

Discusión

DISCUSIÓN

Los estudios presentados en esta tesis se han realizado con la finalidad de profundizar en el estudio de la patogenia de la EM, utilizando como base experimental su modelo animal, la EAE. En los diferentes trabajos se estudia la expresión, regulación, función y posible potencial terapéutico de las MT en la EAE y la EM, siempre en relación a los procesos etiopatogénicos característicos de la enfermedad.

Está ampliamente aceptado que el estrés oxidativo tiene una función importante en la patogenia de la EM, siendo un factor importante en el desarrollo de las lesiones en el SNC (Lin *et al.*, 1993; Hooper *et al.*, 1995; Cross *et al.*, 1996; De Groot *et al.*, 1997; Vladimirova *et al.*, 1998). Se ha observado que la inmunorreactividad frente a la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y a la nitrotirosina (NITT) está aumentada en las placas de EM (Bagasra *et al.*, 1995) y que concentraciones elevadas de NO provocan degeneración axonal y muerte neuronal (Dawson *et al.*, 1993; Tamatani *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999). Las concentraciones de NO y sus metabolitos también están aumentadas en sangre, orina y LCR de pacientes (Smith y Lassmann, 2002), pero sigue siendo controvertida la función de estos metabolitos en la patogenia de la EM. Se ha descrito que el estrés oxidativo, en forma de peroxinitrito (ONOO^-), superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroxilo (OH^-), radicales peroxilo e hidropoxidadas, puede contribuir a la disrupción de la BHE en la EM (Halliwell, 2001; Blasig *et al.*, 2002). Las ROS reducen la función de barrera, modifican la arquitectura de las uniones estrechas que la forman (Kevil *et al.*, 2001) y activan la vía de las kinasas y factores de transcripción como el factor nuclear kappa B ($\text{NF-}\beta\text{B}$) (Kamata *et al.*, 2002) y la poli-ADP ribosa sintetasa (Scott *et al.*, 2001) para inducir genes inflamatorios como la molécula de adhesión endotelial (ECAM), MMP e iNOS, todos ellos implicados en la patogenia de la EM.

El tratamiento con inhibidores selectivos de la iNOS mejora clínicamente la EAE, observándose, además, una reducción de la inflamación y la desmielinización en el SNC (Cross *et al.*, 1994; Ding *et al.*, 1998). Otros antioxidantes como el ácido úrico, un componente natural que une e inactiva selectivamente el peroxinitrito, o precursores de éste, también inhiben la EAE (Hooper *et al.*, 1998; 2000; Scott *et al.*, 2002). Se ha descrito que los pacientes con EM tienen disminuidos, respecto a controles sanos, los niveles séricos y plasmáticos de diferentes antioxidantes naturales como el ácido úrico, la vitamina E, la ubiquinona, la glutatión peroxidasa, etc. (Syburra y Passi, 1999).

Las neuronas son altamente susceptibles al estrés oxidativo debido a la baja concentración de antioxidantes y a la gran cantidad de sustratos oxidables presentes en el SNC (Zhang *et al.*, 2001). En modelos animales, se ha descrito que el peroxinitrito induce daño axonal primario produciéndose una alteración grave de la mielina, desmielinización y formación de NITT (Touil *et al.*, 2001). Mediante estudios *in vitro* se ha demostrado que el peroxinitrito reduce la viabilidad de los oligodendrocitos e induce la muerte celular de forma dosis dependiente (Scott *et al.*, 2003).

Las MT poseen propiedades citoprotectoras relacionadas con su capacidad para inactivar radicales hidroxilo y superóxido (Thornalley y Vasak, 1985; Lazo *et al.*, 1995). Mediante estudios *in vitro*, se ha demostrado que las MT protegen a las células del daño que el NO puede causar al ADN (Schwarz *et al.*, 1995; Tsangaris y Tzortzatos-Stathopoulou, 1998). Por otro lado, se ha observado que el NO regula la expresión de MT (Arizono *et al.*, 1995; Molinero *et al.*, 1998).

Los estudios previos sobre la función de las MT en el SNC nos hacían pensar que estas proteínas antioxidantes podrían proteger contra el daño a la mielina y el daño neuronal que ocurre durante la EAE/EM. Para investigar esta hipótesis se realizaron los trabajos que se discuten a continuación.

En primer lugar, determinamos si se producía inducción de la expresión de MT durante la EAE. Observamos un aumento de la expresión de ARNm de MT-I (y, por tanto, MT-II) en los ratones que desarrollaron EAE respecto a los que no presentaron signos clínicos de la enfermedad, cuyos valores no diferían de los de animales no inmunizados. Además, los niveles de expresión de las MT se correlacionaron con la gravedad de la enfermedad, apoyando que la inducción de estas proteínas antioxidantes podría formar parte de los mecanismos fisiopatológicos (de defensa) que acontecen durante la EAE.

Para entender mejor las funciones de las MT en el SNC, es esencial caracterizar los factores que controlan la expresión de estas proteínas. Los IFN, los reactantes de fase aguda y las proteínas reguladoras de metales son factores que intervienen en la regulación de la expresión de las MT (De *et al.*, 1990; Hernandez *et al.* 1997; Carrasco *et al.*, 1998; Hidalgo *et al.*, 1998). Debido a que las citocinas proinflamatorias tienen una función importante en la inducción de la EAE y son, al mismo tiempo, capaces de inducir las MT, analizamos la inducción de MT en ratones que carecían de la función biológica del IFN- β . Observamos que los ratones deficientes en el receptor de IFN- β sufrían una EAE más grave que la cepa control pero que, sin embargo, el IFN- β no era necesario para la inducción de las MT. En

nuestro modelo, la inducción de MT-I era mayor cuanto más grave eran los signos clínicos y el daño que se producía en el SNC. Estos resultados son comparables con los descritos para ratones transgénicos de IL-6 o TNF- β que desarrollan una enfermedad neurodegenerativa crónica progresiva (Hernandez *et al.*, 1997; Carrasco *et al.*, 2000a). La expresión de MT se producía alrededor de los infiltrados inflamatorios y perivascularmente, coincidiendo con la localización de los astrocitos. Existe la hipótesis generalizada de que la expresión de MT-I y MT-II, por parte de los astrocitos, tiene como función la eliminación de los factores tóxicos procedentes tanto de las células dañadas como del plasma que tienen su entrada al SNC facilitada debido al aumento de la permeabilidad de la BHE (Aschner, 1997). En este sentido, se ha descrito que las MT-I y MT-II son importantes para controlar la muerte por apoptosis de las neuronas inducida por traumatismos (Penkowa *et al.*, 1999b). Estos datos apoyarían la función protectora propuesta para las MT en la patogenia de la EAE/EM.

También se detectó expresión de MT-I y MT-II en los macrófagos y la microglía presente en el infiltrado inflamatorio, sin embargo, los linfocitos infiltrantes no expresaban estas proteínas, lo que explicaría la baja expresión de ARNm de MT-I en el infiltrado inflamatorio comparado con las áreas de alrededor de éste. Los macrófagos podrían contener estas proteínas antioxidantes en su citoplasma apoyando la hipótesis de la función protectora de las células inflamatorias en la resolución de la inflamación (Hohlfeld *et al.*, 2000) y la función beneficiosa de las MT en la EAE/EM.

Curiosamente, la inducción de la isoforma III ocurría de forma diferente. MT-III se expresaba altamente en el SNC de forma constitutiva, tanto en los ratones deficientes del receptor de IFN- β como en los animales control, sin que se observara inducción de la expresión de esta isoforma en las áreas de inflamación en el SNC de los animales con EAE. Los diferentes patrones de expresión de MT-I y MT-II respecto a MT-III sugieren que la función de estas proteínas en el SNC es diferente, como también han postulado anteriormente otros autores (Carrasco *et al.*, 1999).

En el segundo trabajo presentado en esta tesis se describe la expresión de un grupo de citocinas pro- y antiinflamatorias, marcadores de neurodegeneración y de regeneración tisular relacionados con los procesos fisiopatogénicos que ocurren durante la inducción y remisión de la EAE y se relacionan con la expresión de MT en diferentes momentos del curso clínico de la enfermedad. Pudimos diferenciar dos patrones de expresión. En el primer patrón (patrón 1), los marcadores se

expresaban rápidamente con la aparición de los signos clínicos, alcanzando el máximo de expresión con la gravedad máxima de la enfermedad y disminuyendo drásticamente con el inicio de la recuperación de los signos clínicos. En el segundo patrón (patrón 2), la expresión de los marcadores se iniciaba después de la aparición de los signos clínicos y más lentamente que en el patrón 1. Alcanzando su máximo con la máxima gravedad clínica y permaneciendo elevados tras la recuperación clínica. Los marcadores implicados en el desarrollo de la EAE como la producción de citocinas proinflamatorias, el estrés oxidativo, el daño axonal y la apoptosis se incluyeron en el patrón 1. Sin embargo, los marcadores relacionados con la recuperación de los signos clínicos como los factores neurotróficos y de crecimiento, la movilización de progenitores de oligodendrocitos y la regeneración neuroglial seguían el patrón 2 de expresión. Curiosamente, la expresión de MT pertenecía a este segundo patrón de expresión, apoyando una función beneficiosa de las MT en la resolución del brote clínico de la enfermedad.

A nivel del estrés oxidativo, pudo observarse que la inmunorreactividad para NITT y malondialdehído (MDA) aumentaba durante el brote clínico de forma paralela a la infiltración celular, tanto de linfocitos T como de monocitos/macrófagos. Estas células inmunitarias, así como la astrogliá y microglia residentes, utilizan las ROS para realizar muchas de sus funciones. El aumento de ROS influye en numerosos procesos celulares de señalización sensibles a cambios en el potencial redox como la activación de los factores de transcripción NF- β B y AP-1, los cuales regulan la transcripción de una serie de genes implicados en el proceso inflamatorio, entre ellos IL-1, IL-6 y TFN- β (Serkkola y Hurme, 1993; Delerive *et al.*, 1999). En este sentido, observamos un aumento de estas citocinas proinflamatorias durante el brote clínico que disminuyó con la remisión de los signos clínicos y de forma paralela a la infiltración inflamatoria. La expresión de IL-6 estaba adelantada en el tiempo respecto a las otras citocinas proinflamatorias estudiadas. Este resultado apoyaría lo descrito previamente por otros autores sobre la necesidad de la IL-6 para el desarrollo de la EAE (Samoilova *et al.*, 1998b).

Se ha descrito que las citocinas proinflamatorias como el TNF- β y la IL-6 (Hernandez *et al.*, 1997; Carrasco *et al.*, 1998; Giralt *et al.*, 2002a) y el estrés oxidativo (Andrews, 2000; Hidalgo *et al.*, 2002) inducen la expresión de MT. Por otro lado, las MT son proteínas antioxidantes que neutralizan las ROS y que se acumulan en situaciones donde se produce estrés oxidativo (Aschner, 1996; Coyle *et al.*, 2002). En este estudio, observamos que la inducción de MT-I y MT-II se iniciaba después de que las citocinas proinflamatorias y los marcadores de estrés

oxidativo se indujeran. Por otro lado, una vez alcanzada la máxima puntuación clínica e iniciado el proceso de remisión de la enfermedad, estos marcadores inflamatorios disminuían prácticamente a los valores iniciales mientras que la expresión de MT se mantenía elevada. Estos resultados indicarían que las citocinas proinflamatorias y las ROS son importantes en el modelo de EAE para el desarrollo de la respuesta (auto-)inmune y que también participan en la inducción de otros factores, como las MT, implicados en la remisión de la enfermedad, apoyando, nuevamente, la función dual de la inflamación en este tipo de enfermedades (Hohlfeld *et al.*, 2000).

También analizamos la expresión de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y el TGF- β , y, igual que sucedía en la expresión de MT, la expresión de estas citocinas se mantenía elevada una vez habían remitido los signos clínicos. Esto está en la línea de que estas citocinas participan en los procesos de remisión de la enfermedad (Kennedy *et al.*, 1992; Olsson, 1995; Bettelli *et al.*, 1998; Samoilova *et al.*, 1998a; Young *et al.*, 2000). Un patrón similar se observó para los factores de crecimiento bFGF y NGF (factor de crecimiento neuronal). Este último promueve la síntesis de mielina por los oligodendrocitos y el crecimiento neuronal (Cohen *et al.*, 1996; Lewin y Barde, 1996) y bFGF estimula la proliferación y regeneración de los oligodendrocitos en la zona de la lesión (Liu *et al.*, 1998; Ruffini *et al.*, 2001). Por lo tanto, estos factores de crecimiento estarían contribuyendo a la regeneración neuroglial y a la remielinización que se observa durante la remisión de los signos clínicos de la EAE. Se sabe que MT-I y MT-II inducen la expresión de citocinas antiinflamatorias, factores de crecimiento y neurotrofinas (Penkowa y Hidalgo, 2000; Giralt *et al.*, 2002b; Youn *et al.*, 2002). Estos datos refuerzan la hipótesis de la función de las MT en la remisión de la EAE, facilitando la neuroregeneración, bien por inhibición de los procesos de neurodegeneración como el estrés oxidativo, la desmielinización o el daño axonal o por la activación de procesos de reparación tisular.

Para analizar la función de las MT en la EAE se eligió el modelo de ratón MTKO. En los dos trabajos que se discuten a continuación se estudió como la deficiencia en MT-I y MT-II afectaba clínica e histopatológicamente a la EAE. En el primero de estos trabajos, se demostró que la deficiencia genética de MT-I y MT-II aumenta la susceptibilidad a la EAE inducida de forma activa en la cepa de ratón 129Sv. Este efecto clínico se asoció a un aumento de la respuesta inflamatoria de la microglía/macrófagos y de los linfocitos T, que incluía un aumento de la producción de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6 y TNF- β . Así mismo, se

observó un aumento del estrés oxidativo, la desmielinización y la apoptosis celular de neuronas y oligodendrocitos. Sin embargo, la deficiencia en MT provocó una disminución muy significativa de la astrogliosis.

En el segundo trabajo se estudió como la deficiencia en MT afectaba a los procesos de neurodegeneración y de regeneración neuroglial que tiene lugar durante la EAE. Se observó que en los ratones MTKO los procesos de neurodegeneración como la desmielinización y el daño axonal estaban significativamente aumentados. Sin embargo, los procesos relacionados con la reparación tisular como la producción de factores de crecimiento, la presencia de progenitores de oligodendrocitos y la formación de nuevos conos de crecimiento neuronal estaban inhibidos respecto a la cepa control.

Como se mostraba en el trabajo anterior (Espejo *et al.*, 2005) y se ha descrito previamente por otros autores, las citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6 y TNF- β tienen una función importante en el desarrollo de la EAE (Mendel *et al.*, 1998; Samoilova *et al.*, 1998b; Rajan *et al.*, 1998; Okuda *et al.*, 1998; 1999; Lassmann, 1999; Tanuma *et al.*, 1999). Esto justificaría el aumento de la susceptibilidad observado en los ratones MTKO. Desde otro punto de vista, el tratamiento con MT-II en ratas Lewis a las que se les había inducido EAE, redujo la activación y el reclutamiento de macrófagos y linfocitos T en el SNC, lo que justificaría la mejora clínica observada en estos animales (Penkowa y Hidalgo, 2000; 2001). Además, en otros modelos experimentales *in vivo*, se ha observado que MT-I y MT-II disminuyen significativamente la respuesta inflamatoria en el SNC, incluyendo la producción de la IL-1 β , IL-6 y TNF- β (Penkowa *et al.*, 1999a; 2000; Carrasco *et al.*, 2000b) y también existen datos *in vitro*, donde se describe que MT-I y MT-II disminuyen la activación de monocitos por LPS, que apoyan estos resultados (Leibbrandt Koropatnick, 1994; Koropatnick y Zalups, 1997). Por lo tanto, las MT podrían mejorar la EAE mediante la inhibición de la producción de estas citocinas proinflamatorias.

Los ratones MTKO mostraron una potenciación de los procesos relacionados con la neurodegeneración. Los marcadores de estrés oxidativo (iNOS, NIT2 y MDA), la desmielinización, los marcadores de daño y/o transección axonal [proteína precursora del amiloide (APP) y SMI-32 (marcador de neurofilamentos no fosforilados)] y la apoptosis de neuronas y oligodendrocitos estaban significativamente aumentados en los ratones MTKO respecto a la cepa control. MT-I y MT-II podrían inhibir la desmielinización y el daño axonal debido a su capacidad antioxidante, mediante la eliminación de las ROS que se producen

durante la respuesta inflamatoria. Existen evidencias de que las ROS destruyen el tejido y las células nerviosas (Cassarino y Bennett, 1999; Halliwell, 2001) y que el daño tisular inducido por las ROS y el estrés oxidativo son factores importantes en la patogenia de la EAE/EM (Ruuls *et al.*, 1995; Cross *et al.*, 1998; Miljkovic *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha demostrado que la administración de secuestradores de ROS retrasa el inicio y reduce los signos clínicos de la EAE (Cross *et al.*, 1994; Pozza *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2001). Apoyando estos resultados, otros autores han descrito que MT-I y MT-II inhiben el estrés oxidativo y el daño tisular inducido por las ROS en el SNC (Hidalgo *et al.*, 2001) y que el tratamiento con MT-II durante la EAE inhibe significativamente el estrés oxidativo y la formación de ROS (Penkowa y Hidalgo, 2000). Se piensa que las ROS también son mediadores clave de la apoptosis celular (Sun y Chen, 1998; Cassarino y Bennett, 1999). La muerte celular por apoptosis de los oligodendrocitos y las neuronas es un proceso importante en la patogenia de la EAE/EM (Alcazar *et al.*, 1998; Sabelko-Downes *et al.*, 1999; Aktas *et al.*, 2000; Arbizu-Urdiain y Martinez-Yelamos, 2000; Hisahara *et al.*, 2001; Penkowa y Hidalgo 2001). En el tercer trabajo presentado en esta tesis, se observa que los ratones MTKO tienen un aumento significativo de muerte celular por apoptosis principalmente, las neuronas y oligodendrocitos. Estos resultados apoyan los descritos previamente con el tratamiento con MT-II en la EAE (Penkowa y Hidalgo, 2001). Si el efecto antiapoptótico de las MT se debe a sus funciones antioxidantes no está muy claro, pero podría explicarse en base a diferentes propiedades que poseen estas proteínas. En primer lugar, como ya se ha mencionado anteriormente, MT-I y MT-II son proteínas antioxidantes muy eficientes. Se ha descrito que las MT tienen funciones de dadores de grupos tioles, secuestradores de radicales libres y que reducen la toxicidad celular y nuclear inducida por el NO (Radi *et al.*, 1991; Schwarz *et al.*, 1995; Lazo y Pitt, 1995; Lazo *et al.*, 1998). También se ha descrito que la inhibición de la síntesis de NO disminuye la expresión de MT-I y MT-II (Molinero *et al.*, 1998), todo ello apoya la función de estas proteínas en la destoxificación de NO y, por tanto, en la inhibición de la apoptosis (Sun y Chen, 1998; Cassarino y Bennett, 1999; Mates, 2000). En segundo lugar, MT-I y MT-II participan en el control del metabolismo del Zn y el Cu (Aschner, 1996; Kelly y Palmiter, 1996; Coyle *et al.*, 2002) y, por lo tanto, en el control de las concentraciones de éstos, los cuales pueden inducir toxicidad y muerte celular (Choi y Koh, 1998; Sheline *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2002). Tercero, MT-I y MT-II inhiben eficientemente las respuestas neuroinflamatorias y los niveles de citocinas proinflamatorias (Penkowa y Hidalgo, 2000; 2001; Giralt *et al.*, 2002a;

Youn *et al.*, 2002), las cuales aumentan la expresión de proteasas, eicosanoides, factores del complemento, aminas vasoactivas, moléculas de adhesión y coestimuladoras y ROS, que a su vez pueden afectar a la apoptosis celular (Merrill y Benveniste, 1996; Floyd, 1999a; 1999b). Por último, otra posibilidad sería que las MT actuaran a nivel del ciclo celular, alterando los mecanismos que determinan la supervivencia y/o muerte celular. En este sentido, se ha demostrado que MT-I y MT-II pueden regular la expresión de p53 (Abdel-Mageed y Agrawal, 1997; Jasani y Schmid, 1997; Kondo *et al.*, 1997).

Respecto a los procesos relacionados con la reparación tisular, los ratones MTKO presentaron una disminución significativa de todos los marcadores estudiados. La respuesta astrocitaria estaba muy disminuida en los ratones MTKO respecto a los controles. Algunos autores apoyan la idea de que la reacción astrocitaria forma parte de los mecanismos de reparación tisular que pone en marcha el SNC tras sufrir un daño, en parte debido a la capacidad de las células astrocitarias para producir factores de crecimiento. MT-I y -II participarían en la inducción de la astrogliosis y la producción de TGF- β en respuesta al daño tisular producido (Eng *et al.*, 1996; Benveniste, 1997; Aschner, 1998; Penkowa *et al.*, 1999a; 2000; Carrasco *et al.*, 2000b). En la línea de estos resultados, se ha demostrado que la mejora clínica observada en ratas con EAE tratadas con MT-II va asociada a un aumento de la astrogliosis (Penkowa y Hidalgo, 2000) y que el TGF- β previene y mejora la EAE (Racke *et al.*, 1991; Santambrogio *et al.*, 1993; Zargarova *et al.*, 2004). Además, en otros modelos experimentales de daño en el SNC donde se han utilizado los ratones MTKO, se ha observado que la astrogliosis, la producción de factores de crecimiento y la cicatrización están drásticamente disminuidas respecto a la cepa control (Penkowa *et al.*, 1999a; 2000).

Cuando analizamos los conos de crecimiento neuronal y la expansión de neuritas observamos que los ratones MTKO mostraron una disminución significativa de los marcadores relacionados con estos procesos (P-40 y GAP-43) respecto a la cepa control. Estos datos corroboran los descritos previamente en los que se observaba que los ratones MTKO tienen una respuesta deficitaria a nivel de reparación tisular y angiogénesis (Penkowa *et al.*, 1999a; 2000), mientras que la cicatrización de heridas mejora significativamente en modelos de trauma en los ratones que sobreexpresan MT-I o tras el tratamiento con MT-II (Giralt *et al.*, 2002b). El crecimiento de los axones dañados en el SNC está mediado, en gran parte, por los astrocitos. Los astrocitos inducen cambios en la matriz extracelular que permiten la expansión de las neuritas (Wujek *et al.*, 1990; Ard *et al.*, 1993;

Ellison *et al.*, 1999). Como hemos comentado anteriormente, MT-I y MT-II estimulan la astrogliosis (Penkowa *et al.*, 1999a; Penkowa y Hidalgo, 2000; Carrasco *et al.*, 2000b; Giralt *et al.*, 2002b), por lo que el déficit de MT podría contribuir a la menor respuesta neuroregenerativa, a nivel de formación de nuevos axones y expansión de neuritas, observada en los ratones MTKO.

Se ha descrito ampliamente la implicación de las citocinas antiinflamatorias, los factores de crecimiento y las neurotrofinas en los procesos de remielinización y reparación tisular en el SNC (Aschner, 1996, Trapp *et al.*, 1998; Goddard *et al.*, 1999; Dubois-Dalcq y Murray, 2000; Coyle *et al.*, 2002; Franklin, 2002). En los ratones MTKO, durante la EAE, observamos que había una disminución de TGF- β , bFGF, NGF y de las neurotrofinas (NT)-3 y NT-4/5 respecto a los ratones control con EAE. Estos resultados apoyan los publicados previamente donde se describía que MT-I y -II estimulan la síntesis de factores de crecimiento y neurotrofinas en condiciones patológicas en el SNC (Penkowa *et al.*, 2000; Giralt *et al.*, 2002b; Youn *et al.*, 2002) y podrían explicar por un lado, la mayor gravedad clínica durante la EAE que hemos observado en los ratones MTKO, y por otro, la mejoría tras el tratamiento con MT-II (Penkowa y Hidalgo, 2000). En este sentido, se ha demostrado que bFGF puede revertir los signos clínicos e histopatológicos de la EAE (Ruffini *et al.*, 2001), mientras que el TGF- β estaría implicado en la resistencia a la inducción de la EAE y la inhibición de ésta (Cautain *et al.*, 2001). Además, se ha descrito que el tratamiento con NGF durante la EAE mejora el curso clínico y retrasa el inicio de la enfermedad (Arredondo *et al.*, 2001), y que las neurotrofinas son factores importantes para los procesos de neuroregeneración, incluyendo la remielinización (Dubois-Dalcq y Murray, 2000; Alberch *et al.*, 2002; Sayer *et al.*, 2002). Esto hace pensar que el efecto beneficioso de las MT en la EAE pase por la estimulación de estos factores de crecimiento y neurotrofinas. Los datos presentados apoyan el posible potencial terapéutico de estas proteínas antioxidantes en la EM.

Para acercarnos a la enfermedad humana y corroborar los datos obtenidos en el modelo animal, creímos interesante analizar y caracterizar la expresión de MT en el SNC de pacientes con EM. Se estudiaron 30 lesiones (15 lesiones crónicas activas y 15 lesiones crónicas inactivas) pertenecientes a tres pacientes con EM y 15 secciones control procedentes del cerebro de dos pacientes que no sufrían patología del SNC. Pudimos confirmar, que al igual que sucedía en la EAE, en las lesiones de EM había un aumento significativo de la expresión de MT-I y MT-II respecto a las secciones control. Estos resultados están en la línea de los

publicados por Lock y col. (2002) que describen un aumento de la expresión de ARNm de MT-I y MT-II en el SNC de pacientes con EM. Los astrocitos y los macrófagos/microglía activados eran las células que expresaban estas proteínas, mientras que los linfocitos T, los oligodendrocitos y las neuronas carecían de ellas. Estos datos corroboran los que habíamos obtenido previamente en la EAE. Curiosamente, las células que expresaban MT no sufrían estrés oxidativo ni apoptosis, apoyando una función antioxidante y antiapoptótica de las MT, debidas probablemente a su capacidad de actuar como secuestradores de radicales superóxido e hidroxilo (Thornalley y Vasak, 1985; Lazo y Pitt, 1995; Lazo *et al.*, 1998).

Un hallazgo interesante fue que la expresión de MT estaba significativamente aumentada en las lesiones de EM crónicas inactivas, en las que también se observó un aumento de la astrogliosis, respecto de las lesiones crónicas activas. Como ya se ha comentado anteriormente, la reacción astrocitaria está implicada en los mecanismos de reparación tisular y, probablemente, la síntesis de MT por parte de estas células sea un factor muy importante en este proceso. Estos resultados confirman los que previamente habíamos descrito en el modelo animal, sugiriendo que MT-I y MT-II podrían tener una función importante en la remisión de la enfermedad, mediando los procesos de reparación tisular que acontecen en el SNC durante la EM.

En resumen, podríamos decir que los resultados presentados en esta tesis indican que las MT tienen una función importante en la resolución de la lesión que se produce en el SNC en la EAE/EM, debida a sus características antioxidantes, antiinflamatorias y neuroprotectoras. Y que su función en la EAE/EM sería mediar la neurorregeneración del SNC tanto por inhibición de los procesos neurodegenerativos como el estrés oxidativo, la desmielinización y el daño axonal, como induciendo procesos de reparación tisular. Estos datos apoyan y refuerzan una función neuroprotectora de las MT como previamente se había descrito en otras condiciones neuropatológicas como traumatismos, isquemia, epilepsia o degeneración neuroglial y hacen pensar en estas proteínas como posible abordaje terapéutico para el tratamiento de la neurodegeneración que se produce en la EM.

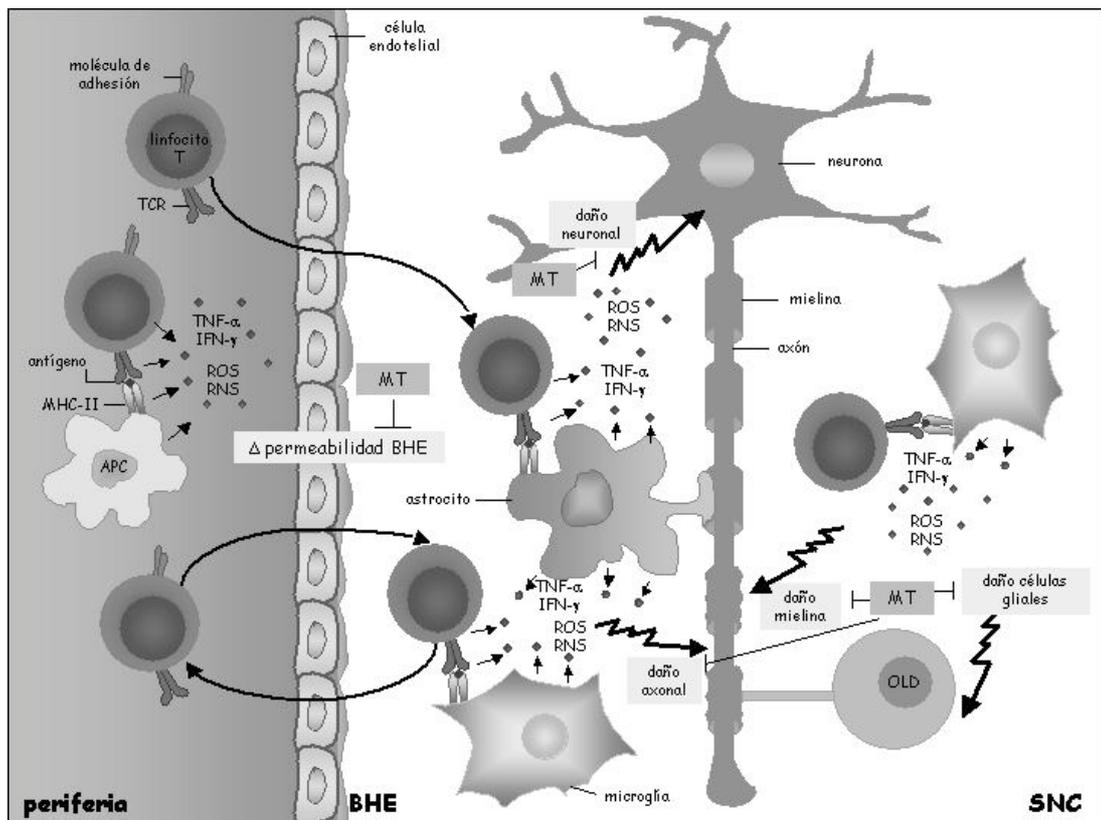


Figura 12: Esquema resumen de las posibles funciones de MT-I y MT-II en la inhibición de los procesos neurodegenerativos que se producen durante la EAE/EM. Durante la EAE/EM, los linfocitos activados atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) y entran en el sistema nervioso central (SNC). Tras una segunda activación inducida por las células presentadoras de antígeno (APC), secretan citocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) induciendo daño celular y tisular. Las también MT están inducidas por las citocinas proinflamatorias y las ROS, probablemente como mecanismo inhibitorio de los procesos relacionados con la neurodegeneración como la inflamación, el aumento de la permeabilidad de la BHE, el estrés oxidativo, la desmielinización y el daño axonal y neuronal. Al mismo tiempo, estas proteínas antioxidantes también estarían implicadas en promover los mecanismos endógenos de reparación tisular mediante la inducción de la expresión de factores de crecimiento y neurotrofinas y la reactividad astrocitaria, entre otros.

TCR: receptor de la célula T; OLD: oligodendrocito