínicos, diferentes características inmunopatológicas y respuestas variables al tratamiento [128, 131-133].

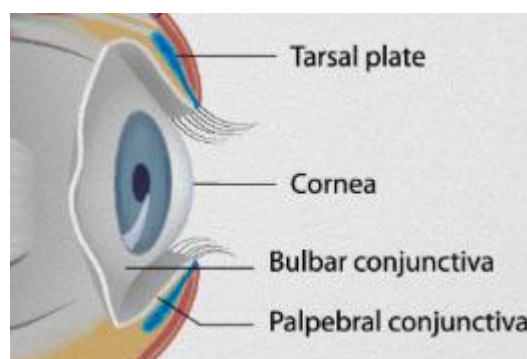
Sin embargo, en 2012 con objeto de relacionar la fisiopatología y la evolución clínica se propuso una nueva clasificación, en la que según la duración en el tiempo de los síntomas las dividen en perennes o intermitentes/estacional y según la intensidad de los mecanismos en: leves, moderadas y graves [127].

	CAES	CAP	KCV	KCA	CPG	CDC
Presentación	Intermitente	Perenne	Intermitente ± exacerbaciones Perenes	Crónico	Perenne	Crónico ± exacerbaciones Intermitentes
Mecanismo alérgico	Mediada por IgE	Mediada por IgE	Mediada por IgE y no mediada por Ig-E	Mediada por IgE y no mediada por IgE	No alérgica	No mediada por IgE

**Tabla 2 - Características clínicas de los principales síndromes de alergia ocular, incluyendo presentación oftalmológica y mecanismo.** Adaptado de *Lionardi et al* [127].

#### Conjuntivitis alérgica estacional e perenne

La conjuntivitis alérgica es una enfermedad crónica, bilateral caracterizada por una inflamación de la conjuntiva tarsal (papilas) y bulbar (Figura 9), que se caracteriza por sus recurrencias [127, 129, 130].



**Figura 9 – La conjuntiva: la conjuntiva tarsal, La conjuntiva bulbar y la conjuntiva palpebral.** [http://www.zazzle.es/poster de la anatomia de la conjuntiva del ojo-228607823011396044](http://www.zazzle.es/poster-de-la-anatomia-de-la-conjuntiva-del-ojo-228607823011396044)

Las formas CAES y CAP son las formas más comunes. El inicio de la enfermedad suele ser brusco, bilateral, con gran sintomatología: picor, escozor, sensación de cuerpo extraño, fotofobia, lagrimeo y rinorrea [134-136]. A la exploración se observa edema conjuntival y palpebral, abundante secreción de origen seroso, folículos, hiperemia conjuntival y dermatitis en casos de que el origen sea por contacto [129, 130, 133, 137]. En las exploraciones citológicas aparecen numerosos eosinófilos y finos granos eosinófilos.

La CAES se caracteriza por sus recurrencias estacionales, primavera y otoño asociada muchas veces con rinitis alérgica. Sin embargo, la CAP se puede dar todo el año siempre que expuesta al alérgeno, como es el caso con la caspa animal, ácaros heces, y otros antígenos persistentes, a la que el paciente puede sufrir episodios agudos individuales o crónicos es decir, los signos y síntomas permanecen cuando se expone a diario embates de alérgeno [128, 129, 133-135, 137].

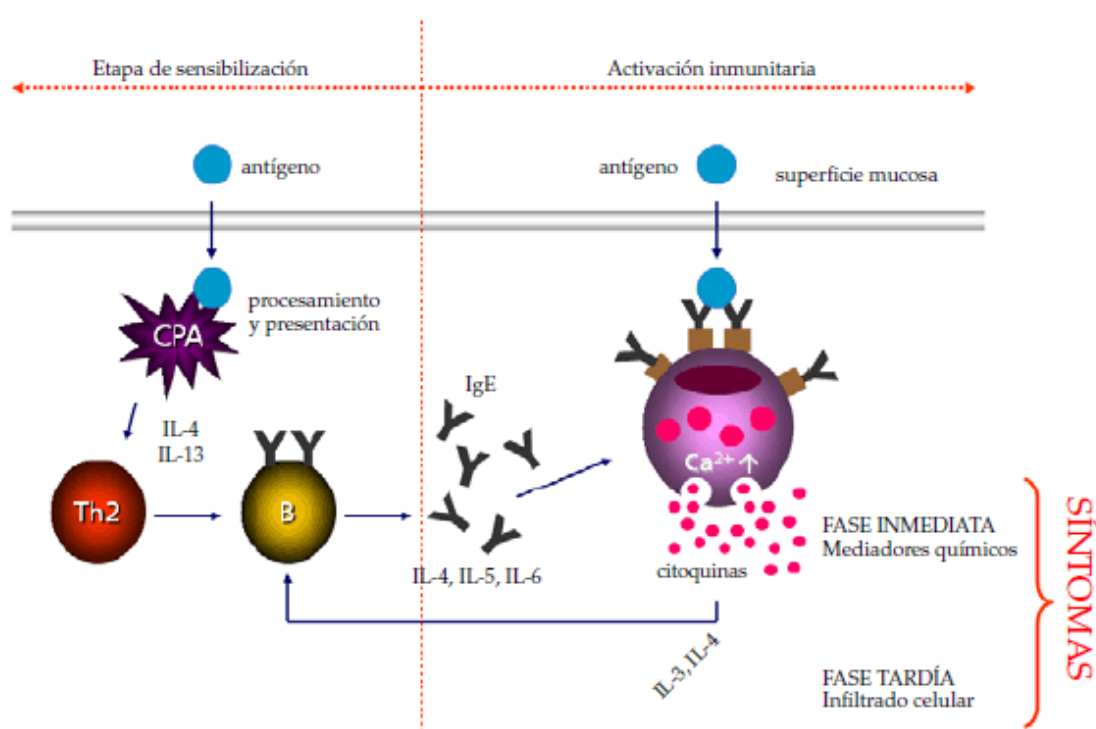
### **3.1.3 Fisiopatología de la conjuntivitis**

La conjuntivitis alérgica es un proceso inflamatorio ocular bilateral y limitante. Como en cualquier otro tejido del organismo, el agente causal de la inflamación va a producir vasodilatación de la conjuntiva que conlleva a un daño endotelial, originando un aumento de su permeabilidad. Estas alteraciones permiten el paso de las células inflamatorias y fluidos, originándose un edema que puede manifestarse clínicamente

de diversas formas; desde una simple disminución de la transparencia del tejido, muy difícil de valorar, hasta la formación de una hernia de la conjuntiva en la hendidura palpebral [129].

La alergia ocular tiene lugar en dos fases (Figura 10):

1. Fase de sensibilización alérgica conjuntival y desarrollo de memoria celular
2. Fase de respuesta efectora que se divide en:
  - a. Fase de respuesta alérgica conjuntival inmediata o precoz
  - b. Fase de respuesta alérgica conjuntival tardía.



**Figura 10 – Origen y formación de la reacción alérgica.** Fase de sensibilización: primera exposición. Fase de respuesta efectora: segunda exposición. Adaptado de Guía de Práctica Clínica: Alergia a picadura de himenópteros en pediatría 2010 [138].

En la fase de sensibilización, el alérgeno entra en contacto con la superficie de las mucosas donde es capturado y procesado por parte de las células presentadoras de antígeno, principalmente las células dendríticas (CDs) de la conjuntiva. Las células dendríticas presentan los péptidos derivados del alérgeno en contexto del complejo de histocompatibilidad clase II a los linfocitos T *helper* CD4+, (Th0), que expresan los

receptores de células T (TRC) específicos, activando y llevando a la diferenciación de los linfocitos efectores. Dependiendo de la capacidad de las citoquinas presentes en el micro-entorno, las células Th0 se pueden diferenciar en Th1, Th2 y Th17. En el caso de las reacciones alérgicas están implicados los linfocitos Th2. La población de linfocitos Th2 se expande y segregan factores como la IL-4, que favorecen la producción por parte de células B de inmunoglobulinas IgE específicas.

La fase efectora induce a una respuesta inmediata de la conjuntivitis alérgica (20-30 minutos de la entrada del alérgeno). Tiene lugar una vez que el individuo, previamente sensibilizado, contacta de nuevo con el alérgeno, el cual se une a los complejos IgE-FcεRI presentes en la superficie de las células efectoras (mastocitos y basófilos). Esto da lugar a la degranulación de las células y a la liberación de mediadores biológicamente activos como la histamina, leucotrienos y citoquinas, entre otros, que favorecen la vasodilatación, la permeabilidad microvascular, la quimiotaxis y la activación de neutrófilos, eosinófilos y otras células inflamatorias que serán las responsables de la respuesta alérgica tardía.

La fase efectora de respuesta tardía (4-10 horas del primer contacto con el alérgeno), se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias como mastocitos, basófilos, eosinófilos y células Th2 específicas en la conjuntiva, dando lugar a una inflamación local. Este reclutamiento a los sitios de entrada del alérgeno, se debe a la liberación de quimiocinas durante la fase precoz. Además, las células Th2 activadas liberan mediadores que producen un aumento tisular de eosinófilos. Los eosinófilos liberan un gran número de mediadores pro-inflamatorios, incluyendo proteínas básicas (proteína catiónica, peroxidasa eosinófila, proteína básica mayor y neurotoxina derivada del eosinófilos), citoquinas (IL-3, IL-5, IL-13), mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos) y óxido nítrico.

### 3.1.4 Tratamiento

El manejo de la alergia ocular incluye evitar los alérgenos, el tratamiento farmacológico, la inmunoterapia y la educación del paciente.



El tratamiento farmacológico basase en la evitación del antígeno ofensor y el uso de solución salina o lágrimas artificiales para diluir y eliminar los alérgenos físicamente. Los medicamentos disponibles pertenecen a diferentes familias farmacológicas: los vasoconstrictores tópicos; los antihistamínicos; los estabilizadores de los mastocitos con acción antihistamínica, llamados agentes con acción dual (*dualacting*); los anti-inflamatorios no esteroideos y los corticosteroides [128, 133].

Los vasoconstrictores tópicos son agonistas alfa-adrenérgicos aprobados para uso tópico en el alivio del enrojecimiento conjuntival, pero tienen poca eficacia en otros síntomas [127]. La administración prolongada de estos fármacos puede causar hiperemia de rebote, conjuntivitis folicular, blefaroconjuntivitis eczematosa y conjuntivitis inducida por fármacos [128].

Los antihistamínicos bloquean los síntomas producidos por la liberación de histamina, como resultado de la interacción con los receptores H1 presentes en las terminaciones nerviosas (reduciendo sensación de picor) y situados en los vasos sanguíneos (reducción de edema y vasodilatación), aunque algunas de estas sustancias también tienen propiedades anti-inflamatorias, con la inhibición de la expresión de ICAM-1, o efectos sobre el PAF, entre otras acciones. Los antihistamínicos más usados son el antazolina y el feniramina [128, 133, 137]. Su tratamiento a largo plazo no es adecuado pues presentan efectos adversos como la hiperemia de rebote [128].

Los estabilizadores de los mastocitos inhiben la degranulación mediante la interrupción de la cadena normal de señales intracelulares que resulta de la activación del receptor de IgE, lo que conlleva a la inhibición de mediadores inflamatorios [127, 133]. Los estabilizadores de los mastocitos son: cromoglicato de sodio (SCG), lodoxamida y NAAGA (Ácido glutámico N-acetil-aspartil) [128, 137].

Como estabilizadores de los mastocitos con acción antihistamínica (*dualacting*); están: azelastina, epinastina, ketotifeno y olopatadina [127, 128, 137]. Tienen la ventaja de proporcionar un alivio rápido de los síntomas (por su efecto antihistamínico), junto con el beneficio a largo plazo de la estabilización de los mastocitos [127, 128].

El ketorolac, utilizado como fármaco anti-inflamatorio no esteroide bloquea la vía de la ciclooxigenasa; reduciendo la síntesis de prostaglandinas y tromboxano. Han sido reportadas crisis asmáticas en el tratamiento con este fármaco [133, 137].

Los corticosteroides son utilizados en el tratamiento más severo de la conjuntivitis alérgica. Pueden modular la respuesta de los mastocitos mediante la inhibición de la producción de citoquinas y el reclutamiento y activación de células inflamatorias [127, 128, 133, 137]. La fluorometolona tópica, medrisona, loteprednol, rimexolona y gotas para los ojos, son la primera opción en la inflamación moderada. Para la inflamación alérgica grave: prednisolona, dexametasona, betametasona, optando por la dosis más baja y durante el menor tiempo [127, 128]. Los esteroides tópicos están asociados a la formación de cataratas y pueden causar un aumento en la presión ocular conduciendo al glaucoma [133].

### 3.1.5 Modelo animal

Igual que en la conjuntivitis alérgica, el modelo animal representa un complejo trastorno del sistema inmune que implica la activación de macrófagos y la presentación del alérgeno, activación de células T y producción de IgE por las células B.

Ratner (citado por Duke-Elder en 1965) en 1927, demostró por primera vez que cobayas, previamente sensibilizados con ciertos componentes de polvo tras una segunda exposición a ese antígeno desarrollaron conjuntivitis aguda [136]. El modelo murino nunca se utilizó hasta 1996. Los ratones ofrecen la ventaja de tener un sistema inmune similar a la de los seres humanos e haber una amplia gama de reactivos inmunológicos disponibles comercialmente para su sistema inmunológico [136, 139].

En general, estos modelos consisten en una primera sensibilización con el antígeno (inmunización o "preparación"), seguida de una segunda dosis del mismo antígeno (dosis "desafiante") algunos días más tarde (por lo general 7-15), iniciando una respuesta inflamatoria. Esta respuesta inflamatoria es rápida y presenta los signos clínicos característicos de la alergia ocular en humanos: edema e hiperemia de ambos párpados y conjuntiva [136].

En 1998, Teresa Magote desarrolló un nuevo modelo experimental animal con signos clínicos, celulares y humorales de la conjuntivitis alérgica, inducidos por una única inmunización y una única exposición al antígeno en el ojo. Este modelo se caracteriza por la presencia de quemosis, hiperemia, edema palpebral, y continuando

picor de los párpados, que comienza inmediatamente después de la exposición al alérgeno tópico. Histológicamente, esta reacción es acompañada de una infiltración celular: neutrófilos, macrófagos y eosinófilos. La infiltración eosinófila se alcanza su punto máximo a las 48 horas después de la exposición tópica al polen. Se observa también degranulación de mastocitos regulada por la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 [140].

## 4. Triterpenos

Los terpenos constituyen el grupo más simple de lípidos insaponificables, formados por dos, cuatro, seis o más unidades de isopreno, formando cadenas lineales o cíclicas y algunos de ellos contienen estructuras de ambos tipos. Debido a su naturaleza hidrocarbonada son sustancias hidrofóbicas y por lo tanto insolubles en agua. Según el número de isoprenos se clasifican en:

- Monoterpenos que contienen 2 moléculas de isopreno,
- Diterpenos con 4 moléculas de isopreno,
- Triterpenos con 6 moléculas de isopreno,
- Tetraterpenos que contienen 8 moléculas de isopreno
- Politerpenos con muchas moléculas de isoprenos.

Los triterpenos son compuestos naturales que se encuentran ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal. Su estructura consta de 30 átomos de carbono provenientes de la condensación “cabeza-cola” de seis unidades de isopreno. Se distinguen cuatro clases de triterpenos: de cadena abierta, tricíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos. Basándose en sus esqueletos de carbono, además pueden clasificarse en:

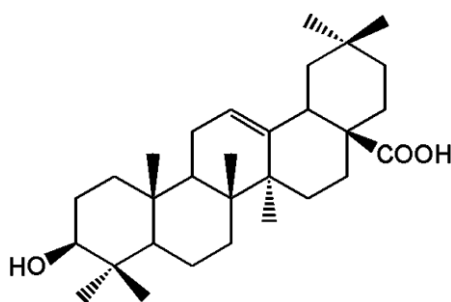
-Tetracíclicos: Lanostanos, dammaranos, cicloartanos o eufanos, entre otros.

-Pentacíclicos: Ursanos (ácido ursólico, uvaol), Oleananos (ácido oleanólico, ácido maslínico, eritrodíol) o Lupanos (lupeol, betulin, ácido betulínico), entre otros [141, 142].

### 4.1 El ácido oleanólico

El ácido oleanólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-oico) es un compuesto biológicamente activo aislado en más de 1620 especies de plantas incluyendo plantas de uso alimenticio y hierbas medicinales. Este compuesto es prevalente en plantas de la familia *Oleaceae*, como el olivo (*Olea europea*) [143, 144].

El ácido oleanólico (AO) es un componente minoritario, pentacíclico cuya estructura consta de 30 átomos de carbono provenientes de la condensación “cabeza-cola” de seis unidades de isopreno (Figura 11).



**Figura 11 – Estructura molecular del Ácido Oleanólico.**

El AO puede obtenerse en grandes concentraciones del subproducto del aceite virgen. Se sabe que en el aceite virgen la concentración de AO es aproximadamente 56mg/kg mientras que en el aceite de orujo podemos encontrar hasta 416mg/kg de AO [143, 145].

En los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre las propiedades y actividades de aceite de oliva y sus triterpenos. Se ha demostrado que el ácido oleanólico presenta varias propiedades como por ejemplo:

**Cardiovasculares** – Es anti-hiperlipidémico, anti-aterogénico, anti-hipertensor y vasodilatador ofreciendo protección miocárdica, disminuyendo así los riesgos de enfermedades cardiovasculares [145-147].

**Anti-cancerígenas** – Posee una gran variedad de actividades anti-carcinogénicas descritas en numerosas líneas celulares tumorales “*in vitro*”: de leucemia humana [148], o de adenocarcinoma de colon humano [149-151]. Inhibe el desarrollo del tumor en distintas etapas incluyendo la tumorigénesis, el progreso tumoral, la angiogénesis y la metástasis [152]. Sus efectos se han observado en el cáncer pancreático, hepático, pulmonar, colón [146, 149, 151, 153], pecho, piel [146] y en astrocitomas [154].

**Anti-inflamatorias** –Se ha demostrado en estudios “*in vivo*” e “*in vitro*”. La inhibición de los procesos inflamatorios, en células endoteliales umbilicales humanas, se lleva a cabo por la inhibición de la expresión del factor nuclear NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y de la expresión del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [146]. Es un potente inhibidor de los procesos inflamatorios, actuando en la inhibición de la ciclooxigenasa-2 (Cox-2), así como de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-6 y IL-1 $\beta$  [146, 147, 155], de la actividad de la fosfolipasa A2 secretada (sPLA2-IIa) [155, 156], inhibición de la liberación de histamina por los mastocitos [157] y de generación del anión superóxido en neutrófilos [158].

**Anti-oxidantes** – Está relacionado con el aumento de los niveles de la glutathion peroxidasa y de la superóxido dismutasa (SOD) [144, 147, 159, 160].

**Hepatoprotectoras** – Protege al hígado de los daños químicos, así como de la fibrosis y de la cirrosis resultado del daño causado por las enfermedades hepáticas [144, 161, 162]. El AO lleva al aumento nuclear de Nrf2, que es la llave transcripcional para la protección del hígado [144]. Hay una disminución de la expresión de los niveles de enzimas lipogénicas como la acetil-CoA carboxilasa y la acetiltransferasa glicerol-3-fosfatasa. La administración del AO aumenta también la expresión de genes relacionados en la proliferación celular y suprime el aumento de la expresión del citocromo P450-hepático [147, 160, 163].

**Otros efectos** - Se han descrito además efectos antiulcerosos en ratas [164, 165]; antimicrobianos e insecticidas [166-168]; en la prevención y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 por la inhibición de la actividad de la enzima que hidroliza los

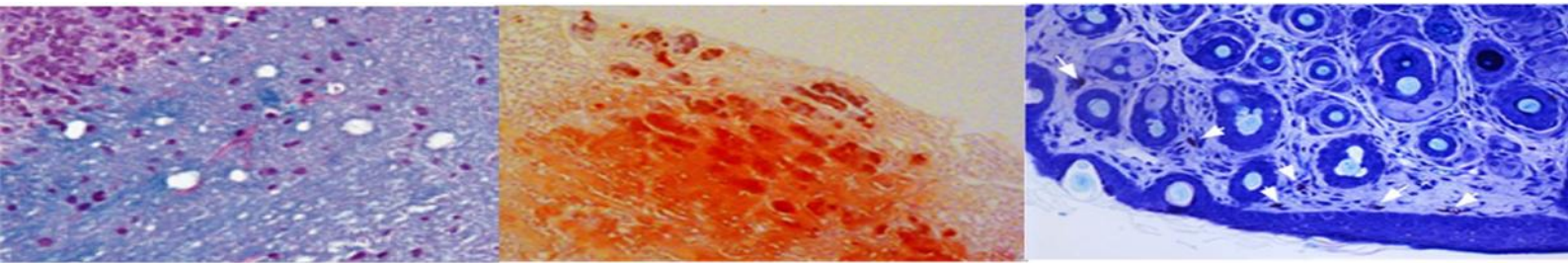
carbohidratos de la dieta ( $\alpha$ -glucosidasa) [169-171]; o actividad moduladora del tránsito intestinal [172].

En algunos países asiáticos como China, Japón y Corea el ácido oleanólico es comercializado como un droga oral para el tratamiento y prevención de algunas enfermedades como hepatitis crónica, desordenes hepáticos, etc [143, 144, 163, 173, 174]. Además, se emplea en el campo de la cosmética e incluso en preparaciones tópicas para prevenir el cáncer de piel [175].

### 4.1.1 Análogos sintéticos del ácido oleanólico

El ácido oleanólico presenta numerosas actividades farmacológicas beneficiosas, para la salud, sin embargo, es relativamente débil, por consiguiente, la modificación química es necesaria para incrementar su actividad biológica sin afectar a su toxicidad.

En los últimos años se han obtenido diversos análogos sintéticos como: el CDDO (ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oico), el CDDO-Me (bardoxolone metil), el CDDO-Im (imidazole), el di-CDDO (nitrilo) el CDDO-MA (metil amida), el CDDO-EA (etil amida) y el CDDO-TFEA (trifluoroetil amida) [143, 176-180]. Estos compuestos sintéticos presentan iguales/semejantes propiedades al compuesto natural, propiedades estas con actividad anti-inflamatoria [176, 177, 181-183], anti-cancerígena [143, 181, 182] y son capaces de inducir a la apoptosis [143, 181-183].



## **II. OBJETIVOS**

### Objetivo General

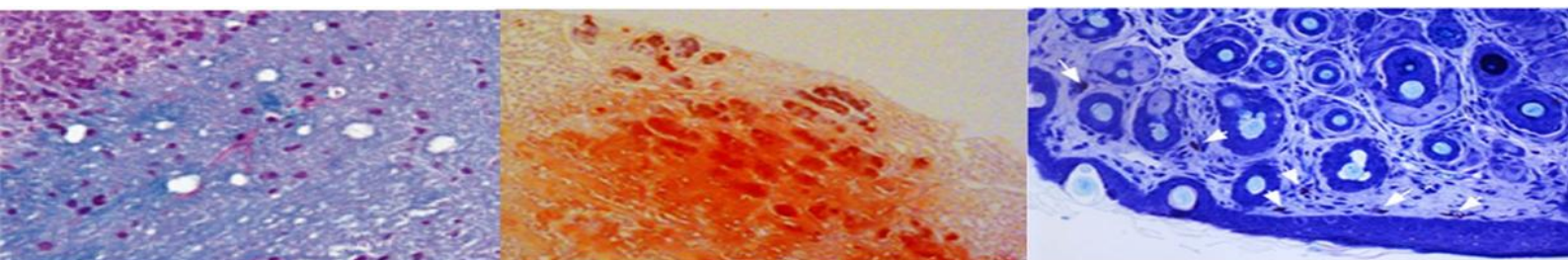
Teniendo en cuenta que el ácido oleanólico es un compuesto natural con características anti-inflamatorias prometedoras, el objetivo general de esta tesis ha sido estudiar el efecto del ácido oleanólico en diferentes modelos animales de enfermedades inflamatorias como: la esclerosis múltiple, la miocarditis y la conjuntivitis alérgica.

### Objetivos específicos:

1. Caracterizar las propiedades neuroprotectoras y anti-oxidantes del ácido oleanólico en un modelo experimental de esclerosis múltiple: la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).
  - a. Evaluación de los síntomas motores y peso corporal.
  - b. Análisis de parámetros microscópicos de inflamación, desmielinización, muerte celular y degeneración neuronal.
  - c. Análisis de la respuesta inflamatoria e inmune.
  - d. Análisis de parámetros de estrés oxidativo.
  - e. Análisis de neurotransmisores.
  
2. Caracterizar las propiedades inmunomoduladoras y cardioprotectoras del ácido oleanólico en un modelo experimental de miocarditis: la miocarditis autoinmune experimental (MAE).
  - a. Evaluación de parámetros funcionales.
  - b. Evaluación de parámetros macroscópicos y microscópicos de inflamación y fibrosis.
  - c. Análisis de la respuesta inflamatoria e inmune.



3. Caracterizar las propiedades anti-alérgicas e inmunomoduladoras del ácido oleanólico en un modelo experimental de conjuntivitis alérgica: la conjuntivitis alérgica experimental (CAE).
  - a. Evaluación de parámetros microscópicos de infiltración celular.
  - b. Análisis de la respuesta inflamatoria e inmune.
  
4. Caracterizar las acciones directas del ácido oleanólico sobre células relevantes en las distintas patologías.



### **III.MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Materiales y reactivos

Al final de cada material y reactivo se detalla entre paréntesis un número que permite identificar la casa comercial de cada uno en un apéndice que aparece al final de este apartado.

### 1.1 Materiales

Agujas estériles-c/luer 0,5X16mm micrilance3 (25G x 5/8") (6)

Agujas estériles-c/luer 1,2X40mm micrilance3 (18GA1½) (6)

Cubreobjetos de 12 mm Ø (18)

Filtros estériles de 0,8 µm (5)

Filtro de 70µm (5)

Filtros estériles de 0,2 µm (27)

Frascos para cultivo de células adherentes y no adherentes (22) (32)

Hojas de bisturí estériles (6)

Imject Alum (35)

Insertos transwell<sup>®</sup> permeables, 8 µm de poro con membrana de policarbonato (10)

Jeringas de vidrio 5 ml (30)

Jeringas estériles-c/luer 1 ml (tuberculina) (5)

Llaves de 3 vías estériles (6)

Pinzas de disección (33)

Pipetas de Pasteur (12)

Pipetas estériles de 5, 10 y 25 ml (32)

Placas de cultivo de 12 pocillos Ø (20)

Placas de cultivo de 96 pocillos Ø (20)

Placas p60 (5)

Poli-L-lisina (35)

Portaobjetos con Polilisina (35)

Portaobjetos sin Polilisina (21)

Puntas de pipeta (23)  
Tissue Tek (OCT) (31)  
Tubos de citómetro (32)  
Tubos de criocongelación (10)  
Tubos de polipropileno de 15 ml (35)  
Tubos Falcon de 50 ml (6)  
Tubos tipo eppendorf (34)

### 1.2 Reactivos generales

2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (34)  
2',7'-dichlorodihydrofluoresceina diacetato (DCFH2-DA) (20)  
4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (34)  
Ácido [N-(2-hidroxietil) piperacina-N'-(2-etanosulfónico)] (HEPES) (34)  
Ácido acético glacial (33)  
Ácido clorhídrico (HCl) (23)  
Ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) (34)  
Ácido fosfomolibdico (34)  
Ácido Oleanólico (OA) (16)  
Ácido tiobarbiturico (TBA) (34)  
Adjuvante completo de Freund (CFA) (34)  
Albúmina de suero bovino deslipidada (BSA) (34)  
Anestésico IMALGÈNE 1000 (24)  
Anestésico ROMPUN 2% (4)  
Anexina-V conjugada con PE (6)  
Angiotensina II (34)  
Bovine Serum Albumin (BSA) (34)  
Carbonato de litio (23)  
Cloramina T (34)  
Cloruro de Potasio (KCl) (23)  
Cloruro sódico (NaCl) (34)  
Colagenasa IA (34)

Dexametasona (34)  
Dihidroetidio (DHE) (20)  
Dimetilsulfóxido (DMSO) (34)  
Eotaxina-1 (11)  
Etanol (32)  
FACSTM Lysing Solutions (5)  
Factor de necrosis tumoral recombinante humano (TNF $\alpha$ ) (28)  
Galectina-3 (27)  
Glicina (34)  
HEPES (18)  
Hidróxido de sodio (NaOH) (17)  
Hidroxitolueno butilado (BHT) (34)  
L-glutamina (34)  
L-Glutamina (8)  
L-Piruvato (18)  
Medio Claycomb (34)  
Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (8)  
Medio de cultivo mínimo esencial de Eagle (EMEM) (8)  
Medio de cultivo RPMI 1640 (8)  
Medio de montaje para fluorescencia EUKITT (34)  
Mycobacterium Tuberculosis H37 Ra (13)  
Parafina (34)  
Paraformaldehído (PFA) (34)  
Penicilina-Estreptomicina (8)  
Permanganato de potasio (34)  
Piruvato (20)  
Sodium dodecyl sulfate (SDS) (17)  
Solución de permeabilización y fijación (15)  
Suero de ternera fetal (STF) (9)  
Tampón de unión a anexina-V (9)  
Toxina pertúsica de Bordetella pertussis (34)  
Tripsina sin EDTA (18)

Tripsina-EDTA (8)

Tritón X-100 (9)

Vitamina D3 (34)

Xilol (23)

$\beta$ -glicerofosfato (34)

### 1.3 Colorantes

Ácido Peryódico (34)

Schiff (PAS) (34)

Azul de Toluidina (34)

Eosina (34)

Hematoxilina de Harris (34)

Luxol fast blue (34)

Rojo de alizarina S (26)

Rojo picrosirio (34)

Violeta de cristal (34)

### 1.4 Anticuerpos

Anti-mouse CD14-APCCy7 (7)

Anti-mouse CD19-PE (7)

Anti-mouse CD3 marcado con PECy5 (7)

Anti-mouse CD3-PECy5 (7)

Anti-mouse CD4 marcado con Pacific Blue (7)

Anti-mouse CD8 marcado con PE (7)

Anti-mouse Foxp3 (15)

Anti-mouse IgG con FITC (34)

Anti-rabbit IgG con FITC (34)

Bloqueante Fc $\gamma$ RII/III con anti-CD16/32 Fc (15)

Gap-43 policlonal anti-rabbit (1)

NG2 policlonal anti-rabbit (23)

## **1.5 Kits comerciales**

Catalasa (3)

ELISA para BNP (15)

ELISA para Eotaxina-1 (15)

ELISA para fosfolipasa secretada A2-II s (PLA2-IIA) (36)

ELISA para Galectina-3 (15)

ELISA para IL-10 (15)

ELISA para IL-13 (15)

ELISA para IL-17 (15)

ELISA para IL-33 (15)

ELISA para IL-35 (15)

ELISA para IL-4 (15)

ELISA para IL-6 (15)

ELISA para MCP-1 (15)

Fluoro Jade C (1)

Glutamato (1)

Peroxido de hidrogeno (3)

Superoxido dismutasa (3)

TUNEL (29)

## **Apéndice de las casas comerciales**

1. AAT Bioquest
2. Abcam
3. Arbor Assay
4. Bayer HealthCare
5. BD Biosciences Pharmingen
6. Beckton Dickinson
7. Biolegend
8. BioWhittaker
9. Calbiochem
10. Corning incorporated costar
11. Data shet
12. Deltalab
13. Difco
14. Duerolab
15. eBiosciences
16. Extrasintesis
17. Fluka BioChemika
18. Gibco
19. IBL
20. Invitrogen
21. Kindler Gmbh
22. Labclinics
23. Merck
24. Merial Laboratorios
25. Millipore Corporation
26. Nunc
27. Pall Corporation
28. Peprotech
29. Promega
30. Ruthe
31. Sakura
32. Sarstedt Internacional
33. Scharlab
34. Sigma-Aldrich
35. Thermo Scientific
36. USCNK life science



## 2. Métodos

### 2.1 Modelos animales experimentales: Estudios *in vivo*

#### ***Los animales***

Los ratones utilizados en los distintos modelos de enfermedades provinieron de los laboratorios del Dr. Charles River (Barcelona). Los ratones se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, en jaulas con lecho de viruta, fueron alimentados con una dieta de piensos especial para animales de laboratorio, con un consumo variable en función al peso y a la edad del animal, agua ad libitum, temperatura constante de 20-24° C y expuestos a un ciclo de luz de 12h/día (8.00 a.m.-8.00 p.m.) (Consejo de Comunidades Europeas, 1986). Los protocolos del estudio fueron aprobados por el comité de Ética de investigación animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, cumpliendo la normativa 86/609/ECC de la comunidad Europea y la legislación que regula la investigación animal (BOE252/34367-91, 2005).

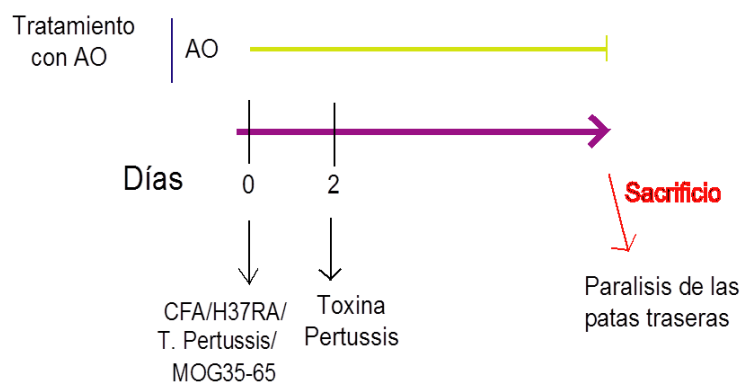
#### **El ácido oleanólico**

El ácido oleanólico administrado (AO) como tratamiento en los diferentes modelos experimentales ha sido sintetizado en los laboratorios de Extrasynthese, Genay Cadex en Francia. El AO se disolvió a una concentración de 25mM en Dimetilsulfóxido (DMSO). Para su administración a los ratones, esta solución se diluyó hasta 10mM en PBS, de manera que la concentración final de DMSO en cada inyección no excediera el 0,2 % w/v. Los ratones se trataron diariamente con una inyección intraperitoneal (i.p). de 0,2 % w/v de DMSO o con 50 mg/kg/día de AO.

### 2.1.1 Modelo de encefalitis autoinmune experimental (EAE)

El modelo de encefalitis autoinmune experimental (EAE) se indujo en ratones hembra del linaje C57Bl/6J de 6-8 semanas siguiendo el protocolo descrito por *Slavin et al* [67-69] que se caracteriza por una parálisis ascendente progresiva crónica. La enfermedad se indujo mediante una inyección bilateral en la base de la cola con un péptido de la mielina de oligodendrocitos de rata (MOG<sub>35-55</sub>) - una mezcla de 200 µl de MOG<sub>35-55</sub> (100µg) emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA) y conteniendo 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*. El péptido MOG<sub>35-55</sub> (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK), fue sintetizado por el laboratorio del Dr. F. Barahona (CBM, Madrid).

Los animales recibieron además dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 300ng de *toxina pertussis*, una administrada en el día de la inmunización y otra a las 48 horas post-inducción (Figura 12). Los animales se examinaron diariamente, para monitorizar la pérdida de peso y la aparición de los síntomas neurológicos.



**Figura 12 – Representación esquemática del tipo del tratamiento en el modelo *in vivo* de EAE y su día de sacrificio.**

#### Tratamiento con AO

Los ratones se trataron diariamente con una inyección i.p. desde el primer día de la inducción hasta el día de sacrificio de los animales (50mg/kg/día).

### Análisis diario de los síntomas

Se realizó diariamente el examen del peso y aparición de los síntomas motores clasificándolos:

- 0** Sin síntomas.
- 0,5** Debilidad o flaqueza de la cola (cola 50% o 2/3).
- 1,0** Parálisis total de la cola (cola 100%).
- 1,5** Paresia (que significa debilidad o flaqueza motora) de patas traseras.
- 2,0** Parálisis moderada parcial 1 o 2 pata(s) traseras (arrastra pata(s) trasera(s)).
- 2,5** Parálisis severa parcial 1 o 2 pata(s) traseras.
- 3,0** Parálisis total de patas traseras.
- 3,5** Parálisis moderada de patas delanteras.
- 4** Parálisis total de patas delanteras.

### Extracción de la sangre, suero y tejido

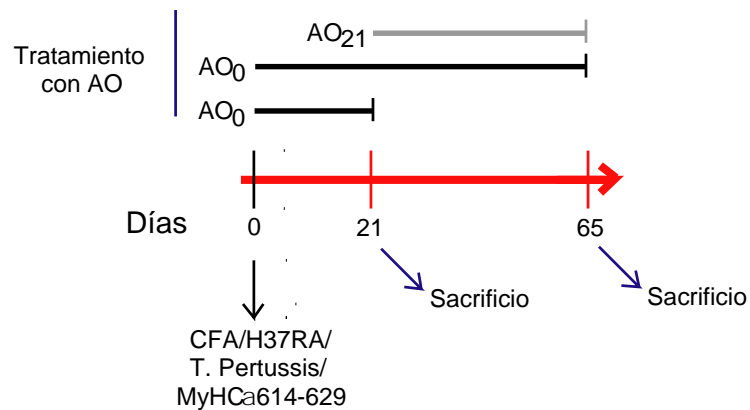
Los animales se anestesiaron con Ketamina (100 mg/kg) y Xilacina (10 mg/kg), y se les abrió la cavidad torácica hasta acceder al corazón. Tras retirar el corazón, con una jeringa se les extrajo la sangre que se encontraba en la cavidad torácica. Se centrifugó la sangre a 3000 r.p.m. durante 10 minutos a 4<sup>0</sup>C y se guardó el suero obtenido a -80<sup>0</sup>C, hasta el momento de su utilización.

Tejidos: se extrajeron cerebelo, médula espinal y nervio óptico. Los tejidos o bien se congelaron a -80<sup>0</sup>C para su posterior uso en los estudios de citoquinas o bien se fijaron para histología. Se extrajo también el bazo para los estudios de células linfoides.

### 2.1.2 Modelo de miocarditis autoinmune experimental (MAE)

La inducción de miocarditis autoinmune experimental (MAE) se realizó mediante un péptido específico acetilado de la cadena pesada  $\alpha$ -miosina (MyHC- $\alpha$ 614-629) del musculo cardiaco de ratón (Ac-SLKLMATLFSTYASAD-OH) (sintetizado por los laboratorios de Immunostep en Salamanca) según *Pummerer et al* [119, 124].

El modelo EAM se indujo en ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad. Los animales recibieron una dosis subcutánea de 200µl por ratón del péptido MyHC- $\alpha_{614-629}$  (100µg) emulsionado en una mezcla de CFA y conteniendo 5mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (1:1). Además, en el día 0 se administró una dosis, i.p., de 500ng/ml de *toxina pertussis* (Figura 13). Los animales fueron pesados en el momento de la inducción y en el día de sacrificio.



**Figura 13 – Representación esquemática del tipo del tratamiento en el modelo *in vivo* de MAE y su día de sacrificio.**

### Tratamiento con AO

La dosis de AO 50mg/kg/día fue administrada mediante inyección diaria i.p.. El diseño experimental se representa en la figura 11.

Se ha diseñado el estudio dividiendo los animales en tres grupos:

- 1) Los ratones se trataron con AO desde la inducción de la MAE, hasta el día 21 post-inducción (fase aguda de la enfermedad).
- 2) Los ratones se trataron con AO desde el día de la inducción hasta el día 65 (fase crónica de la enfermedad).
- 3) Los ratones se trataron con AO desde el día 21 post-inducción (fase aguda) hasta el día 65 (fase crónica).

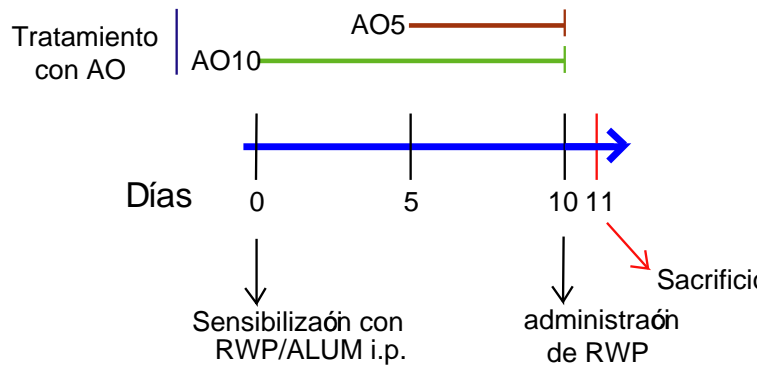
### Extracción de la sangre, suero y tejido cardiaco

Los animales se anestesiaron con Ketamina (100 mg/kg) y Xilacina (10 mg/kg), y se les abrió la cavidad torácica hasta acceder al corazón. Con una inyección de KCl 1M se indujo la parada cardíaca. Se extrajo la sangre y se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos a 4<sup>0</sup>C, obteniendo el suero que se guardó a -80<sup>0</sup>C, hasta el momento de su procesamiento.

Los corazones se lavaron con PBS 1x y se pesaron. El corazón se cortó en 3 partes, desechándose la parte superior con las aurículas, mientras que la intermedia con los ventrículos se fijó para su procesamiento histológico y por último la parte inferior (el ápex) se congeló a -80<sup>0</sup>C para su posterior homogeneización y obtención de las proteínas para los ensayos de citoquinas. Se extrajo también el bazo para el estudio de células linfoides.

### 2.1.3 Modelo de conjuntivitis alérgica experimental (CAE)

El modelo de conjuntivitis alérgica experimental (CAE) se indujo en ratones de 6-8 semanas de edad del linaje BALB/c, de acuerdo con el modelo descrito *por Teresa Magote* en 1998 [140]. Su sensibilización se realizó mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) de 200 µl de la mezcla del polen Ragweed (50 µl) en 0,25 ml de Imject Alum. El polen Ragweed (RWP) utilizado en la inducción de la CAE fue sintetizado en los laboratorios Polyscience en Warrington PA. En el día 10 post-sensibilización, se administró tópicamente, en el ojo del ratón, 1,25mg de polen Ragweed en forma de polvo. Los animales se sacrificaron a las 24h (Figura 14).



**Figura 14 – Representación esquemática del tipo del tratamiento con AO en el modelo *in vivo* de CAE y su día de sacrificio.**

### Tratamiento con AO

El tratamiento con AO se realizó diariamente (Figura 12): con una inyección i.p. (50mg/kg/día). El tratamiento dividió en dos grupos:

- 1- desde el primer día de la sensibilización (AO<sub>10</sub>) hasta el sacrificio;
- 2- en el día 5 post-sensibilización (AO<sub>5</sub>) hasta el sacrificio.

### Extracción de la sangre, suero y tejido oftalmológico

Los animales se anestesiaron con Ketamina (100 mg/kg) y Xilacina (10 mg/kg), y se les abrió la cavidad torácica hasta acceder al corazón. Con la ayuda de una jeringa se extrajo la sangre que se encontraba en la cavidad torácica. Se centrifugó la sangre a 3000 r.p.m. durante 10 minutos a 4<sup>0</sup>C y el suero obtenido se guardó a -80<sup>0</sup>C, hasta el momento de su procesamiento.

Tejido: se extrajo los ojos incluyendo párpados y conjuntiva para posterior análisis histológico. Se les ha extraído también el bazo para el estudio de células linfoides.

### 2.2 Análisis histopatológico

El análisis histopatológico se realizó mediante la utilización de varias tinciones. Los diferentes tejidos estudiados se fijaron en paraformaldeído (PFA) al 4%, a continuación se incluyeron en parafina o en *Tissue Tek* (OCT) y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Antes de la incluir las muestras de tejido en parafina, se procedió a la deshidratación de las mismas, en una serie gradual de alcoholes, eliminando toda el agua y se reemplazó con parafina para de esta manera facilitar el corte de dichos tejidos.

Dependiendo del tipo de inclusión, los cortes se realizaron en el micrótopo de rotación con un espesor de  $3\ \mu\text{m}$  o en el criostato con un espesor de  $16\ \mu\text{m}$ .

Tras las tinciones, los cortes se visualizaron en un microscopio Nikon Eclipse 90i (Nikon Instruments, Inc., Amstelveen, the Netherlands) o en un Olympus B-H (Olympus optical Co. LTD, Tokio, Japan), donde se tomaron fotos con la cámara incorporada (Nikon Instruments Inc).

#### 2.2.1 Histología

Las tinciones histológicas realizadas en este trabajo fueron: Hematoxilina & Eosina, Luxol Fast Blue- Ácido Peryódico de Schiff, Rojo Picrosirios, Alizarin Red S y Azul de Toluidina.

Antes de realizar la tinción, las muestras se desparafinaron mediante xilol y se rehidrató progresivamente el tejido con concentraciones alcohólicas decrecientes. Tras finalizar la tinción, se agregó un líquido de montaje no acuoso (EUKITT<sup>®</sup>) y se cubrió con un cubre-objetos para lograr una preparación permanente.

##### 2.2.1.1 Hematoxilina & Eosina

La tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E) es una tinción dicrómica utilizada con más frecuencia en el diagnóstico histopatológico. El método supone la aplicación

de la tinción de hematoxilina, que por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos Azul y Púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; mientras que la eosina que tiñe los componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma. Las muestras previamente desparafinadas e hidratadas se lavaron en agua destilada y se incubaron durante 6 minutos en Hematoxilina de Harris a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron en agua (+/- 5 minutos) y se incubaron en eosina durante 45 segundos. Después de lavar con agua (+/- 7 minutos), se deshidrataron por pasos sucesivos en alcohol en concentraciones crecientes, terminado la tinción con la sumersión de los portas en el xilol durante 10 minutos.

### **2.2.1.2 Luxol Fast Blue – Ácido Peryódico de Schiff (LFB-PAS)**

La tinción de Luxol Fast Blue de *Klüver Barrer* presenta gran afinidad por los fosfolípidos de la vaina de mielina del SNC.

La tinción de PAS evidencia la presencia de grupos aldehído formados por oxidación previa de los hidratos de carbono. El ácido periódico rompe la unión entre carbonos con hidroxilos (-OH) adyacentes, y forma grupo aldehídos (-CHO) para dar un color rojo púrpura intenso y poniendo en evidencia las células nerviosas, células gliales y detalles citoplasmáticos.

Para la realización de la técnica histológica Luxol Fast Blue – Ácido Peryódico de Schiff (LFB-PAS) [184], las muestras previamente desparafinadas e hidratadas se incubaron en solución de azul de luxol durante toda la noche a temperatura ambiente. Tras un lavado rápido en alcohol a 95%, seguido de un lavado en agua destilada, las muestras, se incubaron con solución de carbonato de litio 0,05%, durante 30 segundos. Se terminó la diferenciación en alcohol a 70% y se lavaron las muestras en agua destilada. A continuación las muestras se incubaron en el reactivo de Schiff's durante 15 minutos a 37<sup>0</sup>C y tras un lavado en agua durante 10 minutos se incubaron en Hematoxilina de Harris durante 20 segundos. Por último, se procedió a la deshidratación mediante concentraciones crecientes de alcoholes terminado la tinción con la sumersión de los portas en el xilol durante 10 minutos.



### **2.2.1.3 Rojo Picrosirios (pSR)**

La tinción Rojo Picrosirios, una modificación del método de *Sweat's* que nos permite identificar selectivamente a diferentes los tipos de colágeno. La tinción no es selectiva, pero ofrece una oportunidad de identificar especialmente las fibras de colágeno neo formadas: las fibras de colágeno tipo I amarillo brillante, naranja o rojo, las II (de acuerdo a orientación) azules o amarillas claras y las de tipo III verde.

Las muestras previamente desparafinadas e hidratadas e se incubaron en ácido fosfomolibdico 0,2% durante 2 minutos y se lavaron en agua destilada. A continuación se incubaron en una solución 0,1% de Rojo Picrosirios durante 110 minutos a temperatura ambiente seguido de HCL 0,01N durante 2 minutos. Las muestras se deshidrataron progresivamente concentraciones de alcohol crecientes (70%, 100%, 100% y 100%), terminado la tinción con un aclarado en xilol durante 45 segundos

### **2.2.1.4 Rojo de Alizarin S (ARS)**

Las deposiciones anormales del mineral calcio pueden ser detectadas mediante la tinción histológica Rojo de Alizarin S. La tinción histológica Rojo de Alizarin S forma un complejo de quelato con el calcio poniendo en evidencia los depósitos de calcio.

Para su realización se desparafinaron los cortes de parafina en xilol durante 10 minutos. Se inmergieron los portas en etanol a 95% y se dejaron secar al aire. Las muestras se incubaron en una solución rojo de Alizarin S durante 2 minutos, controlando el marcaje al microscopio. A continuación se lavaron los portas en agua destilada para retirar el exceso de colorante, se enjuagaron en acetona durante 30 segundos, se sumergieron en acetona-xileno (1:1) durante 15 segundos y se aclararon en xileno durante 10 minutos.

### **2.2.1.5 Azul de Toluidina**

El Azul de toluidina es un colorante sintético que tiñe estructuras basófilas con particularidad afinidad de las estructuras nucleares. Se puede comportar como colorante ortocromático (tiñe de color azul) o metacromático (tiñe de color violeta-rojo), dependiendo del pH y de la naturaleza química de la sustancia teñida. Se usa frecuentemente como colorante ortocromático para teñir el tejido nervioso.

La tinción de Azul de toluidina se realizó para contabilizar el número de eosinófilos y mastocitos infiltrados (debido a la presencia de mucopolisacáridos). Las muestras previamente desparafinadas e hidratadas se sumergieron durante 4 minutos en Azul de Toluidina al 1%. Tras la coloración, se lavaron con agua, se deshidrataron con una batería de alcoholes de concentración creciente y por último, se aclararon con xilol durante 10 minutos.

### 2.2.2 Inmunohistoquímica (IHQ)

Las tinción inmunohistoquímica (IHQ) consiste en la identificación de antígenos celulares o tisulares mediante anticuerpos marcados. Es una técnica de diagnóstico y de investigación que permite visualizar y localizar los componentes celulares específicos en el tejido. Para la realización de los estudios de IHQ se utilizaron porta-objetos con polilisina.

#### 2.2.2.1 Proliferación de axones: *Gap43*

Para la observación de la proliferación de axones, el tejido de médula espinal y cerebelo se incluyó en parafina y se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-Gap43 (1:200). Las muestras previamente desparafinadas e hidratadas se incubaron en tampón citrato a 70<sup>0</sup> C durante 1 hora, para el desenmascaramiento antigénico. Tras lavar con PBS1x, las uniones inespecíficas se bloquearon con suero de cabra al 5% en PBS1x durante 20 min a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario Gap43 se realizó durante toda la noche a 4<sup>0</sup>C a una dilución de 1:200, en suero de cabra al 10% y PBS1x. A continuación tras lavar con PBS1x, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario de conejo anti-IgG conjugado con FITC (1:160) durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó una tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a 0,2µg/ml durante 10 minutos. Las muestras se lavaron con PBS1x y se cubrieron con medio de montaje acuoso (gervatol) y se protegieron con un cubre-objetos.

### 2.2.2.2 Precusores de oligodendrocitos: NG2

Para la visualización de precusores de oligodendrocitos se incubaron los tejido con anticuerpo NG2 policlonal (1:200). Para ello, se utilizaron muestras cerebelo, medula espinal y nervio óptico incluidas en OCT (16µm). Las muestras se lavaron con PBS para retirar el exceso de OCT. El desenmascaramiento antigénico se realizó con PBS/Triton X-100 0,3% a temperatura ambiente, durante 1h. A continuación se lavaron los cortes con PBS1x y se bloquearon con suero de cabra al 5% en PBS1x durante 20 minutos a temperatura ambiente, para evitar uniones inespecíficas. La incubación con el anticuerpo primario, NG2, se realizó durante toda la noche (1:200), en suero de cabra al 10% y PBS1x. A continuación se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario de conejo anti-IgG conjugado con FITC, diluido 1:160 durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó una tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a 0,2µg/ml durante 10 minutos. Las muestras se lavaron con PB1x, se cubrieron con medio de montaje acuoso (gervatol) y se protegieron con un cubre-objetos.

## 2.2.3 Histofluorescencia

### 2.2.3.1 Estrés oxidativo

Para medir los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) se emplearon dos sondas: la sonda 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFHDA) (10µM) para peróxido de hidrógeno y el dihidroetidio (DHE) ( $2 \times 10^{-6}$ M) para el anión superóxido. La sonda DCFHDA es permeable y, una vez dentro de la célula, se oxida en presencia de ROS dando lugar al compuesto fluorescente 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). El DHE se oxida por el anión superóxido produciendo etídio, compuesto que se intercala en el DNA emitiendo fluorescencia [185-187].

La detección de ROS en muestras de tejido, se realizó en tejido congelado en OCT. Las muestras se lavaron con KHB-HEPES para retirar el OCT y se incubaron durante 30 minutos a 37<sup>0</sup>C, en KHB-HEPES. Tras secar las muestras, se incubaron con la respectiva sonda durante 30 minutos a 37<sup>0</sup>C, siempre en oscuridad. Las muestras se

cubrieron con medio de montaje acuoso (gervatol) y se protegieron con un cubre-objetos.

### **2.2.3.2 Fluoro Jade C**

Mediante la técnica de Fluoro Jade C se determinó la neurodegeneración de acuerdo con el método descrito por *Schmued et al* [188].

La tinción de Fluoro Jade C, se realizó mediante un Kit comercial, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez rehidratadas las muestras, se incubaron en una solución de permanganato de potasio al 0,06% durante 10 minutos y se lavaron en agua destilada durante 2 minutos. Las muestras se incubaron en la solución de 0,0001% de Fluoro Jade C disuelta en ácido acético al 0,1% y se lavaron en agua destilada tres veces durante 1 minuto. Tras secar las muestras en la estufa a 50<sup>o</sup>C, durante 5 minutos, se aclararon durante 1 minutos en xilol, se cubrieron con medio de montaje permanente (EUKITT<sup>®</sup>) y se protegieron con un cubreobjetos.

### **2.2.3.3 Terminal dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)**

La técnica de TUNEL se realizó para el estudio de la apoptosis. Durante la apoptosis las endonucleases nucleares dijeron el DNA genómico en fragmentos oligonucleosumales, que son marcados mediante la incorporación catalítica de 16-dUTP, por medio de la enzima transferasa terminal TdT. La enzima TdT marca a los nucleótidos que se añadirán a los grupos hidroxilo (3' - OH grupos) liberados en la cadena de DNA fragmentado cuando se produce la apoptosis. Estos grupos hidroxilo pueden hacerse visibles con fluorescencia.

La técnica de TUNEL se realizó mediante un Kit comercial, en cortes en parafina de cerebelo y nervio óptico, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se desparafinaron en xilol y se hidrataron en una serie de baños decrecientes de alcoholes, se incubaron con NaCl al 0,88% durante 5 minutos, se lavaron con PBS1x y se incubaron durante 10 minutos con proteinasa K (20µg/ml) a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron con PBS1x, se aplicó la solución tampón de equilibración durante 5 minutos y se incubó en la solución de trabajo de la enzima durante 1h a 37<sup>o</sup>C, parándose posteriormente la reacción con la solución SSC20x (1:10). A

continuación se volvió a lavar con PBS1x y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con DAPI. Se realizaron tres lavado con PBS1x durante 5 minutos, se cubrieron con medio de montaje acuoso (gervatol) y se protegieron con un cubreobjetos.

## 2.3 Análisis del estrés oxidativo

### 2.3.1 Cuantificación de marcadores de oxidación

#### 2.3.1.1 *Peróxido de Hidrogeno:*

Los niveles de peróxido de hidrógeno en suero y en tejido se evaluaron mediante un kit comercial de acuerdo las indicaciones del fabricante en placas de 96 pocillos.

Las muestras se diluyeron 1:10 en tampón *Assay*.

Se determinó la fluorescencia de emisión de  $585\pm 5\text{nm}$  y de excitación  $575\pm 5\text{nm}$ .

#### 2.3.1.2 *Peroxidación lipídica:*

La peroxidación lipídica se evaluó mediante la estimación de malondialdehído (MDA) a través de la reacción con el ácido tiobarbiturico (TBA), de acuerdo con el método descrito por *Becerra et al* [189]. El tejido nervioso se homogeneizó en PBS1x (1:6) en presencia de un antioxidante (hidroxitolueno butilado, BHT) para evitar una peroxidación de lípidos que se pudiera producir durante la homogeneización. Las muestras de tejido se incubaron con una solución tampón de glicina-HCl 0,2M, pH 3,6 y reactivo TBA (0,5 % de TBA, 0,5 % SDS). Tras 15 min de incubación a  $90^{\circ}\text{C}$ , las muestras se enfriaron en hielo y se transfirieron a una placa de 96 pocillos para la lectura, por triplicado. Las muestras de suero se incubaron durante 30 minutos en agua a  $90^{\circ}\text{C}$  con la solución de 15% de ácido tricloroacético, 0,375% de ácido tiobarbitúrico y de ácido clorhídrico 0,25N. Tras el enfriar de las muestras se centrifugaron a 4000 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante se pasó una placa de

96 pocillos para la lectura de la absorbancia, por triplicado. El MDA reacciona con el TBA para producir un pigmento con un máximo de absorción de 532nm.

### **2.3.1.3 Productos de oxidación proteica:**

La determinación de los productos de oxidación proteica (AOPP) se realizó siguiendo el método descrito por *Capeillere-Blandin et al* [190]. Para ello, las muestras se diluyeron en PBS1x (1:5 para suero y 1:20 para tejido). A la muestra diluida se añadió de yoduro potásico 1,16M y de ácido acético. La recta patrón se realizó con Cloramina T (0,219M) a diferentes concentraciones. La absorbancia se determinó inmediatamente a 340nm.

Las absorbancias se monitorizaron en un lector de placas Versamax (Molecular Devices).

## **2.3.2 Cuantificación de marcadores anti-oxidantes**

### **2.3.2.1 Superóxido dismutasa (SOD):**

La determinación del marcador anti-oxidante superóxido dismutasa (SOD) se realizó mediante kit comercial, siguiendo las indicaciones del fabricante, en placas de 96 pocillos.

Las muestras de tejido y suero se diluyeron en tampón *Assay* (1:5 para sueros y 1:4 para tejidos).

La densidad óptica se determinó a 450nm.

### **2.3.2.2 Catalasa (Cat):**

La determinación del marcador anti-oxidante Catalasa (Cat) se realizó mediante kit comercial, siguiendo las indicaciones del fabricante, en placas de 96 pocillos.

Las muestras suero y tejido se diluyeron (1:5 para sueros y 1:4 para tejidos) en tampón *Assay*.

Se leyó la fluorescencia de emisión a  $585\pm 5\text{nm}$  y de excitación  $575\pm 5\text{nm}$ .

### **2.3.2.3 Poder antioxidante de reducir el hierro (FRAP):**

La evaluación la actividad del poder antioxidante de reducir el hierro (FRAP) se determinó de acuerdo con el método descrito por *Benzie and Strsain* [191]. Las muestras de suero y tejido se incubaron con una solución de trabajo de FRAP que contiene tampón acetato 300mM pH 3,6, solución TPTZ 10mM en HCL 40mM y  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20mM en HCL al 2%, a una proporción de 10:1:1 respectivamente. Se determinó la absorbancia a 593nm.

La absorbancia se monitorizó en un lector de placas Versamax (Molecular Devices).

## **2.4 Determinaciones**

### **2.4.1 Cuantificaciones séricas de auto-anticuerpos**

La cuantificación de las concentraciones séricas de anticuerpos, en los distintos modelos de experimentales, se realizaron mediante ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). En una placa de 96 pocillos, se puso 100 $\mu$ l/pocillo del péptido  $\text{MOG}_{\alpha 35-55}$ ,  $\text{MyHC}_{\alpha 614-629}$ , o el polen, a una concentración de 5 $\mu$ g/ml, dependiendo del modelo animal (EAE, MAE o CAE) en tampón de bicarbonato (pH 9,6) y se incubó toda la noche a 4<sup>0</sup>C. Tras el bloqueo con BSA 5% durante 2h a temperatura ambiente, los pocillos se incubaron por duplicado con las muestras de suero de los distintos grupos experimentales, diluidas 1:60 en PBS1x, durante 2h a 20<sup>0</sup>C. Para la detección de auto-anticuerpos específicos se usaron anti-IgG de ratón conjugados con HRP, durante 3h a temperatura ambiente, diluidos 1:2000, IgE (para el modelo de CAE), IgG, IgG1, IgG2a e IgM. Tras lavar con PBS-T 0,05%, se incubó con 50 $\mu$ L de TMB durante 1h a temperatura ambiente y se detuvo la reacción con HCl 0,1N. La absorbancia se leyó a 450nm. Los resultados se expresaron como la media de la densidad óptica a 450nm.

### 2.4.2 Detección de citoquinas por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Las muestras de tejido (cerebelo, corazón y conjuntiva ocular) se homogeneizaron en PBS frío suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), usando un homogeneizador (Cole-Parmer Instrument, IL, EE.UU.). A continuación, las muestras se centrifugaron a 4<sup>0</sup>C durante 15 minutos, a 10000 r.p.m. Las alícuotas del sobrenadante fueron almacenadas a -80<sup>0</sup>C hasta su empleo.

La detección y cuantificación de las citoquinas (IL-6, IL-10, IL-4, IL-17, IL-35, IL-33, IL-13, galectina-3, MCP-1, BNP, eotaxina-1 y sPLA2-IIA) en suero y tejido, se realizaron mediante ELISA comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de las citoquinas analizadas se determinaron mediante la extrapolación de las absorbancias en la curva estándar creada a partir de los estándares proporcionados por el kit.

### 2.4.3 Cuantificación de los niveles de glutamato

Las muestras de tejido de médula espinal y nervio óptico se homogenizaron con un homogeneizador de Cole-Parmer Instrument, IL, EE.UU., en suero salino al 0,01% como se describió anteriormente *Q.C. Kan et al* [192]. A continuación, las muestras se centrifugaron a 4<sup>0</sup>C durante 10 minutos, a 10000 r.p.m. y se recogió el sobrenadante. La cuantificación del glutamato se realizó con un kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de la absorbancia se realizó en el lector de placas 576nm.

### 2.4.4 Ensayo de la isoenzima Creatina-kinasa MB (CK-MB)

La actividad enzimática de la isoenzima creatina-kinasa MB (CK-MB) se midió en muestras de suero, mediante un kit comercial, de acuerdo con las instrucciones del



fabricante. La incubación de las muestras de suero en la presencia del sustrato conduce a un aumento de la concentración de la forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH), que es directamente proporcional a la actividad de la enzima. La lectura se hizo en un espectrofotómetro (VERSAmax Microplate Reader, Molecular Devices LLC, CA, USA) a una longitud de onda de 340nm.

### 2.5 Modelos celulares: Estudios *in vitro*

Las diferentes líneas celulares utilizadas en la tesis se mantuvieron a 37<sup>0</sup>C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

La línea de células ganglionares de retina procedentes de rata (RGC-5) fue cedida por la Dr. Patricia Boya, del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC en Madrid, España. Las células crecieron con medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero ternera fetal (STF) al 10% (v/v), 100U/ml de penicilina, 2mM de L-glutamina y 100µg/ml de estreptomina.

La línea células de cardiomiocitos (H9c2) fue cedida por la Dra. A. Branco, del Centro Nacional de Investigaciones Cardiológicas (CNIC) en Madrid, España. Las células crecieron en DMEM con alto contenido en glucosa (4,5g/L) suplementado con 10% (v/v) de suero de ternera fetal (STF), 100µg/ml de estreptomina, 100U/ml de penicilina y 2mM de L-glutamina.

La línea celular de cardiomiocitos auriculares de ratón (HL-1) fue cedida por el Dr. D. Álvarez de la Rosa, de la Universidad de Laguna, España. Las células crecieron en medio Claycomb, suplementado con suplementado con 10% (v/v) de suero de ternera fetal (STF), 100µg/ml de estreptomina, 100U/ml de penicilina y 2mM de L-glutamina, en frascos de cultivos previamente recubiertos con fibronectina-gelatina .

La línea celular de basófilo de sangre periférica de rata Wistar (RBL) línea de mastocitos (RBL-2H3) [193, 194] fue cedida por el Dra. Laura Hernandez-Ruiz, del Hospital Universitario de Puerta del Mar de la Facultad de Medicina de Cádiz, España. Las células crecieron en medio de cultivo mínimo esencial de Eagle (EMEM) suplementado con 15% (v/v) de suero de ternera fetal (STF), 1,5g/L bicarbonato de

## Materiales y Métodos

sódico, 1mM piruvato sódico, 0,1mM aminoácidos no esenciales, 50U/ml de estreptomicina, 50U/ml de penicilina y 2mM de L-glutamina.

La línea celular de eosinófilos humanos (EoL-1) [195] fue cedida por el Dr. Daniel Wicklein, del Centro-Médico de la Universidad Hamburgo-Eppendorf, Alemania. Las células crecieron en medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con 10% (v/v) de suero de ternera fetal (STF), 100µg/ml de estreptomicina, 100U/ml de penicilina y 2mM de L-glutamina.

Los cultivos primarios de cardiofibroblastos (C.F.) adultos, fueron aislados de ratas adultas Wistar de 250-300g de peso, de acuerdo al protocolo descrito por *J. P. Bénitah et al* [196-201]. Los cardiofibroblastos se cultivaron en medio DMEM completo, suplementado con 10% (v/v) de suero de ternera fetal (STF), 100µg/ml de estreptomicina, 100U/ml de penicilina y 2mM de L-glutamina, 10mM de L-Piruvato y 2mM de HEPES. Para la extracción: se extrajo el corazón a las ratas se lavó en suero salino para quitar toda la sangre (en placas P<sub>60</sub>). Con la ayuda de un bisturí se separaron los ventrículos de las aurículas y del ápex y se pasaron los ventrículos a una nueva placa P<sub>60</sub> con colagenasa y tripsina (50%:50%). Con el bisturí se troceó el corazón lo más que se pudo. Todo el contenido se pasó a un tubo de 15ml y se incubó durante 10 minutos a 37<sup>o</sup>C. Se centrifugó a 1100 r.p.m. durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante con una pipeta de Pasteur. Se añadió los restantes mililitros de la solución de digestión (colagenasa y tripsina) y con una pipeta estéril se resuspendió mecánicamente durante 5 minutos. Se centrifugó y sin apurar, se retiró el sobrenadante, se añadió 2 l de medio DMEM completo, se resuspendió y se pasó a un frasco T<sub>75</sub> con 8 ml de DMEM completo. Al día siguiente se les cambió el medio y se les dio dos lavados con PBS1x.

Todas las células adherentes se levantaron con tripsina para su posterior utilización.

### 2.5.1 Esclerosis Múltiple

Los experimentos *in vitro* para los estudios de Esclerosis Múltiple se realizaron en la línea células ganglionares de retina (RGC-5).

#### 2.5.1.1 Estrés oxidativo

La determinación de ROS en la línea celular RGC-5 se realizó empleando la sonda DCFHDA (10 $\mu$ M), para el peróxido de hidrogeno, y la sonda DHE (2x10<sup>-6</sup>M). Los estudios se realizaron en la presencia o ausencia de OA (5 y 10 $\mu$ M).

Las células crecieron en frascos de 25cm<sup>2</sup>, y fueron incubadas con las respectivas sondas incubadas a 37<sup>0</sup>C y 30 minutos. A continuación, se pre-trataron durante 30 minutos a 37<sup>0</sup>C con el triterpeno a diferentes dosis (5 y 10 $\mu$ M) y se incubaron con peróxido de hidrogeno a diferentes concentraciones (300, 500 y 650 $\mu$ M) durante 30 minutos. La intensidad de fluorescencia se midió en un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter).

#### 2.5.1.2 Determinación de la apoptosis celular

La apoptosis se determinó mediante el ensayo de unión de Anexina-V. Las células se trataron con peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones (300, 500 y 650 $\mu$ M) durante 24h, en la presencia o ausencia del OA. Tras lavar las células con PBS1x, se marcaron con Anexina-V conjugada con ficoeritrina (PE), en un tampón óptimo para la unión de la anexina-V (*binding buffer*, BB1x), durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. El análisis se realizó mediante citometría de flujo.

### 2.5.2 Miocarditis

Los experimentos *in vitro* para los estudios de Miocarditis se realizaron en cardiofibroblastos primarios de rata (C.F.) y en cardiomiocitos (HL-1 y H9c2).

#### 2.5.2.1 Proliferación celular: cardiomiocitos

Los ensayos de proliferación celular se realizaron en placas de cultivo de 96 pocillos en un volumen final de 100 $\mu$ l. La cuantificación de la proliferación celular se

llevó a cabo a través de un kit de Promega, The CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay.

Las células se mantuvieron durante 24h en medio sin suero. A las 24h, se estimularon con Angiotensina II ( $1\mu\text{M}$ ), Galectina-3 ( $5\mu\text{g/ml}$ ) y TNF- $\alpha$  ( $200\text{UI/ml}$ ) en la presencia o ausencia de AO ( $5$  y  $10\mu\text{M}$ ). La proliferación se evaluó a las 24 horas midiendo su absorbancia a una longitud de onda de  $490\text{nm}$  en un espectrofotómetro. Los estudios se realizaron por triplicado.

### ***2.5.2.3 Ensayo in vitro de fibrosis***

Los fibroblastos cardiacos se cultivaron en placas de 12 pocillos y se trataron con los diferentes agonistas en la presencia o ausencia del AO, durante 72 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Transcurridas las 72 horas, las células se fijaron con metanol toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Tras la fijación, las células se lavaron dos veces con PBS1x y se incubaron con una solución de pSR  $0,1\%$  a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se eliminó el colorante y se lavaron las células tres veces con ácido acético al  $0,1\%$ . Para la elución del pSR, las células se incubaron con  $200\mu\text{l}$  por pocillo de  $0,1\text{N}$  de hidróxido de sodio (NaOH) durante 1 hora a temperatura ambiente y se analizó la absorbancia a  $540\text{nm}$  en un lector de microplacas VERSAmax.

### ***2.5.2.4 Ensayo in vitro de calcificación***

Para la inducción de la calcificación, se empleó un medio de cultivo calcificante (DMEM;  $10\text{mM}$  de  $\beta$ -glicerofosfato;  $10\text{nM}$  de Vitamina D3 y  $10\text{nM}$  de Dexametasona) que se cambió cada 3 días [202]. Las células se estimularon con  $200\text{UI/ml}$  de TNF- $\alpha$  en la presencia o ausencia de AO, durante 21 días.

Las células se lavaron con PBS1x y se fijaron en PFA al  $4\%$  durante 10-15 minutos, a temperatura ambiente. A continuación, los depósitos de calcio se tiñeron durante 20 min a temperatura ambiente con la solución de ARS ( $40\text{mM}$ , pH  $4,1$ ). El exceso de colorante se eliminó mediante varios lavados con agua destilada. Las fotografías de la capa celular en placas de cultivo se tomaron con una cámara digital Olympus MJU600 (lente óptico de 3 aumentos) en el modo Super Macro y en un microscopio Nikon Eclipse TS100 conectado a un DS-Fi1 (Nikon Instruments Inc)

(100x). Tras su observación y tomadas sus respectivas fotos, la mineralización de la matriz se cuantificó mediante la extracción del ARS con ácido acético al 10%, durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se midió la absorbancia a 405nm.

### 2.5.3 Conjuntivitis alérgica

Los experimentos *in vitro* para los estudios de conjuntivitis alérgica se realizaron en las líneas celulares de eosinófilos (EoL-1) y mastocitos (RBL-2H3).

#### 2.5.3.1 Proliferación celular: EoL-1 y RBL-2H3

Los ensayos de proliferación celular se realizaron del mismo modo que se ha explicado en el apartado anterior 2.5.2.1 a través de un kit de Promega, The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Se sembraron las células en placas de 96 pocillos y se mantuvieron durante 24h en medio sin suero. A continuación se trataron con polen (100, 50 y 25µg/ml) o Eotaxina (60, 30 y 10ng/ml en las EoL-1 y 100, 50 y 25ng/ml en las RBL-2H3) en la presencia o ausencia de AO (5 y 10µM). La proliferación se evaluó a las 24 horas midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 490nm en un espectrofotómetro. Los estudios se realizaron por triplicado.

#### 2.5.3.2 Migración y quimiotaxis

Los estudios de migración y quimiotaxis se realizaron en placas de 24 pocillos con insertos Transwell®, con un filtro de policarbonato de 8µm de poro. En la parte de arriba del inserto se depositaron las células (1x10<sup>6</sup> células/ml) tratadas previamente o no con 10µM de AO (20 minutos). Dependiendo del ensayo, las células se estimularon con polen (50 µg/ml), Eotaxina (50ng/ml) o sPLA2-IIA (1µg/ml). En la parte inferior del inserto se añadió el estímulo quimiotático. Transcurridas 4h (a 37<sup>0</sup>C y 5% de CO<sub>2</sub>), las células se fijaron con PFA al 4% y se tiñeron con de Cristal Violeta 0,1% en 20% de metanol-PBS durante 3 minutos. El Cristal Violeta se solubilizó en metanol y se midió su absorbancia a la longitud de onda de 590nm en un espectrofotómetro.

El índice quimiotático se calculó a partir del número de células que migran hacia el estímulo quimioatrayente partido por el número de células que migran en el

control. La cuantificación de la migración de las células en suspensión (EoL-1) que migró se cuantificó por citometría de flujo.

### **2.5.3.3 Diferenciación celular**

Los estudios de diferenciación se realizaron en la línea celular EoL-1.

Las células se estimularon con ácido butírico (0,5mM), eotaxina-1 (30ng/ml), polen (50µg/ml) y sPLA<sub>2</sub>-IIA (1µg/ml), en presencia o ausencia de AO (10µM). Trascorridos 7 días, las células se lavaron con PBS-BSA 0,5% y se fijaron en PFA al 4% durante 30 minutos. A continuación, se permeabilizaron con Tritón X-100 0,3% en PBS1x durante 10 minutos y las uniones inespecíficas se bloquearon con suero de ratón. La incubación con el anticuerpo primario, anti-proteína básica mayor (MBP) (1:200) se hizo durante 2h a 4<sup>0</sup>C. Tras lavar las células con PBS1x, se incubaron con el anticuerpo secundario de ratón anti-IgG conjugado con FITC, diluido 1:50 durante 1 hora a 4<sup>0</sup>C. Los resultados se analizaron por citometría de flujo.

## **2.5.4 Células linfoides – cultivos ex vivo**

### **2.5.4.1 Extracción de células linfoides del bazo**

Los bazos se lavaron con PBS1x y se disgregó el presionando contra un filtro de rejilla, en hielo y se lavó con una solución (PBS1x y STF 2%). Para la lisis de los glóbulos rojos, la preparación, se incubó con una disolución comercial *FACS<sup>TM</sup> Lysing Solutions* durante 5 minutos a temperatura ambiente.

### **2.5.4.2 Función esplenocítica**

Las células de bazo se mantuvieron durante 24h en medio sin suero y se estimularon 100µg/ml del péptido MOG, del péptido MyHCα o del Polen en presencia o ausencia de AO (5 y 10µM). La proliferación celular se analizó, como se describió en 2.5.2.1..

El sobrenadante se recogió para estudios de liberación de citoquinas. Mediante kit comercial se analizaron: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, MCP-1, IL-13 y IL-33.

### ***2.5.4.3 Análisis fenotípico de células de la población de bazo***

El análisis de las poblaciones linfoides se realizó mediante citometría de Flujo.

Para el marcaje del linaje de bazo las células se marcaron con los anticuerpos de superficie de interés para:

- Linfocitos T  $\rightarrow$  anti-CD4, anti-CD3, anti-CD8
- Linfocitos B/linfocitos T/monocitos  $\rightarrow$  anti-CD3, anti-CD14, y anti-CD19

Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4<sup>0</sup>C, con los respectivos anticuerpos, se lavaron y centrifugaron durante 10 minutos a 1200 r.p.m. y se analizó su fenotipo mediante citometría.

Para la identificación de las células T reguladoras (Treg), se utilizaron como marcadores de superficie:

- Células Treg  $\rightarrow$  anti-Foxp3, anti-CD4 y anti-CD25

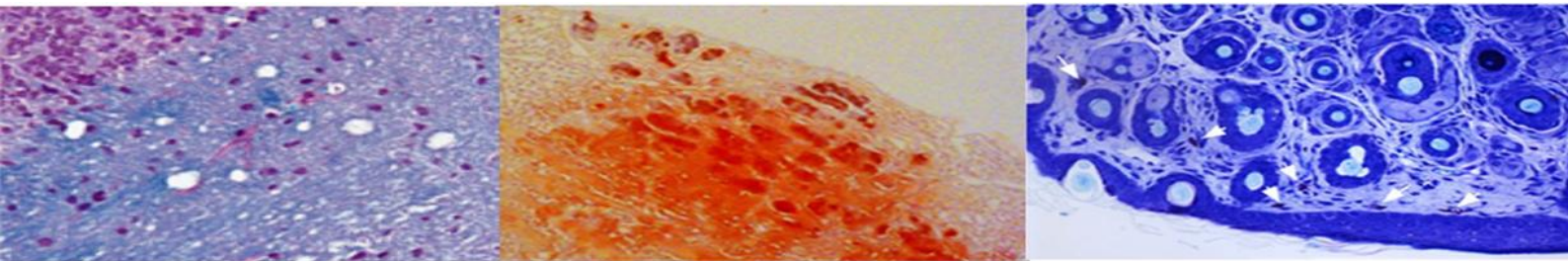
Primero, las células se marcaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para anti-CD4 y anti-CD25. A continuación, las células se lavaron, fijaron y permeabilizaron para el marcaje de FoxP3. La permeabilización se realizó con una solución de trabajo de eBiosciences, durante 15 minutos a 4<sup>0</sup>C. Tras lavar las células con el tampón de permeabilización (1x) se bloqueó el receptor Fc $\gamma$ RII/III con anti-CD16/32 Fc. Finalmente se incubaron con el anticuerpo Foxp3 durante 30 minutos a 4<sup>0</sup>C en oscuridad, se lavaron con tampón de permeabilización (1x), y se analizaron en un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter).

### 2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos fue llevado a cabo con el programa *Graphpad Prism version 4.0* (San Diego, CA, USA), utilizando el test de análisis de varianza (ANOVA). La comparación de varios parámetros se ha realizado mediante el test *One-way ANOVA*. Se ha hecho un análisis posterior mediante la prueba Bonferroni de comparaciones múltiples. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar; los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

Los estudios celulares se realizaron al menos tres veces con resultados similares. Los datos numéricos se representaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de comparación múltiple de Bonferroni.





## **IV.RESULTADOS**

## 1. Esclerosis Múltiple

En este apartado estudiaremos el efecto del tratamiento con AO en un modelo de encefalitis autoinmune experimental (EAE).

Estudiaremos parámetros microscópicos (infiltración celular, desmielinización, muerte celular, degeneración neuronal) en distintos tejidos del SNC (cerebelo, medula espinal y nervio óptico). Analizaremos la respuesta inflamatoria (citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias) e inmune (auto-anticuerpos y capacidad de proliferación de los linfocitos), estrés oxidativo (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, peroxidación lipídica, AOPP, SOD, Cat, FRAP) y los niveles de glutamato en tejido.

Analizaremos *in vitro* el efecto del AO en el estrés oxidativo y la muerte celular.

### 1.1 Efecto del AO sobre un modelo murino de Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE)

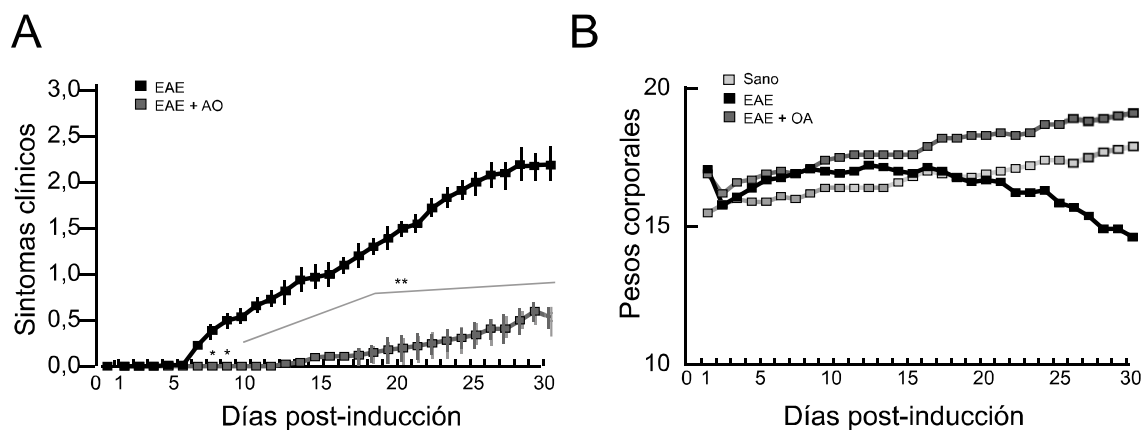
Con el objetivo de estudiar el efecto del tratamiento con AO en la Esclerosis Múltiple, estudiamos el efecto del AO en una enfermedad desmielinizante como la EAE.

#### 1.1.1 El tratamiento con AO protege en la clínica de animales EAE

Se indujo la EAE en hembras C57BL/6 mediante inmunización con el péptido MOG<sub>35-55</sub>, siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. Los animales se trataron con AO (50 mg.kg<sup>-1</sup>.dia) desde el día de la inducción de la enfermedad hasta el final del estudio. Los resultados del análisis clínico de los diferentes grupos experimentales, se muestran en la figura 15. Los síntomas neurológicos de EAE activa comenzaron a desarrollarse en torno al día 11 después de la inmunización. Además, se

produjo una pérdida de peso progresiva en paralelo con la aparición de los síntomas motores de la enfermedad. Concretamente, en el día 20 post-inmunización la pérdida de peso llegó a ser de unos 2-3g con respecto a los 17g que pesaba el ratón en el día 0 (Figura 15 B).

Cuando se administró el ácido oleanólico, la enfermedad fue significativamente menos severa ya que el tratamiento retrasó la manifestación de los síntomas neurológicos y la pérdida de peso en comparación con los animales EAE no tratados con AO (Figura 15 A y B). En los ratones EAE no tratados los primeros síntomas neurológicos (puntuación 1) empezaron alrededor del día 11 con un promedio de  $13,5 \pm 2$ , mientras que en los animales tratados con AO se alcanzó una puntuación similar (atonía de la cola) alrededor del día 27 (valores medios de  $33 \pm 2$ ). Los animales se sacrificaron cuando desarrollaron EAE severa - parálisis total de las patas traseras. Se observó una gran diferencia en el curso temporal de la enfermedad cuando se comparan con los animales tratados con placebo con los animales tratados con AO. Se puede observar, que los animales EAE tratados con el triterpeno se mantuvieron más tiempo sin sintomatología (puntuación 0), así como en las puntuaciones 1 y 2, en respecto al grupo de animales con EAE no tratados.

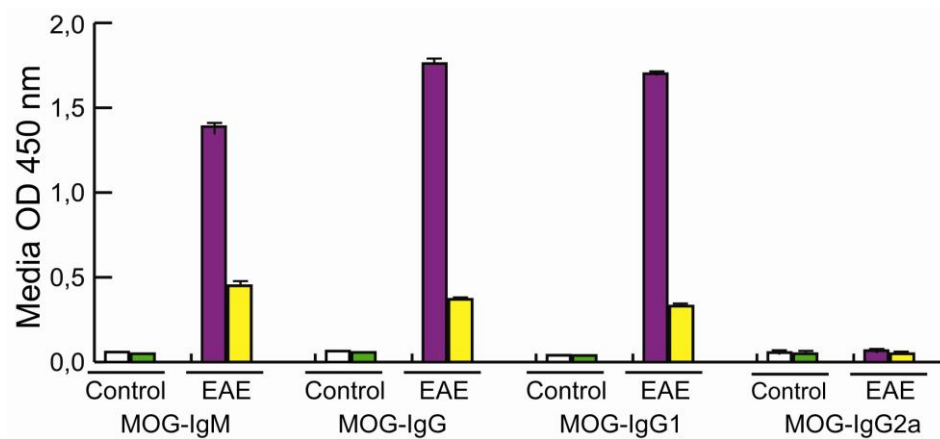


**Figura 15 – El ácido oleanólico inhibe la progresión de la EAE.** El tratamiento con AO retrasó la aparición de los síntomas motores (A) y la pérdida de peso (B) en los animales con EAE. Los ratones C57BL/6J se inmunizaron con MOG<sub>35-55</sub>, como se describe en el apartado material y métodos, y se inyectó diariamente ácido oleanólico (AO) i.p. desde el día de la inmunización hasta el final del experimento (día 30). n = 15 en cada grupo.

Los efectos observados en el parámetro de peso corporal no se deben a un efecto directo del compuesto en la ganancia de peso, ya que la molécula por sí misma no afectó al peso de animales sanos.

### **1.1.2 El tratamiento con AO modula la respuesta inmune humoral en animales EAE**

Altos niveles de auto-anticuerpos circulantes, dirigidos contra la mielina acompañan el desarrollo de la EM, siendo su producción un factor importante para la determinación de la susceptibilidad de la enfermedad. En la figura 16 están representados los valores de los auto-anticuerpos analizados. Los animales EAE no tratados presentaron un aumento significativo de la respuesta específica en los anticuerpos IgG e IgM, en comparación con los ratones no inmunizados. Se puede observar que el tratamiento redujo significativamente los niveles de anti-MOG IgM (67,7 %) e IgG (78,9 %) en relación a los ratones EAE no tratados. De manera similar, los altos niveles de anti-MOG IgG1 se redujeron significativamente en el grupo EAE tratados con AO (80%). No se observaron cambios significativos en los niveles de anticuerpos anti-MOG en la subclase IgG2a entre los distintos grupos experimentales. Los animales sanos tratados con placebo y los animales con EAE tratados con el triterpeno mostraron una ausencia casi completa de anticuerpos anti-MOG.



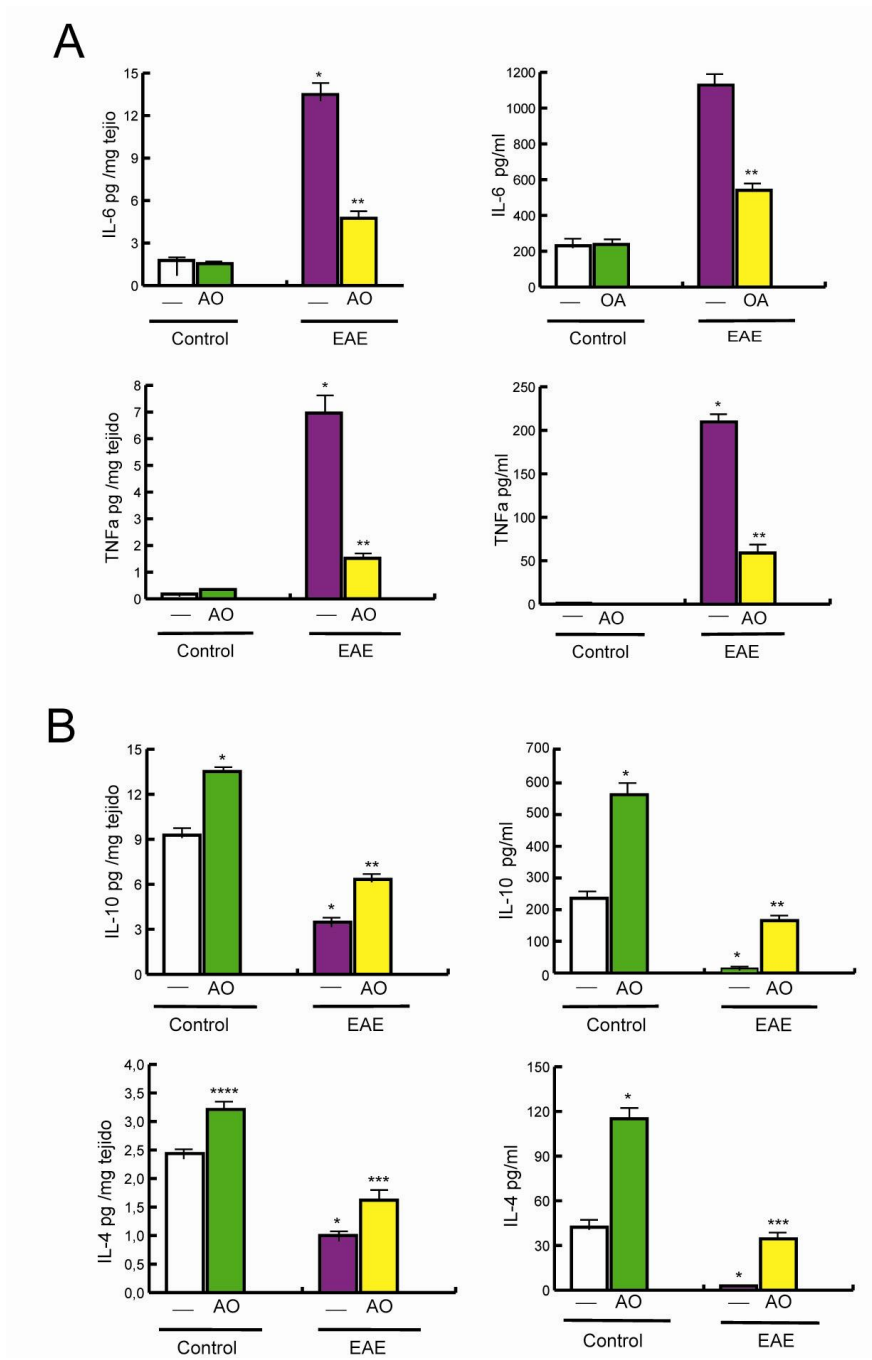
**Figura 16 - El tratamiento con AO modula los niveles séricos de auto-anticuerpos**

**MOG<sub>35-55</sub>**. Los niveles séricos de inmunoglobulinas específicas, fueron evaluados en suero mediante ELISA (dilución de 1:60) como se explica en el apartado material y métodos. Las barras representan la media  $\pm$  SD; n = 7 en todos los grupos. Blanco: Control sano; Verde:

Control AO; Morado: EAE; Amarillo: EAE+AO.

### 1.1.3 El tratamiento con AO modula la expresión de citoquinas en animales EAE

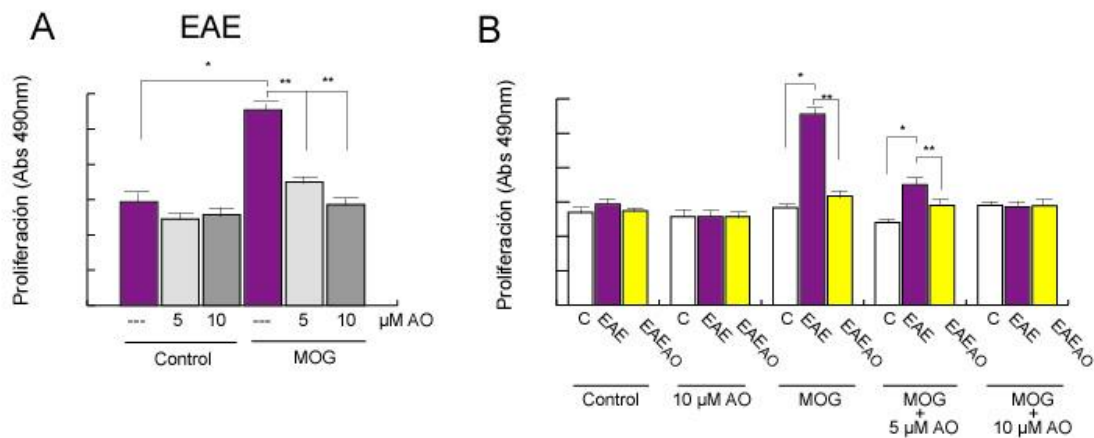
En el SNC se sujetos con EM los niveles de citoquinas pro-inflamatorias del tipo Th1 yTh17 se encuentran elevados. En la figura 17 se representan los niveles de dos citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, y TNF- $\alpha$ ) y dos citoquinas anti-inflamatorias (IL-10 y IL-4). En los animales tratados con AO se observó una reducción significativa, tanto en suero como en tejido de médula espinal, en los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, y TNF- $\alpha$ ) (Figura 17 A), mientras que los niveles de IL-10 y IL-4 se encontraron significativamente aumentados (Figura 17 B) en comparación a los animales enfermos. Curiosamente, en los animales sanos tratados con AO se observó un aumento de las citoquinas IL- 4 e IL- 10, en comparación con los animales tratados con placebo. No se han observado diferencias en las citoquinas pro-inflamatorias entre los diferentes grupos de ratones no inmunizados (control tratado frente al control no tratado).



**Figura 17 – El tratamiento con AO modula los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (A) e anti-inflamatorias (B).** En el día 30 post-inmunización con MOG<sub>35-55</sub>, se midieron las concentraciones de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 (A) y de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y IL-4 (B) en el suero y en extractos de médula espinal. Las barras representan la media  $\pm$  SD; n=7 por grupo. \*p<0,001 y \*\*\*\* p<0,01 en relación al control, y \*\*p<0,001 y \*\*\* p<0,01 en relación a los animales enfermos no tratados.

### 1.1.4 El tratamiento con AO modula los niveles de proliferación de células T en animales EAE

A continuación quisimos evaluar si el tratamiento con el triterpeno también afecta en la función de los esplenocitos aislados de los distintos grupos experimentales. Se aislaron células de bazo y se analizó la proliferación en respuesta al péptido MOG<sub>35-55</sub>, en presencia o ausencia de diferentes dosis de AO. En la figura 18, observamos que la estimulación durante 24h de las células de bazo con el péptido MOG<sub>35-55</sub> indujo a un aumento significativo en la respuesta proliferativa, sin embargo en la presencia del AO, la proliferación de las células de bazo bajó significativamente tanto para la dosis de AO de 5 $\mu$ M como para la dosis de AO de 10 $\mu$ M.



**Figura 18 – El tratamiento con AO disminuye la respuesta proliferativa de las células de bazo.** Las células fueron tratadas durante 24 horas con 100 $\mu$ g/ml de MOG<sub>35-55</sub> en presencia o ausencia de las dosis indicadas de AO, y se midió la proliferación celular (A y B).

Cada barra representa la media  $\pm$  SD; n=5 ratones por grupo. \* y \*\* p<0,001.

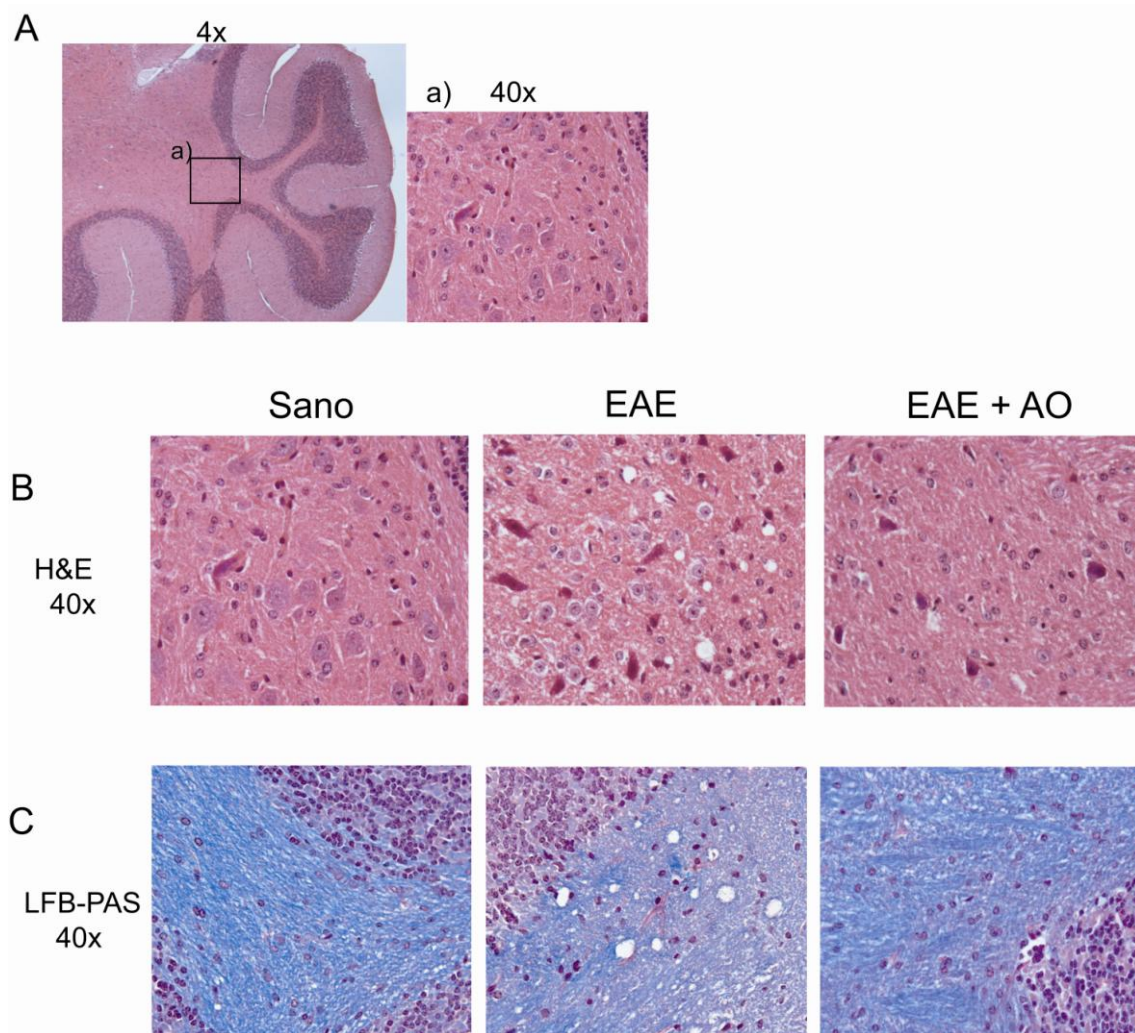
### **1.1.5 El tratamiento con AO protege del infiltrado inflamatorio y la desmielinización de la sustancia blanca en animales EAE**

Realizamos un estudio histológico en muestras de tejido de cerebelo, medula espinal y nervio óptico de ratones de los diferentes grupos en experimentación.

#### **Cerebelo**

En la figura XX se muestran imágenes representativas de secciones de cerebelo de los diferentes grupos en experimentación. Las imágenes con el objetivo de 40x fueron obtenidas en el área cuadrada (Figura 19 A). Se puede observar que los animales EAE no tratados presentaron un mayor número de células inflamatorias así como un mayor número de áreas desmielinizadas. El LFB-PAS es un colorante específico para la mielina, en la imagen representativa del animal enfermo no tratado se ve una disminución del color azul en relación al animal sano, indicándonos pérdida de mielina. En los ratones EAE tratados con AO el grado de desmielinización se redujo notablemente y la sustancia blanca presentó una morfología normal, semejante a los animales control sanos.



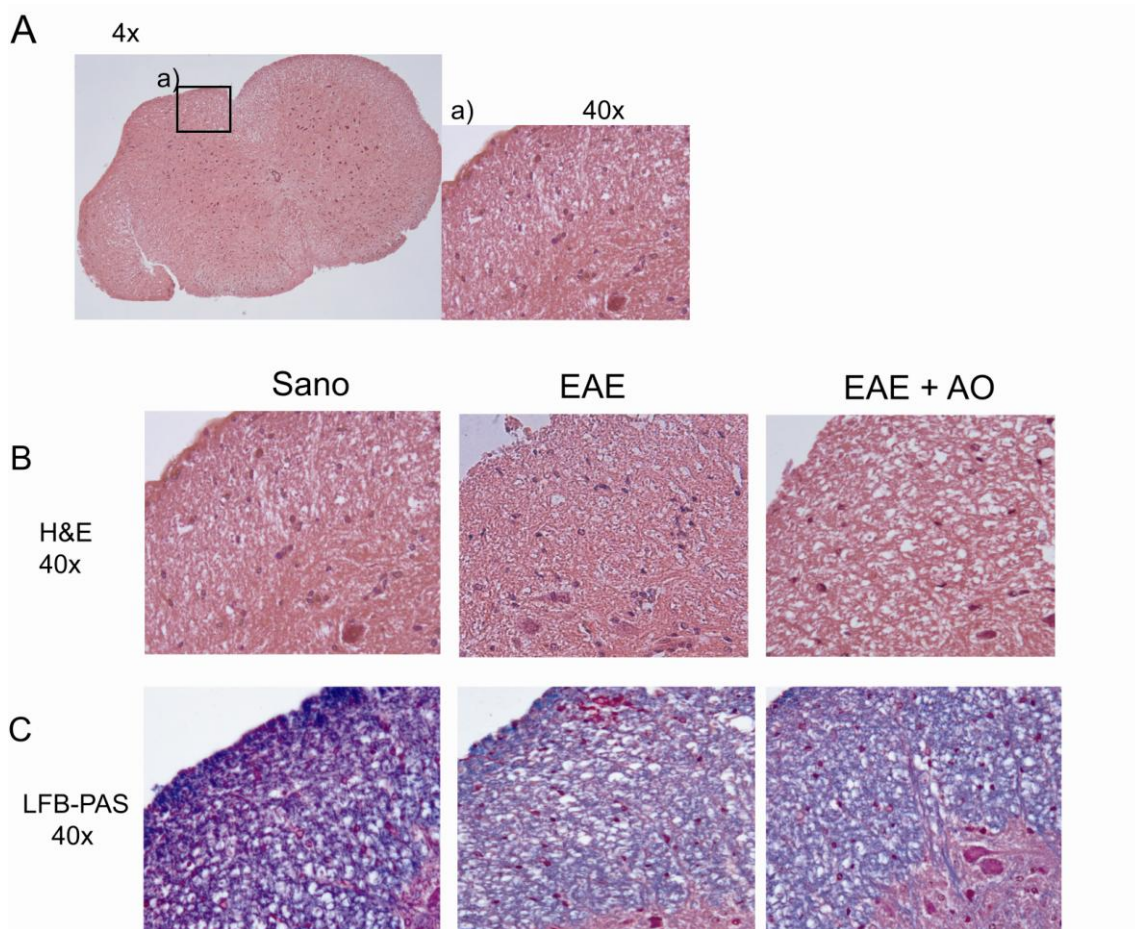


**Figura 19 – El tratamiento con AO protege de la infiltración celular y la desmielinización de la sustancia blanca en el cerebelo.** Imágenes representativas de secciones de cerebelo de los diferentes grupos de experimentación (Sano, EAE y EAE+AO). Las muestras se tiñeron con H&E (B) para la infiltración y con LFB-PAS (C) para la desmielinización siguiendo el protocolo explicado en el apartado de materiales y métodos. n=5 (Objetivos de 4 y 40x).

### **Médula espinal**

En las secciones correspondientes a médula espinal también se observó un aumento del infiltrado inflamatorio en la sustancia blanca de los animales EAE no tratados, así como una pequeña desmielinización, con respecto a los animales control sanos (Figura 20). Los animales EAE tratados con AO presentaron una pequeña pérdida

de mielina, con respecto al animal control sano, sin embargo esta desmielinización en comparación con el animal enfermo no tratado, no es tan acentuada.

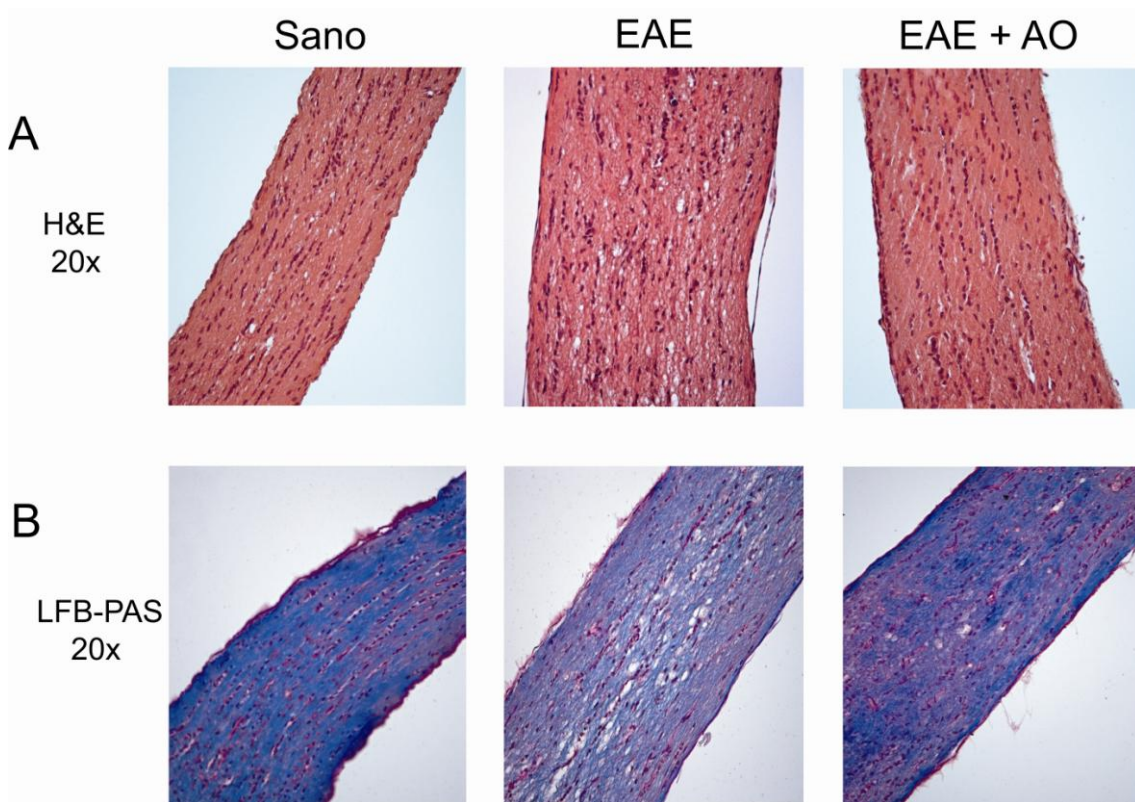


**Figura 20 – El tratamiento con AO protege de la infiltración celular y la desmielinización de la sustancia blanca en la médula espinal.** Imágenes representativas de secciones de médula espinal de los diferentes grupos de experimentación (Sano, EAE y EAE+AO). Las muestras se tiñeron con H&E (B) para la infiltración y con LFB-PAS (C) para la desmielinización siguiendo el protocolo explicado en el apartado de materiales y métodos. n=5 (Objetivos de 4 y 40x).

### Nervio óptico

En la figura 21 se puede observar un aumento del número de células inflamatorias al nervio óptico en los animales EAE así como una desmielinización respecto al animal control sano. De manera semejante al observado en los otros dos tejidos, en los animales enfermos tratados con AO hay una disminución del número de

células inflamatorias y una preservación de la estructura del tejido así como de la mielina respecto a los animales enfermos.



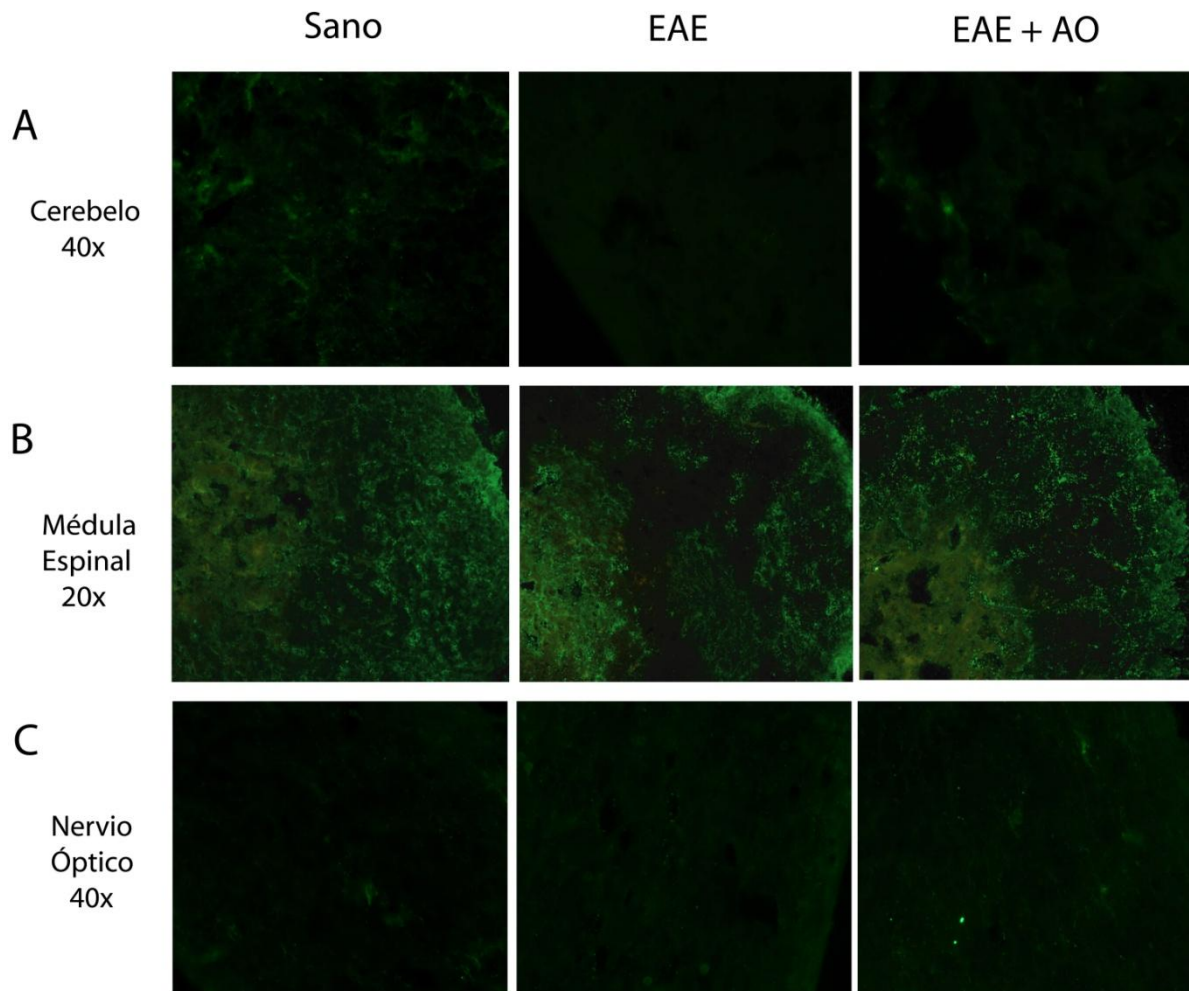
**Figura 21 – El tratamiento con AO protege de la infiltración celular y la desmielinización en el nervio óptico.** Los nervios ópticos, de los diferentes grupos en experimentación se tiñeron con H&E (A) para la infiltración celular y LFB-PAS (B) para la mielina siguiendo el protocolo explicado en el apartado de materiales y métodos. n=5 (Objetivo de 20x).

### 1.1.6 El tratamiento con AO protege los precursores de oligodendrocitos en animales EAE

Para caracterizar el efecto del AO en las células precursoras de oligodendrocitos hemos realizado un estudio inmunohistoquímico utilizando como marcador específico el anticuerpo NG2, en los diferentes tipos de tejido. En la figura 22 se puede observar que en todos los tipos de tejido analizados (cerebelo, médula espinal y nervio óptico), los animales control sanos presentaron un aumento del marcaje para los precursores



de oligodendrocitos en respecto a los animales enfermos sin tratar. En los animales enfermos tratados con AO se observó una preservación de la fluorescencia respecto a los animales con EAE no tratados.



**Figura 22 – El tratamiento con AO da protección a los precursores de Oligodendrocitos.** Secciones de los diferentes tejidos y grupos experimentales marcados, con el anticuerpo NG2 y el correspondiente secundario conjugado con FITC. Los paneles muestran imágenes de cerebelo (A), médula espinal (B) y nervio óptico (C) con un objetivo de 40x y médula espinal con un objetivo de 20x.

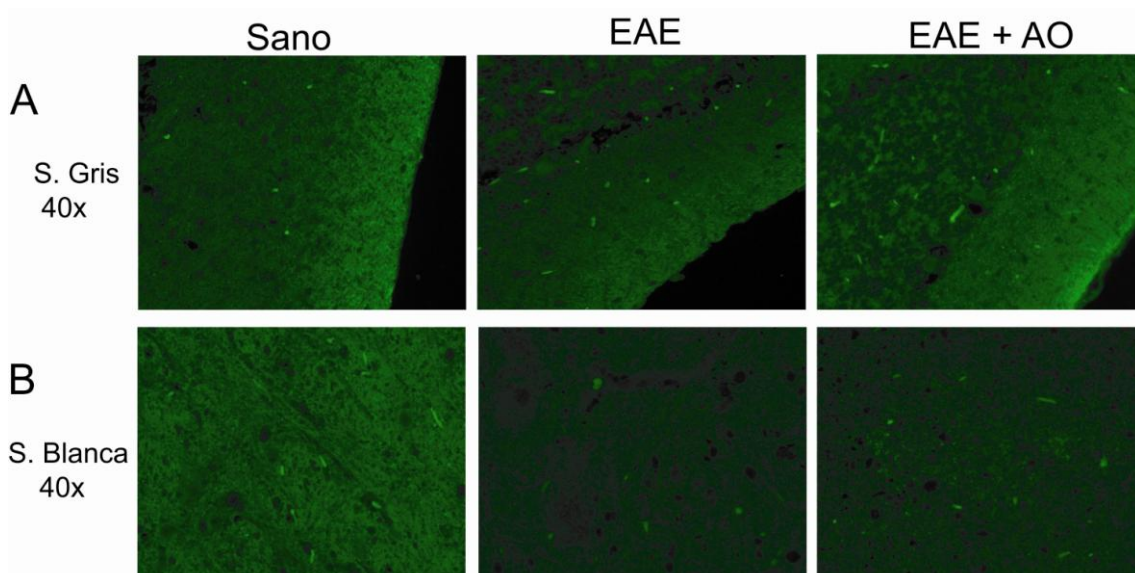
Los animales sanos tratados con AO, no presentaron diferencias con respecto a los controles sanos.

### 1.1.7 El tratamiento con AO previene la muerte axonal en animales EAE

La degeneración axonal es la principal causa del déficit neurológico permanente en la EM. Se utilizó tejido de cerebelo y médula espinal de ratones. Se realizó un marcaje inmunohistoquímico con anti-Gap43, un anticuerpo específico para la regeneración axonal [203, 204].

#### Cerebelo

En la figura 23 se puede observar que el cerebelo de los animales sanos presentó mayor expresión de Gap43 tanto en la sustancia gris (Figura 23 A) como en la sustancia blanca (Figura 23 B) con respecto a los animales EAE sin tratamiento. Sin embargo, en los animales enfermos tratados con AO observó un aumento de la expresión de Gap43 relación a los animales enfermos.

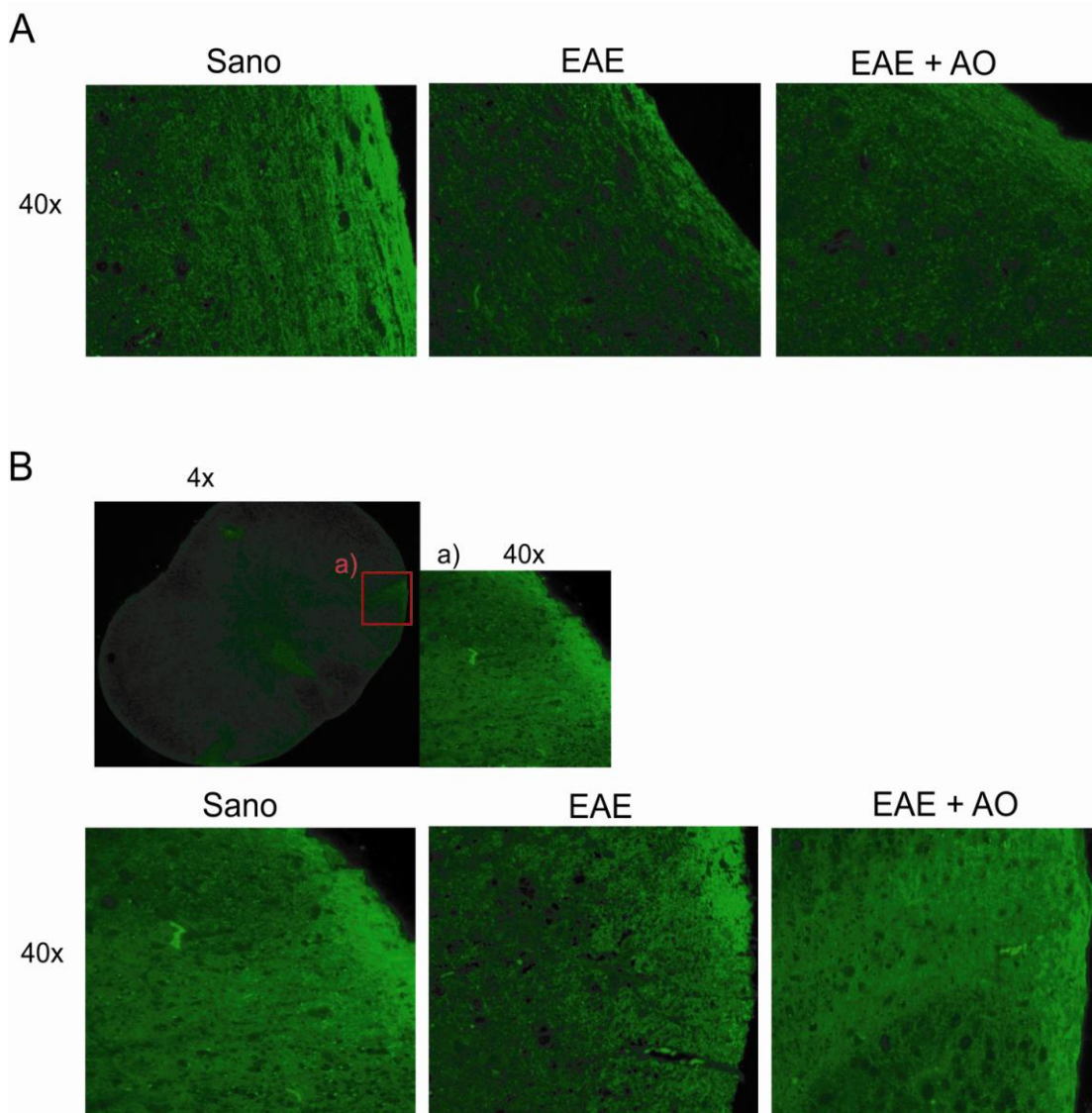


**Figura 23 – El tratamiento con AO protege la plasticidad axonal en el cerebelo en animales EAE.** Imágenes representativas del marcaje inmunohistoquímico con el anticuerpo Gap43 y el correspondiente secundario conjugado con FITC. Secciones de cerebelo: sustancia Gris (A) y sustancia Blanca (B), de los diferentes grupos en experimentación. n=5. Objetivo de

40x.

**Médula espinal**

En la figura 24 podemos observar la expresión de Gap43 en médula espinal. Los animales EAE presentaron un menor marcaje con el anticuerpo respecto a los animales control sanos. Sin embargo, los animales enfermos tratados con AO, preservaron la fluorescencia del marcaje con el anticuerpo.



**Figura 24 – El tratamiento con AO protege la plasticidad axonal de la médula espinal en animales EAE.** Imágenes representativas del marcaje inmunohistoquímico con el anticuerpo Gap43 y el correspondiente secundario conjugado con FITC. Médula espinal, de los diferentes grupos en experimentación. Las muestras fijadas en PFA 4%, se incluyeron en parafina longitudinalmente (A) y transversalmente (B). n=5. Objetivos de 4x y 40x.

Los animales sanos tratados con AO, no presentaron diferencias respecto a los controles sanos.

### **1.1.8 El tratamiento con AO protege frente a la acumulación de ROS en animales EAE**

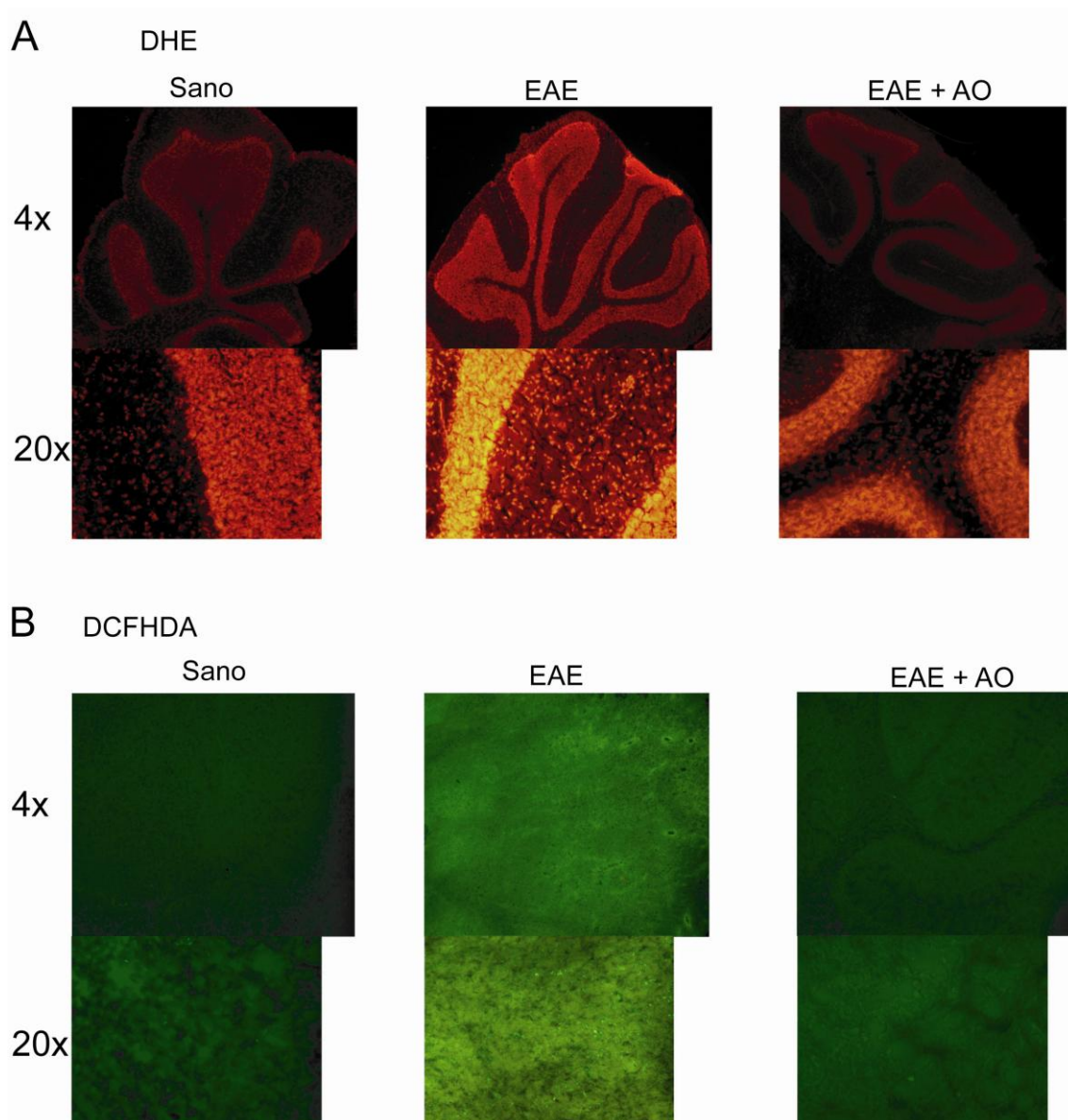
La desregulación de especies las reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) contribuyen a la desmielinización y al daño axonal en pacientes con Esclerosis Múltiple y en el modelo EAE [38, 185].

Por ello, tras el análisis del efecto anti-inflamatorio y anti-desmielinizante del AO, hemos analizado sus acciones anti-oxidantes: la acumulación de ROS en cerebelo, medula espinal y nervio óptico de ratones de los diferentes grupos en experimentación. Se evaluó mediante las sondas específicas para el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el dihidroetidio (DHE), y para el peróxido de Hidrógeno, la Dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFHDA).

#### **Cerebelo**

En las secciones de cerebelo (Figura 25) de los animales enfermos no tratados se observa un aumento de células positivas para DHE (Figura 25 A) y DCFHDA (Figura 25 B) en comparación con los animales sanos. Los animales enfermos tratados con AO presentaron una disminución de esta fluorescencia, siendo muy semejante a la observada en los animales control sanos.





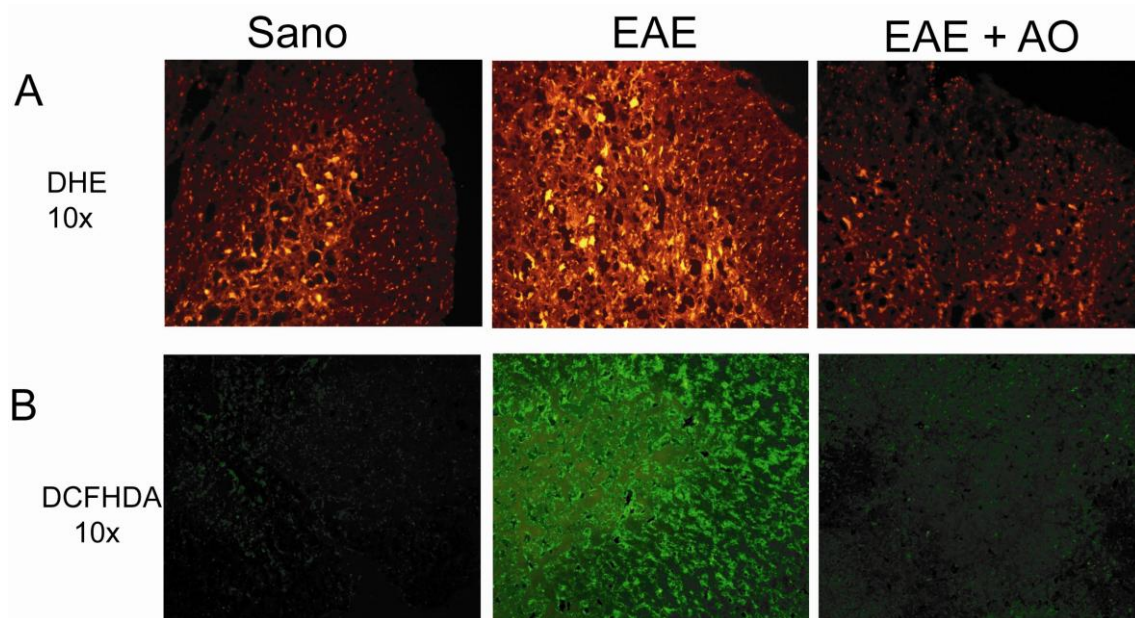
**Figura 25 – El tratamiento con AO disminuye la acumulación de ROS, en cerebelos de los animales EAE.** Secciones de cerebelo marcadas con DHE (A) para evaluar el anión superóxido y con DCFHDA (B) para evaluar la presencia de peróxido de hidrógeno. n=5. Objetivos de 4x y 20x.

### **Médula espinal**

En consonancia con los resultados obtenidos en el cerebelo, en la médula espinal de los animales enfermos tratados con AO se observó una menor fluorescencia con respecto a los animales EAE no tratados, y un pequeño aumento de esta misma con respecto a los animales control sanos; tanto para la sonda del anión superóxido



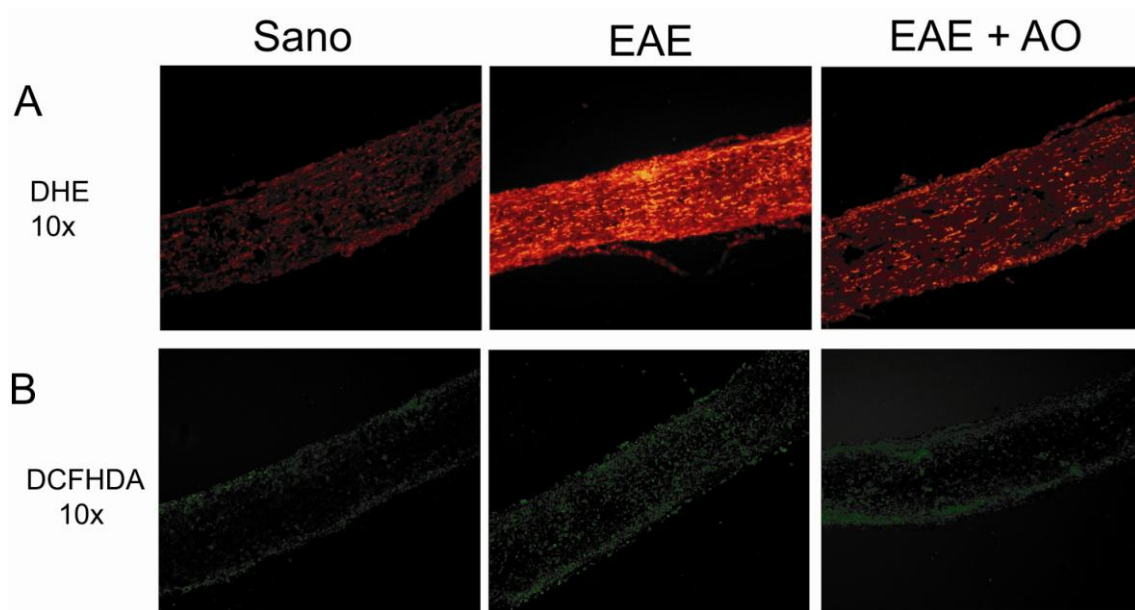
(Figura 26 A), como para la sonda específica del peróxido de hidrogeno (Figura 26 B). En los animales EAE se observó un aumento de la fluorescencia del etidio y DCF en relación a los animales EAE tratados con AO y en relación a los animales sanos.



**Figura 26 – El tratamiento con AO disminuye la acumulación de ROS, en el tejido de médula espinal de los animales EAE.** Secciones de médula espinal marcadas con DHE (A) para evaluar el anión superóxido y con DCFHDA (B) para evaluar la presencia de peróxido de hidrogeno. n=5 Objetivos de 10x.

### Nervio Óptico

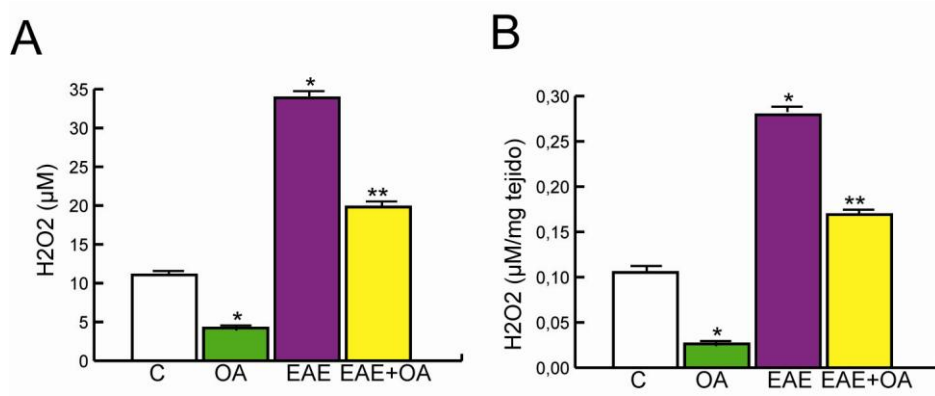
En el nervio óptico, se observaron resultados similares a los descritos en cerebelo y medula espinal. En la figura 27, se observa mayor fluorescencia en los nervios ópticos de los animales enfermos no tratados, en comparación con los animales sanos. Sin embargo, en los animales enfermos tratados con AO esta fluorescencia disminuye casi a los niveles observados en los animales control sano.



**Figura 27 – El tratamiento con AO disminuye la acumulación de ROS en el nervio óptico de los animales EAE.** Secciones de nervio óptico marcadas con DHE (A) para evaluar el anión superóxido y con DCFHDA (B) para evaluar la presencia de peróxido de hidrógeno. n=5. Objetivos de 10x.

### 1.1.9 El tratamiento con AO disminuye los niveles del peróxido de hidrógeno en animales EAE

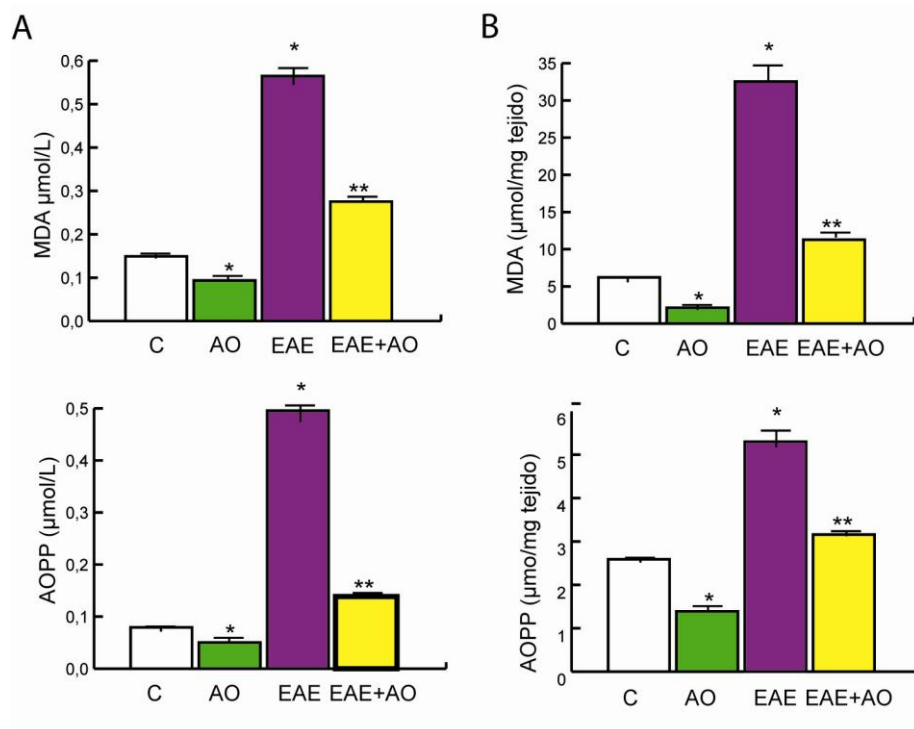
Como parámetro indicativo del estrés oxidativo se midieron los niveles de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en plasma y en cerebelo de ratones de los distintos grupos experimentales. En la figura 28, están representados los niveles de  $H_2O_2$  obtenidos. En los animales enfermos se observó que los niveles de  $H_2O_2$  estaban significativamente más elevados en relación a los animales sanos, tanto en suero como en tejido. Sin embargo, en los animales enfermos tratados con AO estos niveles se encontraron disminuidos significativamente.



**Figura 28 – El tratamiento con AO disminuye los niveles de Peróxido de Hidrógeno en animales EAE.** Se determinaron los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en suero y extractos de cerebelo en los diferentes grupos experimentales (Control sano: C; control AO: AO; enfermos: EAE; animales enfermos tratados con AO: EAE+AO). Los resultados se mostraron como una media ± SD; n= 7 en cada grupo (\*p<0,001 versus control; \*\*p<0,001 versus EAE).

### 1.1.10 El tratamiento con AO disminuye los niveles de marcadores del estrés oxidativo en animales EAE

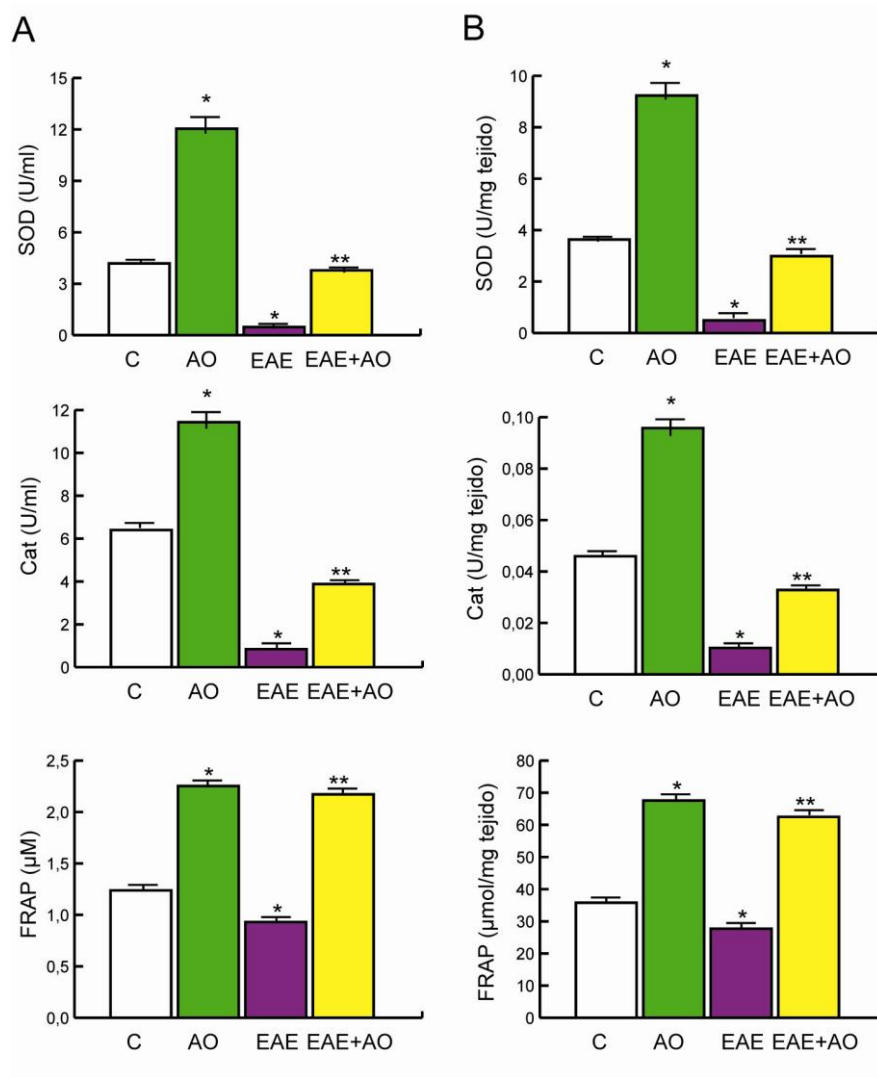
A continuación se cuantificó un marcador de peroxidación lipídica el malondialdehído (MDA) y el producto de oxidación proteica (AOPP). El MDA es un producto secundario a la oxidación lipídica, considerado como un biomarcador del daño oxidativo. En la figura 29 podemos ver que los niveles de MDA y del producto de oxidación proteica, en los animales enfermos, se encontraron significativamente aumentados en relación a los controles sanos. En los animales tratados con AO, estos niveles disminuyeron significativamente tanto en suero como en tejido.



**Figura 29 – El tratamiento con AO atenúa el estrés oxidativo en ratones EAE.** Se determinaron los niveles en suero (A) y cerebro (B) del malonildialdehído (MDA) y del producto de oxidación proteica (AOPP), de los diferentes grupos experimentales (Control sano: C; control AO: AO; enfermos: EAE; animales enfermos tratados con AO: EAE+AO). Los resultados se mostraron como una media  $\pm$  SD; n=7 en cada grupo (\*p<0,001 versus C; \*\*p<0,001 versus EAE).

### 1.1.11 El tratamiento con AO aumenta los niveles de marcadores anti-oxidantes en animales EAE

El sistema anti-oxidante se divide en enzimático y no enzimático. Como marcadores anti-oxidantes enzimáticos fueron analizadas las actividades de la superóxido dismutase (SOD) y de la catalasa. Como marcador no enzimático se cuantificó los niveles de la capacidad de reducción del hierro en plasma (FRAP). En el análisis de los 3 marcadores anti-oxidantes (Figura 30), se observó que los animales enfermos (EAE) presentaron niveles, más bajos con respecto a los controles sanos. En los animales tratados con AO los niveles aumentaron significativamente tanto en los animales sanos como en los animales enfermos.

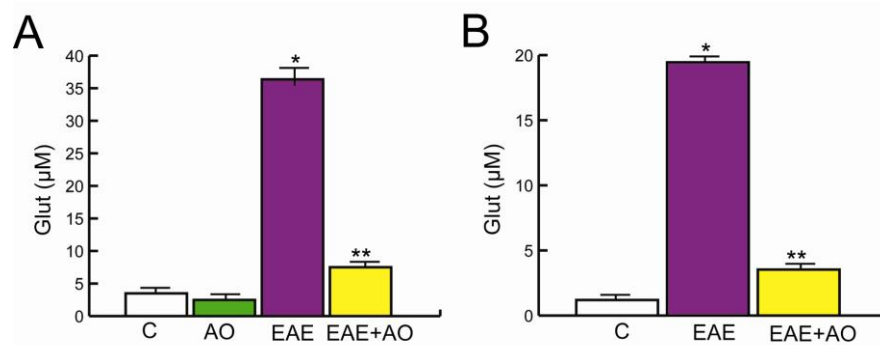


**Figura 30 – El tratamiento con AO aumenta el sistema anti-oxidante en ratones EAE.**

La determinación de la actividad enzimática de los marcadores anti-oxidantes se realizó en suero (A) y en cerebelo (B), de todos los grupos experimentales (Control sano: C; control AO: AO; enfermos: EAE; animales enfermos tratados con AO: EAE+AO). Se determinó la superóxido dismutasa (SOD) y la actividad catalasa (Cat), dos anti-oxidantes enzimáticos y la capacidad de reducción del hierro en plasma (FRAP) un marcador no enzimático. Los resultados se mostraron como una media  $\pm$  SD; n=7 en cada grupo (\*p<0,001 versus C; \*\* p<0,001 versus EAE).

### 1.1.12 El tratamiento con AO disminuye los niveles de glutamato en animales EAE

El glutamato es un neurotransmisor del SNC y está relacionado con el estrés oxidativo así como con la muerte celular, tras el daño neurológico agudo. Los altos niveles extracelulares de glutamato son tóxicos. Para estudiar si el tratamiento con AO influye en los niveles de glutamato en ratones con EAE, se determinó sus niveles presentes en diferentes tejidos: médula espinal y nervio óptico (Figura 31). De forma general, los niveles de glutamato en los animales enfermos se encontraron significativamente elevados en comparación con los animales sanos. En los animales EAE tratados con AO estos niveles bajaron significativamente.

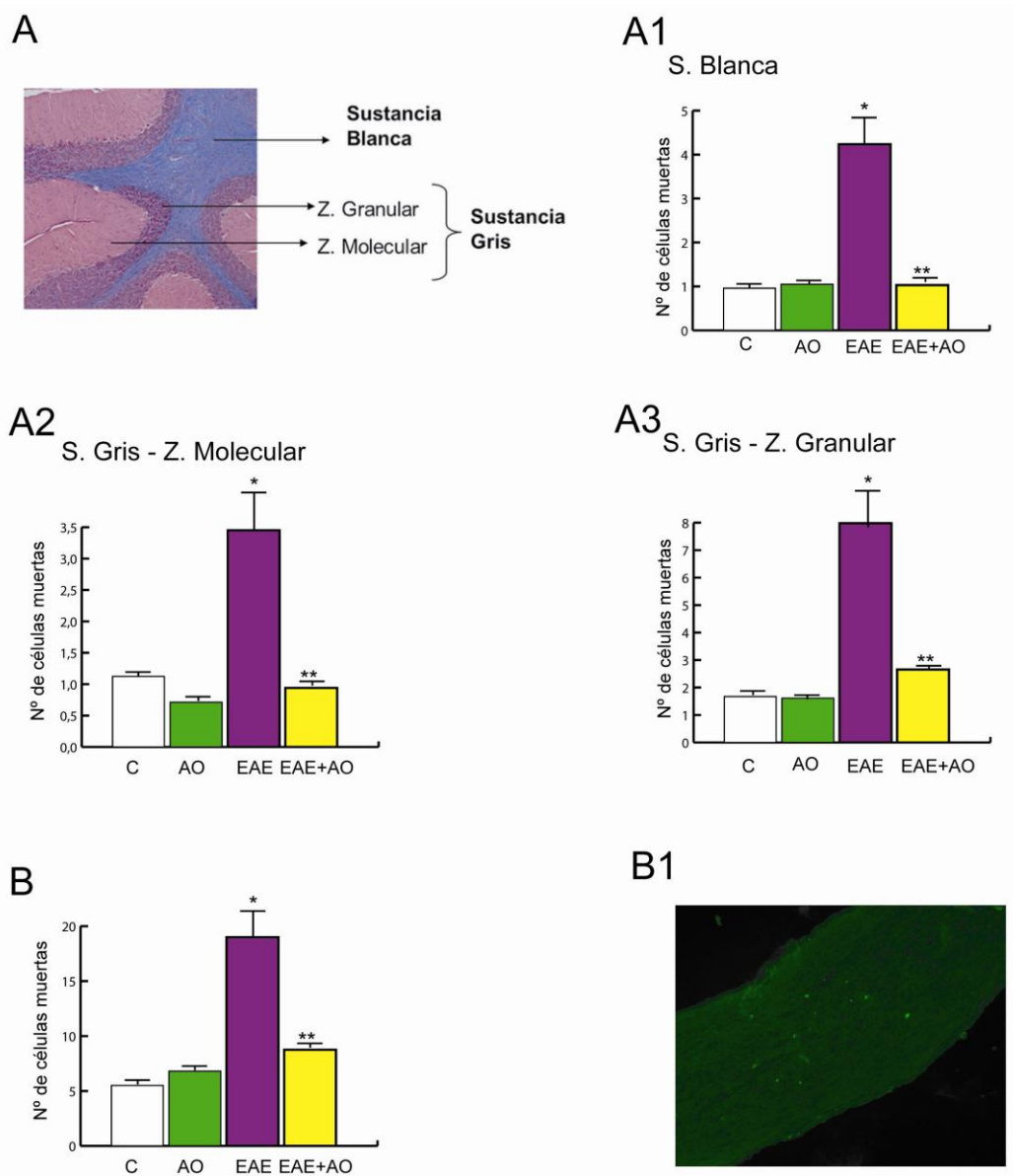


**Figura 31 El tratamiento con AO disminuye los niveles locales de glutamato, en ratones EAE.** Se determinaron los niveles de glutamato en extractos de médula espinal (A) y nervio óptico (B) de los diferentes grupos experimentales (Control sano: C; control AO: AO; enfermos: EAE; animales enfermos tratados con AO: EAE+AO). Los resultados se mostraron como una media  $\pm$  SD; n=7 en cada grupo (\*p<0,001 versus control; \*\* p<0,001 versus EAE).

### **1.1.13 El tratamiento con AO previene la muerte celular de animales EAE**

La presencia de células apoptóticas en tejido del SNC se analizó mediante la tinción de TUNEL.

Para la cuantificación del número de células apoptóticas, en las secciones de cerebelo, este se dividió en dos zonas: sustancia blanca y sustancia gris, y a su vez la sustancia gris se subdividió en: zona molecular y zona granular (Figura 32 A). La cuantificación en el nervio óptico se hizo en todo el corte histológico. El número de células apoptóticas en el cerebelo y en el nervio óptico de animales enfermos se encontró significativamente aumentado en relación a los animales sanos. Sin embargo, en los animales enfermos tratados con AO el número de células apoptóticas disminuyó significativamente (Figura 32 A1, A2, A3 y B).



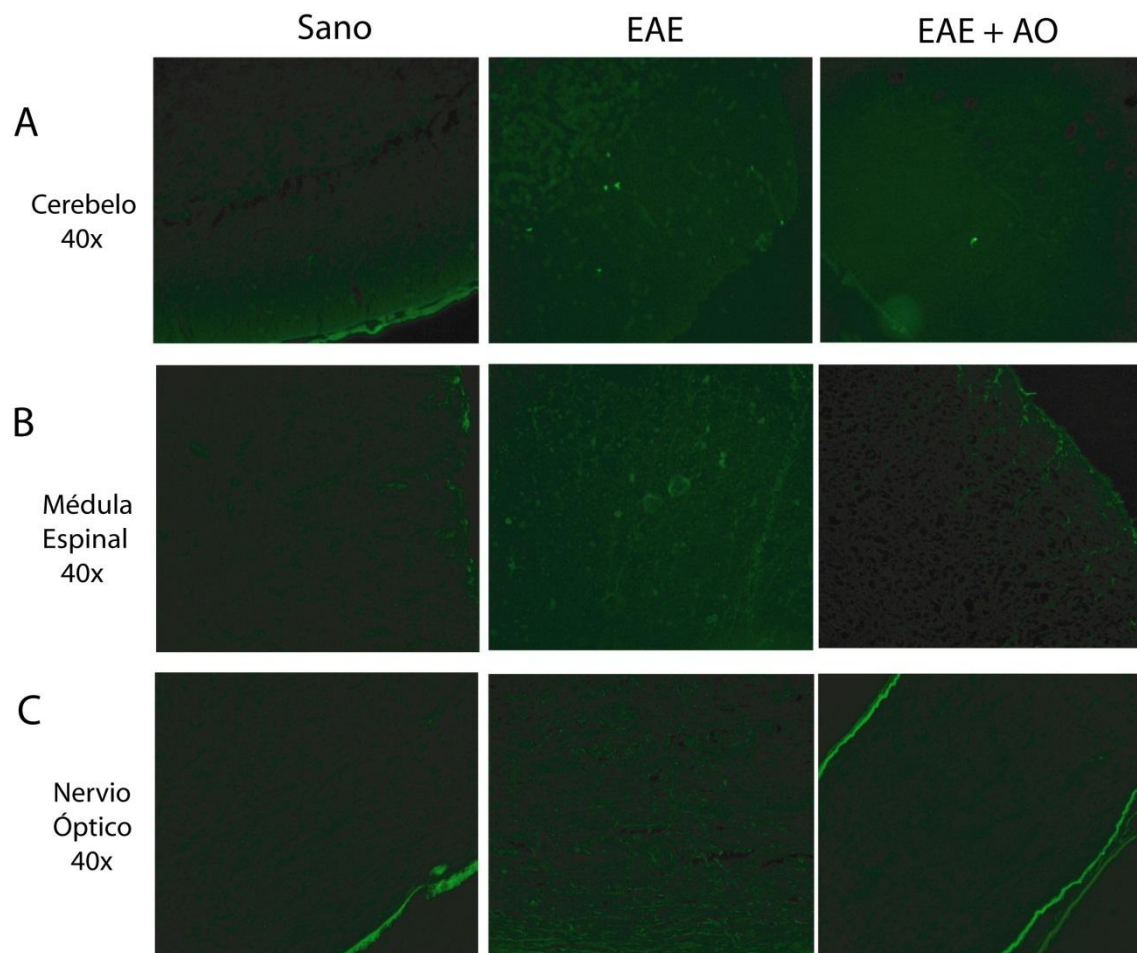
**Figura 32 – El tratamiento con AO disminuye el número de células apoptóticas presentes en los tejidos del sistema nervioso.** El número de células apoptóticas en cerebelo (A) y nervio óptico (B) se analizó mediante la técnica de TUNEL. Para el análisis cuantitativo el cerebelo se dividió en zonas: sustancia gris (A2 y A3) y sustancia blanca (A1). El conteo en la sustancia gris se subdividió a su vez en: zona molecular (A2) y zona granular (A3). En el nervio óptico se contaron las células apoptóticas por todo el corte histológico (B). Imagen representativa de la tinción en nervio óptico (B1). Los resultados se mostraron como una media  $\pm$  SD; n=5 animales por grupo. Control sano: C; control AO: AO; enfermos: EAE; animales enfermos tratados con AO: EAE+AO. (\*p<0,05 versus control; \*\* p<0,05 versus EAE). (Objetivo 20x).



## Resultados

También se analizó la neurodegeneración mediante el marcaje con Fluoro Jade C, en los diferentes tejidos. En el cerebelo de los animales EAE (Figura 33), se observó un aumento de neuronas Fluoro jade C positivas en la sustancia gris en relación al control sano. La degeneración neuronal (Fluoro jade C positivas) en la médula espinal (Figura 33 B) de los animales enfermos, también se observó aumentada en relación a los animales sanos y en relación a los animales EAE tratados con AO. En el nervio óptico (Figura 33 C) de los animales enfermos sin tratamiento se observó un aumento de la neurodegeneración axonal respecto a los animales sanos.

La neurodegeneración en todos los tejidos del sistema nervioso analizados, se observó disminuida con el tratamiento con AO en los animales enfermos.



**Figura 33 – El tratamiento con AO protege de la neurodegeneración.** Se tiñeron con Fluoro Jade C secciones de cerebelo (A), médula espinal (B) y nervio óptico (C), siguiendo las instrucciones del fabricante. n=5. Objetivos 40x

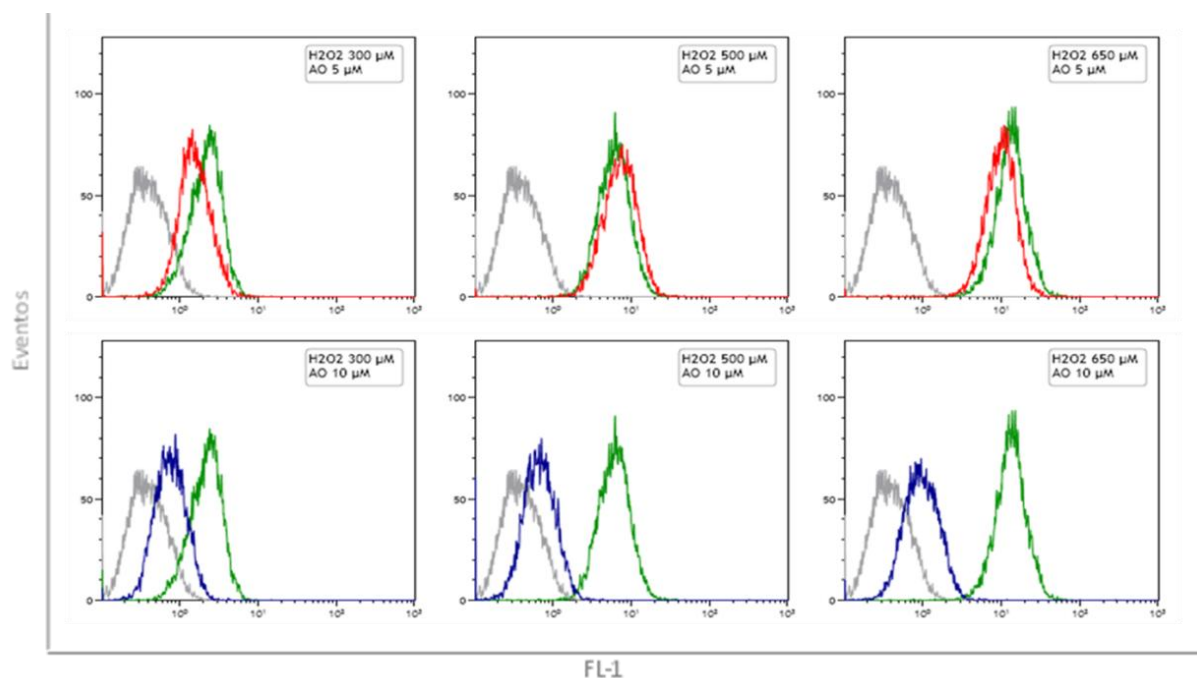
## 1.2 Estudios *In Vitro*: Células ganglionares de retina (RGC-5)

Varios estudios han demostrado la afectación de las células ganglionares de la retina y del nervio óptico, por un aumento de actividad de ROS. El aumento de la actividad de ROS está vinculado a muchas enfermedades neurodegenerativas con pérdida axonal y neuronal [25, 31, 205].

En este trabajo hemos evaluado el efecto del AO *in vitro* en la inducción de ROS y muerte celular, mediante el tratamiento de las células ganglionares de retina (RGC-5) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (una fuente de ROS exógena), en la presencia o ausencia del AO.

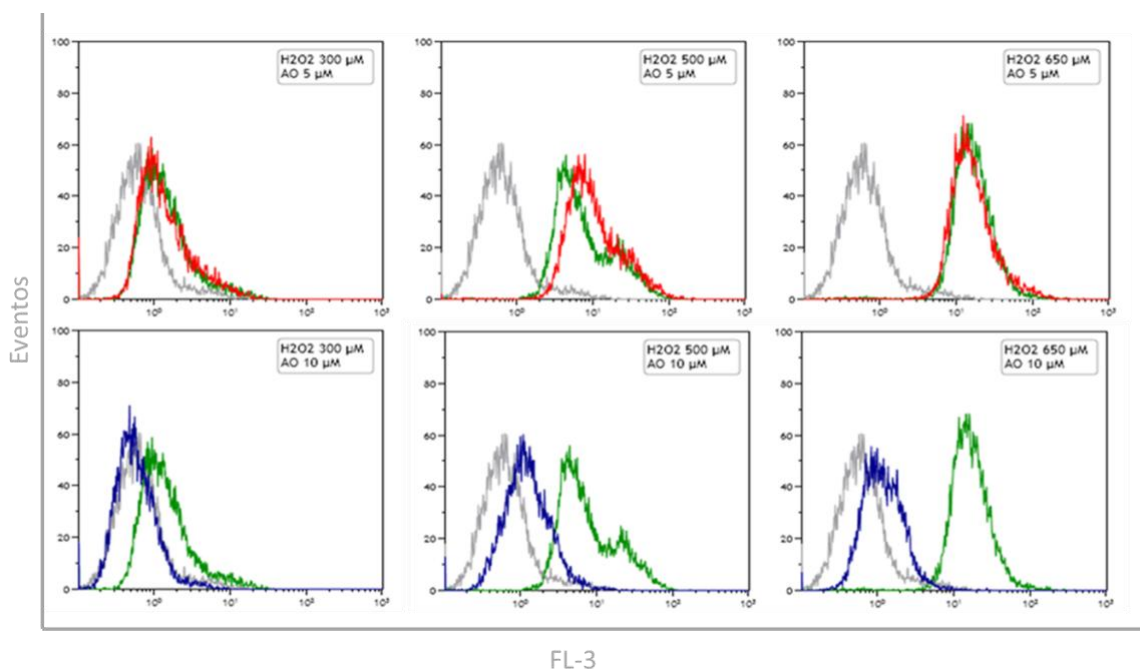
### 1.2.1 El tratamiento con AO inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se analizó el efecto del tratamiento con AO en la producción de ROS *in vitro* en la línea celular RGC-5, mediante la sonda DCFHDA. Las RGC-5 se trataron con varias dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min a 37<sup>0</sup>C, en presencia y ausencia de AO como fue descrito en materiales y métodos. El incremento en la fluorescencia de la diclorofluoresceína (DCF) en las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respecto al control, nos indica que existe un aumento en la producción de ROS (Figura 34). El análisis de los resultados obtenidos nos indica que el pretratamiento de las células con AO bloqueó la producción intracelular de ROS.



**Figura 34 - El tratamiento con AO disminuye de forma dosis dependiente la producción del peróxido de hidrógeno.** Las células fueron pre-tratadas con AO y estimuladas con diferentes dosis  $H_2O_2$  durante 30 minutos. Las células se marcaron con la sonda DCFHDA y se analizaron mediante citometría de flujo. Gris: control; Verde: control; Rojo: AO  $5\mu M$ ; Azul: AO  $10\mu M$ .

También se analizó la producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) mediante la sonda específica DHE. Las células RGC-5 fueron tratadas con diferentes dosis de  $H_2O_2$  durante 30 minutos a  $37^{\circ}C$ , en presencia o ausencia de AO (Figura 35). De nuevo, se observó que el tratamiento con AO fue efectivo a la dosis de  $10\mu M$  protegiendo de la producción de  $O_2^-$ .



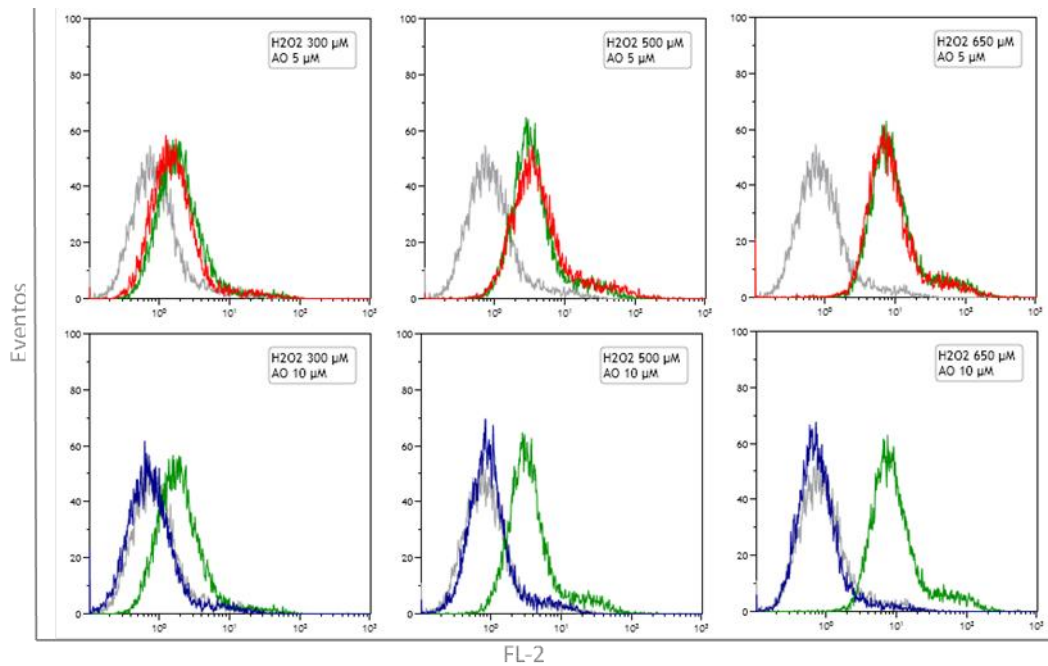
**Figura 35 - El tratamiento con AO disminuye de forma dosis dependiente la producción del anión superóxido.** Las células fueron pre-tratadas con AO y estimuladas con diferentes dosis  $H_2O_2$  durante 30 minutos. Las células se marcaron con DHE y se analizaron mediante citometria de flujo. Gris: control; Verde: control; Rojo: AO 5 $\mu$ M; Azul: AO 10 $\mu$ M.

### 1.2.2 El tratamiento con AO protege de la muerte celular inducida por el $H_2O_2$

A continuación evaluamos el efecto del pretratamiento con AO en la muerte celular por apoptosis. Para ello se realizaron experimentos con la Anexina-V conjugada con ficoeritrina (PE). Esta sonda fluorescente se une a la fosfatidil serina. En situación fisiológica la fosfatidil serina se encuentra localizada exclusivamente en la capa interna de la membrana plasmática. Sin embargo, en apoptosis este fosfolípido se externaliza y se hace accesible para la Anexina-V que se une específicamente a él.

Se realizó una curva dosis-respuesta con diferentes dosis de  $H_2O_2$  (300, 500, 650 $\mu$ M) incubadas durante 24h a 37 $^{\circ}$ C, en presencia y ausencia del AO. En la figura 36 se puede observar que el  $H_2O_2$  indujo un aumento dosis-dependiente de células positivas para Anexina-V. En la presencia del AO a la dosis de 10 $\mu$ M no se observaron

células anexina-v positivas, lo que sugiere que este compuesto protege de la muerte celular.



**Figura 36 - El tratamiento con AO disminuí de forma dosis dependiente la muerte celular.** Las células fueron estimuladas con diferentes dosis  $H_2O_2$  durante 24 horas en presencia de AO. Las células se marcaron con anexina-V y se analizaron mediante citometria de flujo. Gris: control; Verde: control; Rojo: AO 5 $\mu$ M; Azul: AO 10 $\mu$ M.

## 2. Miocarditis

En este apartado estudiaremos el efecto terapéutico del tratamiento con AO en un modelo autoinmune experimental de miocarditis: MAE. Estudiaremos parámetros macroscópicos (índice peso corazón/peso corporal) y microscópicos (infiltrado celular, fibrosis, depósitos de calcio). Analizaremos la respuesta inflamatoria (citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias) e inmune (auto-anticuerpos y capacidad de los linfocitos de producir citoquinas y su proliferación).

Analizaremos *in vitro* la influencia del AO en células relevantes del remodelado cardiaco.

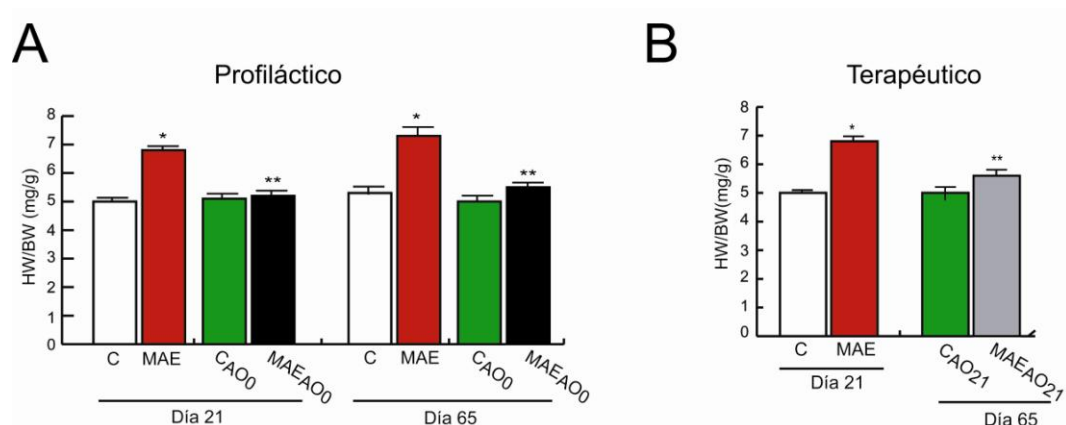
### **2.1 Efectos beneficiosos del tratamiento con AO en un modelo experimental autoinmune de miocarditis: MAE**

Con el objetivo de estudiar el efecto del AO en la miocarditis, se ha utilizado un modelo libre de virus, propuesto por *Pummerer et al*: Miocarditis autoinmune experimental (MAE) [119]. Se emplearon ratones BALB/c, inmunizados con un péptido de la cadena pesada  $\alpha$ -miosina (MyCH $\alpha_{614-629}$ ) como se explicó en materiales y métodos.

#### **2.1.1 El tratamiento con AO mejora la severidad de la miocarditis en el modelo animal MAE**

Los animales se trataron diariamente con 50mg/kg/peso corporal de AO, desde el día de la inmunización (protocolo profiláctico: AO<sub>0</sub>) o desde el día 21 post-inmunización (protocolo terapéutico: AO<sub>21</sub>) y se sacrificaron en el día 21 (fase aguda de la enfermedad) o el día 65 (fase crónica de la enfermedad).

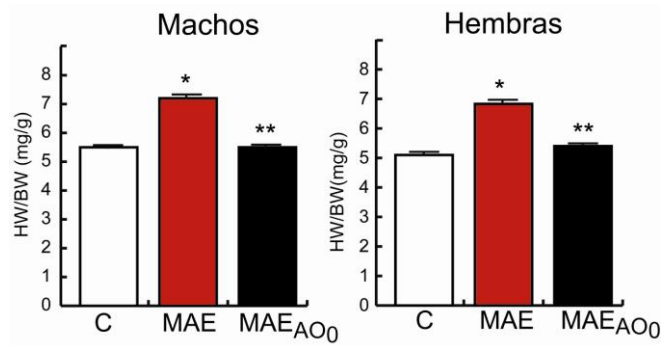
La hipertrofia cardiaca se detectó por el aumento de la relación peso corporal/el peso del corazón (HW/BW) (Figura 37).



**Figura 37 – El tratamiento con AO mejora la hipertrofia cardiaca en ratones MAE.** Se emplearon ratones BALB/c y se indujo la MAE mediante el péptido de MyCH $\alpha_{614-629}$ . El tratamiento i.p. con AO (50mg/kg/peso) se administró diariamente desde (A) el día de la inmunización (protocolo profiláctico - AO<sub>0</sub>) o desde (B) el día 21 post-inmunización (protocolo terapéutico - AO<sub>21</sub>). Se sacrificaron los animales en el día 21 (fase aguda) o en el día 65 (fase crónica) post-inmunización. Los resultados se mostraron como la media  $\pm$  SD; n=15 animales por grupo. (\*p < 0,001 versus control y \*\*p < 0,001 versus MAE).

En los ratones MAE sacrificados el día 21 se observó un índice HW/BW (Figura 37 A) significativamente mayor (38 %, p<0,001) que en el grupo de ratones control. Los animales MAE tratados con AO presentaron una reducción significativa en la relación HW/BW (30%, p<0,001) respecto al grupo MAE que no recibió ningún tratamiento. La relación HW/BW, en el día 65 post-inmunización, siguió un patrón similar al observado en el día 21. Es interesante señalar que en el protocolo terapéutico (Figura 37 B), la relación HW/BW también fue significativamente menor en comparación con los ratones MAE no tratados. De hecho, no se observaron diferencias significativas entre los animales controles sanos y los animales MAE tratados con AO desde el día 21 post-inmunización. Además, tampoco se encontraron diferencias en la relación del peso corporal y en el peso cardiaco entre los animales sanos y los animales sanos tratados con AO, lo que sugiere que este compuesto no afecta al crecimiento general de los animales.

En nuestras condiciones experimentales no hubo diferencias significativas en el índice HW/BW dependiente del género de los animales (Figura 38).



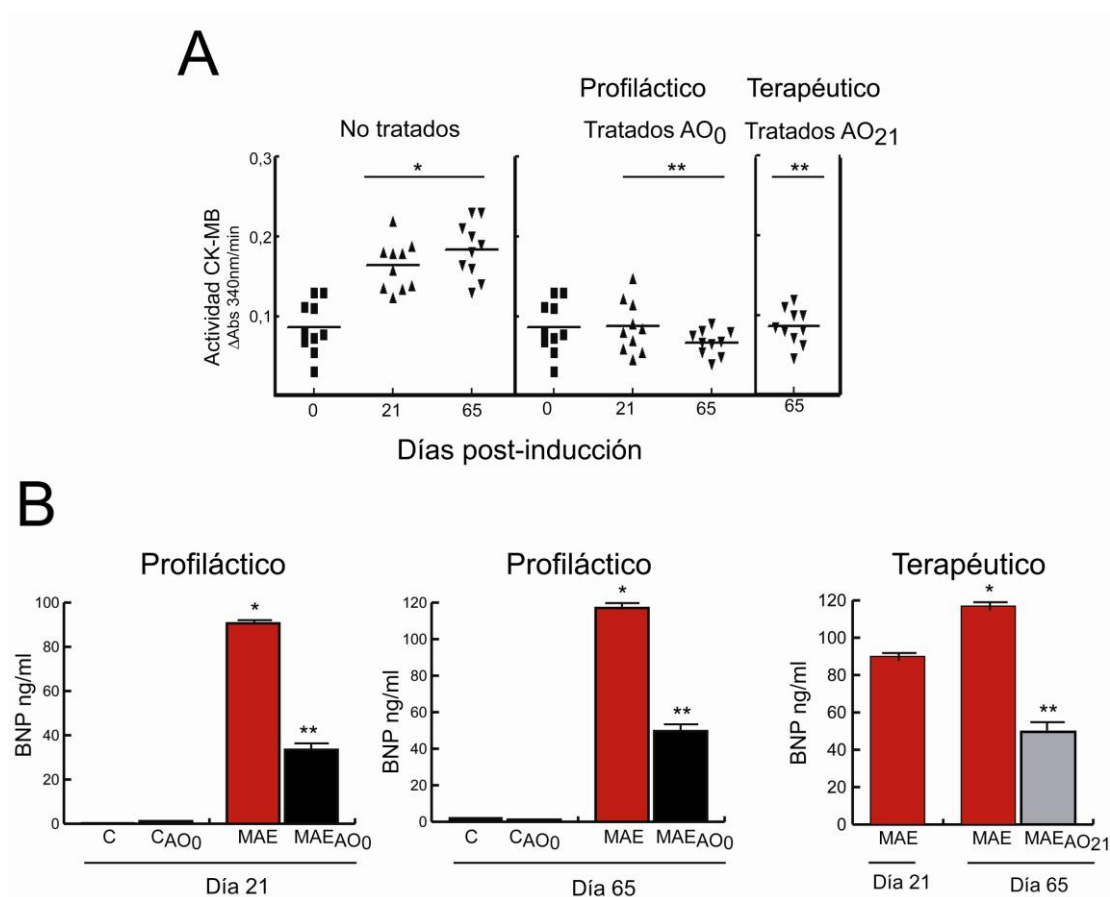
**Figura 38 – No hay diferencias en la relación peso corporal/peso del corazón (HW/BW), entre géneros.** Se indujo la MAE en ratones BALB/c (machos y hembras)

mediante el péptido de MyCH $\alpha_{614-629}$ . El tratamiento i.p. con AO (50mg/kg/peso) se administró diariamente. Se sacrificaron los animales en el día 65 (fase crónica) post-inmunización. Los resultados se mostraron como la media  $\pm$  SD; n=15 animales por grupo. (\*p < 0,001 versus control y \*\*p < 0,001 versus MAE).

### 2.1.2 El tratamiento con AO reduce los niveles séricos de marcadores de daño cardiaco en animales MAE

Como marcadores de daño cardiaco se evaluaron, en suero, la actividad de la isoenzima CK-MB y la concentración de BNP. En la figura 39 están representados los niveles de la actividad de CK-MB (A) y BNP (B) de los diferentes grupos en experimentación. Se observó que en los animales con MAE la actividad de la isoenzima CK-MB y los niveles de BNP están significativamente aumentados, con respecto a los animales control, tanto en la fase aguda como crónica. El tratamiento con AO, en los dos protocolos (profiláctico y terapéutico), redujo significativamente la actividad de CK-MB, y los niveles de BNP. Esto sugiere que el tratamiento con AO previene del daño cardiaco causado por la miocarditis.





**Figura 39 – El tratamiento con AO disminuye la concentración, sérica, de biomarcadores del daño cardíaco.** Se indujo la MAE mediante la inmunización con el péptido de MyCH $\alpha_{614-629}$ . Los animales se trataron diariamente con AO siguiendo el protocolo profiláctico (AO<sub>0</sub>) y terapéutico (AO<sub>21</sub>) y se sacrificaron en el día 21 o en el día 65 post-inmunización. Se midieron los marcadores del daño cardíaco CK-MB (A) y BNP (B) en muestras de suero. Los valores son la media  $\pm$  SD; n=7 animales por grupo. (\*p < 0,001 versus control y \*\*p < 0,001 versus MAE).

### 2.1.3 El tratamiento con AO disminuye la severidad histopatológica en animales MAE

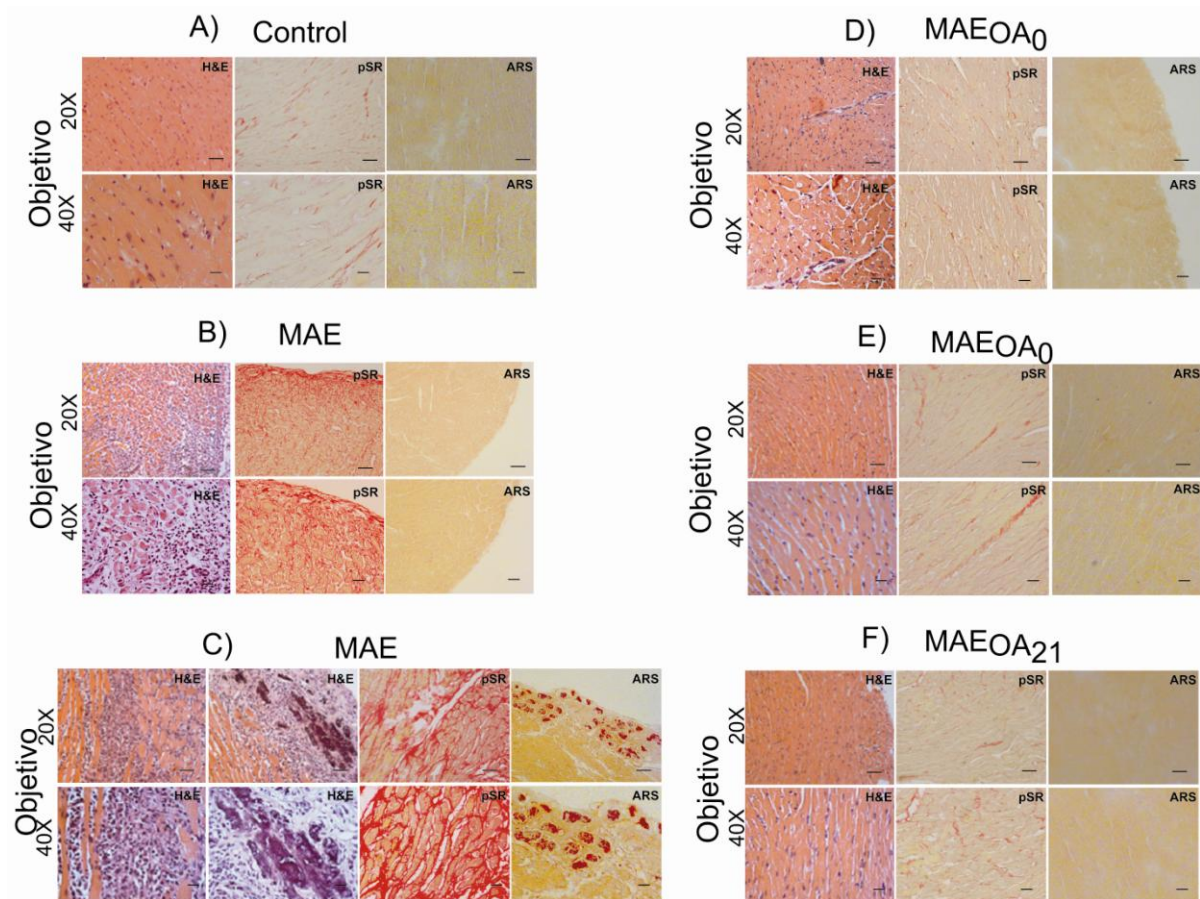
En nuestro análisis macroscópico se observó un aumento en el tamaño del corazón en los ratones MAE así como áreas de calcificación, en relación a los ratones sanos y a los ratones MAE tratados con AO (Figura 40).



**Figura 40 – El tratamiento con AO previene la aparición de depósitos de calcio.** Imagen representativa de corazones de los diferentes grupos experimentales hasta la fase crónica de la enfermedad (día 65).

A continuación, para estudiar el grado de infiltración celular, la fibrosis y la calcificación, se realizaron tinciones histopatológicas con H&E, pSR y ARS respectivamente, en tejido cardíaco de ratones sacrificados al día 21 o 65 post-inducción. Observamos que en los animales control no inmunizados, las tinciones H&E, pSR y ARS (Figura 41 A) no revelaron ninguna evidencia de infiltración celular, fibrosis o deposición de calcio. Sin embargo, en los cortes histológicos de los ratones MAE no tratados, tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad, hubo un aumento del infiltrado inflamatorio, de colágeno y de placas de calcio, en respecto a los de corazones de los animales control sanos. En los distintos protocolos de tratamiento profiláctico (AO<sub>0</sub>), tanto en los ratones sacrificados en la fase aguda (día 21) como en la fase crónica (día 65) de la enfermedad, se observó una disminución, de dichos parámetros histológicos (Figura 41).

Curiosamente, en los animales del grupo del tratamiento terapéutico (AO desde el día 21 post-inducción: MAE<sub>AO21</sub>), también mostraron una pronunciada reducción de los signos histológicos del daño cardíaco, de modo que sólo se observó una infiltración celular residual, sin fibrosis ni depósitos de calcio.



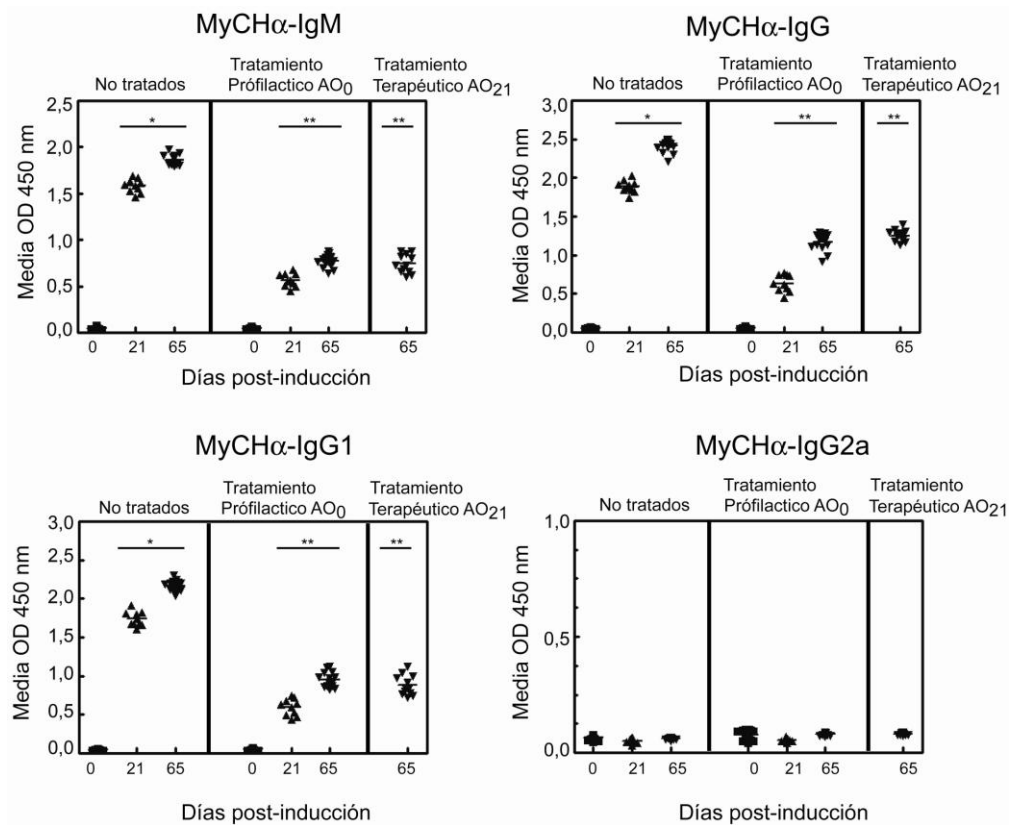
**Figura 41 – El tratamiento con AO previne la aparición de lesiones cardiacas.** Secciones de tejido cardiaco se tiñeron con Hematoxilina & Eosina (H&E) para infiltración celular, Rojo p-Sirios (pSR) para fibrosis y Rojo de Alizarin S (ARS) para los depósitos de calcio. Las imágenes representativas B y D corresponden a los grupos en experimentación en la fase aguda (día 21 post-inducción) y las imágenes A, C, E y F corresponden a la los animales en la fase crónica de la enfermedad (día 65 post-inducción). Objetivo 40x.

### 2.1.4 El tratamiento con AO reduce la presencia de auto-anticuerpos en ratones MAE

Los niveles de auto-anticuerpos frente antígenos cardiacos se encuentran elevados en la miocarditis autoinmune y es indicativa del daño cardiaco. La determinación de la respuesta autoinmune en ratones MAE se realizó mediante el análisis de anticuerpos anti-miosina, evaluando la concentración de inmunoglobulinas en el suero. La respuesta especifica IgG e IgM está asociada positivamente con la gravedad de la enfermedad ( $p < 0,001$ ): los altos niveles de anticuerpos encontrados en

los ratones MAE (Figura 42) se redujeron significativamente en los ratones MAE tratados con AO, independientemente del protocolo de tratamiento utilizado: profiláctico (AO<sub>0</sub>) o terapéutico (AO<sub>21</sub>). El examen de las subclases de IgG mostró que anti-IgG1, pero no IgG2a, se correlaciona con la presencia de enfermedad. Los niveles de anticuerpos anti-MyHC $\alpha$  tipo IgG1 se encontraron marcadamente elevados en la fase aguda (día 21) de los ratones MAE no tratados ( $1,71\pm 0,03$ ) en comparación con los niveles observados en los ratones sanos ( $0,045\pm 0,003$ ,  $p<0,001$ ) o en relación a los ratones sanos tratados con AO ( $0,04\pm 0,002$ ,  $p<0,001$ ). La administración del AO a ratones MAE redujo significativamente la producción de anticuerpos anti-MyHC $\alpha$  IgG1 ( $0,609\pm 0,033$ ,  $p<0,001$ ). Un patrón similar al del día 21, se observó en el día 65. Los niveles séricos de anticuerpos anti-MyHC $\alpha$  tipo IgG1 fueron:  $2,16\pm 0,017$  en el grupo MAE no tratados,  $0,95\pm 0,025$  en el grupo MAE tratados con AO<sub>0</sub>, y  $0,87\pm 0,037$  en el grupo MAE tratados con AO a partir del día 21 ( $p<0,001$ ).

En el análisis del isótipo IgG2a los niveles de anti-MyHC $\alpha_{614-629}$  en suero fueron similares en todos los grupos experimentales.

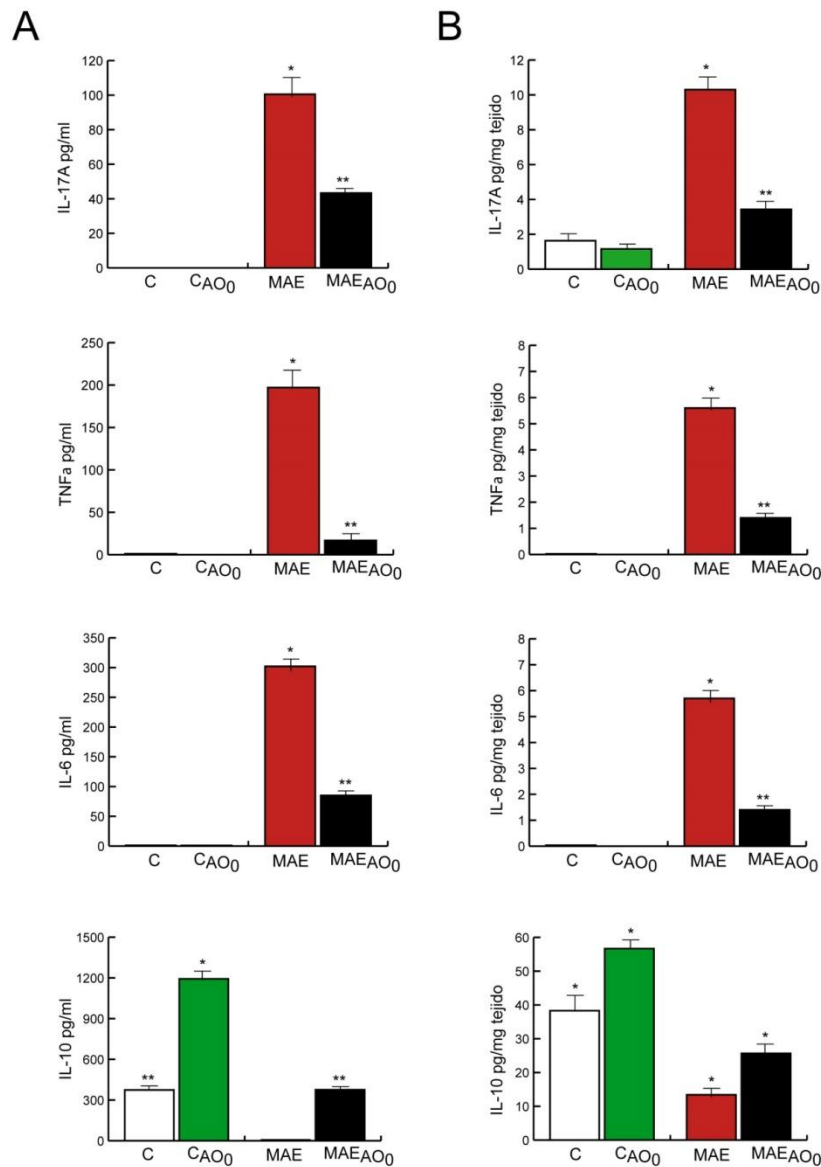


**Figura 42 - El tratamiento con AO modula los niveles séricos de auto-anticuerpos MyCHα.** En el día 21 y 65 después de la inmunización con MyCHα<sub>614-629</sub>, se evaluaron, en suero, las distintas inmunoglobulinas específicas mediante ELISA (dilución de 1:60) como se explica en el apartado material y métodos. Los resultados se mostraron con la media ± SD; n=7 en todos los grupos (p < 0,001 ratones MAE frente a los animales control, p < 0,001 AO - ratones tratados MAE frente a los animales con MAE sin tratamiento).

### 2.1.5 El tratamiento con AO modula los niveles de citoquinas relevantes en ratones MAE

Puesto que la miocarditis es un proceso inflamatorio, a continuación analizamos la presencia de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en suero (Figura 43 A) y tejido cardíaco (Figura 43 B). En la fase aguda de la enfermedad (día 21 post-inmunización) los niveles de las citoquinas IL-17, IL-6 y TNF-α se encontraron significativamente aumentadas en los ratones MAE no tratados, en relación a los animales control y a los animales MAE tratados (AO<sub>0</sub>).

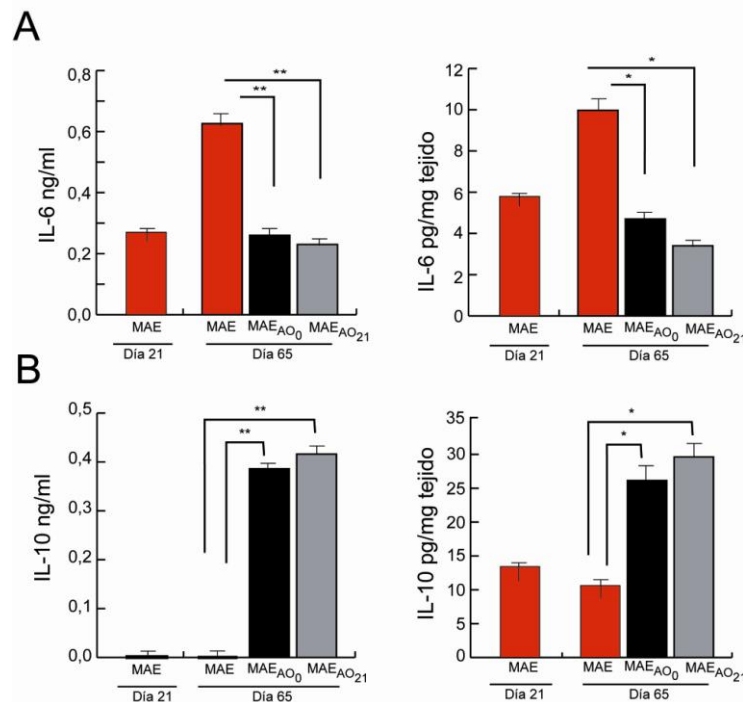
Los niveles de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en animales MAE no tratados se encontraron disminuidos en comparación con los niveles observados en los animales sanos, o en relación a los animales sanos tratados con AO. Sin embargo, los niveles séricos (Figura 43 A) y tisulares (Figura 43 B) de IL-10 en animales MAE tratados con AO aumentaron significativamente con respecto a los animales MAE no tratados.



**Figura 43 – El tratamiento con AO modula los niveles de citoquinas relevantes en animales MAE.** Los niveles de citoquinas IL-17, IL-6 y TNF-α y IL-10 se analizaron en muestras de suero (A) y tejido cardíaco (B), de animales de los diferentes grupos en el día 21 post-inmunización. Los resultados se expresaron con la media ± SD; n=7 animales por grupo. Las diferencias estadísticamente significativas se indicaron con \*p<0,001 con respecto al control, y \*\*p<0,001 en comparación con los no tratados MAE.

A continuación, evaluamos los niveles de una citoquina representativa de la respuesta Th1: IL-6, y una citoquina representativa de la respuesta Th2: IL-10. Los ratones se trataron con AO siguiendo los dos protocolos: el protocolo profiláctico (AO<sub>0</sub>) y el protocolo terapéutico (AO<sub>21</sub>) y se sacrificaron a los 65 días post-inducción. En la figura 44 se puede observar que la producción de la citoquina pro-inflamatoria: IL-6, está significativamente disminuida en los animales tratados con AO (AO<sub>0</sub> y AO<sub>21</sub>), con respecto a los animales MAE no tratados. Sin embargo, los niveles de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 se presentan más altos en los grupos de los animales MAE tratados con AO (AO<sub>0</sub> y AO<sub>21</sub>) con respecto a los animales MAE no tratados.

Curiosamente a los 65 días post inducción, no se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-6 e IL-10 independientemente del tipo de protocolo de tratamiento (profiláctico o terapéutico), lo que sugiere que la administración del AO, como tratamiento terapéutico es tan eficiente como el tratamiento profiláctico, en la reducción de la respuesta inflamatoria.

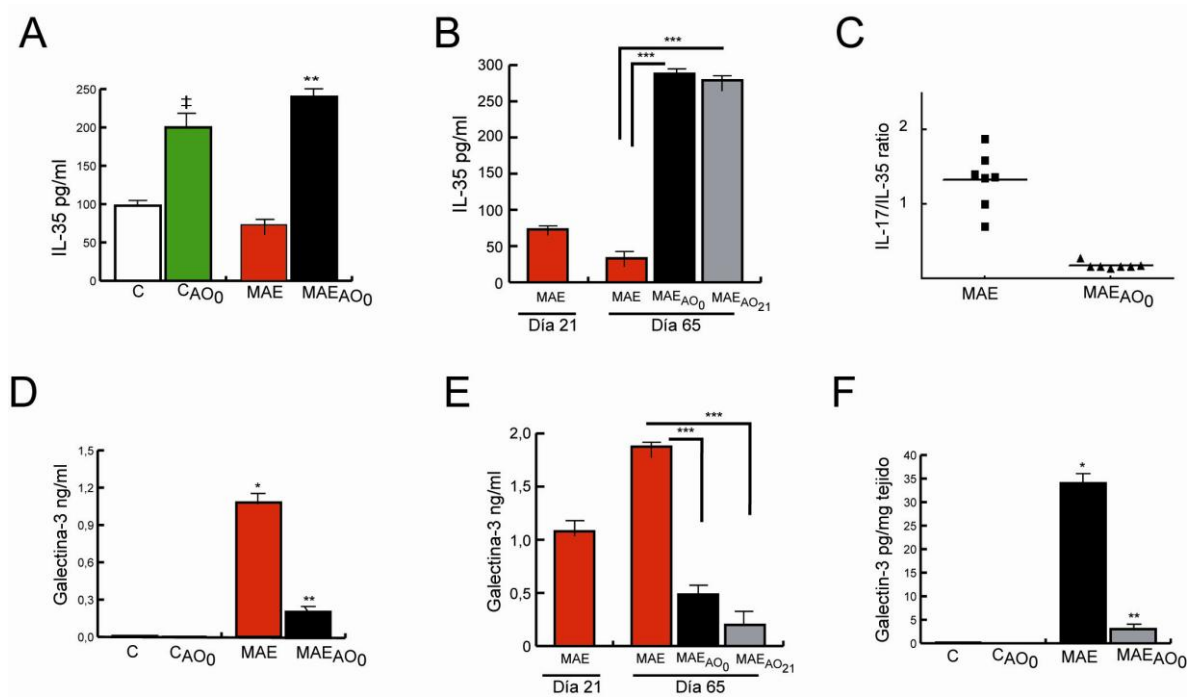


**Figura 44 - El efecto del tratamiento con el triterpeno en los niveles de las citoquinas IL-6 y IL-10.** Se midieron las concentraciones de IL-6 (A) y IL-10 (B) en suero y extractos de tejido cardiaco en animales en la fase aguda (día 21) y en la fase crónica (día 65) post-inmunización. Los resultados se expresaron con la media  $\pm$  SD; n=7 animales por grupo. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con \*p<0,001 y \*\* p<0,001.

A continuación, se analizaron los niveles séricos de IL-35, una citoquina T reguladora (Treg) que está involucrada en la modulación de la respuesta Th17. En la fase aguda de la enfermedad (día 21 post-inducción) los niveles de IL-35 (Figura 45) en los animales tratados con el protocolo profiláctico AO<sub>0</sub>, fueron significativamente mayores que en los animales no tratados (tanto sanos como MAE). Este incremento también se observó en el suero de los ratones MAE tratados según el protocolo AO<sub>21</sub> (Figura 45 B). En el cálculo del índice IL-17A/IL-35 en los grupos MAE y MAE+AO<sub>0</sub> se observó un ratio de  $1,32 \pm 0,14$  y  $0,18 \pm 0,01$ , ( $p < 0,05$ ), respectivamente (Figura 45 C).

Por último, se cuantificaron los niveles de Galectina-3, un marcador biológico que conecta la inflamación con la fibrosis cardiaca y el remodelado adverso [206, 207]. Como se puede observar en la figura 45 D y E, los niveles séricos de galectina-3 están aumentados en los grupos de los ratones MAE no tratados, tanto en la fase crónica como en la fase aguda de la enfermedad. Estos niveles elevados disminuyen cuando los animales MAE son tratados con AO, tanto en el protocolo profiláctico (AO<sub>0</sub>) como en el protocolo de terapéutico (OA<sub>21</sub>). El patrón de expresión de galectina-3 en tejido cardiaco, fue similar al encontrado en suero (Figura 45 F).





**Figura 45 – El efecto del tratamiento con AO en los niveles de galectina-3 y IL-35 en ratones MAE.** Las concentraciones de galectina-3 y IL-35 se midieron en muestras de suero y extractos de tejido cardíaco de ratones en la fase aguda (A, D, F) y en la fase crónica (B y E) de la MAE. Ratio de citoquinas Th17/Th2 en el día 21 post-inmunización, en suero de los ratones MAE tratados y no tratados con AO (C). Las barras representan las medias  $\pm$  SD; n=7 animales por grupo. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con \*p<0,001 y ‡ p<0,001 en respecto al control, y \*\*p<0,001 y \*\*\*p<0,01 en respecto a los animales MAE no tratados.

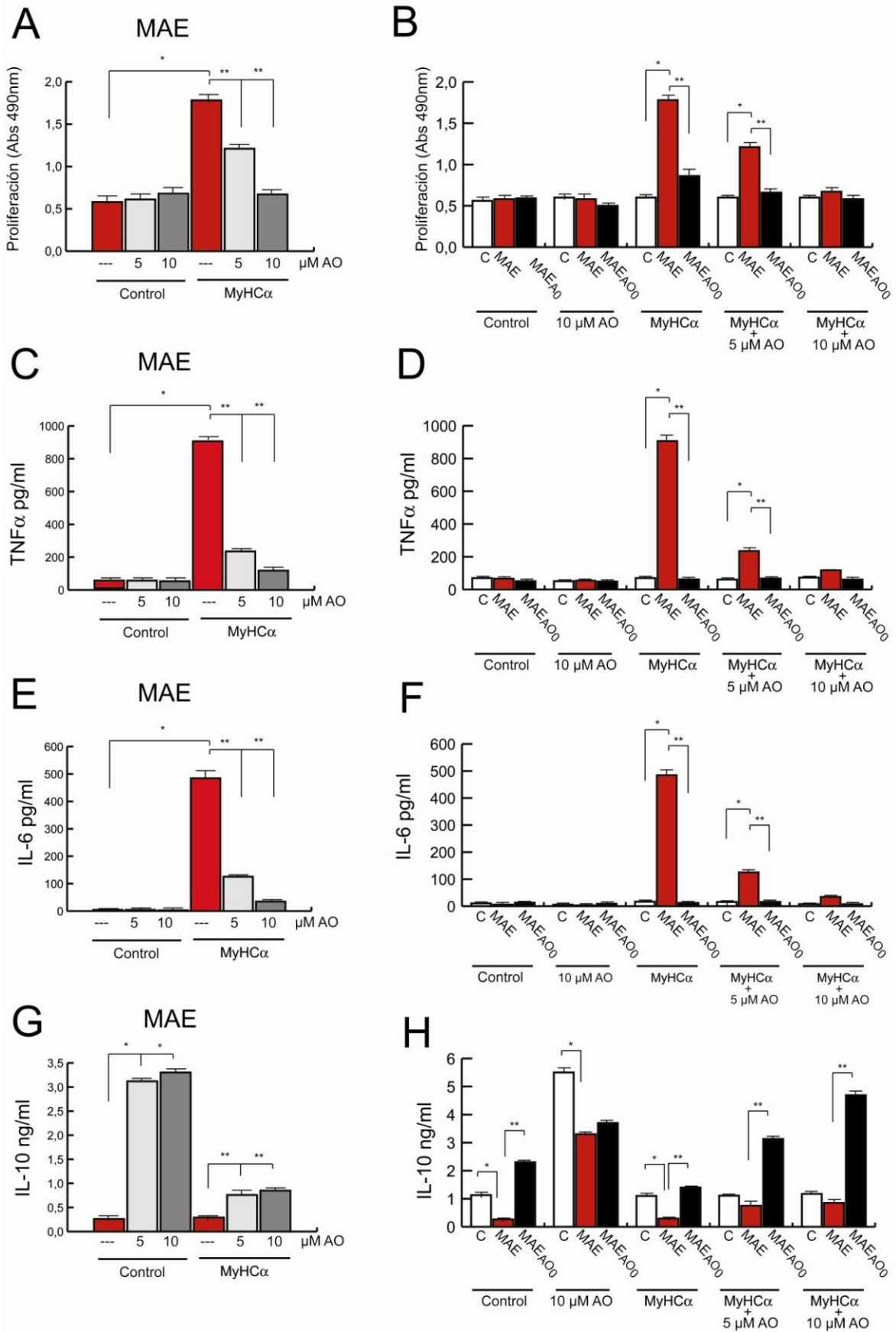
### 2.1.6 El tratamiento con AO regula la respuesta de las células inmunes en ratones MAE

*El tratamiento con AO altera la proliferación de linfocitos y la liberación de citoquinas ex-vivo*

Para evaluar si el tratamiento con AO afecta a la respuesta inmune, se evaluó la función de los esplenocitos aislados de ratones de los distintos grupos de experimentación. Para ello, se aislaron células de bazo y se analizó la proliferación y la producción de citoquinas en respuesta al péptido MyCH $\alpha_{614-629}$ , en presencia o ausencia de diferentes dosis de AO. Como se muestra en la figura 46, la proliferación y

la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  se encontró significativamente elevada en los esplenocitos de los animales MAE no tratados, y la presencia del OA bloqueó esta respuesta de manera dosis dependiente (Figura 46 A, C y E). Los esplenocitos de los ratones sanos respondieron con una baja tasa de proliferación y de liberación de IL-6 y TNF- $\alpha$  en la presencia al MyCH $\alpha_{614-629}$ , así como tampoco hubo una importante respuesta en las células del bazo de los ratones MAE<sub>AO0</sub> (Figura 46 B, D y F). En lo que se refiere a la liberación de IL-10, una citoquina anti-inflamatoria, se observó que los esplenocitos de los ratones MAE, estimulados con MyCH $\alpha_{614-629}$  no presentaron alteración en su respuesta, sin embargo en la presencia del AO, se observó un aumento significativo en la liberación de IL-10 tanto a nivel basal como en las células estimuladas con el péptido (Figura 46 G).

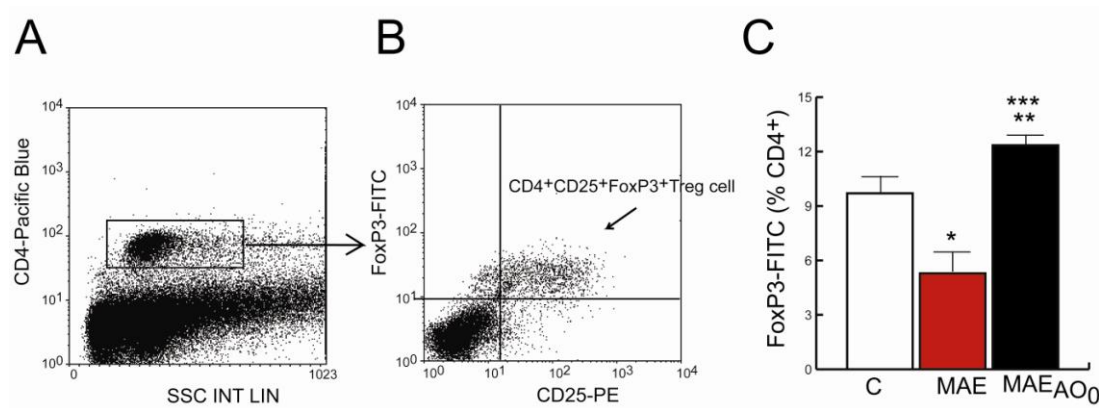
En concordancia con estos resultados, los cultivos de las células de bazo de los ratones MAE tratados desde el inicio de la inmunización (MAE<sub>AO0</sub>), produjeron más cantidad de IL-10 que los ratones MAE no tratados (Figura 46 H).



### **Figura 46 – El tratamiento con AO modula la respuesta específica de las células esplénicas de los ratones con MAE: Proliferación y liberación de citoquinas *ex-vivo*.**

Las células fueron tratadas durante 24 horas con 100µg/ml de MyCHα en presencia o ausencia de las dosis indicadas de AO, y se midió la proliferación celular (A y B). Se procedió a la cuantificación de las citoquinas TNF-α, IL-6 y IL-10 en los sobrenadantes de las células esplénicas (C - H). Las barras representan la media ± SD; n=5 ratones por grupo. \* y \*\*p<0,001.

A continuación se analizaron las poblaciones presentes en el bazo de ratones MAE con y sin tratamiento: células T CD3<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup> y células T CD8<sup>+</sup>, macrófagos/monocitos CD14<sup>+</sup>, células B CD19<sup>+</sup> y células Treg Foxp3<sup>+</sup>, mediante citometría de flujo. Se aislaron las células del bazo de los diferentes grupos experimentales el día 21 post-inducción enfermedad (fase aguda). No se encontraron diferencias significativas en la proporción de células T CD3<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup>, y células T CD8<sup>+</sup>, macrófagos/monocitos CD14<sup>+</sup>, y células B CD19<sup>+</sup>, entre los diferentes grupos experimentales (datos no presentados). Sin embargo, como se puede observar en la figura 47 A, B y C, se observaron cambios en el porcentaje las células Treg CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup>. En los animales MAE no tratados el porcentaje de células Treg disminuyó significativamente tanto con respecto a los animales control como en relación a los animales MAE tratados con AO. Se pudo observar también que los animales MAE tratados con AO presentaron una mayor frecuencia de células Tregs, con respecto a los animales control.



**Figura 47 – El tratamiento con AO modula la respuesta Treg.** Dot plot representativo (A y B) del análisis en citometría de flujo de las células aisladas de bazo al día 21 post-inmunización, de los diferentes grupos experimentales. Porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> (A). Porcentaje de células Treg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) en las células T CD4<sup>+</sup> (B). Linfocitos Treg en una proporción de células T CD4<sup>+</sup> de células de bazo de los animales controles MAE sin tratar y MAE tratados con AO (C). Los resultados son de una media de n=7 por grupo. SSC, Side - scatter. p<0,001 versus animales control \*\*p<0,05 versus ratones de control, y \*\*\*p<0,001 versus MAE.

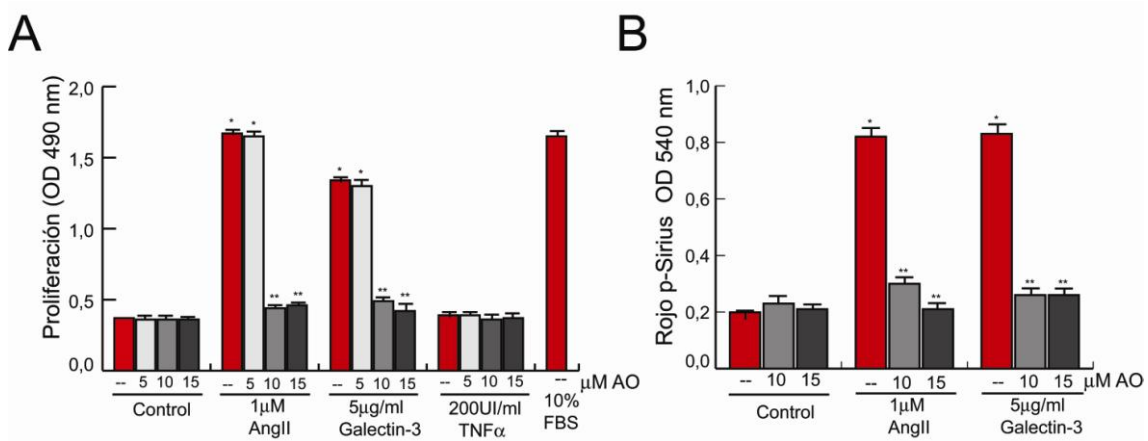
## 2.2 Estudios *in vitro*: El efecto beneficioso del tratamiento con AO sobre el remodelado cardiaco - cardioblastos primarios y cardiomiocitos (HL-1 y H9c2)

### 2.2.1 El tratamiento con AO ejerce un efecto protector sobre las células cardiacas

Finalmente para estudiar si el efecto del AO sobre el remodelado cardiaco encontrado *in vivo*, implica acciones directas sobre cardioblastos (C.F) y cardiomiocitos (H9c2 y H-1) se realizaron estudios *in vitro*.

Para ello, las células se estimularon con agonistas relevantes en la miocarditis: Angiotensina II (Ang-II), TNF- $\alpha$  y galectina-3. Los fibroblastos cardiacos (C. F.) se estimularon con Ang-II y galectina-3. Se observó un aumento de proliferación celular (Figura 48 A), que fue significativamente reducida en la presencia del AO. Las células

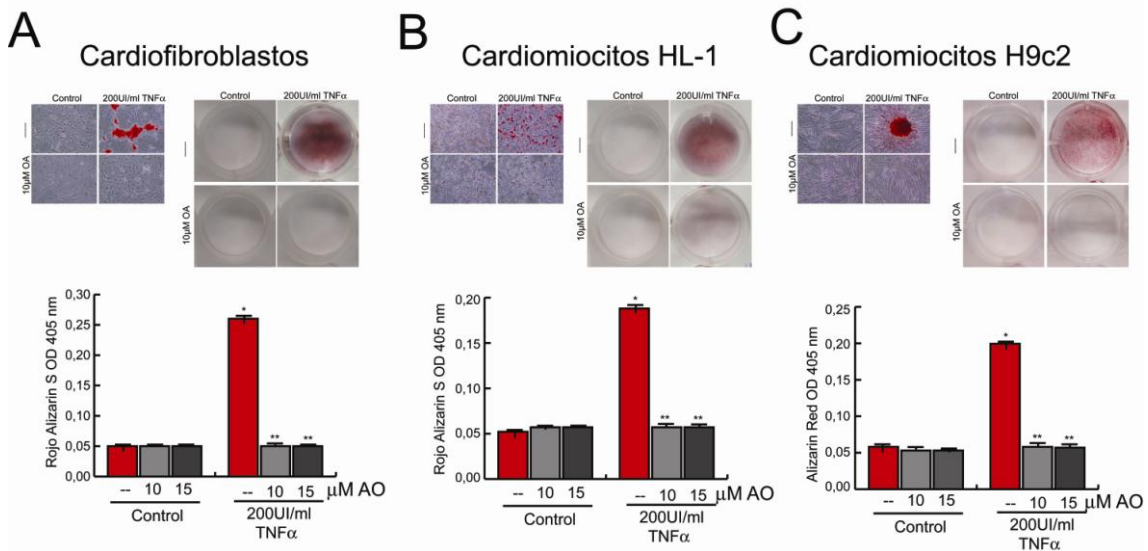
estimuladas con TNF- $\alpha$  no alteraron sus niveles de proliferación. A continuación se verificó que el tratamiento de los C.F. con Ang-II y galectina-3 indujo a la fibrosis (Figura 48 B) y en la presencia del AO estos niveles bajaron significativamente.



**Figura 48 - El ácido oleanólico modula funciones de las células cardíacas.** Los cultivos primarios de fibroblastos de rata cardíaca fueron pre-tratados durante 30 minutos con diferentes dosis de AO, y a continuación estimulados con los estímulos indicados. (A) Tras 24h de incubación, se midió la proliferación celular. Los resultados se mostraron con una media  $\pm$  SD; n=3. (B) A las 72 h de incubación, las células se tiñeron con pSR (para el colágeno) y se cuantificó en un espectrofotómetro. (\*p<0,001 en comparación con el control, y \*\*p<0,001 en comparación con los estímulos sin AO)

A continuación analizamos la calcificación en un modelo *in vitro*, en cultivos de células cardíacas (cardiofibroblastos y cardiomiocitos). Las células se sembraron y se mantuvieron 21 días en cultivo, tanto con medio calcificante como con medio *Standard*, en ausencia o presencia de 10µM de AO. Al final del experimento (día 21), las células mantenidas con medio calcificante presentaron un aspecto diferenciado, perdiendo su morfología, en respecto al medio *standard*. Se tiñeron con la misma tinción específica Rojo de Alizarin S (ARS). Las células mantenidas en medio calcificante y estimuladas con TNF- $\alpha$  (200U/ml), una citoquina pro-inflamatoria, presentaron áreas de calcificación (Figura 49 A, B y C). Sin embargo, en presencia del AO se observó una reducción de estas áreas de calcificación y el aspecto morfológico se mantuvo semejante a las células control con medio *standard*. Por otra parte, la tinción con ARS reveló que los cultivos inmortalizados de cardiomiocitos, tratados con TNF- $\alpha$  (células

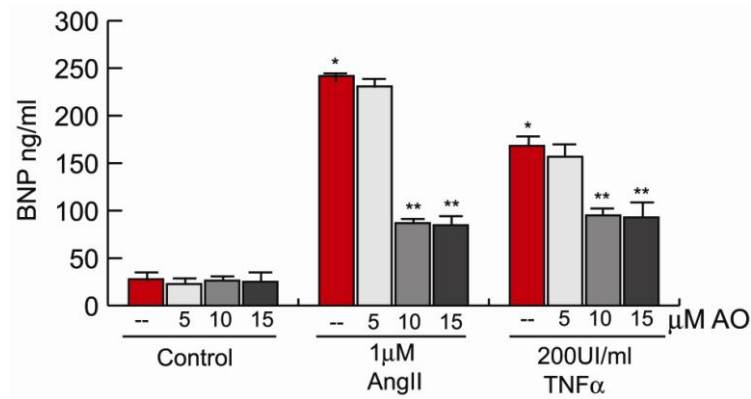
HL-1 y células H9c2) mostraron un aspecto granular difuso de depósitos de calcio al final de 21 días de experimentación, mientras que en los cultivos no sometidos a la estimulación con TNF- $\alpha$  solo mostraron signos leves de mineralización (Figura 49 B). Se ha podido también observar que el tratamiento previo de las células con 10 $\mu$ M de AO abolió totalmente la aparición de depósitos de calcio.



**Figura 49 - El ácido oleanólico modula la calcificación *in vitro*.** Las diferentes células cardiacas: cardiofibroblastos (A), y cardiomiocitos HL-1 (B) y H9c2 (C), fueron pre-tratadas durante 30 minutos con diferentes dosis de AO, y estimuladas con 200UI/ml de TNF- $\alpha$ . Trascorridos 21 días de incubación en condiciones de mineralización, las células se tiñeron con Rojo de Alizarin S. Los depósitos de calcio se visualizaron y se cuantificaron en un espectrofotómetro. (\* $p < 0,001$  en comparación con el control, y \*\* $p < 0,001$  en comparación con los estímulos sin AO; n = 3)

Por último, evaluamos el efecto directo del AO en la función de los cardiomiocitos (HL-1), mediante la cuantificación de los niveles de BNP liberados en el medio de cultivo, tras estimular las células con: Ang-II y TNF- $\alpha$ . Como se observa en la figura 50, la presencia del triterpeno redujo la capacidad de la Ang-II y del TNF- $\alpha$  para inducir a la secreción del BNP, de manera dosis dependiente.

Estos resultados sugieren que el AO puede desempeñar un papel protector directo y pleiotrópico en las células cardíacas.



**Figura 50 – El tratamiento con AO disminuye los niveles de BMP *in vitro*.** Los cardiomiocitos, HL-1, se estimularon con AngII (1µM) y TNF-α (200UI/ml) durante 24h, en presencia o ausencia de diferentes dosis de AO. Se recogió el medio de cultivo y se cuantificaron los niveles de BNP, mediante ELISA comercial. (\*p<0,001 en comparación con el control, y \*\*p<0,001 en comparación con los estímulos sin AO; n=3).

### 3. Conjuntivitis alérgica

En este apartado estudiamos el efecto profiláctico del AO en un modelo de conjuntivitis alérgica experimental (CAE). Este modelo permite estudiar la respuesta alérgica e inmune mediada por células T. Estudiaremos parámetros microscópicos (infiltración celular) la respuesta inflamatoria (citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias) e inmune (auto-anticuerpos y capacidad de proliferación de los linfocitos).

Analizaremos *in vitro* la influencia del AO en la migración y diferenciación de celular en células relevantes en procesos alérgicos.



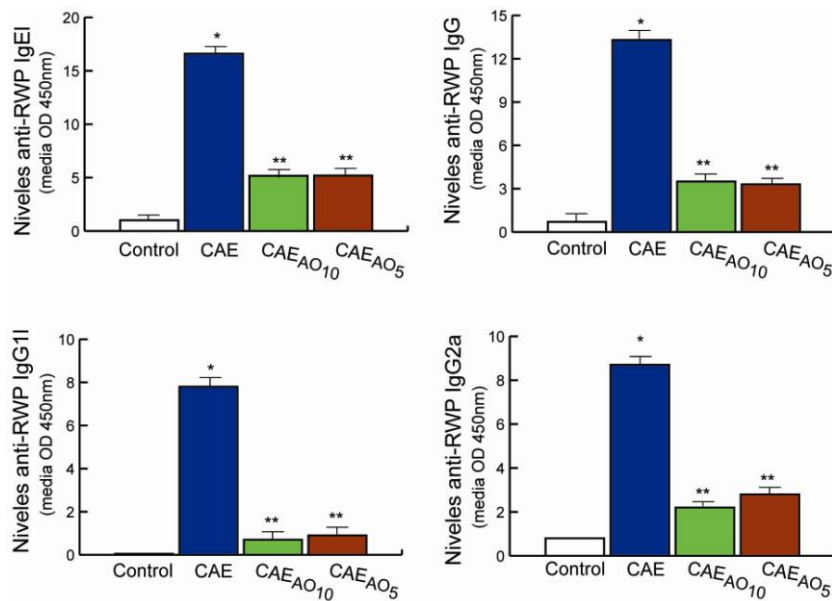
### **3.1 Efectos beneficiosos del tratamiento con AO en un modelo de conjuntivitis alérgica experimental (CAE)**

Con el objetivo de estudiar el efecto del tratamiento con AO en la conjuntivitis alérgica, se realizaron dos protocolos de tratamiento: desde el día de la sensibilización (AO<sub>10</sub>), y desde el día 5 post-sensibilización (AO<sub>5</sub>).

#### **3.1.1 El tratamiento con AO disminuye la producción de anticuerpos específicos RWP en animales CAE**

Para evaluar si el tratamiento con AO influye en la respuesta inmune específica del antígeno en animales CAE, se determinaron los niveles, en suero, de anticuerpos anti-RWP en los distintos grupos de experimentación. La combinación de la sensibilización sistémica y el refuerzo local con polen (RWP), resultó en niveles significativamente más altos de anticuerpo anti-RWP IgE (Figura 51), en comparación con los niveles encontrados en ratones normales. Los animales tratados con AO, tanto desde el día de sensibilización (AO<sub>10</sub>) como desde el día 5 post-sensibilización (AO<sub>5</sub>), presentaron una reducción dramática y similar de los niveles de anticuerpos específicos anti-IgE.

Para evaluar la inmunosupresión generada por el AO, también se evaluaron en suero, los niveles de los anticuerpos específicos anti-RWP - IgG, IgG1 e IgG2a (Figura 51). La administración del AO a los ratones CAE, siguiendo los dos protocolos AO<sub>10</sub> y AO<sub>5</sub>, condujo a una reducción de los niveles de los anticuerpos estudiados.



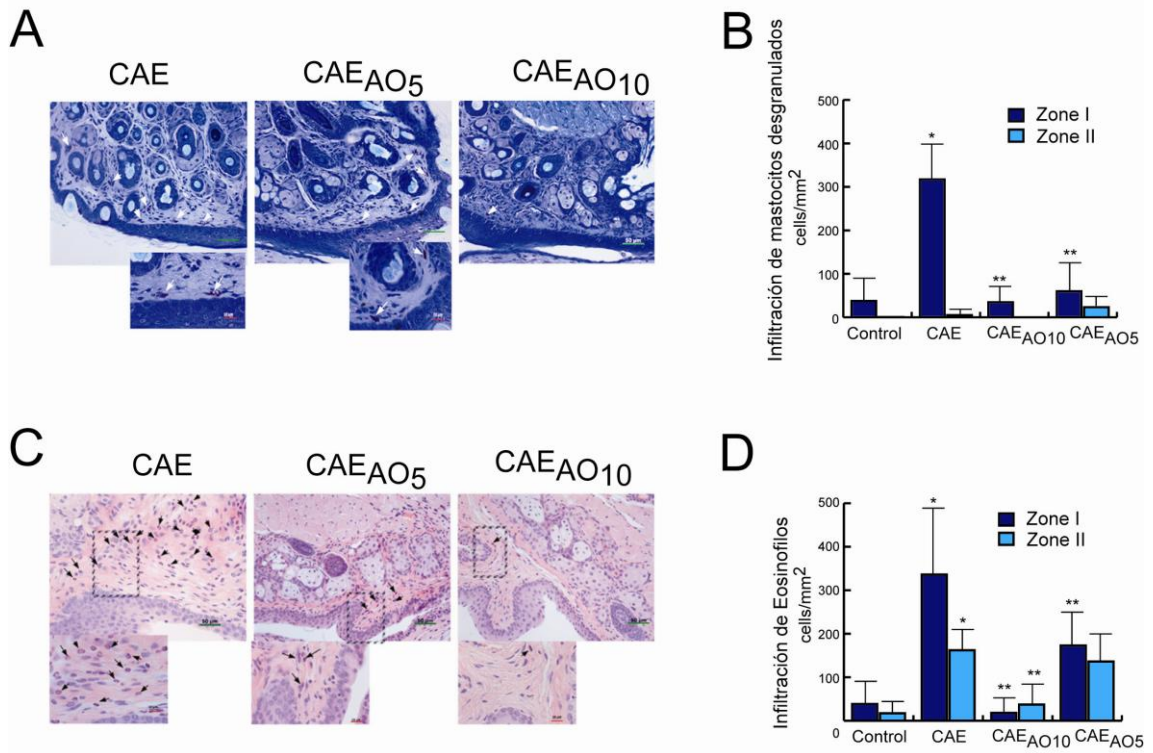
**Figura 51 – Reducción de los niveles séricos de anticuerpos anti-RWP en los animales tratados con ácido oleanólico.** Se indujo la CAE en ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas de edad, mediante la sensibilización con polen (RWP) y alum como se explica en el apartado material y métodos. En el día 10 después de la sensibilización con polen, se sacrificaron los animales y se evaluaron las distintas inmunoglobulinas específicas de RWP en el suero de todos los grupos de experimentación. Los resultados se mostraron con la media  $\pm$  SD; n=7 por grupo.  $p < 0,001$  versus animal control y  $**p < 0,001$  versus CAE sin tratamiento.

### 3.1.2 El tratamiento con AO disminuye la infiltración celular en la conjuntiva de los animales CAE

Se realizaron estudios histológicos en las conjuntivas de los diferentes grupos experimentales. Se utilizaron las tinciones azul de Toluidina, para estudiar el infiltrado de mastocitos en la lámina propia y en el estroma de la conjuntiva (Figura 52 A), y Hematoxilina & Eosina para observar el infiltrado de eosinófilos (Figura 52 C).

El número de mastocitos, siendo la mayoría de ellos mastocitos degranulados, y el número de eosinófilos en la conjuntiva están representados en la figura 52 B y D. Los animales enfermos (CAE) presentaron un aumento significativo de mastocitos y eosinófilos en relación a los animales control, sin embargo, en los animales enfermos CAE tratados con AO el número bajó significativamente. Entre los animales CAE

tratados con AO (AO<sub>10</sub> y AO<sub>5</sub>), no se encontraron diferencias significativas. El número de eosinófilos infiltrados en las conjuntivas de los animales tratados anteriormente con AO fue mínimo (Figura 52 D).



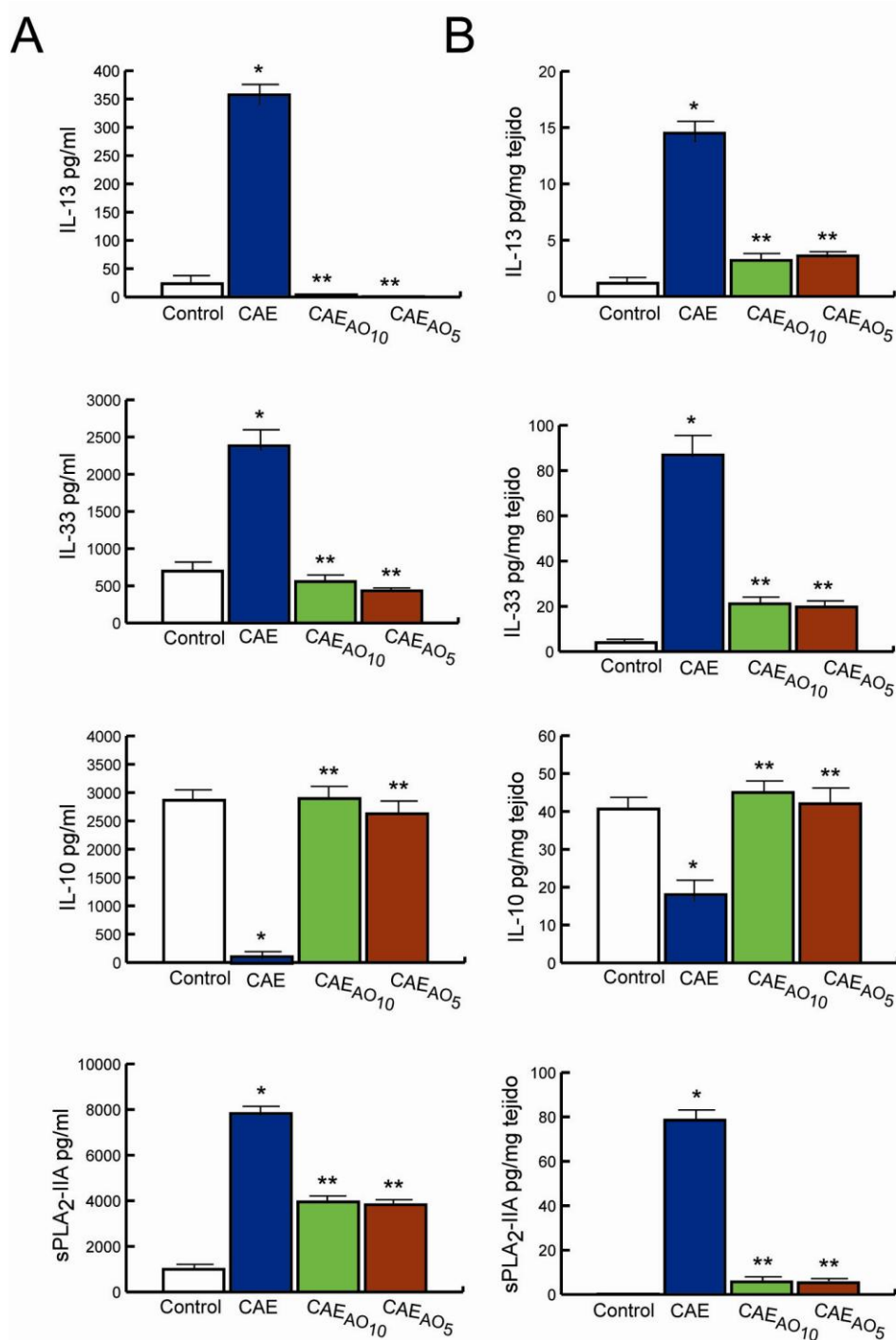
**Figura 52 – El tratamiento con AO atenúa la infiltración de células inflamatorias en la conjuntivitis alérgica.** Las secciones del tejido de conjuntiva de los diferentes grupos en experimentación (Control, CAE, AO<sub>10</sub>, AO<sub>5</sub>) se tiñeron con Azul de Toluidina (A) y Hematoxilina & Eosina (H&E) (C) para ver la infiltración de mastocitos y eosinófilos, respectivamente, en la conjuntiva palpebral. El número de mastocitos degranulados células/mm<sup>2</sup> (B) e eosinófilos células/mm<sup>2</sup> (D). Zona I: conjuntiva palpebral y Zona II: conjuntiva bulbar. \*p<0,01 y \*\*p< 0,01 (n=10, tres experimentos independientes). \*p<0,001 y +p<0,001 control versus zona I y zona II. \*\*p< 0,001 y ++p<0,001 CAE no tratados versus zona I y zona II; y \*\*\*p< 0,01 versus CAE no tratados zona I.

### **3.1.3 El tratamiento con AO modula los niveles de citoquinas y quimiocinas en animales CAE**

La conjuntivitis alérgica es una enfermedad típicamente asociada a citoquinas de respuesta Th2. En suero y tejido conjuntivo se cuantificaron los niveles de IL-13 y IL-33, dos citoquinas involucradas en la conjuntivitis alérgica. En la figura 53 se observa que los niveles de estas dos citoquinas se encontraron significativamente elevados en los animales CAE con respecto a los animales control. En los animales CAE tratados con AO, tanto en el protocolo AO<sub>10</sub> como en el protocolo AO<sub>5</sub> los niveles de IL-13 y IL-33 fueron significativamente menores.

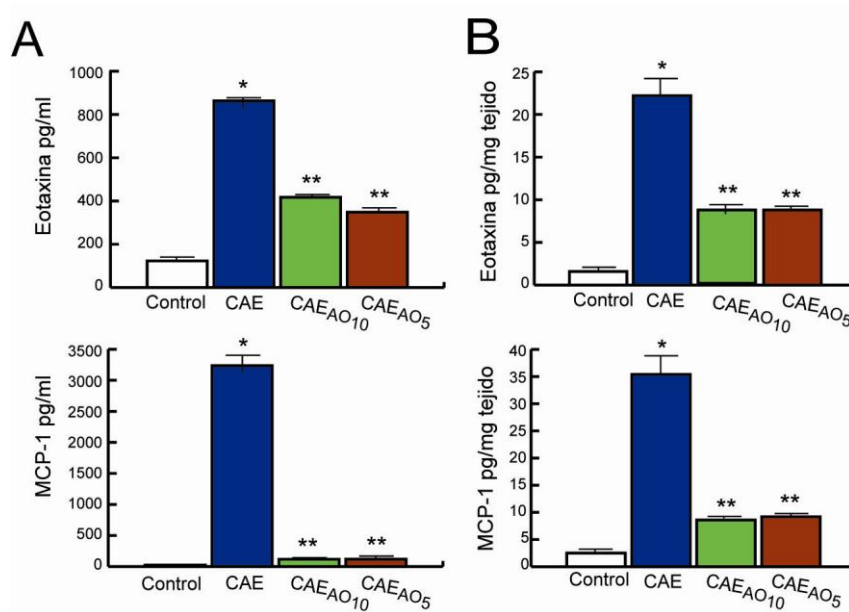
Además, se determinaron los niveles de IL-10, una citoquina anti-inflamatoria. Se observó que los niveles, en suero y tejido conjuntivo, de IL-10 estaban significativamente disminuidos en los animales alérgicos, mientras que en los animales CAE tratados con AO estos se encontraron significativamente aumentados en relación a los animales sanos.

También se analizaron los niveles de sPLA<sub>2</sub>-IIA que es una proteína de fase aguda, y que está asociada a varias enfermedades inflamatorias, autoinmunes y alérgicas. Igual que las citoquinas de tipo Th2 (IL-13 y IL-33) la sPLA<sub>2</sub>-IIA, se encontró aumentada en los animales alérgicos, tanto a nivel sistémico como a nivel local, mientras que en los animales CAE tratados con AO sus niveles bajaron significativamente.



**Figura 53 – El tratamiento con AO modula los niveles de las citoquinas en animales CAE.** 24h después de la última exposición al polen se cuantificaron los niveles de las citoquinas IL-13, IL-33, IL-10 y sPLA<sub>2</sub>-IIA, mediante ELISA comercial, en muestras de suero (A) y extractos de conjuntiva (B) de todos los grupos en experimentación. Los resultados se mostraron como la media  $\pm$  SD; n=7 por grupo. \*p<0,001 versus control sano y \*\*p<0,001 versus enfermos no tratados (CAE).

También se determinaron los niveles de dos quimiocinas: Eotaxina-1 y MCP-1. La eotaxina-1 está involucrada en el reclutamiento de eosinófilos al sitio de la inflamación, y MCP-1 es esencial en el reclutamiento de mastocitos en la respuesta inflamatoria aguda [208]. De nuevo, se ha podido observar que los animales alérgicos presentaron niveles de estas dos quimiocinas significativamente más altos con respecto a los animales control. En los ratones CAE tratados con AO (tanto los AO<sub>10</sub> como los AO<sub>5</sub>) los niveles de eotaxina-1 y MCP-1 en suero y tejido conjuntivo, bajaron significativamente en relación a los animales alérgicos no tratados (Figura 54).



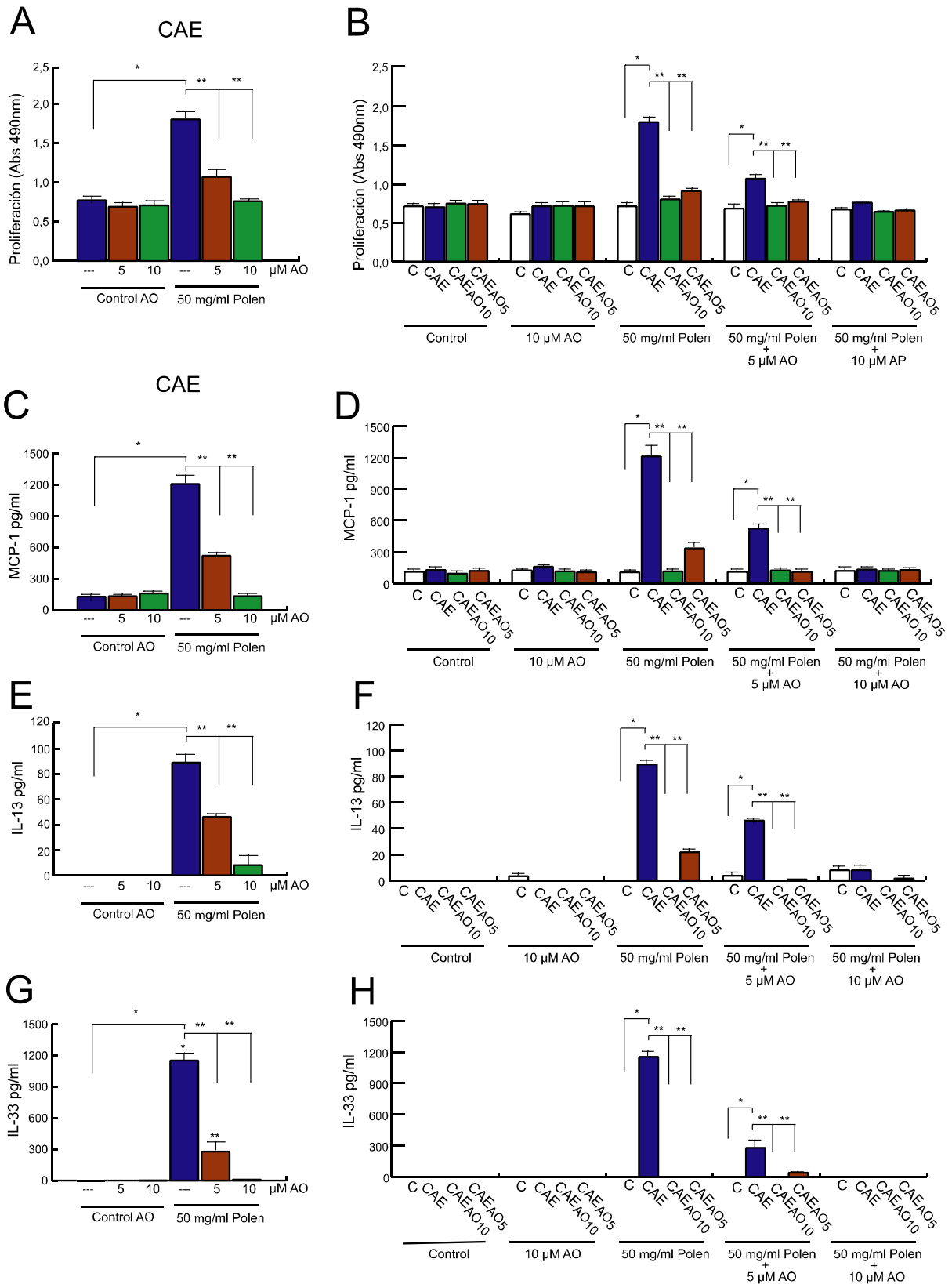
**Figura 54 – El tratamiento con AO modula los niveles de quimiocinas en animales CAE.** Los niveles de las quimiocinas Eotaxina-1 y MCP-1 se midieron en muestras de suero (A) y extractos de conjuntiva (B) de todos los grupos en experimentación, 24h después de la última exposición al polen. Los resultados se mostraron como la media  $\pm$  SD; n=7 por grupo. \*p<0,001 versus control sano y \*\*p<0,001 versus enfermos no tratados (CAE).

### 3.1.4 El tratamiento con AO regula la respuesta de células T en animales CAE

Para estudiar si el tratamiento con AO afecta a la respuesta inmune sistémica, se evaluó la función de los esplenocitos de bazo de ratones de los diferentes grupos

de experimentación. Se aislaron células de bazo, para ensayos de proliferación y secreción de citoquinas. Los esplenocitos fueron estimulados con el polen, en presencia o ausencia del AO. En la figura 55 se puede observar que la respuesta proliferativa y la producción de la quimiocina MCP-1 y de las citoquinas IL-13 y IL-33 se encontraron aumentadas en los esplenocitos aislados de los animales alérgicos (CAE) no tratados, en respuesta al polen. En presencia al AO, la proliferación y los niveles de citoquinas bajaron significativamente de manera dosis dependiente. Los esplenocitos aislados de los animales sanos no responden al polen así como tampoco los esplenocitos aislados de los animales CAE tratados con AO (AO<sub>10</sub> y AO<sub>5</sub>).

## Resultados



**Figura 55 – El tratamiento con AO modula la respuesta específica de las células esplénicas de los ratones CAE: Proliferación y liberación de citoquinas *ex-vivo*.** Las células aisladas del bazo de los diferentes grupos en experimentación se estimularon con 100μg/ml de polen durante 24 horas, en presencia o ausencia de las dosis indicadas de AO, y



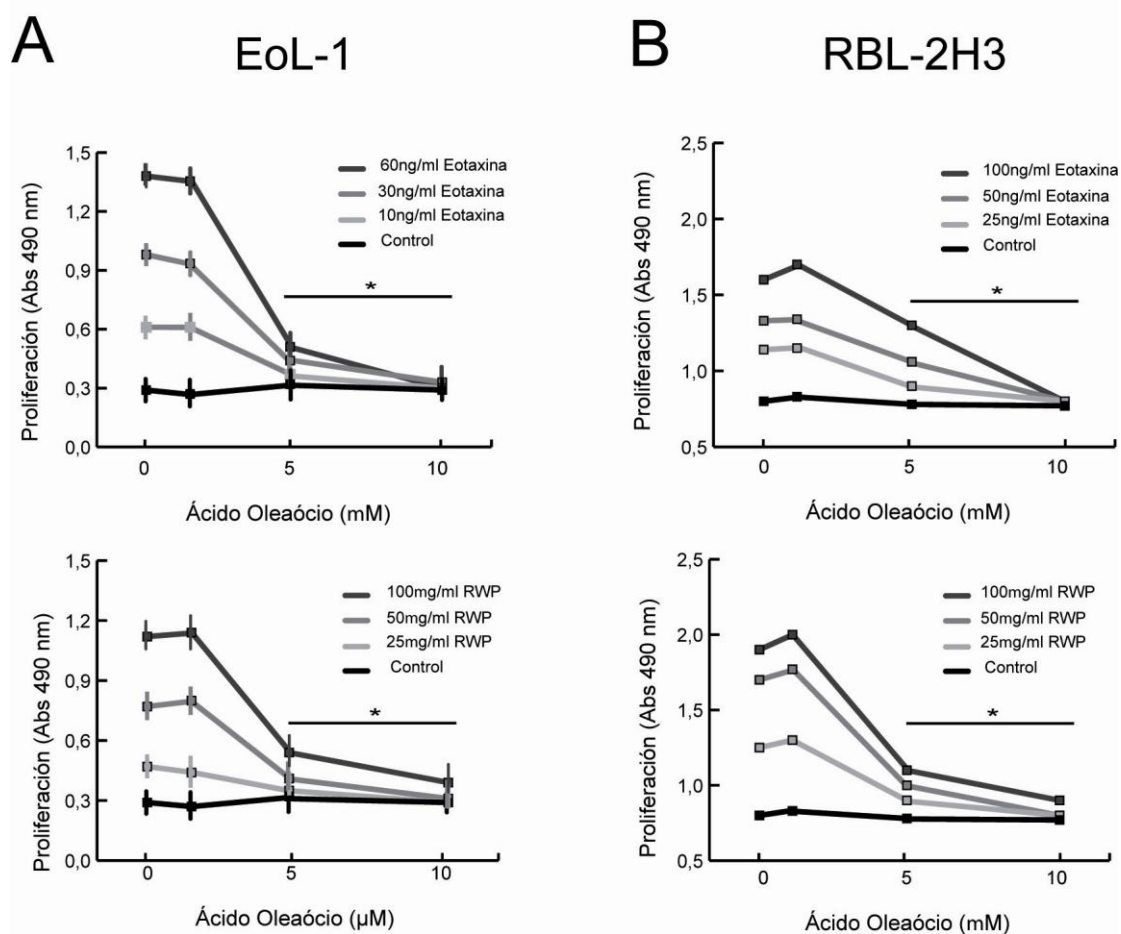
se midió la proliferación. (A) Animales CAE no tratados (B) grupo de animales indicados en la gráfica. Se procedió a la cuantificación de las citoquinas IL- 13, IL- 33, IL- 10 y MCP- 1 en los sobrenadantes de las células esplénicas (C -H ). Cada barra representa la media  $\pm$  SD; n=5 por grupo. \* y \*\*  $p < 0,001$ .

### **3.2 Estudios *in vitro*: El tratamiento con AO inhibe la activación de células relevantes en procesos alérgicos**

Finalmente para estudiar si el efecto anti-inflamatorio encontrado *in vivo*, en ratones CAE tratados con AO, implica acciones directas sobre células relevantes en procesos alérgicos: eosinófilos (EoL-1) y mastocitos (RBL-2H3), se realizaron estudios *in vitro*.

#### **Proliferación celular**

Para estudiar el efecto del tratamiento con AO sobre los eosinófilos (EoL-1) y mastocitos (RBL-2H3), se estimularon las células con diferentes concentraciones de eotaxina-1 y polen. Tras 24h de estimulación con eotaxina-1 como con polen se verificó un aumento en la proliferación celular de manera dosis dependiente. En la presencia del tratamiento con AO se observó una reducción significativa en la proliferación celular, siendo el efecto del tratamiento con AO dosis dependiente (Figura 56 A y B). Igual que en los experimentos *in vivo*, se observó una reducción de la proliferación celular en la presencia del tratamiento con AO.

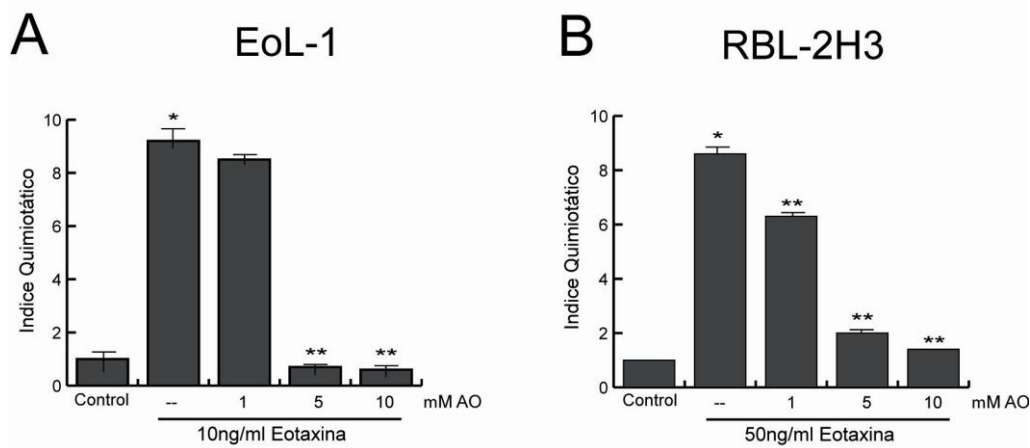


**Figura 56 – El tratamiento con AO cambia la respuesta proliferativa de las líneas celulares EoL-1 y RBL-2H3.** En la presencia de AO (10 $\mu$ M), las líneas celulares de eosinófilos (A) y mastocitos (B) presentaron una disminución de la respuesta a la Eotaxina-1 y al polen (RWP), a nivel proliferativo. \*  $p < 0,001$  versus células no estimuladas; \*\*  $p < 0,001$  versus células estimuladas sin tratamiento (n=3).

### Migración celular

A continuación se analizó el poder quimioatractivo de la eotaxina-1 y la capacidad de modulación del AO, en las líneas celulares EoL-1 y RBL-2H3 (Figura 57 A y B). Se verificó que en la presencia del estímulo eotaxina-1 la capacidad de migración de las células aumentó, siendo la eotaxina-1 un gran quimioatractivo celular para eosinófilos (Figura 57 A) y mastocitos (Figura 57 B). Sin embargo, el pre-tratamiento con AO redujo el poder quimioatractivo de la eotaxina-1, sobre las células EoL-1 y RBL-2H3, de manera dosis dependiente.

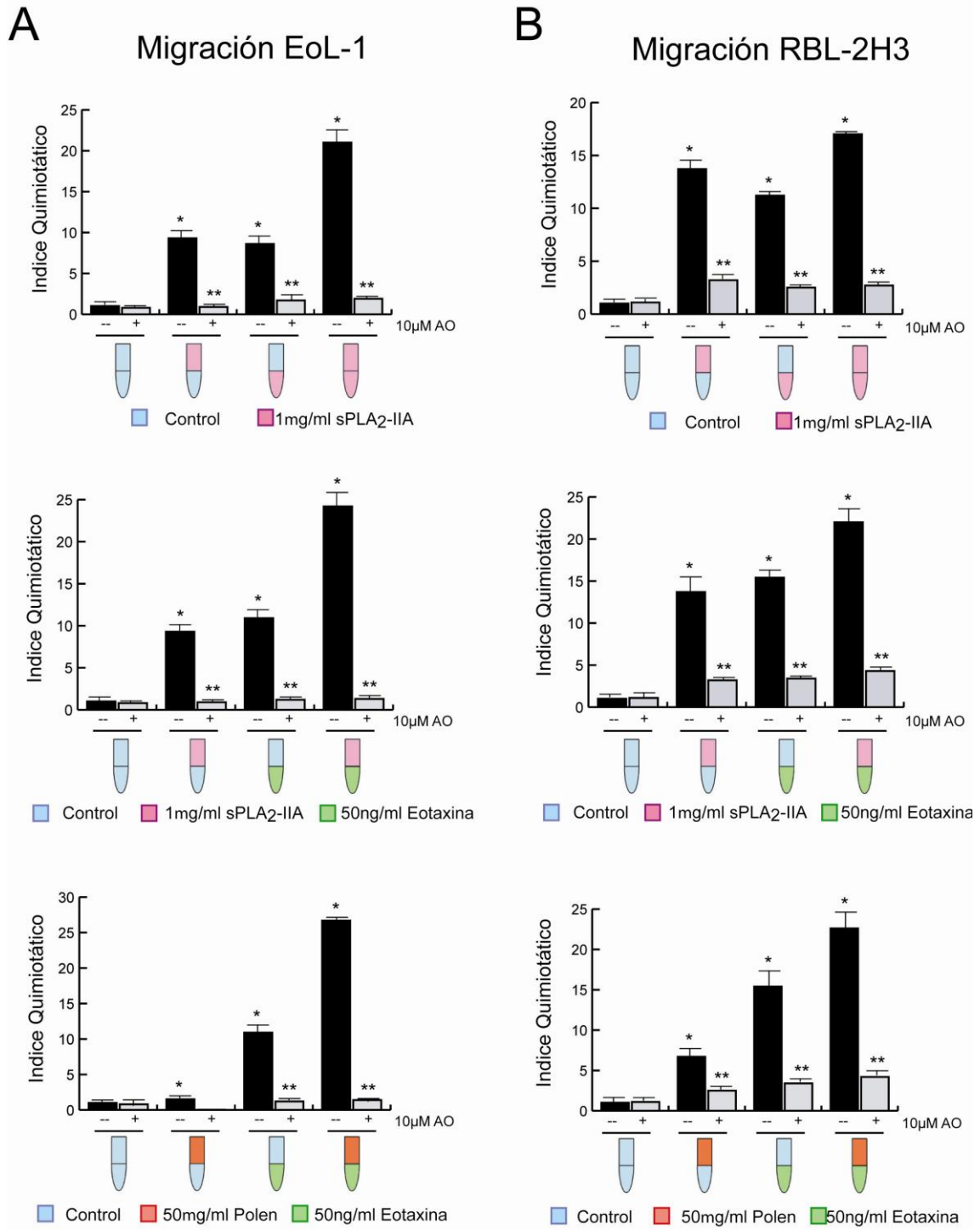
Tras observar que el tratamiento con AO se comporta de manera dosis dependiente, los estudios siguientes se realizaron utilizando la dosis óptima del AO: 10 $\mu$ M.



**Figura 57 – El tratamiento con AO cambia la respuesta específica de las líneas celulares EoL-1 y RBL-2H3.** En la presencia de AO (10  $\mu$ M), las líneas celulares de eosinófilos (A) y mastocitos (B) presentaron una disminución del poder quimioatrayente al estímulo Eotaxina-1. \* $p < 0,001$  versus células no estimuladas; \*\*  $p < 0,001$  versus células estimuladas sin tratamiento (n=3).

En los experimentos *in vivo* en los animales CAE no tratados, se observaron niveles aumentados de sPLA<sub>2</sub>.IIA y de eotaxina-1.

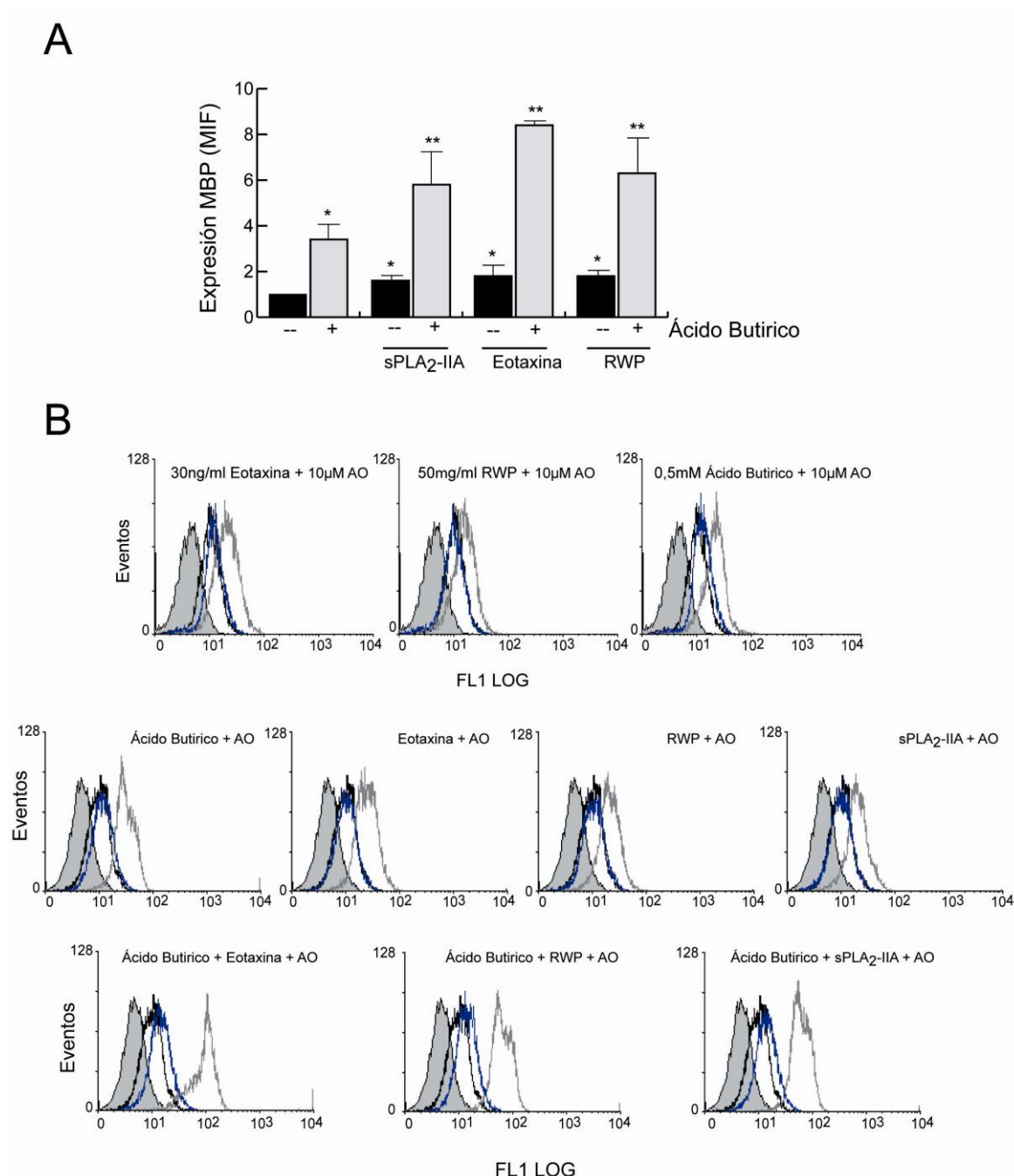
De acuerdo con la representación en la figura 58 A y B, se utilizaron como estímulos quimioatrayente (estímulo en la cámara inferior) y migratorio (estímulo en la cámara superior): la sPLA<sub>2</sub>.IIA, eotaxina-1 y el polen. Se observó que todos los estímulos utilizados ejercieron un gran poder quimioatrayente y migratorio, tanto en las EoL-1 como en las RBL-2H3. Sin embargo, al pre-tratar las células con 10 $\mu$ M de AO se observó una inhibición en el poder quimioatrayente y migratorio ejercido por los estímulos.



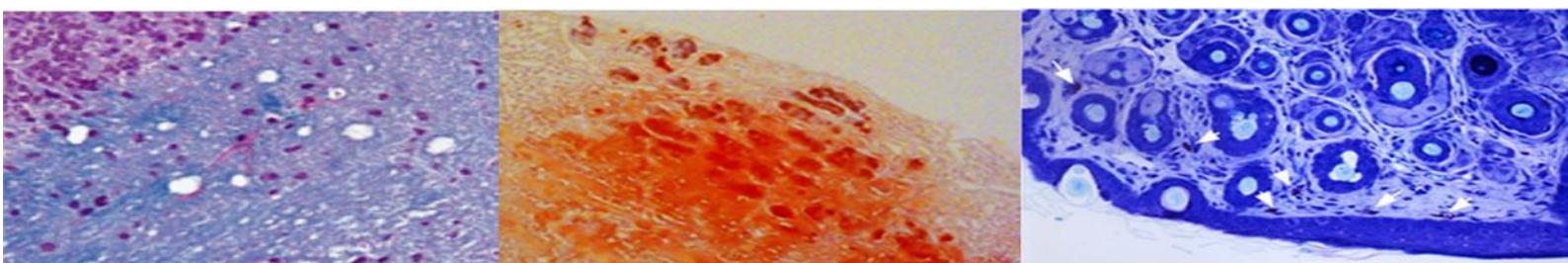
**Figura 58 – El tratamiento con AO inhibe la migración celular.** Las células EoL-1 (A) y RBL-2H3 (B) fueron pre-tratadas con 10µM AO durante 30 minutos a 37<sup>0</sup>C como se explica en el apartado materiales y métodos. Se utilizaron como estímulos migratorios: la eotaxina-1 (verde), la sPLA<sub>2</sub>-IIA (rosa) y polen (rojo) como se esquemáticamente indicado. El control se representa a azul. Los resultados se mostraron con media ± SD; n=3 y una significación estadística \*p<0,001 versus control no tratado y \*\*p<0,001 versus estimulado y no tratado.

### Diferenciación celular

La diferenciación de las EoL-1 a eosinófilos maduros se da mediante la incubación química con ácido butírico [209]. Para estudiar el poder del tratamiento con AO en la diferenciación celular, se indujo diferenciación celular en las EoL-1 mediante el ácido butírico y/o estímulos como eotaxina-1, sPLA<sub>2</sub>-IIA y polen y la expresión de un marcador de eosinófilos maduros, el MBP, mediante citometría de flujo. En la figura 59, muestra que todos los agonistas indujeron a la diferenciación de los eosinófilos (aumento en la expresión de MBP) tras la estimulación durante 7 días. Cuando se combinaron los agonistas: la eotaxina-1, polen, o sPLA<sub>2</sub>-IIA con el ácido butírico, el proceso de diferenciación se potencia en relación a las células estimuladas solo con el ácido butírico. Cuando las células fueron pre-tratadas con AO se observó que el proceso de diferenciación se suprimió.



**Figura 59 – El tratamiento con AO inhibe la diferenciación celular de las EoL-1 a eosinófilos maduros.** Las células EoL-1 en la presencia o ausencia de 0,5mM de ácido butírico, y 30ng/ml de eotaxina, 1μg/ml de sPLA<sub>2</sub>-IIA o 50μg/ml de polen (RWP) durante 7 días, en la ausencia (A) o presencia de 10μM de AO (B). Se analizó la expresión de MBP mediante citometría de flujo. Los resultados en A se mostraron con media ± SD \*p<0,001 versus células control, y \*\*p<0,01 versus células tratadas con ácido butírico; n=3. En B los histogramas son representativos de tres experimentos independientes. Negro: células no tratadas; Gris oscuro: células estimuladas; Azul: células estimuladas y tratadas con AO; Gris con relleno: células con el control de isotipo.



## I. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha incrementado el uso de productos naturales, derivados de extractos de plantas, en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades. Se ha llevado a cabo múltiples estudios dado que sus mecanismos de acción son en general poco conocidos.

En la actualidad se sabe que con la dieta mediterránea y el ejercicio físico se pueden prevenir o mejorar diversas enfermedades crónicas como la obesidad, hipercolesterolemia, hipertensión, trastornos cardiovasculares, etc. La dieta mediterránea es considerada una dieta variada y equilibrada, que se caracteriza por una elevada ingestión de verduras, frutas, frutos secos, legumbres y cereales, consumo moderado de pescado, leche y productos lácteos, bajo consumo de carne roja y productos cárnicos, un alto consumo de aceite de oliva, y una baja ingesta de lípidos saturados .

El ácido oleanólico (AO) es un compuesto natural presente en la dieta mediterránea, en particular en el aceite de oliva. Este compuesto ha sido objeto de estudio por sus propiedades anti-inflamatorias, cardiotónicas, anti-disríticas, anti-cancerígenas y neuroprotectoras, actuando sobre la expresión de múltiples citoquinas y moléculas claves en la inflamación [179, 180, 210-212].

En este trabajo se ha investigado el potencial terapéutico y/o profiláctico del AO en tres modelos de enfermedades inflamatorias distintas, profundizando en sus características anti-inflamatorias y anti-oxidantes “*in vivo*” e “*in vitro*”.

### **Potencial terapéutico del ácido oleanólico en la Esclerosis Múltiple**

**En este estudio se caracterizaron las propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes del ácido oleanólico en un modelo animal experimental de esclerosis múltiple, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).**



La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica que afecta a jóvenes adultos, y está asociada a la discapacidad neurológica progresiva. La enfermedad se caracteriza por la presencia focal de áreas inflamatorias, desmielinización, gliosis, depleción de oligodendrocitos y daño axonal. Los principales resultados presentados en este trabajo indican que el tratamiento profiláctico con AO puede modular los niveles de estrés oxidativo en animales EAE y proteger al proceso de desmielinización y neurodegeneración.

Para la realización de este estudio se utilizó un modelo animal murino, en el que se indujo la enfermedad mediante un péptido MOG. Este modelo se considera adecuado debido a sus similitudes histopatológicas e inmunológicas con la EM humana [48, 72, 205, 213, 214]. En la EAE la progresión de la respuesta inmune implica la activación de células Th1/Th17, su entrada en el SNC, la activación de células gliales residentes y el reclutamiento de células inflamatorias mediante la producción de diferentes mediadores [215-217].

Estudios en ratones deficientes en células B han mostrado que las células B y los anticuerpos no son necesarios en la inducción de la EAE mediante el péptido MOG y que influyen en el curso de la enfermedad y/o la gravedad de las lesiones del SNC [218, 219]. En nuestro estudio se observó que el tratamiento profiláctico con AO disminuye los niveles de auto-anticuerpos, que podría estar relacionado con la inhibición, en la activación de células B y en la proliferación, tal como se describe *Martin et al* [212]. Del mismo modo, en enfermedades autoinmunes, como la esclerosis múltiple, se han observado elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias [30, 83, 220]. Mediante el análisis de los niveles de auto-anticuerpos y de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) se observó que el tratamiento profiláctico con AO bloqueó la producción de auto-anticuerpos en la EAE, reduciendo la liberación de los mediadores inflamatorios, y aumentando los niveles de las citoquinas protectoras anti-inflamatorias IL-10 y IL-4.

La característica principal de la EM son las placas de desmielinización en la sustancia blanca con infiltración de macrófagos y células T y B [221]. De una forma general, el desarrollo de la enfermedad involucra áreas del tronco cerebral, del cerebelo y de la médula espinal. Además, una de las muchas manifestaciones observadas en pacientes con esclerosis múltiple es la neuritis óptica, que se debe a un

desorden inflamatorio, con pérdida repentina de la visión y dolor ocular, más común en el sexo femenino [222-224]. De acuerdo con estos datos se estudió el efecto del AO en muestras de tejido del SNC: cerebelo, medula espinal y nervio óptico.

*Compston y Coles* han observado que cerca de 95% de los pacientes con EM presentan anormalidades en la sustancia blanca en imágenes de MRI, que indican infiltración celular y pérdida axonal [225]. La pérdida de mielina es la llave neuropatológica en EM, que conduce al desarrollo de la enfermedad. En nuestro trabajo se observaron áreas de desmielinización e infiltración celular en la sustancia blanca de los animales EAE. En los animales EAE tratados con AO, estas áreas desmielinizadas y multicelulares se presentaron más pequeñas o estaban ausentes.

El daño axonal y la degeneración neuronal es muy frecuente en las áreas desmielinizadas y están correlacionadas con el grado de inflamación, siendo la pérdida axonal considerada el principal contribuyente para la no remisión de la discapacidad en EM [203, 226]. De acuerdo con *Kornek et al* y *Peterson et al*, en las lesiones desmielinizadas se encuentran principalmente en áreas de degeneración axonal y neuronal [227, 228]. En el análisis histológico de cerebro, en autopsias de pacientes con EM, se ha observado daño y muerte axonal [37]. Según *Teunissen et al* el daño axonal temprano puede ser compensado por los procesos regenerativos. La proteína 43 (GAP-43) es un marcador asociado al crecimiento axonal y a la sinaptogénesis en varias enfermedades neurodegenerativas [204]. Hemos querido analizar si el tratamiento con AO en los animales EAE modifica el proceso de la expresión de Gap-43 un marcador de la regeneración axonal. Se ha demostrado que Gap-43 se expresa a lo largo de toda la médula espinal, aunque esté más concentrado en las regiones torácicas y cervicales. Los estudios inmunohistoquímicos de *Curtis et al*, han mostrado la distribución de Gap-43 en la médula espinal de ratas adultas: mediante inmunotinciones de secciones longitudinales identificaron la presencia de Gap-43 en los axones de la sustancia blanca y mediante secciones transversales han caracterizado la expresión de Gap-43 en la sustancia gris [229]. En el estudio realizado por *Teunissen et al*, se observó una disminución de 74% en la expresión de Gap-43, en lesiones de la sustancia blanca de pacientes con EM, independientemente de la etapa de la lesión. El aumento de la expresión de Gap-43 reflejó el intento de regeneración por los axones dañados [204]. En el trabajo de *Kerschensteiner et al* han demostrado, en un modelo

animal de EM, que la regeneración axonal se da en múltiples niveles en respuesta a una lesión neuroinflamatoria [230]. Conforme estos datos, los animales EAE no tratados presentaron una disminución de la expresión de Gap-43, sin embargo en los animales EAE tratados con AO la expresión de Gap-43 estuvo más conservada apuntando a que el tratamiento con AO ayuda a preservar la plasticidad axonal.

El conjunto: oligodendrocitos-mielina-axones; representa la especialización estructural y funcional del sistema nervioso central [231]. Los precursores de oligodendrocitos son células gliales que dan lugar a oligodendrocitos mielinizados. Debido a la destrucción de los oligodendrocitos maduros en las regiones desmielinizadas por procesos inflamatorios y apoptóticos, la principal fuente de mielina y, por lo tanto, la reparación, depende de células precursoras de oligodendrocitos (OPC) en las lesiones y en su diferenciación a células productoras de mielina funcionales. Según *Aharoni et al*, las OPC se encuentran distribuidas uniformemente en la sustancia blanca y gris del cerebro adulto [232]. Las OPC pueden regenerar y mantener la mielinización de la sustancia blanca, proporcionando el soporte esencial para la supervivencia axonal [37]. La remielinización ocurre espontáneamente en el inicio de la enfermedad [45, 46, 233]. *Aharoni et al*, han observado en el modelo animal EAE una disminución de precursores de oligodendrocitos en médula espinal [232]. Al analizar nuestros resultados se observó una disminución del marcador para precursores de oligodendrocitos en tejido del SNC (cerebelo, médula espinal y nervio óptico) de animales EAE. El análisis histológico de los animales EAE tratados con AO mostró una preservación del marcador NG-2 llevándonos a concluir que el tratamiento con AO protege a los precursores de oligodendrocitos.

En la literatura, esta descrito que pacientes y modelos animales con EM presentan muerte celular por apoptosis y neurodegeneración. La técnica de TUNEL es un método sensible a la degradación del DNA asociada a la muerte celular por apoptosis. Diferentes estudios en cerebros de pacientes con EM describen un aumento significativo del número de células apoptóticas - células positivas para TUNEL [228, 234, 235]. En nuestro trabajo también se observó un mayor número de células apoptóticas en los animales EAE. Un marcador específico a la degeneración neuronal que se utiliza cada vez más en los estudios es el Fluoro Jade C (FJC). Según *G. Chidlow*

*et al* y *Cardoso et al* este marcador es un fluorocromo aniónico que se generó con el fin de identificar las neuronas que mueren en el sistema nervioso central [236, 237]. En nuestro estudio se observó un aumento de la degeneración neuronal en los animales EAE no tratados en muestras de cerebelo, medula espinal y nervio óptico.

La muerte celular por apoptosis y la neurodegeneración evaluada mediante las dos técnicas de TUNEL y Fluoro Jade C, respectivamente, presentaron resultados muy similares. En ambas, se observó un aumento de la muerte celular por apoptosis y degeneración neuronal en los animales EAE con respecto a los diferentes grupos en experimentación, verificándose una reducción de dichos parámetros en los animales EAE tratados con AO. El tratamiento con el AO ejerció un efecto protector frente a la neurodegeneración y muerte celular.

De acuerdo con algunos autores, hay grandes evidencias que indican que el estrés oxidativo es uno de los factores que está implicado en el desarrollo enfermedades neurodegenerativas [59, 238-240]. Está bien establecido que el estrés oxidativo es causado por el desequilibrio entre la producción y la desintoxicación de especies reactiva de oxígeno (ROS), que pueden perturbar el equilibrio redóx dentro de las células. Así la producción de ROS por los macrófagos infiltrados y microglía activada contribuye a la vulnerabilidad de la desmielinización axonal [24, 205]. Nuestros resultados muestran una mayor acumulación de ROS en tejidos del SNC (cerebelo, medula espinal y nervios ópticos) de animales EAE.

Se sabe que el anión superóxido induce la oxidación de proteínas y de ácidos nucleicos y a la peroxidación lípidica [241]. Los mecanismos antioxidantes endógenos incluyen una serie de reacciones enzimáticas. La primera de estas enzimas es la superóxido dismutasa (SOD), que convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que puede ser eliminado por la catalasa (CAT) y/o glutatión peroxidasa (GPx) [239, 241].

Estudios del sistema nervioso en modelos animales y en humanos han mostrado una disminución progresiva de la actividad de las enzimas anti-oxidantes tales como SOD y Cat en cerebros envejecidos [242, 243]. También se ha observado en animales con discapacidad que la peroxidación lípidica asociada con una respuesta anti-oxidante aumenta la vulnerabilidad de las neuronas, aumentando el riesgo de trastornos neurológicos [237]. De acuerdo con estas evidencias nosotros observamos

en los animales EAE no tratados niveles disminuidos de la respuesta anti-oxidante, mientras que se observó un aumento en la actividad de Catalasa, SOD y FRAP en el grupo EAE tratados con AO, siendo este capaz de proteger de la peroxidación lipídica (AOPP) y de los niveles de TBARS (MDA).

El glutamato es el mayor neurotransmisor excitatorio presente en el sistema nervioso central y periférico. Diferentes estudios han mostrado alteraciones en los niveles de glutamato en pacientes con EM, los cuales se correlacionan con la presencia de microglía activada y del daño sináptico sugestivo de excitotoxicidad [244-246]. La neurotoxicidad se refleja en la excitotoxicidad mediada por óxido nítrico y por la inducción y liberación de glutamato por microglia y macrófagos. Según *Zarate et al*, la excitotoxicidad producida por el glutamato es el mayor vínculo entre la neuroinflamación y la neurodegeneración [247], y según *Kumar et al*, la sobreexpresión de los receptores de glutamato actúan como uno de los mediadores intracelulares responsables del estrés oxidativo [248]. *Srinivasan* y sus compañeros han observado altos niveles de glutamato en lesiones activas de pacientes con EM [249]. *Micus* y su equipo han asociado los altos niveles de glutamato en el sistema nervioso con el daño de axones y de oligodendrocitos, así como con la desmielinización [250]. En nuestros experimentos, en los ratones EAE los niveles de glutamato se encontraron aumentados con respecto a los animales control. En los animales enfermos tratados con AO estos niveles bajaron significativamente, sugiriendo que el tratamiento con AO también actúa en la acumulación del glutamato.

*Lieven et al* en su trabajo observó que el daño del nervio óptico generaba grandes cantidades de anión superóxido llevando a la muerte las células de ganglionares de retina [251]. Así mismo, *Qi et al* describió en animales EAE que la existencia de grandes cantidades de ROS en el nervio óptico llevaba al daño de las células ganglionares de retina [205]. Varios estudios han descrito que la utilización *in vitro* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce al daño oxidativo mitocondrial [185]. En nuestro trabajo observamos que las células estimuladas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan lugar a la producción de ROS y a la muerte celular por apoptosis. Estas respuestas inducidas por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se vieron disminuidas en la presencia de AO demostrando el efecto directo del triterpeno sobre las células ganglionares de retina (RGC-5).

En conclusión, los resultados de nuestros estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado la eficacia del AO en la prevención de la EAE como se evidencia por la reducción de la producción de diferentes mediadores (citoquinas pro-inflamatorias, ROS, RNS), la inhibición de la producción de auto-anticuerpos y del reclutamiento de células inflamatorias que puede llevar a la muerte celular. En el presente estudio el tratamiento con AO no solo redujo todos estos parámetros característicos en EM retrasando el apareamiento de los síntomas motores y ejerciendo un cambio en la respuesta inflamatoria sino que también protegió de la neurodegeneración. Por lo tanto, este estudio proporciona información útil para la posible aplicación del AO en el tratamiento de pacientes que sufren de esclerosis múltiple.

### **Potencial profiláctico y terapéutico del ácido oleanólico en la Miocarditis**

**En este estudio se caracterizó las propiedades beneficiosas del ácido oleanólico en un modelo animal experimental de miocarditis, la miocarditis autoinmune experimental (MAE)**

La miocarditis es una enfermedad inflamatoria que conlleva a lesiones en el miocardio y, en algunos casos, a una insuficiencia cardíaca e incluso a la muerte súbita.

Con el objetivo de identificar el potencial profiláctico y/o terapéutico del AO como agente modulador de la respuesta inflamatoria en un modelo experimental de miocarditis – MAE - los animales se trataron diariamente con AO, desde el día de la inmunización (protocolo profiláctico: AO<sub>0</sub>) o desde el día 21 post-inmunización (protocolo terapéutico: AO<sub>21</sub>) y se sacrificaron en el día 21 (fase aguda de la enfermedad) o el día 65 (fase crónica de la enfermedad). Se empleó un modelo murino de miocarditis autoinmune que presenta complicaciones semejantes a la miocarditis en humanos [121, 252].

Para estudiar el mecanismo por el cual el AO ejerce un efecto protector en la MAE, nuestro estudio se fijó en las propiedades anti-inflamatorias del AO. Tras la

activación de las células T por auto-anticuerpos, éstas liberan citoquinas y quimioquinas, que reclutan y activan las células inflamatorias al miocardio. De acuerdo con algunos estudios, existe una fuerte relación entre la inflamación del miocardio y fibrosis, y la densidad de las células mononucleares infiltradas en el corazón de los ratones con MAE [101, 106]. En nuestro modelo el AO ejerció un efecto cardioprotector. El efecto cardioprotector se asoció tanto a la supresión de la producción de auto-anticuerpos específicos y la secreción de citoquinas inflamatorias, como la presencia de elevados niveles de moléculas inmunorreguladoras. Además, el AO también redujo la expresión de citoquinas pro-inflamatoria/pro-fibróticas en el miocardio y la infiltración celular, atenuando el desarrollo de la fibrosis cardiaca y la acumulación de depósitos de calcio.

El diagnóstico de la miocarditis tiene lugar tras las primeras manifestaciones clínicas. Con lo cual, es importante determinar si la administración del AO es eficaz tanto en el tratamiento de la enfermedad, como en su profilaxis. En nuestro estudio, se observó que en todos los grupos MAE tratados con el AO, los marcadores que reflejaron la gravedad de la miocarditis - hipertrofia cardiaca, alteraciones macroscópicas y microscópicas del miocardio (infiltración celular, fibrosis y calcificación) y los parámetros inflamatorios – se encontraron disminuidos en relación a los animales MAE no tratados.

Las citoquinas liberadas pelas células Th1 y Th2 van a regular la actividad de los fibroblastos. Según *Wei et al* las citoquinas de la respuesta Th1 están involucradas en la iniciación de la fibrosis, mientras que las citoquinas de la respuesta Th2 actúan en una fase más avanzada [101]. Nuestros resultados demostraron que los animales MAE de ambos grupos, fase aguda o fase crónica, presentaron un aumento del infiltrado inflamatorio y de la acumulación de colágeno. En los distintos grupos MAE tratados con AO, en tanto AO<sub>0</sub> como en AO<sub>21</sub>, se observó una disminución de dichos parámetros histológicos. Estudios en tejido de miocardio de autopsias humanas, han mostrado áreas de calcificación asociadas con daños celulares severos [93, 106, 110]. La calcificación que se debe al daño celular severo, tiene un papel importante en el desarrollo y/o progresión de la miocarditis hasta una cardiomiopatía dilatada y/o en el fallo cardíaco crónico [122]. En nuestro estudio, se observaron áreas de calcificación

en ambas fases de la enfermedad, aunque en la fase crónica estuvo más presente y en mayor cantidad que en la fase aguda.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la administración del AO es capaz de suprimir signos de miocarditis, incluso cuando las células inflamatorias ya han empezado a infiltrarse en el miocardio, modulando la síntesis de marcadores de inflamación y de daño del miocárdico. Estos resultados están en acuerdo con los datos que el AO es eficaz en modelos de enfermedades inmunes inflamatorias como: en la encefalitis autoinmune experimental, en la lesión pulmonar aguda experimental o en la pleuresía experimental mediante la inhibición de las respuestas Th1 y en la activación de células T [178, 212, 253, 254].

El AO puede modular a varias vías de la respuesta inmune que conducen a la miocarditis. Las concentraciones de anticuerpos anti-miosina del isotipo IgG están correlacionadas con la gravedad de la enfermedad [255-257]. En nuestro estudio, se observó que los animales MAE tratados con AO, redujeron los niveles de anticuerpos anti-miosina IgG, en particular del isotipo IgG1. Esta inhibición de la producción de anticuerpos anti-miosina también puede contribuir al mecanismo por el cual el AO protege de la MAE. El efecto del AO sobre la producción de auto-anticuerpos se ha descrito anteriormente en un modelo de Esclerosis Múltiple [212]. La inhibición de la respuesta inmune humoral en MAE se describió previamente para otros tratamientos [258]. Sin embargo, debe señalarse que la formación de auto-anticuerpos no está involucrada directamente con el desarrollo de la lesión miocárdica en el modelo MAE, ya que los ratones deficientes en células B pueden desarrollar miocarditis [259, 260].

Otro posible mecanismo por el cual el tratamiento con AO puede proteger contra la MAE, es la regulación del equilibrio de citoquinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias. Se sabe que las citoquinas inflamatorias juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades cardiacas, y en el modelo de MAE se ha demostrado que está asociada a una respuesta tipo Th1/Th17 [261]. Las citoquinas de tipo Th1 tales como el TNF- $\alpha$ , la IL-6 o la IL-1 $\beta$  ejercen un papel importante en la diferenciación de las células Th1 y en la patogénesis de la MAE [92, 94, 101, 122], y el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  promueven la miocarditis inducida por coxsakie B3 en ratones B10.A resistentes [262, 263]. En los animales MAE, los niveles proteicos de TNF- $\alpha$  y IL-6 se encontraron aumentados, mientras que en los grupos de animales MAE tratados con AO estos



valores fueron significativamente más bajos. Por otra parte, la IL-17A, una citoquina de tipo Th17, es esencial para la progresión a cardiomiopatía dilatada, y es necesaria en la miocarditis para la expresión de IL1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , y TGF $\beta$ 1 [264]. En nuestro estudio se observó que el tratamiento con AO no sólo resultó en una disminución significativa de los niveles plasmáticos de IL-17A, TNF- $\alpha$  e IL-6 en ratones MAE, sino también en un aumento de la expresión de los inmunosupresores IL-10 e IL-35. Del mismo modo, nuestros datos también mostraron que el AO modula las respuestas inmunes de las células T a la miosina cardiaca *in vivo* e *in vitro*: los esplenocitos de los diferentes grupos experimentales mostraron una reducción sustancial en la proliferación celular inducida por MyHC $\alpha$  y la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  por la acción del AO, junto con un aumento significativo en la producción de IL-10.

La citoquina de respuesta Th2, IL-10 no solo es liberada por las células Th2, sino que también puede ser producida por otros tipos de células, como macrófagos, células dendríticas o células B y desempeña un papel importante en el control celular y en las respuestas inflamatorias, reduciendo los niveles de citoquinas pro-inflamatorias [105], así como es un efector clave en las células Treg, controlando la liberación de células Treg, especialmente como la población Tr1, subtipo celular productor de IL-10 [265, 266]. La IL-10 es una de las citoquinas importantes que cuando se usa en terapéutica, mejora la fase aguda en la MAE. Es por lo tanto una citoquina muy importante y necesaria en la respuesta inflamatoria de las enfermedades autoinmunes. En este trabajo se observó que la administración del AO tanto desde el inicio de la inmunización como desde en el día 21 da lugar a un aumento de los niveles de IL-10, no encontrándose diferencias significativas entre los dos grupos. Así, se puede decir que el AO presenta un gran potencial tanto profiláctico como terapéutico.

La IL-35 ha sido considerada recientemente como una importante citoquina pro-inflamatoria que restringe la respuesta inmune a través de la expansión de células Treg, aumentando la síntesis de la IL-10 y suprimiendo el desarrollo de células tipo Th17 [267, 268]. Los pacientes con miocarditis presentan niveles bajos de células Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> en relación a sujetos sanos. En conformidad, en nuestros resultados se observó que el tratamiento con AO aumentó los niveles de IL-35 y el número de células Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> en relación a los grupos de los animales no tratados (controles sanos y MAE).

Por todos los resultados obtenidos, se puede plantear que el tratamiento con AO conlleva a un cambio favorable en la respuesta inflamatoria, esto es una supresión de citoquinas de respuesta tipo Th1/Th17 a citoquinas tipo Th2/Treg, modulando el inicio y la progresión clínica de miocarditis.

En este estudio también se analizaron los niveles de galectina-3, verificándose que en los animales enfermos no tratados (MAE) sus niveles estaban aumentados, sin embargo en los animales MAE tratados con AO estos niveles eran significativamente menores. La galectina-3 ha sido identificada en macrófagos y en el tejido cardiaco, exhibiendo propiedades inflamatorias y profibróticas. Los estudios clínicos han demostrado que un aumento de los niveles de galectina-3 en pacientes con insuficiencia cardiaca se asocia con resultados adversos cardiovasculares a largo plazo, y la combinación de galectina-3 con NT-proBNP es un buen marcador pronóstico en pacientes con insuficiencia cardiaca aguda [206, 207]. En la actualidad, los modelos experimentales han mostrado que: 1) corazones de ratones con enfermedad de Chagas expresan altos niveles de galectina-3 en el infiltrado inflamatorio; 2) ratas transgénicas con hipertrofia cardiaca sobreexpresan galectina-3 que colocaliza con los macrófagos del miocardio; 3) la galectina-3 se une a C.F. e induce su proliferación y la producción de colágeno; y 4) la galectina-3 modula la respuesta inmune agravando enfermedades autoinmunes, tales como la EAE, a través de su capacidad de aumentar la síntesis de IL-17 y IFN- $\gamma$  y disminuir la producción de IL-10 [269, 270]. Tomados en conjunto, todos estos resultados, indican que la expresión de galectina-3 es un factor importante que une la respuesta inmune a la fibrosis, con lo cual la reducción de sus niveles locales y sistémicos puede ser otro mecanismo por el cual este triterpeno actúa y protege en la MAE.

La sobreexpresión de la galectina-3, de la IL-17A, del TNF- $\alpha$  y de la IL-6 en el tejido cardiaco de ratones MAE se correlaciona con el desarrollo de la lesión cardiaca, como se reflejaron en los valores de la actividad de la isoenzima CK-MB y los elevados niveles plasmáticos de BNP. En los animales MAE tratados con AO, se observó una reducción significativa en los niveles de ambos marcadores. Estas citoquinas producidas principalmente por las células inflamatorias infiltradas en el tejido cardiaco, pueden tener un efecto directo sobre las células cardiacas afectando su funcionalidad y jugando un papel importante en el remodelado del tejido cardiaco.

Así, la fibrosis puede contribuir a la proliferación de fibroblastos y a los depósitos de colágeno que se producen después de la muerte de los miocitos, en respuesta a mediadores inflamatorios. La acumulación desproporcionada de colágeno fibrilar en una lesión tisular grave, puede conducir a la deposición de calcio en las células del miocardio. La acumulación de calcio convierte la lesión celular potencialmente reversible en un daño irreversible. Nuestros datos *in vitro* mostraron que la galectina-3 y el TNF- $\alpha$  inducen a la proliferación, a depósitos de calcio y a la fibrosis cardiaca en fibroblastos, mientras que estos efectos son suprimidos en presencia del AO. Del mismo modo, el AO abrogó los signos de mineralización producidos por el tratamiento con TNF- $\alpha$  observados en las células cardiacas, responsables del remodelado cardiaco.

Varios estudios apuntan que las células cardiacas también están involucradas en la producción de citoquinas en el miocardio y que son capaces de producir IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , bajo diferentes condiciones [271]. Además, aunque se cree que la IL-17 es una citoquina que deriva de una célula T, hay estudios que sugieren que otros tipos de células, no células T, también la pueden producir, planteándose una nueva hipótesis de que son los cardiomiocitos una fuente de IL-17 [272]. Esta evidencia apunta a la hipótesis de que no sólo las células inmunes, sino también las células cardíacas pueden ser objetivos directos del tratamiento con AO.

En conclusión, los resultados de nuestros estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado la eficacia del AO en la prevención de la MAE como se evidencia por la reducción en la severidad de la inflamación, de la fibrosis y de la calcificación del miocardio. Los efectos beneficiosos pueden asociarse con la inhibición de la producción de auto-anticuerpos, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias/profibróticas, y posiblemente con la estimulación de poblaciones específicas de células T a través de la producción de proteínas inmunorreguladoras que amortiguan la autoinmunidad. Por lo tanto, este estudio proporciona información útil para la posible aplicación del AO para el tratamiento de pacientes que sufren de miocarditis.

### Potencial terapéutico del ácido oleanólico en la Conjuntivitis alérgica

**En este estudio se caracterizó el potencial profiláctico del ácido oleanólico en un modelo animal experimental de conjuntivitis alérgica, la conjuntivitis autoinmune experimental (CAE).**

Varios estudios han comprobado que el AO es un potente anti-inflamatorio, sin embargo es la primera vez que se describe su efecto en una enfermedad inflamatoria ocular, la conjuntivitis alérgica. En este estudio se observaron fuertes evidencias que el tratamiento con AO presenta propiedades anti-alérgicas tanto cuando fue administrado en modo profiláctico (día de la sensibilización - AO<sub>10</sub>), como terapéutico (día 5 post-sensibilización AO<sub>5</sub>).

Las principales alteraciones fisiopatológicas observadas en la conjuntivitis alérgica incluyen la generación de anticuerpos IgE en suero, así como la degranulación de mastocitos dependiente de IgE y la infiltración de eosinófilos en la conjuntiva [128, 137, 140]. Todas estas características patológicas están presentes en nuestro modelo experimental de ratón descrito por *Magote et al* [140]. Las inmunoglobulinas pueden ser encontradas localmente, en la conjuntiva y en el suero debido al sistema de transporte vascular presente en el ojo. El tratamiento con el AO redujo el número de eosinófilos y mastocitos degranulados en la conjuntiva, y suprimió la presencia de anti-Igs específicas en el suero, no mostrando ninguna diferencia notable en el grado de supresión, entre los dos protocolos de administración con AO. Estos resultados fueron consistentes con los bajos niveles de mediadores inflamatorios y citoquinas Th2, que se encontraron en animales CAE tratados con AO (CAE<sub>AO10</sub> y CAE<sub>AO5</sub>).

Los procesos patológicos en una reacción alérgica son mediados por células Th2, que liberan citoquinas tales como IL-5 e IL-13. Estas citoquinas son responsables de una cascada de eventos necesarios en la inflamación alérgica: la producción de IgE por las células B, la activación de eosinófilos y el reclutamiento y activación de los mastocitos. La IL-13 es un mediador importante en las reacciones de hipersensibilidad [132, 136, 273, 274]. Varios estudios en modelos murinos han demostrado que la IL-13 es crucial en la inducción de respuestas similares a las que tiene lugar en la

enfermedad humana. La IL-13 regula la síntesis de IgE y coordina el proceso inflamatorio debido a su capacidad para estimular la expresión de moléculas de adhesión, quimiocinas y metaloproteinasas; que influyen en la captación, en el tráfico y en la activación de células inflamatorias. La IL-33 es un importante inductor de la inflamación alérgica, que se encuentra sobre-expresada en enfermedades asociadas a respuestas Th2, como el asma, la conjuntivitis alérgica y la rinitis [275, 276]. La IL-33 promueve respuestas que implican la activación y migración de linfocitos Th2, eosinófilos, mastocitos y basófilos. En nuestros experimentos se observaron elevados niveles de IL-13 e IL-33 en el tejido conjuntivo y en suero de los ratones CAE y cuando los animales CAE fueron tratados con AO sus niveles fueron notablemente menores. Del mismo modo, en los cultivos de esplenocitos, se observó un aumento en la liberación de estas citoquinas después de la exposición al alérgeno, sin embargo en la presencia de AO, tanto *in vivo* como *in vitro*, los niveles de IL-13 e IL-33 liberados se redujo significativamente.

Además, también se encontraron niveles elevados de eotaxina-1 y MCP-1 en ratones CAE. En animales CAE tratados con AO los niveles de eotaxina-1 y MCP-1 disminuyeron sustancialmente. *In vitro* se observaron resultados similares: en los esplenocitos de los diferentes grupos experimentales, hubo una reducción sustancial de los niveles de la eotaxina-1 y de MCP-1 inducidos por la presencia de alérgenos, así como una minimización de la respuesta proliferativa de los cultivos de estas células T por la acción del AO. Todo esto sugiere que el AO fue capaz no sólo de modular la respuesta inflamatoria sistémica y local inducida por el alérgeno, sino que también afectó a la respuesta de las células T inducida por el alérgeno *in vivo* e *in vitro*.

La IL-13 regula la expresión de MCP-1 y eotaxina-1 en la mucosa respiratoria y gastrointestinal. La aplicación exógena de IL-33 en un modelo de CAE induce la liberación local del quimioatrayente eotaxina-1 y potencia la capacidad de las células Th2 de producir citoquinas como la IL-13 [276-281]. Además, la eotaxina-1 es considerada como una de las quimiocinas más relevantes en la fisiopatología de las enfermedades alérgicas, debido a su influencia en el reclutamiento de eosinófilos y su función reguladora de los mastocitos en el tejido ocular: regulando tanto la degranulación inducida por IgE como su maduración [276]. Por lo tanto, la reducción de la presencia de eosinófilos y mastocitos degranulados en la conjuntiva de animales CAE

tratados con AO, podría estar estrechamente vinculada a la disminución de la expresión de IL-13, IL-33 y de eotaxina-1. Del mismo modo, otros compuestos naturales como la curcumina o timoquinona, presentes en *Nigella sativa*, y que tienen propiedades anti-oxidantes y anti-inflamatorias, demostraron ser beneficiosas en modelos murinos de conjuntivitis alérgica debido a su capacidad de suprimir las respuestas inmunes Th2 [282, 283].

Simultáneamente, se observó que el tratamiento con AO previno la disminución de los niveles de IL-10 en ratones CAE. Los niveles de expresión en el suero y tejido de conjuntiva de esta citoquina Treg, implicada en la homeostasis de la respuesta Th1/Th2, fueron similares en los animales CAE tratados con AO y en los animales control sanos. Además de sus propiedades anti-inflamatorias en los mastocitos humanos, la IL-10 es capaz de estabilizar los mastocitos murinos y reducir su degranulación *in vitro* [284, 285]. Royer *et al*, han observado *in vivo*, que la IL-10 amortigua los síntomas de la conjuntivitis alérgica mediante la protección de la degranulación de los mastocitos, afectando al número de mastocitos activados en la conjuntiva [284]. Del mismo modo, en nuestros resultados se observó que el tratamiento con AO en los ratones CAE previno de la degranulación de mastocitos en la conjuntiva.

Además, encontramos elevados niveles de sPLA<sub>2</sub>-IIA en el suero y en la conjuntiva de los ratones CAE, con respecto a los ratones control sanos y a los ratones CAE tratados con AO. Altas concentraciones de sPLA<sub>2</sub>-IIA se han encontrado en las lágrimas de pacientes con conjuntivitis alérgica estacional y perenne, en la enfermedad del ojo seco, en la blefaritis crónica y en la intolerancia a lentillas de contacto [286-288]. Recientemente, Wei *et al* en su trabajo, en un modelo experimental murino de ojo seco, ha observado un aumento de la expresión de sPLA<sub>2</sub>-IIA en las células caliciformes (de *goblet*) y en las células epiteliales, asociadas a los signos y síntomas en la enfermedad [273]. La sPLA<sub>2</sub>-IIA en la superficie ocular normal, es una barrera inmune innata contra la infección microbiana, pero la barrera ocular cuando se ve comprometida, da lugar a la amplificación del proceso inflamatorio [273, 288]. Estos hallazgos apoyan a la hipótesis de que los niveles elevados de sPLA<sub>2</sub>-IIA en la conjuntiva de nuestro modelo CAE pueden desempeñar un papel importante en la inflamación ocular afectando a las células epiteliales de la conjuntiva. La

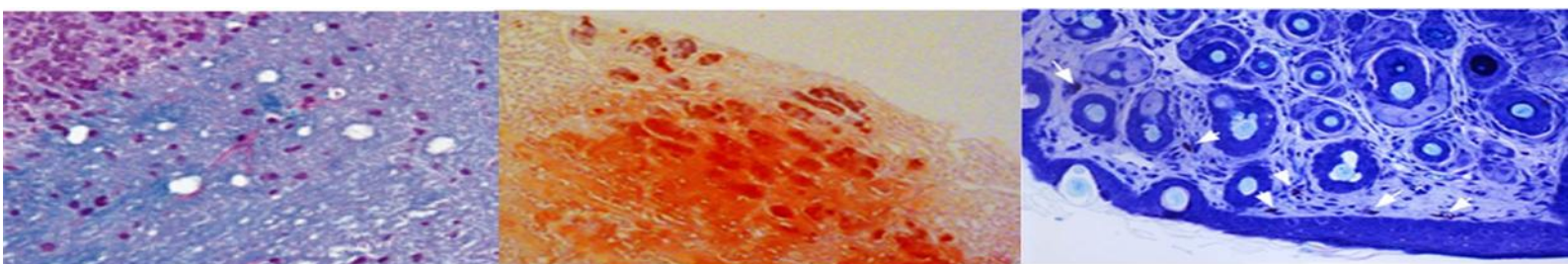
administración del AO a los animales CAE redujo sus niveles, llevando a creer que esta reducción está relacionada con la disminución de la inflamación en la superficie ocular.

Tanto los eosinófilos como los mastocitos son mediadores importantes en el desarrollo de la conjuntivitis alérgica, debido a sus acciones citotóxicas e inflamatorias. Así, se demostró que la sPLA<sub>2</sub>-IIA se comporta como un potente quimioatrayente como la eotaxina-1, tanto para eosinófilos (EoL-1) como para mastocitos (RBL-2H3). Además la sPLA<sub>2</sub>-IIA, y el polen (RWP) amplifican la quimiotaxis inducida por la eotaxina. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos, realizados por *Hayat et al*, donde han demostrado respuestas quimiotácticas de cooperación entre la eotaxina-1 y la citoquina IL-5 [283]. Todo esto nos sugiere que los diversos mediadores inflamatorios, incluyendo sPLA<sub>2</sub>-IIA, pueden actuar en conjunto para potenciar respuestas locales quimiotácticas. Además, se ha observado que la fosfolipasa desencadena degranulación de mastocitos, así como, un aumento en la diferenciación morfológica de los eosinófilos a células maduras [282]. Curiosamente, todas las respuestas estudiadas fueron suprimidas en las células pre-tratadas con el AO. Siendo así, se puede decir, que nuestros datos apuntan a un papel importante de la actividad de la sPLA<sub>2</sub>-IIA en la capacidad migratoria de los eosinófilos y de los mastocitos a los tejidos, y un papel regulador por parte del triterpeno AO en la prevención de la activación y reclutamiento celular.

En conclusión, los resultados de nuestros estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado la eficacia del AO en el tratamiento de la CAE como se evidencia por la reducción en la severidad de la inflamación. Los efectos beneficiosos pueden asociarse con la inhibición de la producción de IgE, de la degranulación de los mastocitos, de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y quimiocinas, y posiblemente con la inhibición de la migración de eosinófilos y mastocitos a los focos de inflamación y de la diferenciación de eosinófilos que amortiguan la alergia. Por lo tanto, este estudio proporciona información útil para la posible aplicación de AO para el tratamiento de pacientes que sufren desórdenes alérgicos oculares. Otros estudios deben ser realizados para explorar su actividad cuando es administrado por vía tópica.

Las concentraciones del AO utilizadas en nuestros modelos animales y experimentos no pueden ser alcanzadas en humanos a través de la ingesta alimentaria, dado el contenido en AO de las plantas es muy bajo. Por lo tanto, para hacer frente a la utilidad del AO en promoción de la salud se debería considerar su uso como suplemento alimenticio.





## **V. CONCLUSIONES**

## Conclusiones

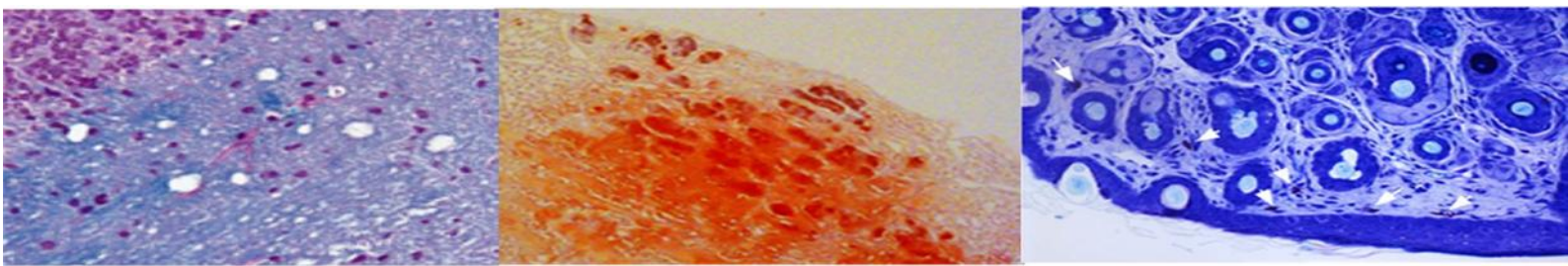
De acuerdo con los resultados obtenidos en el tratamiento con el ácido oleanólico en los diferentes modelos experimentales hemos elaborado las siguientes conclusiones:

- En relación con los estudios realizados en el modelo animal EAE, el tratamiento con el ácido oleanólico:
  1. Retrasa la aparición de los síntomas clínicos motores y pérdida de peso en los animales EAE.
  2. Disminuye las características histológicas de la esclerosis múltiple: Reduce el infiltrado inflamatorio, la desmielinización, la pérdida de oligodendrocitos y la pérdida de la plasticidad axonal en los animales EAE
  3. Protege a los animales EAE del estrés oxidativo: Disminuye la acumulación de ROS y los niveles de marcadores de oxidación; y aumenta los niveles de marcadores anti-oxidantes en suero y tejidos del SNC.
  4. Previene de la acumulación de glutamato en tejidos del SNC de los animales enfermos.
  
- En relación con los estudios realizados en el modelo animal MAE, el tratamiento con el ácido oleanólico:
  5. Protege del aumento de la relación peso corporal/ peso del corazón.
  6. Reduce la acumulación de marcadores del daño cardiaco.
  7. Disminuye las características histológicas de la miocarditis: Reduce el infiltrado inflamatorio, la fibrosis y la calcificación, en miocardio de ratones MAE.
  8. Modula la respuesta inmuno-inflamatoria: Inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias y aumenta los niveles de citoquinas anti-inflamatorias, dando

lugar a cambios en el balance de la respuesta Th1/Th2. Además aumenta la presencia de células Treg.

- En relación con los estudios realizados en el modelo animal CAE, el tratamiento con el ácido oleanólico:
  9. Disminuye las características histológicas de la conjuntivitis alérgica: Previene de la degranulación de mastocitos dependiente de IgE y la infiltración de eosinófilos en la conjuntiva.
  10. Modula la respuesta inmuno-inflamatoria: Inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias y quimiocinas; y aumenta los niveles de citoquinas anti-inflamatorias.
  
- En relación con los estudios *in vitro* realizados en varias células relevantes en las distintas patologías, el tratamiento con el ácido oleanólico:
  11. Disminuye la liberación de ROS por células ganglionares de retina, así como la muerte celular que induce.
  12. Modula las funciones de las células relevantes del remodelado cardiaco.
  13. Protege frente la migración de eosinófilos y basófilos a los focos de inflamación y de la diferenciación de eosinófilos.

Por tanto se puede concluir que el ácido oleanólico ejerce un efecto protector en enfermedades inflamatorias y autoinmunes, y podría ser considerado como un complemento/alternativa en terapias frente a enfermedades inflamatorias.



## **VI. BIBLIOGRAFIA**

1. Wright, C.M., *Biographical notes on Ancel Keys and Salim Yusuf: origins and significance of the seven countries study and the INTERHEART study*. J Clin Lipidol, 2011. **5**(6): p. 434-40.
2. Sotos-Prieto, M., M.A. Zulet, and D. Corella, *[Scientific evidence of the mediterranean diet effects in determining intermediate and final cardiovascular disease phenotypes]*. Med Clin (Barc), 2010. **134**(1): p. 22-9.
3. Calañas-Continente, A. and D. Bellido, *Bases científicas de una alimentación saludable*. Rev Med Univ Navarra, 2006. **50**, nº 4: p. 7-14.
4. Ortega, R., *Importance of functional foods in the Mediterranean diet*. Public Health Nutr, 2006. **9**(8A): p. 1136-40.
5. Visioli, F., et al., *Mediterranean food and health: building human evidence*. J Physiol Pharmacol, 2005. **56 Suppl 1**: p. 37-49.
6. Estruch, R., et al., *Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet*. N Engl J Med, 2013. **368**(14): p. 1279-90.
7. Crous-Bou, M., et al., *Mediterranean diet and telomere length in Nurses' Health Study: population based cohort study*. BMJ, 2014. **349**.
8. Portou, M.J., et al., *The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review*. Vascular Pharmacology, (0).
9. Fausto, K.A., *Robins & Cotran Patologia - Bases patológicas das doenças*, ed. 7th. 1999: ELSEVIER.
10. Peng, Y., et al., *Innate and adaptive immune response to apoptotic cells*. Journal of Autoimmunity, 2007. **29**(4): p. 303-309.
11. Smeltzer, S.C., et al., *BRUNNER & SIDDARTH'S TEXTBOOK OF MEDICAL-SURGICAL NURSING*, ed. 11. Vol. 2. 2009: Editora Guanabara Koogan S. A.
12. Green, M.S.N.M., *MEDICAL-SURGICAL NURSING Health and Illness Perspectives*, ed. th. 2007, Loures: LUSODIDACTA.
13. Vincenti, F. and M. Luggen, *T cell costimulation: a rational target in the therapeutic armamentarium for autoimmune diseases and transplantation*. Annu Rev Med, 2007. **58**: p. 347-58.
14. Cunha-Neto, E., et al., *Autoimmunity*. Adv Parasitol, 2011. **76**: p. 129-52.
15. Miyagawa, F., et al., *The use of mouse models to better understand mechanisms of autoimmunity and tolerance*. Journal of Autoimmunity, 2010. **35**(3): p. 192-198.
16. Viorritto, I.C.B., N.P. Nikolov, and R.M. Siegel, *Autoimmunity versus tolerance: Can dying cells tip the balance?* Clinical Immunology, 2007. **122**(2): p. 125-134.
17. Sun, E., *Cell death recognition model for the immune system*. Med Hypotheses, 2008. **70**(3): p. 585-96.
18. Fehervari, Z. and S. Sakaguchi, *CD4+ Tregs and immune control*. J Clin Invest, 2004. **114**(9): p. 1209-17.
19. Wright, K.T., C. Giardina, and A.T. Vella, *Therapeutic targeting of the inflammome*. Biochemical Pharmacology, 2014. **92**(2): p. 184-191.
20. Rescigno, M., *Dendritic cell functions: Learning from microbial evasion strategies*. Semin Immunol, 2015.
21. Lleo, A., et al., *The consequences of apoptosis in autoimmunity*. Journal of Autoimmunity, 2008. **31**(3): p. 257-262.
22. Bahamonde, C., et al., *Elevated melatonin levels in natalizumab-treated female patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: Relationship to oxidative stress*. Eur J Pharmacol, 2014. **730C**: p. 26-30.
23. Marrie, R.A., *Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology*. Lancet Neurol, 2004. **3**(12): p. 709-18.
24. Witte, M.E., et al., *Mitochondrial dysfunction contributes to neurodegeneration in multiple sclerosis*. Trends Mol Med, 2014. **20**(3): p. 179-187.

25. Ellwardt, E. and F. Zipp, *Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS*. Exp Neurol, 2014.
26. van Waesberghe, J.H., et al., *Axonal loss in multiple sclerosis lesions: magnetic resonance imaging insights into substrates of disability*. Ann Neurol, 1999. **46**(5): p. 747-54.
27. Lassmann, H., W. Bruck, and C. Lucchinetti, *Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy*. Trends Mol Med, 2001. **7**(3): p. 115-21.
28. Singh, V., et al., *Proteomics technologies for biomarker discovery in multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2012. **248**(1-2): p. 40-7.
29. Lee, D.H., R. Gold, and R.A. Linker, *Mechanisms of Oxidative Damage in Multiple Sclerosis and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Modulation via Fumaric Acid Esters*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(9): p. 11783-803.
30. Hernandez-Pedro, N.Y., et al., *Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 413465.
31. Hauser, S.L. and J.R. Oksenberg, *The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 61-76.
32. Koch-Henriksen, N. and P.S. Sorensen, *The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology*. Lancet Neurol, 2010. **9**(5): p. 520-32.
33. Gaby, A., *Multiple sclerosis*. Glob Adv Health Med, 2013. **2**(1): p. 50-6.
34. Hedstrom, A.K., et al., *Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis*. Neurology, 2014. **82**(10): p. 865-72.
35. Haghikia, A., et al., *Therapies for multiple sclerosis: translational achievements and outstanding needs*. Trends Mol Med, 2013. **19**(5): p. 309-19.
36. de Andres, C., *[The interest of multiple sclerosis attacks. Physiopathology and therapy]*. Rev Neurol, 2003. **36**(11): p. 1058-64.
37. Trapp, B.D. and K.A. Nave, *Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?* Annu Rev Neurosci, 2008. **31**: p. 247-69.
38. Ferreira, B., et al., *Glutathione in multiple sclerosis*. Br J Biomed Sci, 2013. **70**(2): p. 75-9.
39. Ghezzi, A., *Therapeutic strategies in childhood multiple sclerosis*. Ther Adv Neurol Disord, 2010. **3**(4): p. 217-28.
40. Polman, C.H., et al., *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria*. Ann Neurol, 2011. **69**(2): p. 292-302.
41. Arcos Sánchez, C., F.T. Salinas Vela, and M.N. Olmedilla González, *Nuevas perspectivas en el tratamiento de la Esclerosis múltiple*. Sanidad Militar, 2011. **67**: p. 108-114.
42. Miller, D.H., D.T. Chard, and O. Ciccarelli, *Clinically isolated syndromes*. Lancet Neurol, 2012. **11**(2): p. 157-69.
43. Lublin, F.D. and S.C. Reingold, *Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis*. Neurology, 1996. **46**(4): p. 907-11.
44. Keegan, B.M. and J.H. Noseworthy, *Multiple sclerosis*. Annu Rev Med, 2002. **53**: p. 285-302.
45. Boulanger, J.J. and C. Messier, *From precursors to myelinating oligodendrocytes: Contribution of intrinsic and extrinsic factors to white matter plasticity in the adult brain*. Neuroscience, 2014. **269C**: p. 343-366.
46. Clemente, D., et al., *The effect of glia-glia interactions on oligodendrocyte precursor cell biology during development and in demyelinating diseases*. Front Cell Neurosci, 2013. **7**: p. 268.

47. von Bernhardt, R., *La Barrera Hemato-Encefálica en la patología del Sistema Nervioso Central: su importancia en la Respuesta Inflamatoria*. Revista chilena de neuropsiquiatría, 2004. **42**: p. 121-130.
48. Peterson, L.K. and R.S. Fujinami, *Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2007. **184**(1-2): p. 37-44.
49. Herz, J., F. Zipp, and V. Siffrin, *Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation*. Exp Neurol, 2010. **225**(1): p. 9-17.
50. Sato, F., et al., *Theiler's virus infection: Pathophysiology of demyelination and neurodegeneration*. Pathophysiology, 2011. **18**(1): p. 31-41.
51. Hermanns, S., et al., *The collagenous wound healing scar in the injured central nervous system inhibits axonal regeneration*. Adv Exp Med Biol, 2006. **557**: p. 177-90.
52. Rudick, R.A. and S.E. Goelz, *Beta-interferon for multiple sclerosis*. Exp Cell Res, 2011. **317**(9): p. 1301-11.
53. Comi, G., et al., *Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study*. Lancet, 2001. **357**(9268): p. 1576-82.
54. Brown, B.A., *Natalizumab in the treatment of multiple sclerosis*. Ther Clin Risk Manag, 2009. **5**(3): p. 585-94.
55. Stuve, O., et al., *alpha4-Integrin antagonism with natalizumab: effects and adverse effects*. J Neurol, 2008. **255 Suppl 6**: p. 58-65.
56. Killestein, J., R.A. Rudick, and C.H. Polman, *Oral treatment for multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2011. **10**(11): p. 1026-34.
57. Garcia-Merino, J.A. and A.J. Sanchez, *[Basic mechanisms of action of fingolimod in relation to multiple sclerosis]*. Rev Neurol, 2012. **55**(1): p. 31-7.
58. Cotte, S., et al., *ABC-transporter gene-polymorphisms are potential pharmacogenetic markers for mitoxantrone response in multiple sclerosis*. Brain, 2009. **132**(Pt 9): p. 2517-30.
59. Witte, M.E., et al., *Mitochondrial dysfunction: a potential link between neuroinflammation and neurodegeneration?* Mitochondrion, 2010. **10**(5): p. 411-8.
60. Denic, A., et al., *The relevance of animal models in multiple sclerosis research*. Pathophysiology, 2011. **18**(1): p. 21-9.
61. Ransohoff, R.M., *Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line*. Nat Neurosci, 2012. **15**(8): p. 1074-7.
62. Molina-Holgado, E., et al., *[Theiler's virus encephalomyelitis infection as a model for multiple sclerosis: cytokines and pathogenic mechanisms]*. Rev Neurol, 2002. **35**(10): p. 973-8.
63. Pachner, A.R., *Experimental models of multiple sclerosis*. Curr Opin Neurol, 2011. **24**(3): p. 291-9.
64. van der Star, B.J., et al., *In vitro and in vivo models of multiple sclerosis*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2012. **11**(5): p. 570-88.
65. Rivers, T.M., D.H. Sprunt, and G.P. Berry, *OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS*. J Exp Med, 1933. **58**(1): p. 39-53.
66. Rangachari, M. and V.K. Kuchroo, *Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology*. J Autoimmun, 2013. **45**: p. 31-9.
67. Sun, D., et al., *Encephalitogenic activity of truncated myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptides and their recognition by CD8+ MOG-specific T cells on oligomeric MHC class I molecules*. Int Immunol, 2003. **15**(2): p. 261-8.
68. Slavin, A., et al., *Induction of a multiple sclerosis-like disease in mice with an immunodominant epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein*. Autoimmunity, 1998. **28**(2): p. 109-20.

69. Mendel, I., N. Kerlero de Rosbo, and A. Ben-Nun, *A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(7): p. 1951-9.
70. Iglesias, A., et al., *T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis*. Glia, 2001. **36**(2): p. 220-34.
71. Sriram, S. and I. Steiner, *Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2005. **58**(6): p. 939-45.
72. Steinman, L., *Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy*. Neuron, 1999. **24**(3): p. 511-4.
73. Elenkov, I.J. and G.P. Chrousos, *Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **966**: p. 290-303.
74. Lafaille, J.J., et al., *Pillars article: High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice*. Cell. 1994. **78**: 399-408. J Immunol, 2013. **190**(7): p. 3028-37.
75. O'Garra, A., L. Steinman, and K. Gijbels, *CD4+ T-cell subsets in autoimmunity*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(6): p. 872-83.
76. Cash, E., et al., *Macrophage-inactivating IL-13 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in rats*. J Immunol, 1994. **153**(9): p. 4258-67.
77. Stromnes, I.M., et al., *Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 337-42.
78. Kroenke, M.A., et al., *IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1535-41.
79. Codarri, L., M. Greter, and B. Becher, *Communication between pathogenic T cells and myeloid cells in neuroinflammatory disease*. Trends Immunol, 2013. **34**(3): p. 114-9.
80. Simmons, S.B., et al., *Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals*. Trends Immunol, 2013. **34**(8): p. 410-22.
81. Segal, B.M., B.K. Dwyer, and E.M. Shevach, *An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease*. J Exp Med, 1998. **187**(4): p. 537-46.
82. Goverman, J., *Autoimmune T cell responses in the central nervous system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(6): p. 393-407.
83. Aggarwal, S., et al., *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1910-4.
84. Kleinschek, M.A., et al., *IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 161-70.
85. Fillatreau, S., et al., *B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10*. Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 944-50.
86. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-87.
87. Richardson, P., et al., *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies*. Circulation, 1996. **93**(5): p. 841-2.
88. Aretz, H.T., et al., *Myocarditis. A histopathologic definition and classification*. Am J Cardiovasc Pathol, 1987. **1**(1): p. 3-14.
89. Li, H.S., D.L. Ligans, and N.R. Rose, *Genetic complexity of autoimmune myocarditis*. Autoimmun Rev, 2008. **7**(3): p. 168-73.
90. Laradogoitia, E. and I. Díez, *Miocarditis y miocardiopatías*. Revista Española de Cardiología, 2006. **6**(Supl.E): p. 21-29.



91. Rizo, G.O., *Miocarditis: Parte 1*. Insuficiencia cardíaca, 2014. **9**: p. 134-142.
92. Mito, S., et al., *Curcumin ameliorates cardiac inflammation in rats with autoimmune myocarditis*. Biol Pharm Bull, 2011. **34**(7): p. 974-9.
93. Oka, K., et al., *Fulminant myocarditis demonstrating uncommon morphology--a report of two autopsy cases*. Virchows Arch, 2005. **446**(3): p. 259-64.
94. Cunningham, M.W., *Cardiac myosin and the TH1/TH2 paradigm in autoimmune myocarditis*. Am J Pathol, 2001. **159**(1): p. 5-12.
95. Rose, N.R. and S.L. Hill, *Autoimmune myocarditis*. International Journal of Cardiology. **54**(2): p. 171-175.
96. Rose, N.R. and S.L. Hill, *The Pathogenesis of Postinfectious Myocarditis*. Clinical Immunology and Immunopathology, 1996. **80**(3): p. S92-S99.
97. Galve Basilio, E., et al., *Guidelines of the Spanish Society of Cardiology on Cardiomyopathy and Myocarditis*. 2000. **53**: p. 360-393.
98. Tominaga, M., et al., *Beta-blocker treatment of dilated cardiomyopathy. Beneficial effect of carteolol in mice*. Circulation, 1991. **83**(6): p. 2021-8.
99. Magnani, J.W. and G.W. Dec, *Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment*. Circulation, 2006. **113**(6): p. 876-90.
100. Kindermann, I., et al., *Update on myocarditis*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(9): p. 779-92.
101. Wei, L., *Immunological aspect of cardiac remodeling: T lymphocyte subsets in inflammation-mediated cardiac fibrosis*. Exp Mol Pathol, 2011. **90**(1): p. 74-8.
102. Marsland, B.J., et al., *TLR ligands act directly upon T cells to restore proliferation in the absence of protein kinase C-theta signaling and promote autoimmune myocarditis*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3466-73.
103. Lichtman, A.H., *The heart of the matter: protection of the myocardium from T cells*. J Autoimmun, 2013. **45**: p. 90-6.
104. Goser, S., et al., *Critical role for monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1alpha in induction of experimental autoimmune myocarditis and effective anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy*. Circulation, 2005. **112**(22): p. 3400-7.
105. Matsumori, A., *Cytokines in myocarditis and cardiomyopathies*. Curr Opin Cardiol, 1996. **11**(3): p. 302-9.
106. Porter, K.E. and N.A. Turner, *Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling*. Pharmacol Ther, 2009. **123**(2): p. 255-78.
107. Kohl, P., *Cardiac cellular heterogeneity and remodelling*. Cardiovasc Res, 2004. **64**(2): p. 195-7.
108. Banerjee, I., et al., *Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1080**: p. 76-84.
109. Turner, N.A. and K.E. Porter, *Regulation of myocardial matrix metalloproteinase expression and activity by cardiac fibroblasts*. IUBMB Life, 2012. **64**(2): p. 143-50.
110. Stallion, A., et al., *Myocardial calcification: a predictor of poor outcome for myocarditis treated with extracorporeal life support*. J Pediatr Surg, 1994. **29**(4): p. 492-4.
111. Matsumori, A., et al., *High doses of digitalis increase the myocardial production of proinflammatory cytokines and worsen myocardial injury in viral myocarditis: a possible mechanism of digitalis toxicity*. Jpn Circ J, 1999. **63**(12): p. 934-40.
112. *Heart Failure Society of America (HFSA) practice guidelines. HFSA guidelines for management of patients with heart failure caused by left ventricular systolic dysfunction--pharmacological approaches*. J Card Fail, 1999. **5**(4): p. 357-82.
113. Gluck, B., et al., *Cardioprotective effect of NO-metoprolol in murine coxsackievirus B3-induced myocarditis*. J Med Virol, 2010. **82**(12): p. 2043-52.
114. Fuchs, M. and H. Drexler, *Pharmacotherapy of chronic heart failure: current status and future aspects*. European Heart Journal Supplements, 2002. **4**(suppl I): p. I81-I87.

115. Felix, S.B., A. Staudt, and G. Baumann, *Immunoabsorption as a new therapeutic principle for treatment of dilated cardiomyopathy*. European Heart Journal Supplements, 2002. **4**(suppl I): p. I63-I68.
116. Montero-Cabezas, J.M., *Treatment of myocarditis and its complications*. Cardiacore, 2012. **47**(4): p. 147-150.
117. San Martín, M.A., et al., *[Dilated cardiomyopathy and autoimmunity: an overview of current knowledge and perspectives]*. Rev Esp Cardiol, 2002. **55**(5): p. 514-24.
118. Billingham, M.E., *Can histopathology guide immunosuppression for cardiac allograft rejection in the light of new techniques?* Transplant Proc, 1997. **29**(8A): p. 35S-36S.
119. Pummerer, C.L., et al., *Identification of cardiac myosin peptides capable of inducing autoimmune myocarditis in BALB/c mice*. J Clin Invest, 1996. **97**(9): p. 2057-62.
120. Liao, L., et al., *Cardiac alpha-myosin heavy chains differ in their induction of myocarditis. Identification of pathogenic epitopes*. J Clin Invest, 1993. **92**(6): p. 2877-82.
121. Neu, N., et al., *Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice*. J Immunol, 1987. **139**(11): p. 3630-6.
122. Ritter, J.T., et al., *In vivo characterization of cytokine profiles and viral load during murine cytomegalovirus-induced acute myocarditis*. Cardiovasc Pathol, 2010. **19**(2): p. 83-93.
123. Cruz-Adalia, A., et al., *CD69 limits the severity of cardiomyopathy after autoimmune myocarditis*. Circulation, 2010. **122**(14): p. 1396-404.
124. Huber, S.A., *Autoimmunity in Myocarditis: Relevance of Animal Models*. Clinical Immunology and Immunopathology, 1997. **83**(2): p. 93-102.
125. Constantinescu, C.S., et al., *Pathogenesis of neuroimmunologic diseases. Experimental models*. Immunol Res, 1998. **17**(1-2): p. 217-27.
126. Itziar Familiar López, H.H.B., *Myocarditis viral*. Medigraphic Artemisa, 2006. **13**(3): p. 122-128.
127. Leonardi, A., et al., *Ocular allergy: recognizing and diagnosing hypersensitivity disorders of the ocular surface*. Allergy, 2012. **67**(11): p. 1327-37.
128. MC Sánchez, B.F.P., V Matheu, A Navarro, MD Ibáñez, I Dávila, MT Dordal, M Lluch Bernal, C Rondón, J Montoro, E Antón, C Colás, A Valero, *Allergic Conjunctivitis*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2011. **21**: p. 1-19.
129. Saloiero, M.S., et al., *Conjunctivitis*, ed. E. MED. 1995, Barcelona: S. L. Barcelona.
130. Sanz, J.A., et al., *Guiones de Oftalmología*. 1999, Madrid: MC Graw Hill - interamericana.
131. Ono, S.J. and M.B. Abelson, *Allergic conjunctivitis: update on pathophysiology and prospects for future treatment*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(1): p. 118-22.
132. Fukushima, A., et al., *TLR2 agonist ameliorates murine experimental allergic conjunctivitis by inducing CD4 positive T-cell apoptosis rather than by affecting the Th1/Th2 balance*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(4): p. 1048-55.
133. Bilkhu, P.S., J.S. Wolffsohn, and S.A. Naroo, *A review of non-pharmacological and pharmacological management of seasonal and perennial allergic conjunctivitis*. Cont Lens Anterior Eye, 2012. **35**(1): p. 9-16.
134. Bielory, L., *Allergic and immunologic disorders of the eye. Part II: ocular allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(6): p. 1019-32.
135. Fukuda, K., et al., *Critical role of IgE-dependent mast cell activation in a murine model of allergic conjunctivitis*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(4): p. 827-33 e2.
136. Calonge, M., K.F. Siemasko, and M.E. Stern, *Animal models of ocular allergy and their clinical correlations*. Curr Allergy Asthma Rep, 2003. **3**(4): p. 345-51.
137. Abelson, M.B., L. Smith, and M. Chapin, *Ocular allergic disease: mechanisms, disease sub-types, treatment*. Ocul Surf, 2003. **1**(3): p. 127-49.

138. *Guía de Práctica Clínica: Alergia a picadura de himenópteros en pediatría*. Archivos argentinos de pediatría, 2010. **108**: p. 266-272.
139. Groneberg, D.A., et al., *Animal models of allergic and inflammatory conjunctivitis*. Allergy, 2003. **58**(11): p. 1101-13.
140. Magone, M.T., et al., *A novel murine model of allergic conjunctivitis*. Clin Immunol Immunopathol, 1998. **87**(1): p. 75-84.
141. Vincken, J.P., et al., *Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom*. Phytochemistry, 2007. **68**(3): p. 275-97.
142. Yoshikawa, M., et al., *Bioactive saponins and glycosides. II. Senegae Radix. (2): Chemical structures, hypoglycemic activity, and ethanol absorption-inhibitory effect of E-senegasaponin c, Z-senegasaponin c, and Z-senegins II, III, and IV*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1996. **44**(7): p. 1305-13.
143. Shanmugam, M.K., et al., *Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical evidence*. Cancer Lett, 2014.
144. Pollier, J. and A. Goossens, *Oleanolic acid*. Phytochemistry, 2012. **77**: p. 10-5.
145. Simonsen, U., et al., *Novel approaches to improving endothelium-dependent nitric oxide-mediated vasodilatation*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(1): p. 105-15.
146. Sanchez-Quesada, C., et al., *Bioactive properties of the main triterpenes found in olives, virgin olive oil, and leaves of Olea europaea*. J Agric Food Chem, 2013. **61**(50): p. 12173-82.
147. Lou-Bonafonte, J.M., et al., *Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(7): p. 1043-57.
148. Fernandes, J., et al., *Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines*. Cancer Lett, 2003. **190**(2): p. 165-9.
149. Li, J., W.J. Guo, and Q.Y. Yang, *Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15*. World J Gastroenterol, 2002. **8**(3): p. 493-5.
150. Juan, M.E., et al., *Olive fruit extracts inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 human colon cancer cells*. J Nutr, 2006. **136**(10): p. 2553-7.
151. Juan, M.E., et al., *Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells*. Br J Nutr, 2008. **100**(1): p. 36-43.
152. Sohn, K.H., et al., *Anti-angiogenic activity of triterpene acids*. Cancer Lett, 1995. **94**(2): p. 213-8.
153. Hsu, H.Y., J.J. Yang, and C.C. Lin, *Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice*. Cancer Lett, 1997. **111**(1-2): p. 7-13.
154. Martin, R., et al., *Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation*. Cancer Res, 2007. **67**(8): p. 3741-51.
155. Angaswamy, N., et al., *Synergism of a natural plant product, oleanolic acid with calcineurin inhibitor in prolonging islet allograft survival*. Transpl Immunol, 2013. **29**(1-4): p. 64-70.
156. Dharmappa, K.K., et al., *Anti-inflammatory activity of oleanolic acid by inhibition of secretory phospholipase A2*. Planta Med, 2009. **75**(3): p. 211-5.
157. Singh, G.B., et al., *Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice*. J Pharm Pharmacol, 1992. **44**(5): p. 456-8.
158. Leu, Y.L., et al., *The inhibition of superoxide anion generation by neutrophils from Viscum articulatum*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2004. **52**(7): p. 858-60.
159. Tsai, S.J. and M.C. Yin, *Anti-oxidative, anti-glycative and anti-apoptotic effects of oleanolic acid in brain of mice treated by D-galactose*. Eur J Pharmacol, 2012. **689**(1-3): p. 81-8.

160. Wang, X., et al., *Oleanolic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory effects*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **376**(1-2): p. 70-80.
161. Zhang, H., et al., *Curative effects of oleanolic Acid on formed hypertrophic scars in the rabbit ear model*. Evid Based Complement Alternat Med, 2012. **2012**: p. 837581.
162. Joy Hoskeri, H., et al., *In vivo prophylactic effects of oleanolic acid isolated from chloroform extract of Flaveria trinervia against ethanol induced liver toxicity in rats*. Arch Pharm Res, 2012. **35**(10): p. 1803-10.
163. Liu, J., *Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid*. J Ethnopharmacol, 1995. **49**(2): p. 57-68.
164. Gupta, M.B., et al., *Antiulcer activity of some plant triterpenoids*. Indian J Med Res, 1981. **73**: p. 649-52.
165. Wrzeczono, U., et al., *[Nitrogenous triterpene derivatives. 10. Hemisuccinates of some oleanolic acid derivatives and their antiulcer effect]*. Pharmazie, 1985. **40**(8): p. 542-4.
166. Tang, H.Q., et al., *Terpenoids and flavonoids from Artemisia species*. Planta Med, 2000. **66**(4): p. 391-3.
167. Marquina, S., et al., *Bioactive oleanolic acid saponins and other constituents from the roots of Viguiera decurrens*. Phytochemistry, 2001. **56**(1): p. 93-7.
168. Favel, A., et al., *In vitro antifungal activity of triterpenoid saponins*. Planta Med, 1994. **60**(1): p. 50-3.
169. Hou, W., et al., *Triterpene acids isolated from Lagerstroemia speciosa leaves as alpha-glucosidase inhibitors*. Phytother Res, 2009. **23**(5): p. 614-8.
170. Chen, J., et al., *Pentacyclic triterpenes. Part 3: Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase*. Bioorg Med Chem Lett, 2006. **16**(11): p. 2915-9.
171. Wang, Z.H., et al., *Anti-glycative effects of oleanolic acid and ursolic acid in kidney of diabetic mice*. Eur J Pharmacol, 2010. **628**(1-3): p. 255-60.
172. Li, Y., H. Matsuda, and M. Yoshikawa, *Effects of oleanolic acid glycosides on gastrointestinal transit and ileus in mice*. Bioorg Med Chem, 1999. **7**(6): p. 1201-5.
173. Yoo, K.Y. and S.Y. Park, *Terpenoids as potential anti-Alzheimer's disease therapeutics*. Molecules, 2012. **17**(3): p. 3524-38.
174. Martin, R., et al., *Natural triterpenes modulate immune-inflammatory markers of experimental autoimmune encephalomyelitis: therapeutic implications for multiple sclerosis*. Br J Pharmacol, 2012. **166**(5): p. 1708-23.
175. Muto, Y., M. Ninomiya, and H. Fujiki, *Present status of research on cancer chemoprevention in Japan*. Jpn J Clin Oncol, 1990. **20**(3): p. 219-24.
176. Honda, T., et al., *Synthetic oleanane and ursane triterpenoids with modified rings A and C: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages*. J Med Chem, 2000. **43**(22): p. 4233-46.
177. Liby, K.T. and M.B. Sporn, *Synthetic oleanane triterpenoids: multifunctional drugs with a broad range of applications for prevention and treatment of chronic disease*. Pharmacol Rev, 2012. **64**(4): p. 972-1003.
178. Dumont, M., et al., *Triterpenoid CDDO-methylamide improves memory and decreases amyloid plaques in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2009. **109**(2): p. 502-12.
179. Liby, K., et al., *Triterpenoids CDDO-methyl ester or CDDO-ethyl amide and rexinoids LG100268 or NRX194204 for prevention and treatment of lung cancer in mice*. Cancer Prev Res (Phila), 2009. **2**(12): p. 1050-8.
180. Tran, T.A., et al., *The synthetic triterpenoid CDDO-methyl ester modulates microglial activities, inhibits TNF production, and provides dopaminergic neuroprotection*. J Neuroinflammation, 2008. **5**: p. 14.

181. Sporn, M.B., et al., *New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress*. J Nat Prod, 2011. **74**(3): p. 537-45.
182. Stadheim, T.A., et al., *The novel triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid (CDDO) potently enhances apoptosis induced by tumor necrosis factor in human leukemia cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(19): p. 16448-55.
183. Yue, P., et al., *Depletion of intracellular glutathione contributes to JNK-mediated death receptor 5 upregulation and apoptosis induction by the novel synthetic triterpenoid methyl-2-cyano-3, 12-dioxooleana-1, 9-dien-28-oate (CDDO-Me)*. Cancer Biol Ther, 2006. **5**(5): p. 492-7.
184. Mora, M., et al., *Modified Klüber-Barrera staining for the study and diagnosis of fetal encephalopathies*. Ital J Anat Embryol, 2007. **112**(2): p. 111-6.
185. Xu, J., et al., *Imaging of reactive oxygen species burst from mitochondria using laser scanning confocal microscopy*. Microsc Res Tech, 2013. **76**(6): p. 612-7.
186. LeBel, C.P., H. Ischiropoulos, and S.C. Bondy, *Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress*. Chem Res Toxicol, 1992. **5**(2): p. 227-31.
187. Wang, H. and J.A. Joseph, *Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(5-6): p. 612-6.
188. Schmued, L.C., et al., *Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons*. Brain Res, 2005. **1035**(1): p. 24-31.
189. Becerra, M.C., et al., *Lipids and DNA oxidation in Staphylococcus aureus as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin*. Mol Cell Biochem, 2006. **285**(1-2): p. 29-34.
190. Capeillere-Blandin, C., et al., *Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1689**(2): p. 91-102.
191. Benzie, I.F. and J.J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. Anal Biochem, 1996. **239**(1): p. 70-6.
192. Kan, Q.C., et al., *Matrine regulates glutamate-related excitotoxic factors in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Neurosci Lett, 2014. **560**: p. 92-7.
193. Barsumian, E.L., et al., *IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones*. Eur J Immunol, 1981. **11**(4): p. 317-23.
194. Passante, E., et al., *RBL-2H3 cells are an imprecise model for mast cell mediator release*. Inflamm Res, 2009. **58**(9): p. 611-8.
195. Mayumi, M., *EoL-1, a human eosinophilic cell line*. Leuk Lymphoma, 1992. **7**(3): p. 243-50.
196. Heredia, M.P., et al., *Neuropeptide Y increases 4-aminopyridine-sensitive transient outward potassium current in rat ventricular myocytes*. Br J Pharmacol, 2002. **135**(7): p. 1701-6.
197. Heredia Mdel, P., et al., *Neuropeptide Y rapidly enhances [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients and Ca<sup>2+</sup> sparks in adult rat ventricular myocytes through Y1 receptor and PLC activation*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(1): p. 205-12.
198. Fernandez-Velasco, M., et al., *TNF-alpha downregulates transient outward potassium current in rat ventricular myocytes through iNOS overexpression and oxidant species generation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H238-45.
199. Martin, R., et al., *DIOL triterpenes block profibrotic effects of angiotensin II and protect from cardiac hypertrophy*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41545.
200. Benitah, J.P., et al., *Heterogeneity of the early outward current in ventricular cells isolated from normal and hypertrophied rat hearts*. J Physiol, 1993. **469**: p. 111-38.
201. Benitah, J.P., et al., *Effects of aldosterone on transient outward K<sup>+</sup> current density in rat ventricular myocytes*. J Physiol, 2001. **537**(Pt 1): p. 151-60.

202. Gregory, C.A., et al., *An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction*. *Anal Biochem*, 2004. **329**(1): p. 77-84.
203. Bechtold, D.A., R. Kapoor, and K.J. Smith, *Axonal protection using flecainide in experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Ann Neurol*, 2004. **55**(5): p. 607-16.
204. Teunissen, C.E., et al., *Growth-associated protein 43 in lesions and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2006. **32**(3): p. 318-31.
205. Qi, X., et al., *Suppression of mitochondrial oxidative stress provides long-term neuroprotection in experimental optic neuritis*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007. **48**(2): p. 681-91.
206. Anand, I.S., et al., *Baseline and serial measurements of galectin-3 in patients with heart failure: relationship to prognosis and effect of treatment with valsartan in the Val-HeFT*. *Eur J Heart Fail*, 2013. **15**(5): p. 511-8.
207. Lopez-Andres, N., et al., *Association of galectin-3 and fibrosis markers with long-term cardiovascular outcomes in patients with heart failure, left ventricular dysfunction, and dyssynchrony: insights from the CARE-HF (Cardiac Resynchronization in Heart Failure) trial*. *Eur J Heart Fail*, 2012. **14**(1): p. 74-81.
208. Tominaga, T., et al., *Blocking mast cell-mediated type I hypersensitivity in experimental allergic conjunctivitis by monocyte chemoattractant protein-1/CCR2*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. **50**(11): p. 5181-8.
209. Saito, H., et al., *Effect of butyric acid on induction of differentiation into eosinophil-like cells in human eosinophilic leukemia cells, EoL-1 cell line: possible role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an autocrine differentiating factor*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1993. **100**(3): p. 240-7.
210. Somova, L.I., F.O. Shode, and M. Mipando, *Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol*. *Phytomedicine*, 2004. **11**(2-3): p. 121-9.
211. Marquez-Martin, A., et al., *Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells*. *Cytokine*, 2006. **36**(5-6): p. 211-7.
212. Martin, R., et al., *Beneficial actions of oleanolic acid in an experimental model of multiple sclerosis: a potential therapeutic role*. *Biochem Pharmacol*, 2010. **79**(2): p. 198-208.
213. Schreiner, B., F. Heppner, and B. Becher, *Modeling multiple sclerosis in laboratory animals*. *Seminars in Immunopathology*, 2009. **31**(4): p. 479-495.
214. Zamvil, S.S. and L. Steinman, *Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis*. *Neuron*, 2003. **38**(5): p. 685-8.
215. Bauer, J., H. Rauschka, and H. Lassmann, *Inflammation in the nervous system: the human perspective*. *Glia*, 2001. **36**(2): p. 235-43.
216. Owens, T., *The enigma of multiple sclerosis: inflammation and neurodegeneration cause heterogeneous dysfunction and damage*. *Curr Opin Neurol*, 2003. **16**(3): p. 259-65.
217. Esiri, M.M., *The interplay between inflammation and neurodegeneration in CNS disease*. *J Neuroimmunol*, 2007. **184**(1-2): p. 4-16.
218. Stadelmann, C., C. Wegner, and W. Bruck, *Inflammation, demyelination, and degeneration - recent insights from MS pathology*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1812**(2): p. 275-82.
219. Linington, C., et al., *Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein*. *Am J Pathol*, 1988. **130**(3): p. 443-54.
220. Hashemina, S.J., et al., *Cytokines gene expression in newly diagnosed multiple sclerosis patients*. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2015. **14**(2): p. 208-16.

221. Sriram, S., *Role of glial cells in innate immunity and their role in CNS demyelination*. J Neuroimmunol, 2011. **239**(1-2): p. 13-20.
222. Brown, D.A. and P.E. Sawchenko, *Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Comp Neurol, 2007. **502**(2): p. 236-60.
223. *Multiple sclerosis risk after optic neuritis: final optic neuritis treatment trial follow-up*. Arch Neurol, 2008. **65**(6): p. 727-32.
224. Pueyo, V., et al., *Axonal loss in the retinal nerve fiber layer in patients with multiple sclerosis*. Mult Scler, 2008. **14**(5): p. 609-14.
225. Compston, A. and A. Coles, *Multiple sclerosis*. Lancet, 2008. **372**(9648): p. 1502-17.
226. Black, J.A. and S.G. Waxman, *Phenytoin protects central axons in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neurol Sci, 2008. **274**(1-2): p. 57-63.
227. Kornek, B., et al., *Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions*. Am J Pathol, 2000. **157**(1): p. 267-76.
228. Peterson, J.W., et al., *Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions*. Ann Neurol, 2001. **50**(3): p. 389-400.
229. Curtis, R., et al., *The distribution of GAP-43 in normal rat spinal cord*. J Neurocytol, 1993. **22**(1): p. 39-50.
230. Kerschensteiner, M., et al., *Remodeling of axonal connections contributes to recovery in an animal model of multiple sclerosis*. J Exp Med, 2004. **200**(8): p. 1027-38.
231. Frohman, E.M., M.K. Racke, and C.S. Raine, *Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis*. N Engl J Med, 2006. **354**(9): p. 942-55.
232. Aharoni, R., et al., *Demyelination arrest and remyelination induced by glatiramer acetate treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(32): p. 11358-63.
233. Wolswijk, G., *Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord*. Brain, 2002. **125**(Pt 2): p. 338-49.
234. Dowling, P., et al., *Cell death and birth in multiple sclerosis brain*. J Neurol Sci, 1997. **149**(1): p. 1-11.
235. Chang, A., et al., *NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions*. J Neurosci, 2000. **20**(17): p. 6404-12.
236. Chidlow, G., et al., *Evaluation of Fluoro-Jade C as a marker of degenerating neurons in the rat retina and optic nerve*. Exp Eye Res, 2009. **88**(3): p. 426-37.
237. Cardoso, H.D., et al., *Differential vulnerability of substantia nigra and corpus striatum to oxidative insult induced by reduced dietary levels of essential fatty acids*. Front Hum Neurosci, 2012. **6**: p. 249.
238. Thomas, B. and M.F. Beal, *Parkinson's disease*. Hum Mol Genet, 2007. **16 Spec No. 2**: p. R183-94.
239. Melo, A., et al., *Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives*. Oxid Med Cell Longev, 2011. **2011**: p. 467180.
240. Hashimoto, M. and S. Hossain, *Neuroprotective and ameliorative actions of polyunsaturated fatty acids against neuronal diseases: beneficial effect of docosahexaenoic acid on cognitive decline in Alzheimer's disease*. J Pharmacol Sci, 2011. **116**(2): p. 150-62.
241. Kohen, R. and A. Nyska, *Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification*. Toxicol Pathol, 2002. **30**(6): p. 620-50.
242. Kolosova, N.G., et al., *Comparative analysis of LPO products in brain structures of Wistar and OXYS rats of different age*. Bull Exp Biol Med, 2003. **135**(6): p. 593-6.

243. Venkateshappa, C., et al., *Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human substantia nigra compared to striatum: implications for Parkinson's disease*. Neurochem Res, 2012. **37**(2): p. 358-69.
244. Cianfoni, A., S. Niku, and S.G. Imbesi, *Metabolite findings in tumefactive demyelinating lesions utilizing short echo time proton magnetic resonance spectroscopy*. AJNR Am J Neuroradiol, 2007. **28**(2): p. 272-7.
245. Sarchielli, P., et al., *Excitatory amino acids and multiple sclerosis: evidence from cerebrospinal fluid*. Arch Neurol, 2003. **60**(8): p. 1082-8.
246. Vercellino, M., et al., *Altered glutamate reuptake in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis cortex: correlation with microglia infiltration, demyelination, and neuronal and synaptic damage*. J Neuropathol Exp Neurol, 2007. **66**(8): p. 732-9.
247. Zarate, C., Jr., et al., *Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders?* Harv Rev Psychiatry, 2010. **18**(5): p. 293-303.
248. Kumar, P., H. Kalonia, and A. Kumar, *Role of LOX/COX pathways in 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease-like symptoms in rats: protective effect of licofelone*. Br J Pharmacol, 2011. **164**(2b): p. 644-54.
249. Srinivasan, R., et al., *Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T*. Brain, 2005. **128**(Pt 5): p. 1016-25.
250. Micu, I., et al., *NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia*. Nature, 2006. **439**(7079): p. 988-92.
251. Lieven, C.J., et al., *Retinal ganglion cell axotomy induces an increase in intracellular superoxide anion*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(4): p. 1477-85.
252. Kamal, F.A., et al., *A novel phenylpyridazinone, T-3999, reduces the progression of autoimmune myocarditis to dilated cardiomyopathy*. Heart Vessels, 2011. **26**(1): p. 81-90.
253. Pereira, D.A., et al., *Lotus corniculatus regulates the inflammation induced by bradykinin in a murine model of pleurisy*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(6): p. 2291-8.
254. Raphael, T.J. and G. Kuttan, *Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system*. Phytomedicine, 2003. **10**(6-7): p. 483-9.
255. Neu, N., et al., *Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to Coxsackievirus B3-induced myocarditis*. J Immunol, 1987. **138**(8): p. 2488-92.
256. Skyllouriotis, P., et al., *IgG subclass reactivity to human cardiac myosin in cardiomyopathy patients is indicative of a Th1-like autoimmune disease*. Clin Exp Immunol, 1999. **115**(2): p. 236-47.
257. Kuan, A.P., et al., *Immunoglobulin isotype determines pathogenicity in antibody-mediated myocarditis in naive mice*. Circ Res, 2000. **86**(3): p. 281-5.
258. Bahk, T.J., et al., *Comparison of angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade for the prevention of experimental autoimmune myocarditis*. Int J Cardiol, 2008. **125**(1): p. 85-93.
259. Eriksson, U., et al., *Interleukin-6-deficient mice resist development of autoimmune myocarditis associated with impaired upregulation of complement C3*. Circulation, 2003. **107**(2): p. 320-5.
260. Malkiel, S., S. Factor, and B. Diamond, *Autoimmune myocarditis does not require B cells for antigen presentation*. Journal of Immunology, 1999. **163**(10): p. 5265-5268.
261. Afanasyeva, M., et al., *Experimental Autoimmune Myocarditis in A/J mice Is an Interleukin-4-Dependent Disease with a Th2 Phenotype*. The American Journal of Pathology, 2001. **159**(1): p. 193-203.
262. Rose, N.R., *Critical cytokine pathways to cardiac inflammation*. J Interferon Cytokine Res, 2011. **31**(10): p. 705-10.



263. Cihakova, D. and N.R. Rose, *Chapter 4 Pathogenesis of Myocarditis and Dilated Cardiomyopathy*, in *Advances in Immunology*, W.A. Frederick, Editor. 2008, Academic Press. p. 95-114.
264. Baldeviano, G.C., et al., *Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy*. *Circ Res*, 2010. **106**(10): p. 1646-55.
265. x, et al., *IL-10–producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2004. **114**(10): p. 1372-1378.
266. Nishio, R., et al., *Treatment of experimental viral myocarditis with interleukin-10*. *Circulation*, 1999. **100**(10): p. 1102-8.
267. Chaturvedi, V., et al., *Cutting edge: Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance*. *J Immunol*, 2011. **186**(12): p. 6661-6.
268. Kochetkova, I., et al., *IL-35 stimulation of CD39+ regulatory T cells confers protection against collagen II-induced arthritis via the production of IL-10*. *J Immunol*, 2010. **184**(12): p. 7144-53.
269. Jiang, H.R., et al., *Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Immunol*, 2009. **182**(2): p. 1167-73.
270. Soares, M.B., et al., *Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells*. *Cell Cycle*, 2011. **10**(9): p. 1448-55.
271. Zhu, H., et al., *Histone deacetylase-3 activation promotes tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expression in cardiomyocytes during lipopolysaccharide stimulation*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(13): p. 9429-36.
272. Oppeltz, R.F., et al., *Increased expression of cardiac IL-17 after burn*. *J Inflamm (Lond)*, 2010. **7**: p. 38.
273. Wei, Y., et al., *sPLA2-IIa amplifies ocular surface inflammation in the experimental dry eye (DE) BALB/c mouse model*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011. **52**(7): p. 4780-8.
274. Stern, M.E., et al., *Evaluation of ocular surface inflammation in the presence of dry eye and allergic conjunctival disease*. *Ocul Surf*, 2005. **3**(4 Suppl): p. S161-4.
275. Kim, Y.H., et al., *Anti-IL-33 antibody has a therapeutic effect in a murine model of allergic rhinitis*. *Allergy*, 2012. **67**(2): p. 183-90.
276. Matsuba-Kitamura, S., et al., *Contribution of IL-33 to induction and augmentation of experimental allergic conjunctivitis*. *Int Immunol*, 2010. **22**(6): p. 479-89.
277. Gu, N., et al., *Intelectin is required for IL-13-induced monocyte chemotactic protein-1 and -3 expression in lung epithelial cells and promotes allergic airway inflammation*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010. **298**(3): p. L290-6.
278. Lim, E.J., et al., *Epigenetic regulation of the IL-13-induced human eotaxin-3 gene by CREB-binding protein-mediated histone 3 acetylation*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(15): p. 13193-204.
279. Matsukura, S., et al., *Interleukin-13 upregulates eotaxin expression in airway epithelial cells by a STAT6-dependent mechanism*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. **24**(6): p. 755-61.
280. Pecaric-Petkovic, T., et al., *Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33*. *Blood*, 2009. **113**(7): p. 1526-34.
281. Komai-Koma, M., et al., *IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells*. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(10): p. 2779-86.
282. Chung, S.H., et al., *Curcumin suppresses ovalbumin-induced allergic conjunctivitis*. *Mol Vis*, 2012. **18**: p. 1966-72.
283. Hayat, K., et al., *Ameliorative effect of thymoquinone on ovalbumin-induced allergic conjunctivitis in Balb/c mice*. *Curr Eye Res*, 2011. **36**(7): p. 591-8.
284. Royer, B., et al., *Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10*. *Clin Exp Allergy*, 2001. **31**(5): p. 694-704.

285. Bundoc, V.G. and A. Keane-Myers, *IL-10 confers protection from mast cell degranulation in a mouse model of allergic conjunctivitis*. *Exp Eye Res*, 2007. **85**(4): p. 575-9.
286. Li, K., et al., *Quantification of tear proteins and sPLA2-IIa alteration in patients with allergic conjunctivitis*. *Mol Vis*, 2010. **16**: p. 2084-91.
287. Aho, V.V., T.J. Nevalainen, and K.M. Saari, *Group IIA phospholipase A2 content of tears in patients with keratoconjunctivitis sicca*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2002. **240**(7): p. 521-3.
288. Chen, D., et al., *sPLA2-IIa is an inflammatory mediator when the ocular surface is compromised*. *Exp Eye Res*, 2009. **88**(5): p. 880-8.

El trabajo realizado durante de mi tesis doctoral ha dado lugar a diversas colaboraciones, resultando en las siguientes publicaciones:

1. Martín R, Cordova C, Nieto ML. **Secreted phospholipase A2-IIA-induced a phenotype of activated microglia in BV-2 cells requires epidermal growth factor receptor transactivation and proHB-EGF shedding.** J Neuroinflammation. 2012 Jul 2; 9(1):154.
2. Martín R, Miana M, Jurado-López R, Martínez-Martínez E, Gómez-Hurtado N, Delgado C, Visitación Bartolomé M, San Román JA, Cordova C, Lahera V, Nieto ML, Cachofeiro V. **DIOL Triterpenes Block Profibrotic Effects of Angiotensin II and Protect from Cardiac Hypertrophy.** PLoS One. 2012;7(7): e41545. Epub 2012 Jul 23
3. Martín R, Hernández M, Córdova C, Nieto ML. **Natural triterpenes modulate immune-inflammatory markers of experimental autoimmune encephalomyelitis: therapeutic implications for multiple sclerosis.** Br J Pharmacol 2012 Jul; 166 (5):1708-23.
4. Córdova C.; Gutierrez B.; Martínez-García C.; Martín R.; Gallego-Muñoz P.; Hernandez M.; M<sup>a</sup> Luisa Nieto. **Oleanolic acid controls allergic and inflammatory responses in experimental allergic conjunctivitis. Oleanolic acid controls allergic and inflammatory responses in experimental allergic conjunctivitis.** PLoS One, Abril 2014, vol. 9, n. 4, p. 1-11.
5. R Martín, C. Córdova, JA San Román, V Cachofeiro, ML Nieto. **Oleanolic acid modulates the Immune-Inflammatory response in mice with Experimental Autoimmune Myocarditis and Protects from Cardiac Injury. Therapeutic Implications for the Human Disease.** J Mol Cell Cardiol, Abril 2014, 72: 250-262

Otras publicaciones:

6. Nuria San Martin, Ana M. Cervera, Claudia Córdova, Diego Covarello, Kenneth J. McCreath and Beatriz G. Galvez. **Mitochondria determine the differentiation potential of cardiac mesoangioblasts.** Stem Cells. 2011 Jul; 29(7):1064-74.