



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado  
Medikuntza Gradua / Grado en Medicina

# REVISIÓN CRÍTICA DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE



Egilea /Autor:  
**Santiago Balerdi Trebol**  
Zuzendaria / Director/a; Codirector/a:  
Carlos Matute Almu; Fernando Pérez Cerdá

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. DEFINICIÓN.....	1
1.2. IMPACTO SOCIAL.....	1
1.3. DISTRIBUCIÓN DE LA EM .....	2
1.4. PATRONES DE LA ENFERMEDAD .....	3
1.5. FISIOPATOLOGÍA.....	4
1.6. CLÍNICA.....	7
1.7. ETIOLOGÍA.....	8
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
4. RESULTADOS: MODELOS ANIMALES (Tabla 2, anexo) .....	13
4.1. EAE.....	13
4.2. TA-EAE .....	15
4.3. THEILER.....	17
4.4. MODELO DE LA CUPRIZONA .....	17
4.5. MODELO DE LA LISOLECITINA .....	21
5. DISCUSIÓN.....	22
5.1. EAE.....	23
5.2. TA-EAE .....	24
5.3. THEILER.....	24
5.4. MODELO DE CUPRIZONA .....	25
5.5. MODELO DE LA LISOLECITINA .....	27
5.6. RESUMEN DE VENTAJAS Y LIMITACIONES .....	27
5.7. FACTORES AMBIENTALES Y PROPUESTA REFLEXIVA.....	29
6. CONCLUSIONES.....	39
7. BIBLIOGRAFÍA .....	40
8. ANEXO .....	51

**ABREVIATURAS**

**ADCC** – Anticuerpo dependiente de citotoxicidad mediada por células

**CD.** - Cúmulo de diferenciación (cluster of differentiation)

**EAE** – Encefalomiélitis autoinmune experimental

**EBV** – Virus de Epstein-Barr

**EM** – Esclerosis múltiple

**EMRR** – EM recurrente-remitente

**EMSP** – EM secundariamente-progresiva

**EMPP** – EM primaria-progresiva

**EMPR** – EM progresiva-(con)recaídas

**GFP** – Proteína verde fluorescente (Green fluorescent protein)

**HHV** – Herpesvirus humano

**HLA** – Antígeno leucocitario humano

**MAG** – Glicoproteína asociada a la mielina

**MBP** – Proteína básica de la mielina

**MHC** – Complejo mayor de histocompatibilidad

**MOG** – Proteína oligodendrocítica de la mielina

**PLP** – Proteína proteolipídica

**VCAM** – Molécula de adhesión a células vasculares (vascular cell-adhesion protein)

**VLA** – Antígeno muy tardío (very late antigen)

**RMN** – Resonancia magnética nuclear

**TA-EAE** – Transferencia adoptiva de encefalomiélitis autoinmune experimental

**TMEV** – Virus de la encefalomiélitis murina de Theiler

**TNF** – Factor de necrosis tumoral

## 1. INTRODUCCIÓN

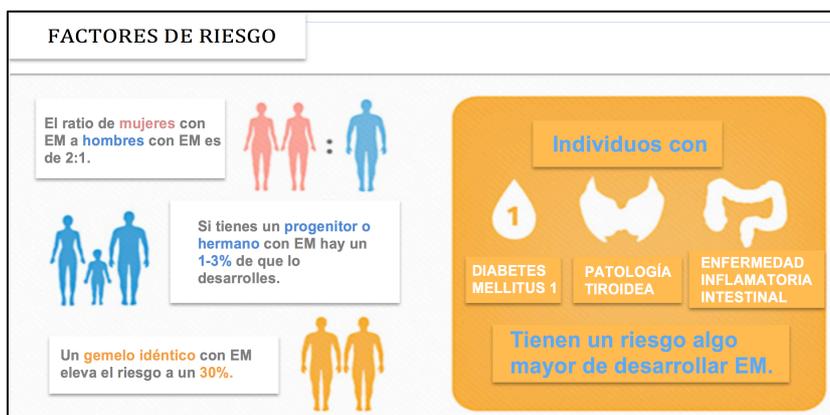
### 1.1. DEFINICIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune desmielinizante crónica, que se desencadena mediante factores ambientales no del todo conocidos sobre un individuo con base genética (Hemmer et al., 2002) susceptible. Comprenderla es hoy en día todo un reto pues su fisiopatología es muy compleja y variada. La mejor forma de estudiarla es mediante modelos animales, donde cada uno de ellos refleja un aspecto concreto de la enfermedad. Y juntando todos estos perfiles se obtiene una visión más global de ella.

### 1.2. IMPACTO SOCIAL

La EM se detecta en individuos, en su mayoría mujeres, de entre 20 y 30 años, y constituye la enfermedad neurológica más común en adultos jóvenes, afectando al menos a 350.000 individuos en el Norte de América y a 500.000 en Europa (Hafler et al., 2005; Sospedra et al., 2005). Aunque la esclerosis múltiple normalmente no conlleva una disminución de la esperanza de vida, su carga socioeconómica en la población afectada es superada únicamente por la generada debido a traumatismos graves (Sospedra et al., 2005).

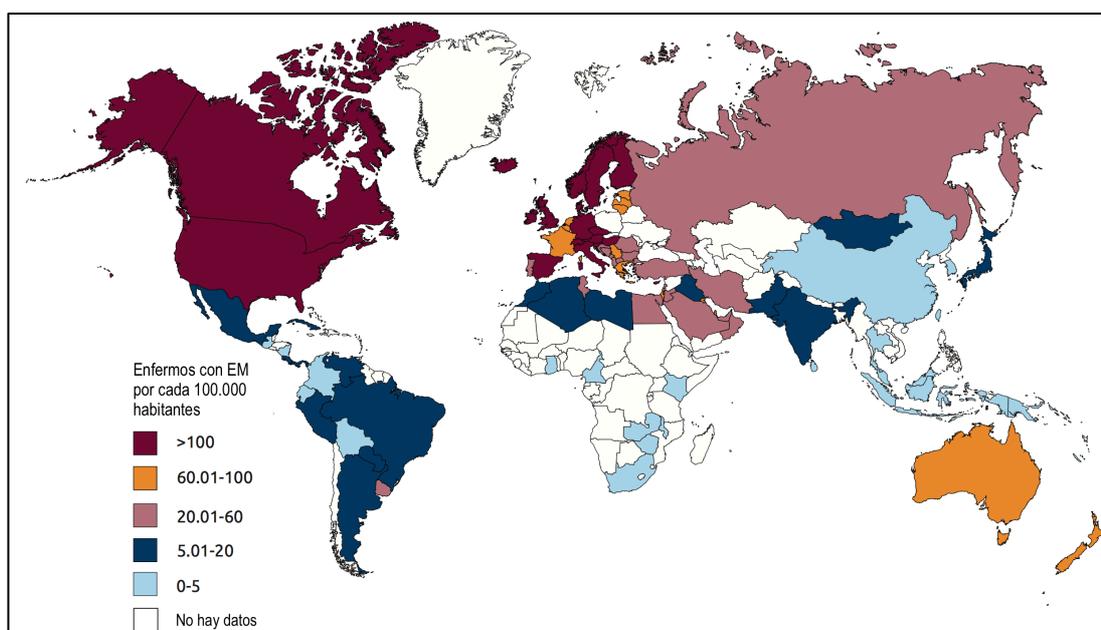
Como se aprecia en la **Figura 1**, si una persona en una familia tiene esclerosis múltiple, los familiares de primer grado de esa persona, tienen una probabilidad de 1 a 3 por ciento de contraer la enfermedad. En el caso de los gemelos idénticos la probabilidad de que el segundo contraiga la enfermedad teniendo el primero EM, es aproximadamente del 30%. Los gemelos fraternos (no heredan fondos de genes idénticos) tienen una probabilidad del 4%, es decir, mayor que la de los hermanos que no son gemelos.



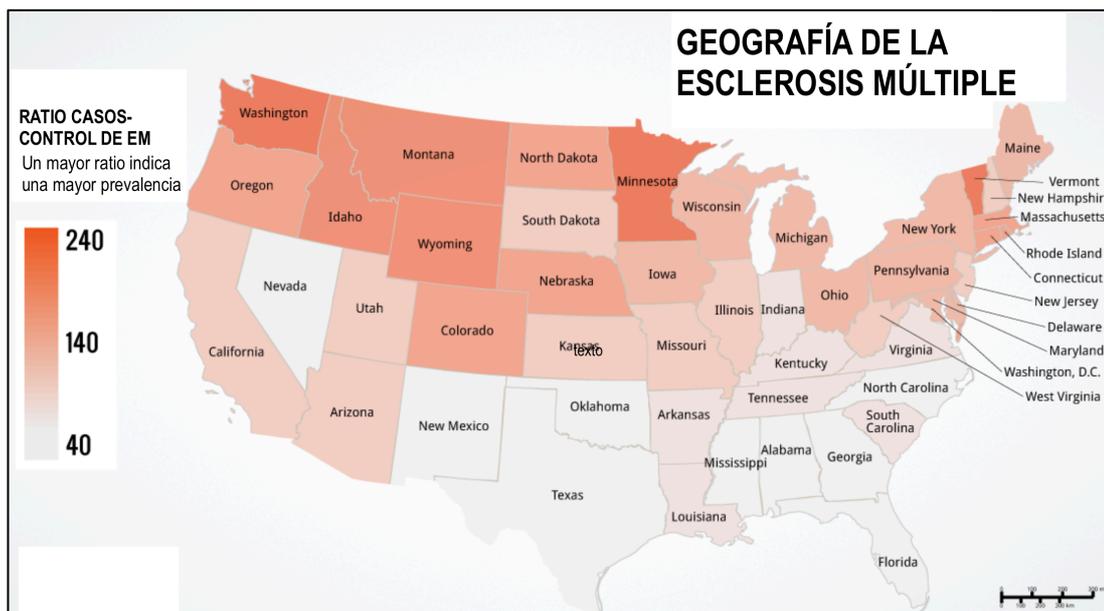
**Figura 1.** Se detalla la epidemiología de la enfermedad así como factores de riesgo implicados

### 1.3. DISTRIBUCIÓN DE LA EM

A comienzos del siglo XX la esclerosis múltiple se convirtió en la causa más común de acudir a los neurólogos. El periodo de 1900-1950 vió una maduración gradual de los métodos para definir estadísticas basadas en la población. Por consiguiente, estudios de muchas partes del mundo permitieron establecer la geografía (**Figura 2**) de la esclerosis múltiple and dieron cabida a las especulaciones para dar una explicación al patrón de su distribución. Kurtzke recopiló sistemáticamente datos de prevalencia y sugirió dividir la distribución de la enfermedad en zonas de bajo, medio y alto riesgo (Kurtzke 1975) (**Figura 3**). Zonas de alto riesgo ( $>30/10.000$ ) se extendían por el norte de Europa, el norte de los EEUU, Canada, sur de Australia y Nueva Zelanda. Areas de riesgo intermedio ( $5-25/10.000$ ) eran sur de Europa, sur de EEUU y el norte de Australia. Zonas de bajo riesgo ( $<5-10/10.000$ ) se extendían por Asia y Sudamérica. Una mejora de la metodología, de alteraciones en la clasificación y de una mayor vigilancia investigadora ha hecho que estos datos se actualicen mostrando un incremento del número de casos en todas las partes del globo (Bauer 1987; Lauer and Firnhaber 1994; Kurtzke 1993).



**Figura 2.** Mapa mundial de la distribución de EM por cada 100.000 habitantes



**Figura 3.** Distribución geográfica de la prevalencia de EM en los EEUU. Nótese el gradiente norte-sur y la diferencia entre países de la misma latitud.

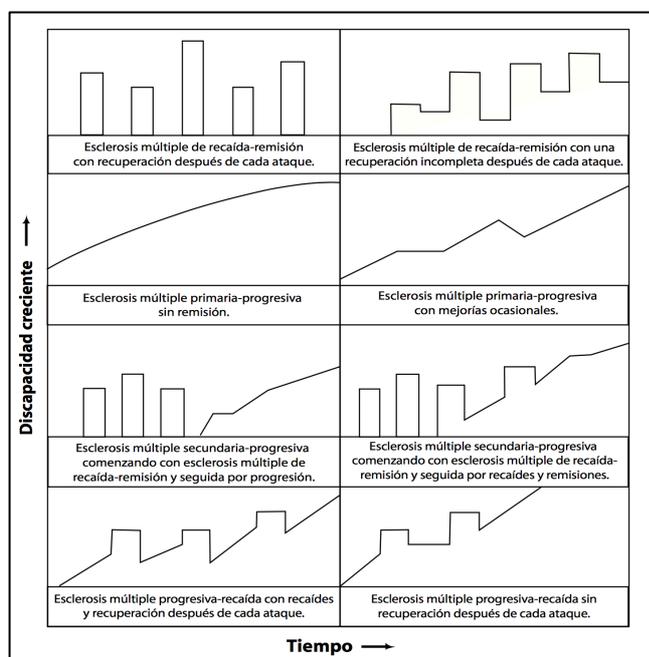
#### 1.4. PATRONES DE LA ENFERMEDAD (Figura 4)

**1.4.1. Recaída-remisión (RR):** con recuperación después de cada ataque

**1.4.2. Primaria-progresiva (PP):** sin remisión

**1.4.3. Secundaria-progresiva (SP):** comienza con esclerosis múltiple de RR y se sigue de un patrón de progresión

**1.4.4. Progresiva-recaída (PR):** trayectoria progresiva marcada con ataques agudos dentro de su progresión



**Figura 4.** Patrones clínicos de la EM

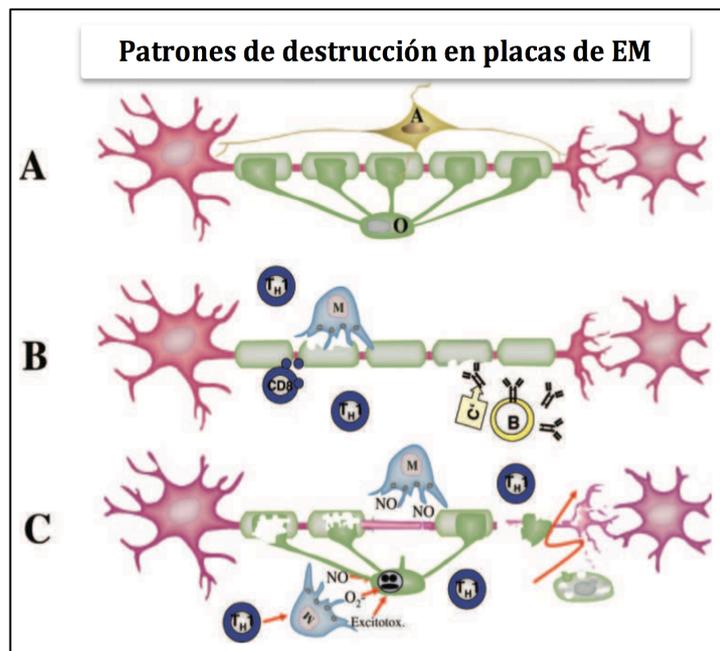
El patrón RR se considera agudo mientras que los patrones PP, SP y PR se consideran crónicos.

## 1.5. FISIOPATOLOGÍA

Esta alteración del sistema inmune está caracterizada por múltiples lesiones focales que afectan a las vainas de mielina del sistema nervioso central (SNC) y que acumulan una serie de síntomas clínicos causados, principalmente, por el proceso neuroinflamatorio y por el proceso desmielinizante que conduce al daño axonal.

Se produce un infiltrado de linfocitos B y T (Traugott et al., 1983; Hauser et al., 1986). La activación de las células B y la producción de inmunoglobulinas en el SNC quedaría demostrada por el característico patrón de bandas en el líquido cefalorraquídeo (Andersson et al., 1994). En los pacientes, se han detectado células T autorreactivas activadas para antígenos de mielina tales como la proteína básica miélica MBP (*myelin basic protein*), la proteína proteolípida PLP (*proteolipid protein*) o la glucoproteína oligodendrocítica de mielina MOG (*myelin oligodendrocyte protein*).

En la **Figura 5** se aprecia la clasificación inmunopatológica de placas focales desmielinizantes en la EM aguda y recurrente llevó a definir los distintos patrones de lesión en placas (Lassman et al., 2001). El patrón I se caracteriza por infiltrados de células T y macrófagos asociados a daño miélico. En el patrón II la principal característica son los precipitados de inmunoglobulinas y los componentes del complemento en regiones de desmielinización. Las lesiones del patrón III muestran signos sugestivos de distrofia oligodendrocitaria con una pérdida desproporcionada de MAG y apoptosis oligodendrocitaria, reflejando lesiones que recuerdan al cerebro hipóxico (Aboul-Enein et al., 2003). El patrón IV muestra degeneración de oligodendrocitos con morfología circular en la periplaca de sustancia blanca adyacente a sitios de desmielinización. La heterogeneidad de los cuatro patrones fue observado en diferentes pacientes pero no hay tal variabilidad en las lesiones de un mismo paciente. Estas diferencias pueden acarrear importantes consecuencias no solo para entender los mecanismos de la enfermedad si no también para plantear una terapia subtipo-dependiente de EM.



**Figura 5.** Patrones de destrucción en una placa de esclerosis múltiple. (A) En un SNC sano los oligodendrocitos abrazan el axón formando internodos mielínicos de tamaño regular. (B) Un ataque citotóxico puede destruir la vaina de mielina vía células-T y la inflamación mediada por macrófagos. Las células T citotóxicas secretan perforinas y granzimas como moléculas efectoras dirigidas hacia la diana (izquierda). Los factores humorales destruyen la vaina de mielina mediante la deposición de anticuerpos que activan al complemento como se muestra aquí (derecha) o mediante efectores fagocíticos ADCC. (C) El daño dirigido hacia el oligodendrocito y el axón es mediado por citotóxicos liberados por macrófagos/microglía (izquierda), siendo el óxido nítrico (NO) uno de sus mayores constituyentes. Nótese que el oligodendrocito muestra una morfología típica de la apoptosis. En la parte derecha, el difuso patrón de destrucción axonal y mielínico está ilustrado, pero hasta ahora no se ha identificado un mecanismo patogénico indiscutible

### Patogénesis:

La EM es una enfermedad heterogénea con una clínica variable y unas características patológicas que evidencian diferentes vías de dañar tejidos (Weiner 2004). Los mecanismos patológicos que causan las principales manifestaciones clínicas son la inflamación, la desmielinización y la degeneración axonal. Sin embargo, la etiología de la EM sigue siendo desconocida (Goodin et al., 2015; Nylander et al., 2012). La teoría mejor aceptada es que la EM comienza como una inflamación inmuno-mediada caracterizada por linfocitos autorreactivos (Weiner 2004; Roach 2004). Más tarde, es dominante la activación de la microglía y una degeneración crónica (Compston and Coles 2008).

**Inmunopatología:**

Se da una inflamación en conjunción con una disrupción de la BHE, caracterizada por un realce de gadolinio en la RMN visible en etapas tempranas de la mayoría de las lesiones en pacientes con EMRR. Células inflamatorias del tipo linfocitos T, linfocitos B y macrófagos son típicamente encontrados en exámenes histopatológicos de lesiones de EM, bien en biopsias o en autopsias (Lucchinetti et al., 2000).

Aproximadamente la mitad de pacientes con EM tiene un autoanticuerpo sérico IgG dirigido contra el canal de potasio Kir4.1, que es expresado por oligodendrocitos y astrocitos perivasculares en el SNC (Srivastava et al., 2012). Esto sugiere que Kir4.1 es una diana de la respuesta inmune involucrada en la patogénesis de la EM, al menos en un subconjunto de pacientes. Las células T reactivas a mielina son encontradas en placas de EM, en el LCR y en la circulación periférica de pacientes con EM (Oksenberg et al., 1993; Zhang 1994).

El riesgo de desarrollar EM está asociado con los alelos clase I y clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), son loci involucrados en activación de células T y su regulación. Drogas inmunomoduladoras que reducen la respuesta Th1 (ej interferón beta), aumentan la respuesta Th2 y Th3 (ej acetato de glatiramer), o bloquean el movimiento celular de células T de la sangre al SNC (ej natalizumab) reduciendo la actividad de la EM. Hay evidencia de que la supresión del factor TNF puede inducir o exacerbar la EM. Además de la pérdida de la vaina de mielina y de los oligodendrocitos, el daño axonal es un rasgo distintivo de las placas de EM. La progresión de la enfermedad supone una atrofia cerebral y una pérdida axonal que no están claramente relacionadas con mecanismos inmunes o inflamación.

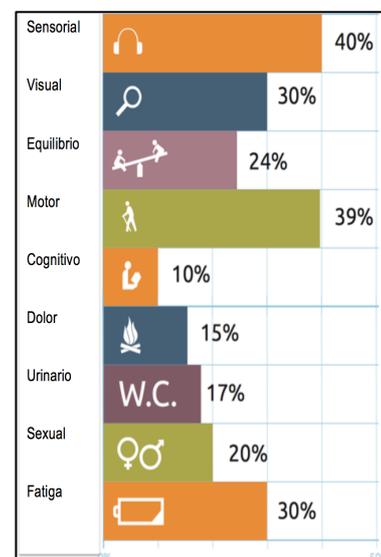
La evidencia neuropatológica sugiere que la apoptosis oligodendrocitaria, quizás desencadenada por virus o excitotoxicidad por glutamato, puede ser el primer evento precediendo la inflamación en al menos algunas lesiones producidas en pacientes con EMRR (Barnett et al., 2004; Matute and Pérez-Cerdá 2005). No obstante, la importancia de la apoptosis oligodendrocítica en la patogénesis de la EM no es conocida (Frohman et al., 2006).

La EM ha sido largo tiempo considerada una enfermedad de la sustancia blanca del SNC. Sin embargo, recientes observaciones de imagen y de inmunohistoquímica han permitido reconocer la formación de lesiones en la materia gris también como un proceso patológico importante y clínicamente relevante (Prins et al., 2015).

En las lesiones de EM los astrocitos ejercen acciones activas, duales y paradójicas en el desarrollo de la enfermedad (Williams et al., 2007). Datos experimentales identifican a los astrocitos como actuales mediadores de la inflamación, en contraposición, otras evidencias sugieren que los astrocitos reducen efectos nocivos que causan los factores pro-inflamatorios. Esta dicotomía puede hacer necesario el diseño de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a los astrocitos. En este contexto, una mejor definición de los subtipos astrogiales basados en sus propiedades moleculares, funcionales y estructurales ayudaría a entender su papel en la fisiopatología de la EM y consecuentemente llevar al desarrollo de unas terapias con nuevas dianas celulares para tratar la enfermedad (Correale and Farez 2015).

## 1.6. CLÍNICA

Los pródromos de la EM es importante detectarlos tempranamente ya que de un tratamiento médico temprano depende la evolución y el pronóstico de la EM en el paciente. Puede comenzar con problemas de visión tales como visión borrosa, doble o hasta pérdida de la misma. Cuando la enfermedad está instaurada afecta a un 30% de los enfermos (**Figura 6**). Puede aparecer hormigueo y entumecimiento en cara o extremidades. Dolor y espasmos que son referidos en muchos casos como dolor crónico. Fatiga y debilidad repentina que puede durar varias semanas. Problemas de equilibrio y mareos pueden ocasionar una disminución de la movilidad. Problemas de vejiga, intestino y disfunción sexual. Problemas cognitivos tales como pérdidas de memoria, dificultad de organización hasta prestar poca atención. Puede provocar irritabilidad,



**Figura 6.** Esferas a las que afecta la EM

cambios de humor y hasta padecer de la condición conocida como afecto pseudobulbar. Por último pueden aparecer entre otras pérdida de audición, convulsione, estremecimiento incontrolable y intolerancia al calor (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Principales manifestaciones clínicas de la EM.**

• Parestesias	• Síntomas consituacionales: fatiga basal 70% y de esfuerzo, mareo, insomnio
• Espasticidad	• Dolor 30-50%
• Disfunción vesical, intestinal y sexual	• Dificultades cognitivas: atención, concentración, memoria y juicio
• Triada de Charcot: disartria, ataxia y temblor	• Depresión
• <b>Neuritis óptica</b>	• Euforia
• Neuralgia trigeminal o debilidad facial bilateral	• Trastorno bipolar
• Fasciculaciones	• Demencia
• Diplopia 33%	• Síntomas asociados a mielitis transversa
• Intolerancia al calor	
Otras manifestaciones: afasia o disfasia, convulsiones 5%, paroxísticos (ataxia, aquinesia, parestesias, prurito), afección motora sin déficit sensorial o disautonomía	

## 1.7. ETIOLOGÍA

No hay evidencia epidemiológica que sugiera que la EM sea contagiosa. Se demostró que la EM no se contagiaba entre parejas matrimoniales después de un año tras el brote en uno de los cónyuges (Robertson and Compston 1997). También se ha hecho estudios acerca de la implicación de Chlamydia Pneumoniae, tres en particular. El primero de ellos reporta que mediante PCR hallaron el microorganismo en la mayoría de los pacientes (Sriram et al., 1999), mientras que en los otros dos estudios fueron incapaces de detectarla (Kaufman et al., 2002). El HHV-6 sigue siendo un candidato (Ablashi et al., 1998). Se encontraron proteínas estructurales y anticuerpos contra el HHV-6 en el suero y en el tejido cerebral con EM en comparación con los controles (Friedman et al., 1999). La controversia acerca de la vacunación ha sido resuelta: tres estudios han demostrado un nulo incremento en los trastornos desmielinizantes o en la actividad de

enfermedades preexistentes en individuos que habían sido vacunados de hepatitis B (Ascherio et al., 2001; Confavreux et al., 2001; Zipp et al., 1999).

El traumatismo también se considera la causa por la que se puede desencadenar las primeras manifestaciones de la EM o alterar el curso de las manifestaciones preexistentes. Un estudio prospectivo estudio durante 8 años eventos traumáticos mediante cuestionarios y exploración física tras estos, evaluando al paciente 3-6 meses tras el trauma (Sibley et al., 1991). Parece que solo el trauma eléctrico mostró asociación con nuevos episodios, concluyendo que las otras formas de trauma no tienen correlación con exacerbaciones clínicas o con la progresión de la enfermedad (Siva et al., 1993).

Muchos autores han demostrado mediante estudios prospectivos que hay un aumento de episodios nuevos desmielinizantes tras la exposición viral, sin que un solo agente esté aisladamente implicado (Andersen et al., 1991; Sibley et al., 1985): 9% de la infecciones van seguidas de una recaída, un 27% de nuevos episodios están relacionados con infecciones; el riesgo relativo de tener una recaída tras un período de 4 semanas tras una infección respiratoria (especialmente por adenovirus) o tras infecciones gastrointestinales es del 1.3. También hay descrita agrupaciones de nuevos episodios de desmielinización, especialmente neuritis óptica, en la primavera en las regiones del norte de Europa (Jin et al., 2000). Se declaró un riesgo relativo del 7.9% (95% CI 1.7-37.9) en los individuos que habían tenido mononucleosis (EBV) en la adolescencia con menos de 18 años (Martyn et al., 1993). Se ha descrito que no hay brotes de EM durante el embarazo, pero que sin embargo hay un aumento de recaídas durante la etapa puerperal. Los estudios indican que aproximadamente hay un riesgo tres veces más probable y siendo la recaída de mayor severidad tras el alumbramiento durante los 3-6 meses siguientes. Sin embargo, como hay una reducción de los brotes durante el embarazo no hay una variación en el número total de brotes durante el año entero del embarazo (Confavreux et al., 1998).

Acorde a los resultados de los grandes estudios epidemiológicos el riesgo de EM va asociado al mes de nacimiento. Hay una fuerte relación con tener un alto riesgo de padecer EM al ser adulto para los habitantes del mes hemisferio norte que ha nacido en Mayo y para los habitantes del hemisferio sur en Noviembre (Willer 2005; Staples et al., 2010). La mielinización del SNC ocurre en el tercer trimestre, mayormente entre las

semanas 29-39 de la gestación (Jakovcevski et al., 2007; Abe et al., 2004), es más razonable que el misterioso factor ambiental debiera estar relacionado con esta fecha. Consecuentemente, para los individuos nacidos en Mayo y Noviembre, el efecto sobre la remielinización tuvo que ser a mediados de Marzo y a mediados de Septiembre respectivamente.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión es comparar las ventajas y limitaciones de cada modelo experimental animal. Asimismo, hacer una breve recopilación de los factores exógenos que parecen jugar un papel importante en la EM.

Estamos hablando de EM, una enfermedad muy compleja, y que por ello necesita modelos experimentales cada vez más próximos a la realidad en afán de buscar terapias novedosas.

El primer modelo que se llevó a cabo fue el de la EAE, que muestra la neuroinflamación y la activación del sistema inmune. Posteriormente, se han estudiado modelos inducidos por virus siendo el más conocido el de Theiler (TMEV), con el que se estudia el daño axonal y la desmielinización inducida por la inflamación. Otro grupo de modelos experimentales importante son los inducidos mediante tóxicos entre los cuales se encuentra el de la Cuprizona y el de la Lisolecitina, los cuales estudian procesos de des- y re-mielinización.

Viendo los éxitos y carencias de cada modelo es posible tratar de buscar soluciones a estas limitaciones y sugerir caminos por los que seguir investigando. Siendo la etiología desconocida es muy difícil plantear un modelo que plasme la enfermedad exactamente igual que en humanos. El fin último de esta revisión se trata de seleccionar los modelos que mejor reflejen la EM y dejar planteadas ciertas incógnitas tratando que la exposición de estas sugiera nuevas ideas, o qué por lo menos despierte la actitud reflexiva en el lector.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para situarme en el tema comencé a leerme el libro *Myelin Biology and disorders* de Robert A. Lazzarini. Con este libro adquirí una perspectiva global de la enfermedad, tanto de su epidemiología, como de su fisiopatología y los diferentes modelos animales existentes.

Posteriormente, me documenté más a fondo utilizando la plataforma de PubMed. Hicé los siguientes patrones de búsqueda

“Review AND multiple sclerosis AND adoptive-transfer AND encephalomyelitis”=22 results

“Review AND multiple sclerosis AND cuprizone”=10

“Review AND multiple sclerosis AND lysolecithin”=7

“Review AND multiple sclerosis AND weather”=84

“Review AND multiple sclerosis AND epidemiology map”=4

“Review AND multiple sclerosis AND theiler”=7

“Multiple sclerosis AND animal models AND limits”=46

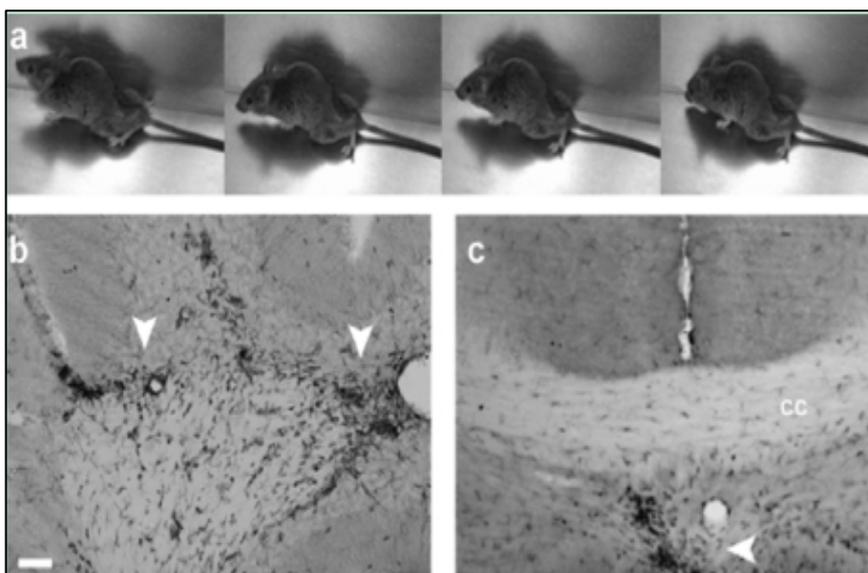
Para completar más la parte de la clínica y de epidemiología me serví de la plataforma UpToDate.

Por último el feedback recibido por los tutores me ha ayudado mucho de manera global.

## 4. RESULTADOS: MODELOS ANIMALES (Tabla 2, anexo)

### 4.1. EAE

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es el modelo animal más usado, en la actualidad, para el estudio de la esclerosis múltiple. Su origen se estima en los años treinta, del siglo pasado, cuando las observaciones de los efectos neurológicos que tenían lugar tras algunas vacunaciones contra la rabia (Stuart and Krikorian 1928) llevaron a Koritschoner y Schweinburg (Koritschoner and Schweinburg 1925) y, más tarde, a Hurst (Hurst 1932), a comprobar experimentalmente el efecto de la inoculación de emulsiones de cerebro o médula espinal en roedores. El modelo fue definitivamente establecido en 1933 por Tomas Rivers quien logró, por primera vez, producir una reacción inflamatoria acompañada de desmielinización mediante repetidas inmunizaciones con tejido nervioso, y demostró que las complicaciones encefálicas eran causadas por contaminantes de este tejido presente en las vacunas (Rivers et al., 1933). Una vez extendido a otras especies animales, serían Olitsky y Yager los que en 1949 lograrían inducir EAE en un ratón de manera similar a la que se conoce hoy en día (Olitsky and Yager 1949). Desde entonces, el modelo de EAE ha sido empleado en distintas especies y ha llegado a reproducir muchas de las características clínicas, neuropatológicas e inmunológicas de la esclerosis múltiple (Swanborg 1995; Hohlfeld and Wekerle 2001; El Behi et al., 2005; Gold 2006; Baxter et al., 2007).



**Figura 7.** Inducción de EAE con MOG35-55 en ratones C57Bl/6 × 129SW. (a) Fotomontaje de imágenes de vídeo de ratón con EAE captadas a intervalos de 0,5 seg. Se puede apreciar la dificultad de movimientos en las extremidades traseras y la falta de tono muscular en la cola, que imposibilita su alzada. (b, c) Imágenes de secciones coronales de cerebelo (b) y telencéfalo (c) de ratón con EAE mostrando infiltrado de células T CD4 en el área perivascular (puntas de flecha) y en las proximidades del cuerpo calloso (CC). Barra (b, c): 100 μm.

Clínicamente, los animales con EAE presentan afectado el neuroeje y manifiestan una parálisis de los miembros, parcial o total, que asciende, generalmente, en sentido caudorostral. Los primeros signos clínicos, establecidos generalmente en un rango de 5-6 fases (Fuller et al., 2004; Terayama et al., 2005), son, secuencialmente, debilidad en la cola, debilidad de las patas traseras, parálisis de las patas traseras (**Figura 7a**), y finalmente, parálisis de las cuatro extremidades, tras lo cual suele sobrevenir la muerte del animal. Además, estos síntomas vienen generalmente acompañados por una pérdida de peso causada por una disminución en la ingesta de agua y alimento. Al igual que en la EM la patología de la EAE en el SNC está caracterizada inicialmente por una infiltración de linfocitos y macrófagos en la sustancia blanca (**Figura 7b**) y una posterior desmielinización (Gold et al., 2006; Herrero-Herranz et al., 2008). Las lesiones suelen manifestarse en forma de múltiples lesiones del SNC distribuidas en tiempo y espacio, aunque, generalmente, más localizadas en el tronco cerebral y la médula espinal; existe una localización perivascular preferente de las lesiones (**Figura 7c**); un curso temporal del proceso que parte de la inflamación y desmielinización, un proceso de gliosis y una remielinización parcial; y hay presencia de inmunoglobulinas en el SNC y el líquido cefalorraquídeo (Baxter et al., 2007; Adams and Kubik 1952).

El curso de la enfermedad puede variar según el caso, pudiendo consistir, bien en una fase aguda de inflamación que revierte totalmente con el tiempo, bien en una alternancia de episodios clínicos intercalando periodos de remisión total o parcial de los síntomas, o bien en una progresión continuada de la sintomatología hasta llegar a una parálisis total del individuo que conllevaría a la muerte. En cualquier caso, se ha demostrado que, tanto el proceso inflamatorio, como el neurodegenerativo, pueden concurrir a la vez, como sucede en la EM.

Pocos años después, Schluesener y Wekerle proporcionaron las pruebas definitivas para desestimar el término “alérgico” al demostrar la presencia de clones de linfocitos T autorreactivos en el sistema inmune normal, base de una reacción autoinmune (Schluesener and Wekerle 1985). Basándose en estos experimentos se estableció el modelo de “transferencia adoptiva de EAE”, que consistía en provocar los síntomas de la enfermedad a través de la inoculación directa de los linfocitos T reactivos a algún componente de la mielina.

## **Ventajas y limitaciones**

-Descubrir la presencia de células autorreactivas que escapan de la selección negativa en el timo y que pueden encontrarse en individuos sanos. Ha supuesto la base de estrategias terapéuticas que utilizan células T inactivadas como vacuna preventiva, estrategia que está siendo evaluada como tratamiento para la EM.

-Contribución a rebatir el dogma que consideraba al SNC como un órgano inmunoprivilegiado. Con el desarrollo de la GFP (green fluorescent protein) dentro de células T autorreactivas permitió demostrar como cruzaban la BHE mediante ligandos VLA-4/VCAM-1 para después iniciar los procesos de inflamación. Basándose en estos hallazgos se iniciaron estudios usando anticuerpos humanizados anti-VLA4 (Natalizumab) que han resultado muy efectivos en el tratamiento de la EM.

## **4.2. TA-EAE**

La transferencia adoptiva de encefalitis autoinmune experimental (TA-EAE) consiste en generar pasivamente la respuesta correspondiente a la EAE mediante la inoculación de células T, CD4+ o CD8+, activadas contra epítomos de la mielina en lugar de inducirla directamente de manera activa a través de la inmunización frente a alguno de sus antígenos.

En 1960, Philip Y. Paterson demostró, por primera vez, que la EAE podía ser transferida desde ratas inmunizadas a huéspedes sanos mediante la inoculación de células extraídas de los nodos linfáticos, y no a través del suero (Paterson 1960). Estos resultados dieron pie, tras el aislamiento de líneas de células T monoespecíficas, a determinar que este tipo celular, concretamente el linfocito T colaborador CD4+, era el causante de la respuesta inmune presente en la EAE (Ben-Nun et al., 1981). Estas células T colaboradoras reconocen los epítomos antigénicos mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II, y responden a la activación secretando las citocinas interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), por lo que fueron clasificadas como células colaboradoras (Th, de *T helper*) de tipo 1 (Th1) (Liblau et al., 1995). Recientemente se ha puesto de manifiesto, por otro lado, que existe un conjunto de células T CD4+, Th17, que liberan la citocina interleucina-17 (IL-17), en lugar de IFN- $\gamma$ , y que juegan un papel crítico en el desarrollo de la EAE (Bettelli and

Kuchroo 2005). Así, los ratones deficientes genéticamente en IL-17, o aquellos en los que la actividad de ésta se encontraba neutralizaba mediante el tratamiento con anticuerpos anti-IL17, presentaban una menor severidad de síntomas respecto a los ratones controles (Park et al., 2005; Komiyama et al., 2006). La importancia de las poblaciones celulares Th17 quedó también confirmada por la incapacidad de desarrollar EAE en ratones carentes de IL-23, una citocina esencial en la expansión de células Th17 (Cua et al., 2003).

Aunque la mayoría de los modelos de TA-EAE son obtenidos mediante la inoculación de células T CD4+, se ha demostrado que las células T CD8+ específicas de MBP también pueden mediar una severa autoinmunidad en el SNC, presentando similitudes con la EM que no están presentes en la EAE mediada por células T CD4+, tales como ataxia, espasticidad, hiperreflexia y pérdida de la coordinación del movimiento. Histológicamente, el infiltrado inflamatorio se localiza en el cerebro y no en la médula espinal como ocurre con las células CD4+ (Ji and Goverman 2007). Todo ello indicaría que las células T CD8+ podrían inducir autoinmunidad interaccionando con el CMH clase I como presentador de epítomos (Huseby et al., 2001). Este papel patogénico de las células T CD8+ contrasta con observaciones anteriores en la EAE que les asignaban un papel regulador o inhibidor de la autoinmunidad en el SNC (Jiang et al., 1992). Estos papeles opuestos de las células CD8+ sugieren que existen dos subtipos celulares que influyen en la enfermedad de manera distinta; por un lado, las células CD8+, que expresan el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y que parecen mantener una función reguladora; por otro, las células CD8+ específicas de neuroantígenos, como por ejemplo MBP, que producen IFN- $\gamma$  y, por tanto, agravan la respuesta inmune. Este doble comportamiento es similar al observado en las células CD4+, las cuales inhiben la respuesta autoinmune cuando su especificidad antigénica no está definida y coexpresan CD25, mientras que al mostrarse específicas de un antígeno del SNC, inducen EAE (Shevach, 2001).

La autoinmunidad mediada por células T CD8+ tiene rasgos diferenciales respecto a la mediada por las células CD4+. Una característica principal es que son dependientes de la actividad del IFN- $\gamma$ , inhibiéndose cuando se neutraliza su acción; mientras que cuando la autoinmunidad está mediada por células T CD4+ este interferón constituye una citocina protectora ante la EAE, disminuyendo su severidad. Hay que tener en cuenta que ambos tipos celulares conviven en la patogenia de la enfermedad, máxime

cuando se consideran posibilidades terapéuticas. El papel de las células T CD8<sup>+</sup> en la EM adquirió importancia tras ensayos clínicos en los que se administró IFN- $\gamma$  al paciente. Esto dio como resultado un empeoramiento de los síntomas, a pesar de que experimentos previos con ratones con y sin el gen de IFN- $\gamma$  parecían indicar lo contrario en la EAE (Feber et al., 1996). Este resultado, unido a la mayor presencia de células T CD8<sup>+</sup> respecto a las CD4<sup>+</sup> que se observa en tejido cerebral de pacientes (Cabarrocas et al., 2003), la alta proporción de CD8<sup>+</sup> específicas para neuroantígenos en células mononucleares de sangre periférica de pacientes EM-RR (Crawford et al., 2004), así como la mayor susceptibilidad a contraer la enfermedad asociada al antígeno leucocitario humano HLA-A3 del CMH clase I (Harbo et al., 2004), parece sugerir que la respuesta mediada por las células T CD8<sup>+</sup> tiene un papel relevante en la EM. Por ello, el modelo de TA-EAE mediado por células T CD8<sup>+</sup> aporta nuevas e importantes herramientas para el estudio de EM así como para el diseño de terapias alternativas contra la enfermedad.

#### **4.3. THEILER**

Se conocen varios virus capaces de inducir desmielinización en animales de laboratorio mediante protocolos de infección y que pueden ser utilizados para generar modelos útiles en el estudio de enfermedades desmielinizantes, tales como la EM. De entre todos ellos, el modelo más estudiado es el que se lleva a cabo mediante el TMEV. La infección de este picornavirus citolítico en ratones sirve como modelo para explicar los mecanismos infecciosos y parainfecciosos que subyacen en la desmielinización del SNC. Este virus puede desarrollar la infección a través de dos mecanismos distintos según el tipo celular, bien al infectar oligodendrocitos, donde lo hace de una forma productiva, provocando la lisis y liberación de los viriones, bien en los macrófagos, donde la infección es restrictiva, liberando pequeñas cantidades de virus durante el proceso, lo que permite la infección de más macrófagos y oligodendrocitos, aumentando así la destrucción de la mielina (Schlitt et al., 2003).

#### **4.4. MODELO DE LA CUPRIZONA**

Cuando se administra oralmente en ratones, la cuprizona, un quelante de cobre, causa rápida desmielinización y gliosis, o rápida proliferación de subtipos gliales. El modelo

animal de cuprizona refleja diversos aspectos de la patología de la EM, evitando la reacción autoinmune que ocurre en otros modelos preclínicos.

La administración de cuprizona es el tóxico más usado dentro de los modelos animales de EM inducidos mediante tóxicos entre los que se encuentran la lisolecitina y el bromuro de etidio. Se estudia el recambio oligodendrocítico, la astrogliosis y la microgliosis. Así como en otros modelos en los que la inoculación de los agentes tóxicos es mediante microinyecciones guiadas estereotáxicamente y resultan en desmielinización focal, la administración oral de la cuprizona produce un efecto global. Diferentes cepas de roedores se comportan de manera idiosincrásica a la cuprizona, que es mejor caracterizada por la cepa C57BL/6. Por ejemplo, al contrario que el ratón C57BL/6, el ratón BALB/cJ presenta una desmielinización retardada e incompleta en ciertas regiones cerebrales tras administrar la cuprizona, mientras que las ratas son resistentes a la desmielinización y por tanto, no constituyen un modelo apropiado para estudiar procesos de remielinización.

Un largo número de estudios reporta que las hembras de ratón son más resistentes a la desmielinización tóxica inducida por la cuprizona. Típicamente son los machos C57BL/6 los que son alimentados con cuprizona, lo que conlleva una muerte celular selectiva de oligodendrocitos y una desmielinización reproducible en el cerebro.

En este paradigma, la robusta remielinización sigue un curso predecible en el tiempo. El género del animal y la edad junto con el tiempo de exposición a la cuprizona son importantes determinantes de reproductibilidad y secuencia de desmielinización y remielinización. Una exposición prolongada a la cuprizona induce una desmielinización crónica que afecta negativamente a la reparación cerebral. Asimismo, una mayor edad disminuye la tasa de recambio oligodendrocítico y el reclutamiento de progenitores al lugar de desmielinización.

### **Método de inducción**

En el crucial paradigma de la cuprizona, machos C57BL/6 de 6 a 9 semanas de edad son alimentadas a base de comida mezclada con cuprizona al 0,2% en el curso de 6

semanas. A la tercera semana de la dieta con cuprizona se evidencia desmielinización consistente en el cuerpo caloso, el mayor tracto de sustancia blanca en el cerebro de ratón. La desmielinización alcanza su pico a las 5-6 semanas (Hibbits et al., 2009; Skripuletz et al., 2008; Steelman et al., 2012). Cuando se vuelve a una dieta normal, ocurre una intensa remielinización en el cuerpo caloso, que llega a ser completa a las 3-5 semanas libre de tóxico.

Estudios congruentes de diferentes laboratorios recalcan que la desmielinización sigue un patrón rostrocaudal en el cuerpo caloso confiriéndole una apariencia parcheada ( Binder et al., 2008, Stidworthy et al., 2003; Wu et al., 2008). La línea media superficial del genu en la parte rostral del cuerpo caloso aparece sustancialmente desmielinizada, mientras que en la parte dorsal del cuerpo caloso, los oligodendrocitos se encuentran totalmente deplecionados, como lo indican el 90% de neuronas glutathione S-transferasa positivas (Steelman et al., 2012). Otras regiones cerebrales incluyendo la comisura dorsal del hipocampo y en menor medida el córtex que también es vulnerable a la cuprizona (Koutsoudaki et al., 2009).

De forma paralela y a pesar de la presencia del tóxico, los precursores oligodendrocíticos maduran e inician una remielinización parcial del cuerpo caloso en la zona desmielinizada (Matsushima and Morell, 2001). Un aumento de los ratios-G (que van de la circunferencia axonal a la circunferencia de mielina) pasan de 0.802 a 0.926 y 0.964 en la semana 4 y 6. Esto indica una evidencia adicional de que la remielinización ha tenido lugar ( Lindner et al., 2008). El equipo de laboratorio de Wendy Macklin ha desarrollado una técnica para separar mejor las fases de desmielinización y remielinización en el modelo de cuprizona. Los investigadores inyectan rapamycina a los ratones que están siendo alimentados con cuprizona. La rapamycina es un fármaco que bloquea mTOR (serin-treonin-quinasa involucrada en muchos procesos como supervivencia celular, síntesis proteica, transcripción y estrés oxidativo) y el proceso de remielinización espontánea, permitiendo una mejor cuantificación de la pérdida de oligodendrocitos. Administrando solo la cuprizona la mielinización es del 30-40% a las 6 semanas, siendo la remielinización completa a las 3-5 semanas sin el tóxico. Administrando conjuntamente la cuprizona y la rapamycina se detecta un 0% de mielinización a las 6 semanas y una completa remielinización 7

semanas más tarde. “Tenemos un positivo limpio y un negativo limpio” dijo Dr. Macklin en una entrevista con el Forum de Esclerosis Múltiple (MSDF).

Descifrar los mecanismos moleculares de este patrón predeterminado de remielinización e identificar poblaciones progenitoras de oligodendrocitos con capacidad reparadora puede ser la base de terapias futuras para tratar la EM. Un componente vital poco comprendido hasta el momento es el reemplazo endógeno de astrogliosis y microgliosis que ocurre en los sitios de desmielinización. La microglía es reclutada de otras regiones cerebrales. No obstante, artículos contrapuestos dejan la función de la microglía dudosa en el contexto de muerte oligodendrocítica tras la desmielinización. Según un estudio la microglía es responsable de citoquinas proinflamatorias neuroprotectoras (Kotter et al., 2001; Simard and Rivest 2007; Turrin and Rivest 2006), mientras que otros grupos de investigación han descrito sus efectos neurotóxicos (Kim and de Vellis 2005; Walker and Lue 2005).

La desmielinización crónica se puede inducir si los ratones C57BL/6 tienen una dieta con cuprizona durante 12 semanas (Hibbits et., 2009; Matsushima and Morell 2001; Skripuletz et al., 2010; Skripuletz et al., 2008). Los síntomas sistémicos aparecen a las 14 semanas, los ratones C57BL/6 no sobreviven más allá de la semana 16. No obstante, está descrito que otras cepas de ratones viven hasta 6-7 meses. Los oligodendrocitos y los progenitores oligodendrocíticos sufren una muerte celular programada y deplecionan. Al añadir O4+ (marcador de precursores oligodendrocíticos), este induce una reparación de los axones desmielinizados crónicamente, indicando que la desmielinización resulta como consecuencia del agotamiento del pool de oligodendrocitos más que por su incapacidad de repararlo (Mason et al., 2004).

### **Procesos patológicos clave**

La cuprizona (bis-cyclohexanone oxaldihidrazona) – un quelante de cobre – tiene como diana oligodendrocitos maduros, encargados de sintetizar la cubierta de mielina que protege los axones en el SNC. El cobre es un elemento esencial para el funcionamiento de muchas metaloproteinasas, y se han observado niveles bajos en un gran número de patologías neurodegenerativas. Se ha observado un patrón consistente de

desmielinización principalmente en el cuerpo calloso. La depleción oligodendrocítica también se vislumbra en los pedúnculos cerebelosos, córtex y en las comisuras hipocampales dorsales. Astrocitos y microglía reactivos acuden a las áreas de desmielinización y secretan una batería de citoquinas proinflamatorias incluyendo TNF- $\alpha$ , interleukina-1 $\beta$  e interferon- $\gamma$ , que regulan los procesos desmielinizantes (Arnett et al., 2001; Blakemore 1972; Hiremath et al., 1998; Mason et al., 2001; Voss et al., 2012). El descenso transcripcional y translacional de los niveles de la fosfolipasa A2 (Palumbo et al., 2011), de la glicoproteína asociada a la mielina (MAG), la proteína básica de la mielina, ceramida y de la galactosiltransferasa preceden al inicio de la desmielinización (Jurevics et al., 2001; Norkute et al., 2009). Concentraciones elevadas de cuprizona producen disfunción mitocondrial (megamitocondrias) mediante el aumento de su tamaño o fusión y reducción de la citocromo y monoaminooxidasa.

#### **4.5. MODELO DE LA LISOLECITINA**

Parece que el mejor modelo para estudiar la remielinización es la inyección de toxinas, bien lisolecitina, bromuro de etidio u otras, en los pedúnculos caudales cerebrales (Woodruff and Franklin 1999) o en la sustancia blanca de la médula espinal. La localización es lograda mediante 3 precisas inyecciones estereotáxicas y está limitada a roedores de mayor tamaño (rata) debido a la dificultad técnica que supone tener unos pedúnculos cerebrales pequeños (Keough et al., 2015). Lamentablemente esto excluye a la fuente de ratones transgénicos para los estudios de des- y remielinización. La médula espinal, sin embargo, contiene muchos tractos de sustancia blanca que son fácilmente accesibles quirúrgicamente. Los espacios vertebrales posibilitan un buen acceso a la región de los segmentos torácicos rostrales sin la necesidad de laminectomía, procedimiento quirúrgico necesario en el área torácica caudal. Una ventaja de tratar de acceder por la sustancia blanca ventral es que los axones son uniformemente más largos que los dorsales, haciendo que la cuantificación de la remielinización sea una tarea menos ambigua – similar a las dificultades asociadas al cuerpo calloso. Algunos protocolos inyectan la lisolecitina tanto dorsalmente como ventralmente (Mei et al., 2014). Esto puede aumentar tanto la probabilidad de un buen posicionamiento capilar así como tener una mejor cuantificación de las lesiones.

Cuantificar la remielinización no es una tarea banal. Un dogma central postula que los segmentos remielinizados son más cortos en longitud y más gruesos de promedio que

sus homólogos correspondientes. Por tanto, los cálculos del ratio-G (diámetro axón/diámetro axón + mielina) de secciones transversales semi o ultrafinas se ha convertido en el procedimiento estándar de medida. No obstante, se conoce que los segmentos remielinizados se engruesan con el tiempo (Jeffery and Blakemore 1995) y un estudio reciente utilizando un transgen reporter de remielinización oligodendrocitario sugiere que muchos internodos se vuelven indistinguibles del control (Powers et al., 2013). Cuantificar el número de oligodendrocitos maduros en la lesión es una forma indirecta de medir la reparación ya que los oligodendrocitos son capaces de crear un gran número de internodos y una proporción significativa de remielinización – dependiendo del modelo utilizado podría ocurrir mediante células de Schwann. Por supuesto, la remielinización está ligada a una restauración de la conducción saltatoria (Smith et al., 1979), la última medida para evaluar la reparación sería una recuperación funcional de los déficit neurológicos. Mientras que la remielinización está ligada a la recuperación de función en ciertas especies (Blakemore et al., 1997) (Duncan et al., 2009) no se ha convertido en un procedimiento estándar en los modelos murinos de lisolecitina. Esto es debido a una falta de observación de manifestaciones bien dorsales o bien ventrales, comparado a una desmielinización más robusta observada en modelos como el EAE o el de Cuprizona. Se piensa que déficits funcionales resultantes de la inyección de la lisolecitina y una recuperación subsecuente con la remielinización serán solamente observados utilizando unos test muy sensibles a alteraciones sensoriomotoras.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. EAE

#### **Limitaciones**

El EAE no es el modelo ideal para estudiar la remielinización por tres motivos:

- Primero la localización de las lesiones es un tanto azarosa y localizar lesiones al procesar los tejidos de sección semi o ultrafina puede suponer un reto.
- El segundo es que la remielinización ocurre dentro de un espacio de tiempo determinado y que la edad exacta de una lesión concreta de EAE no puede saberse si no es con continua monitorización mediante RMN.
- La tercera es que la remielinización es un fenómeno que ocurre de forma natural en roedores y que la evidencia de remielinización tras una terapia en EAE puede no ser una respuesta primaria al fármaco, si no una respuesta secundaria a la reducción de la inflamación.

Los mecanismos de lesión de la sustancia blanca son heterogéneos, resultando en patrones de desmielinización que varían muchos entre pacientes o entre grupos de pacientes. Mas aún la variabilidad es también interindividual en el contexto de daño axonal, remielinización y reparación. Es probable que factores genéticos que modulan la inflamación inmuno-mediada así como la supervivencia neuronal y glial jueguen un papel importante modulando el fenotipo de la enfermedad.

Los modelos de EAE son estudiados principalmente en inbreed o en poblaciones genéticamente homogéneas. De ahí que la heterogeneidad solo se estudie cuando modelos paralelos murinos se estudian a la vez. El modelo EAE proporciona poca información acerca de la progresión de la EM. La utilización de la cepa C57BL/6 no permite el estudio de la tasa de recaídas. La remielinización es difícil de estudiar en la EAE. Las lesiones ocurren estocásticamente con respecto a la localización y el tiempo de evolución. Además, no se ha realizado un estudio exhaustivo del daño a la mielina en tejidos EAE.

La EAE afecta principalmente a la sustancia blanca espinal mientras que la EM afecta mayoritariamente al cerebro y al cortex cerebeloso. Desafortunadamente solo unos

pocos estudios han analizado la afección del cortex en EAE. La mayoría de formas de EAE son generadas con auto-péptidos que determinan la activación celular de CD4+. Muy pocos estudios han abordado el papel de los CD8+T, los cuales muestran una expansión clonal y activación en las lesiones de EM (Friedman et al., 1999).

El EAE en si mismo, es un modelo imperfecto de EM, puesto que no simula sus características clínicas y patológicas (Weiner 2004; Roach 2004; Chaudhuri et al., 2004). Asimismo, el EAE es responsable de la creación de fármacos dirigidos contra las células T (ej ciclosporina y anticuerpos monoclonales anticélulas CD4). Estos mismos fármacos han demostrado repetidamente no ser efectivos como terapias para tratar la EM.

## **5.2. TA-EAE**

La transferencia adoptiva de EAE mantiene ciertas diferencias respecto a la inmunización activa, diferencias que pueden resultar útiles en función de los estudios que se quieran realizar. Datos obtenidos de la comparación de ambos modelos en rata demostraron que la inoculación de las células CD4+ presentaba manifestaciones clínicas en un menor tiempo y con una mayor incidencia. Así, mientras que, tras la inducción activa, el tiempo de latencia era de, aproximadamente,  $13 \pm 0,1$  días, y la incidencia alcanzaba un 53%, la transferencia adoptiva generaba sintomatología clínica a, aproximadamente,  $6 \pm 0,1$  días del procedimiento, y se observaba en el 100% de los individuos analizados. Otra de las ventajas que presenta es su utilización en estudios farmacológicos, particularmente en la evaluación de agentes inmunosupresores, ya que muestra síntomas más estables y severos respecto a la inducción activa además de, por otro lado, ser muy útil a la hora de estudiar el papel específico de las células T CD4+ en la inducción de la patología de la enfermedad. Precisamente, la utilización de esta metodología ha permitido avanzar en el conocimiento del papel que las poblaciones reguladoras CD4+CD25+ juegan en la patogenia de la enfermedad y demostrar, recientemente, que su inoculación contribuye a la eficacia terapéutica del acetato de glatirámico y la remisión de la EAE.

## **5.3. THEILER**

Cabe destacar que el patrón de destrucción de mielina en esta enfermedad viral es similar al que ocurre en la EAE, es decir, está mediada por linfocitos T CD4+ y CD8+. Se ha demostrado que los linfocitos aislados de nodos linfáticos de ratones inmunizados con TMEV producen IL-2, TNF- $\alpha$  y INF- $\gamma$  pero no IL-4, IL-6 o IL-10, y que pueden liberar anticuerpos de la subclase IgG2a, lo que pertenece a una respuesta característica de las células CD4+ del subtipo Th1. Esto hace pensar que la desmielinización sea dependiente de una respuesta inmune secundaria contra algún componente de la mielina, la cual puede ser mediada por un mimetismo molecular o expansión de epítomos. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la EAE, ni las células ni el suero de animales infectados son capaces de transferir la enfermedad ni producir desmielinización en cultivos organotípicos. Por tanto, es posible que en las primeras fases de la enfermedad la destrucción de la mielina en este modelo sea causada por el virus y la consiguiente respuesta celular ante el mismo, mientras, en la fase crónica, el causante sea la respuesta inmune secundaria ante la mielina.

#### **5.4. MODELO DE CUPRIZONA**

##### **Claves clínicas**

Brian Popko, Ph.D, un neurocientífico de la Universidad de Chicago dice que los efectos que se producen en los ratones alimentados con cuprizona – déficits motores y interacciones sociales alteradas – son sutiles y requieren de test específicos para detectarlas. Por ejemplo, en un ensayo sensoriomotriz (desarrollado por el laboratorio de Regina Armstrong de la USUHS), el ratón tratado con cuprizona corre más lento en una rueda de hámster con carreras irregularmente separadas a diferencia de los ratones control (Hibbits et al., 2009).

##### **Ventajas**

El modelo de la cuprizona es simple y fiable a la hora de inducir y examinar desmielinización y remielinización. Otros modelos animales inducidos mediante tóxicos requieren cirugías complejas estereotáxicas. Por si fuera poco, el daño producido es

reproducibile por un espacio de tiempo prolongado y en una localización determinada que es el cuerpo calloso.

Otros modelos animales como el EAE, inducen desmielinización por medio de desencadenar una activación de linfocitos-T y su infiltración en el cerebro, provocando un ataque inmune. Las citokinas y factores inflamatorios liberados por las células inflamatorias añaden variables adicionales que complican la interpretación de la muerte celular de los oligodendrocitos. La apoptosis oligodendrocitaria asociada a la cuprizona mimetiza el sello distintivo fisiopatológico de la EM primaria progresiva y en menor medida la EM progresiva remitente como no lo hace ningún otro modelo experimental (Lucchinetti et al., 2000). Como el modelo de la cuprizona está bien descrito en el ratón C57BL/6, que es la cepa más utilizada para crear ratones knockout, es posible estudiar el papel de genes específicos y la interacción celular involucrada en el proceso de remielinización.

### **Limitaciones**

Hay limitaciones a la hora de estudiar el cuerpo calloso por las siguientes razones: para empezar el diámetro axonal (y por ende el grosor de la vaina miélica) es más pequeño que otras regiones del SNC, por consiguiente las vainas remielinizadas pueden ser indistinguibles de aquellas que nunca fueron desmielinizadas. En segundo lugar porque el cuerpo calloso del ratón contiene >70% de axones no mielinizados (Sturrock 1980). Puede no estar claro si el segmento remielinado es una verdadera reparación del daño causado a la mielina o si se trata de una síntesis de novo en el adulto, lo cual ocurre normalmente (Young et al., 2013).

### **Utilidad para desentrañar las vías biológicas subyacentes**

Este modelo puede ser utilizado para identificar importantes cascadas moleculares o moléculas aisladas involucradas en la reparación de la mielina, incluyendo el incremento de niveles de Olig 2 antes de que valores de proteínas específicas de la mielina disminuyan o citoquinas inflamatorias se incrementen durante la fase de desmielinización-remielinización (Morell et al., 1998). El ácido fumárico no parece que frene la muerte oligodendrocítica en los modelos murinos de cuprizona, mientras que el

glatiramero, uno de los tratamientos aprobados más común, resultó ser efectivo en este modelo preclínico. Los efectos beneficiosos han sido atribuidos a una secreción de interleukinas-10 y 4 (Rosato et al., 2013). Más aún, el knockdown de FGF2 y FGFR1 se ha visto que acelera los procesos de remielinización en los modelos de cuprizona (Mierzwa et al., 2013).

## **5.5. MODELO DE LA LIPOLECITINA**

Las ventajas de este modelos son principalmente ser un modelo animal idóneo para estudiar la desmielinización y la remielinización así como a evitar limitaciones que muestra el modelo de la cuprizona. Las limitaciones radican en la dificultad técnica de llevarlo a cabo pues es una técnica difícil.

## **5.6. RESUMEN DE VENTAJAS Y LIMITACIONES**

### **EAE**

- +Descubrir la presencia de células autorreactivas que escapan de la selección negativa en el timo.
- +Contribución a rebatir el dogma que consideraba al SNC como un órgano inmunoprivilegiado, con el desarrollo de la GFP permitió demostrar como células T autorreactivas cruzaban la BHE mediante ligandos VLA-4/VCAM-1.
- +Ser el modelo que más ha contribuido hasta este momento para entender fenómenos inmunitarios y moleculares.
- Necesidad de potentes adyuvantes para inducir la enfermedad.
- Falta de heterogeneidad en el estudio.
- Principalmente se afecta sustancia blanca cuando la EM, afecta tanto a sustancia blanca como a sustancia gris.
- Fármacos desarrollados en EAE han demostrado ser ineficaces en humanos.
- Falta mayor estudio de células B o CD8+.

### **TA-EAE**

- +La TA genera una inducción del 100%.
- +Muestra sintomatología más temprana y más estable en la que se pueden testar agentes inmunosupresores.

### **TMEV**

-Ni las células ni el suero de animales infectados son capaces de transferir la enfermedad.

-Hace pensar que la desmielinización en las primeras fases de la enfermedad la destrucción de la mielina en este modelo sea causada por el virus mientras que la crónica sea dependiente de una respuesta inmune secundaria contra algún componente de la mielina.

### **MODELOS TÓXICOS: Aspectos compartidos**

+Elude el componente inflamatorio y hace posible la identificación de factores que ensalzan o inhiben la reparación de la mielina.

+Mejores modelos existentes para estudiar la des- y re-mielinización.

-Modelo pobre para entender la implicación del sistema inmune.

-Los efectos tóxicos no son susceptibles de imitar la complicada patología de la EM en humanos y específicamente la EM remitente-recurrente o la EM secundaria progresiva.

### **CUPRIZONA**

+Simple y fiable a la hora de inducir y examinar desmielinización y remielinización.

+El daño producido es reproducible por un espacio de tiempo prolongado y en una localización determinada que es el cuerpo calloso.

+Permite testar el rendimiento de fármacos para la supervivencia oligodendrocitaria así como para la remielinización axonal.

+El tratamiento con la cuprizona puede detenerse.

+Estudia la depleción oligodendrocitaria.

-El diámetro axonal (y por ende el grosor de la vaina mielínica) es más pequeño que otras regiones del SNC, por consiguiente las vainas remielinizadas pueden ser indistinguibles de aquellas que nunca fueron desmielinizadas.

-El cuerpo calloso del ratón contiene >70% de axones no mielinizados.

-Puede no estar claro si el segmento remielinado es una verdadera reparación del daño causado a la mielina o si se trata de una síntesis de novo en el adulto.

-Los investigadores necesitan sacrificar a los animales y hacer una disección del cuerpo calloso para documentar los efectos del tóxico y los diferentes factores remielinizantes a

estudio, ya que no es posible una determinación fiable por RMN. Esto dificulta hacer estudios longitudinales.

-Las fluctuaciones hormonales de progesterona y estrógenos retrasan el proceso de desmielinización y aceleran los procesos de remielinización.

### **LISOLECITINA**

+No presenta las dificultades técnicas del modelo de la cuprizona a la hora de analizar los resultados.

-Técnica estereotóxica compleja de llevar a cabo.

## **5.7. FACTORES AMBIENTALES Y PROPUESTA REFLEXIVA**

Recopilando muchos de los datos citados a lo largo de la revisión podemos concluir lo siguiente:

-La mayor concordancia genética que se ha dado es del 30 % entre gemelos

-No tiene que ver con un traumatismo

-El riesgo de padecer EM va acorde al mes nacido: Mayo para el hemisferio norte y Noviembre para el hemisferio sur (Willer 2005; Staples et al., 2010)

-Parece que hay relación con virus EBV, HHV y con Chlamydia pneumoniae pero no está del todo claro el vínculo

-Parece que la vit D juega un papel importante en la EM. Su deficiencia incrementa el riesgo de padecer EM y tomar suplementos de vit D ayuda a ralentizar la frecuencia de brotes y la progresión de la enfermedad. (Feldman et al., 2011)

-Si ocurre una migración antes de los 15 años de edad el individuo adquiere la probabilidad de contraer EM del lugar al que va; si el traslado es después de los 15 años la probabilidad es la del lugar del que vino.

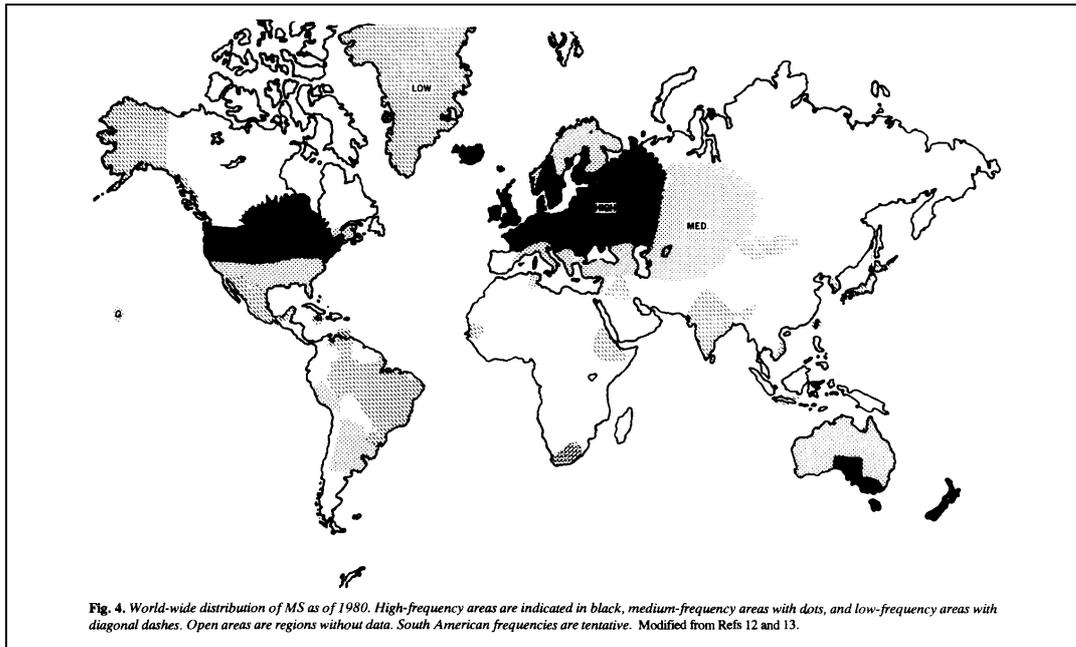
-Hilando estas dos últimas: la gente que migra a regiones donde la tasa de rayos UVA es menor de donde proviene, tiene dificultades para mantener sus niveles de vit D y por ende, una mayor probabilidad de padecer EM (Jablonski et al., 2012).

Viendo los porcentajes de epidemiología entre gemelos, se puede deducir que es muy importante el factor ambiental, pudiendo tratarse del determinante más importante en lo que respecta a la etiología de la enfermedad. Así pues debemos indagar y pensar en

posibles agentes exógenos. Tenemos ciertos indicios que son, gradiente norte-sur de la enfermedad, siendo ésta más frecuente cerca de los polos y menos frecuente en el ecuador. Pero que sin embargo, no sigue una distribución por latitudes puesto que hay excepciones entre países anexos.

Haciendo un paréntesis, para encuadrar un poco la enfermedad, debemos contextualizarla. Se han descrito casos de EM desde antes del siglo XVIII. Y ya en el siglo XX, se convirtió en la enfermedad grave más frecuente a la hora de acudir a un neurólogo. Debemos de tener en cuenta, que en estos siglos se da la revolución industrial y el éxodo rural (1750-1950), donde la gente acude de forma masiva a buscarse un futuro a la ciudad. Esto conlleva un cambio de ambiente y pasar mayor tiempo dentro de edificios.

Analizando el mapa de prevalencia mundial de la EM podemos concluir que es más frecuente en Canadá, norte de EEUU, Europa, Sur de Australia, Tasmania y Nueva Zelanda. Además se aprecian variaciones relativas en cada territorio. Cuestiones comunes a todas ellas son el hecho de ser países desarrollados, de haber población genéticamente susceptible (cuyo origen es compartido, siendo Europeo), de que hay estaciones del año; esto implica una variación de temperatura ambiental cosa que no ocurre en regiones cercanas al ecuador, donde la temperatura se mantiene más constante y estable. El mapa mundial (**Figura 8**) nos puede dar información útil para plantear el problema y es interesante ver que las regiones mundiales con mayor prevalencia comparten ciertas características:



**Figura 8.** Muestra distribución mundial de la EM en 1980.

-Hay una media de temperatura menor

-Hay una mayor media anual de lluvia (mm)

-Zonas costeras o cercanas a lagos (en su defecto con mucha lluvia)

-Se aprecia una relación con el número de horas de exposición solar en un año

Generalmente estas zonas comparten una humedad relativa mayor que otras áreas,. Además, está demostrado que hay exposición a un factor desconocido a mediados de marzo en el hemisferio norte y a mediados de septiembre en el hemisferio sur, coincidiendo con la subida de las temperaturas tras el invierno (la llegada de la primavera).

Esto nos puede llevar a plantear dos hipótesis:

1. Que sea un agente atmosférico que suspenso en el aire, se precipite con el agua en la región y entre en contacto con los habitantes bien siendo inhalado o ingerido.
2. Que sea un agente biológico que se vea influenciado por la humedad haciéndose más patente su efecto en regiones más húmedas, un ejemplo de ello sería el moho.

Hilando estas dos últimas bien podría ser que las esporas o micotoxinas de moho viajasen en el aire y se precipitasen con la lluvia.

El hecho de que la incidencia y la prevalencia de la EM esté en aumento con el paso de las décadas puede explicarse mediante un mayor diagnóstico de la enfermedad o quizás tenga que ver con el hecho de haber dejado de vivir en las zonas rurales y de que hoy en día estemos más expuestos a un factor "x" (desconocido) en el medio urbano (en relación con la teoría alérgica de la higiene). La clave para evitar el mayor número de sesgos es comparar zonas en las que haya una gran diferencia de prevalencia siendo ambos países desarrollados, donde se diagnostica por igual esta enfermedad. Y parece ser que se correlacionan en todos los casos con la humedad.

Estudiando la distribución mundial de la enfermedad se podrían plantear las causas más probables que produzcan la enfermedad. Una vez diseñado el argumento teórico se podría plantear un modelo experimental humano epidemiológico en el que individuos recién diagnosticados de EM sean movilizados a vivir a una región en la que se plantee la no existencia de un factor ambiental susceptible concreto. Por ejemplo, de los EEUU al desierto del Sahara. Que sean recién diagnosticados implica que lo más probable (85%) es que sea del patrón RR. Y esta es la razón de movilizar a las personas pues al llegar a la etapa crónica es posible que la enfermedad y los brotes dependan exclusivamente de fenómenos autoinmunitarios endógenos y no exógenos. Siendo plausible la teoría de que se tratase de una enfermedad neurotóxica, podría ser entendida como alérgica, teniendo una transición a enfermedad autoinmune con el paso de los años y la evolución de la enfermedad. El hecho de que el contacto con el factor "x" sea desde el nacimiento y se haya demostrado su efecto, sugiere una posible hipersensibilidad a dicho factor.

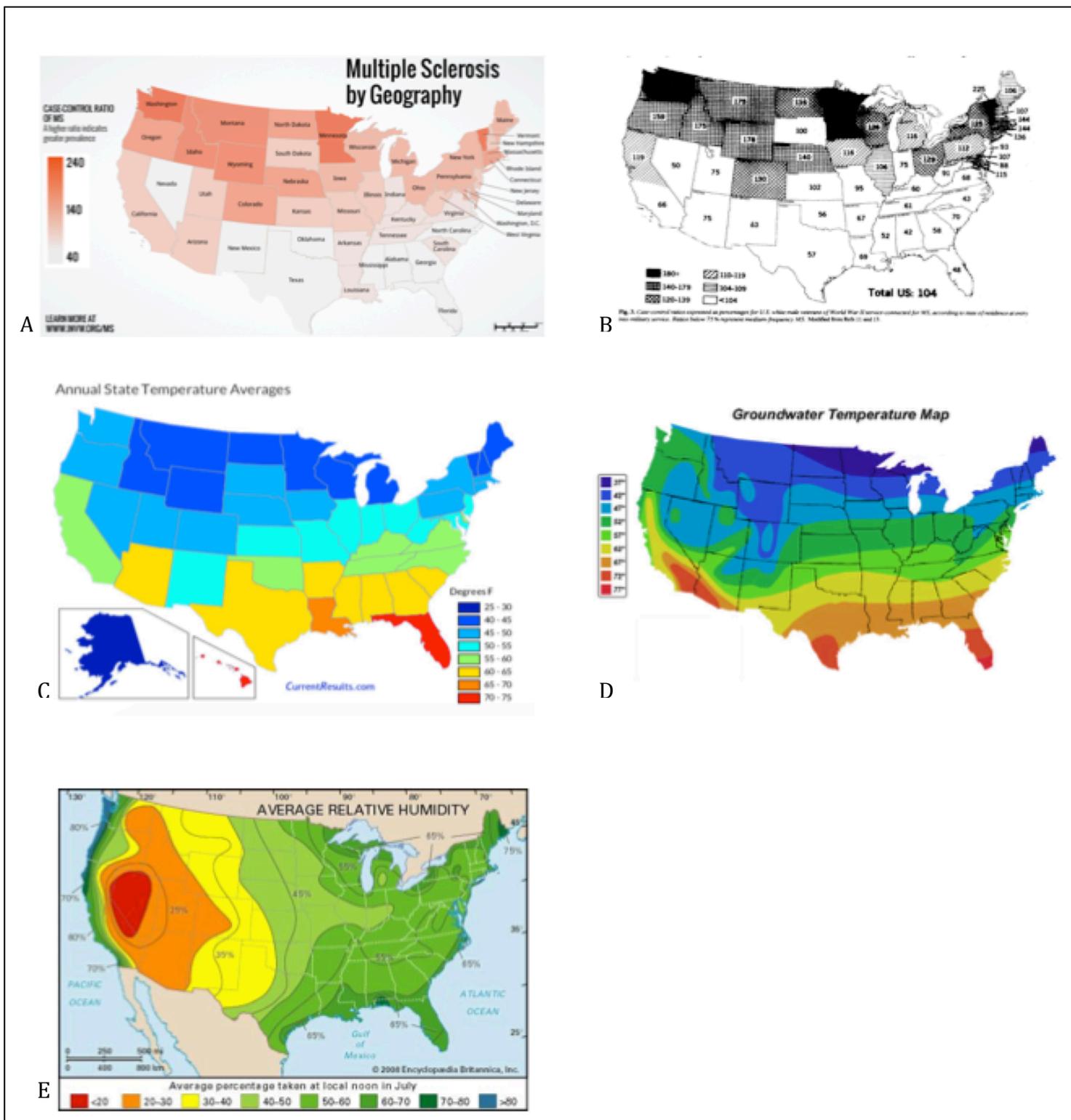
Viendo en qué casos mejoran los pacientes al cambiar de lugar o país de residencia puede proporcionar datos, que retroalimen la idea de que ciertos factores susceptibles se acepten como verdaderos, o por el contrario se descarten. Ya que el único modelo experimental moral y lícito que se debe hacer en humanos es el de "no enfermedad", es el que tenemos que estudiar a toda costa. Logrando comprender mejor estos factores ambientales se podrían plantear modelos experimentales animales con exposición a estos mismos factores, para desarrollar terapias que pudieran ser más efectivas en humanos.

No estaría de más hacer un estudio relativo al moho y al efecto que pueden producir sus micotoxinas en el humano. Éstas son liberadas con mayor frecuencia al haber cambios

de temperatura o al pasar de un ambiente más frío y húmedo a uno más cálido y seco, como ocurre al llegar la primavera con el cambio estacional. Al vivir en el medio rural estamos en contacto con múltiples estímulos que mantienen activo a nuestro sistema inmune, desde el polvo y polen a garrapatas o bacterias. Esta diversidad de estímulos se pierde al vivir en un medio urbano donde nuestro sistema inmune focaliza toda su atención en luchar contra el polvo, los ácaros, el moho o ciertos alimentos.

Aunque existen muchas especies distintas de moho, solo unas pocas de ellas producen micotoxinas, las cuales son neurotóxicas. Generalmente, los mohos más tóxicos también son los más resistentes. Es por eso, que es más probable que sobrevivan en el medio urbano a pesar de nuestros esfuerzos por deshacernos de las humedades y se dé una selección natural de los más patógenos. Y no solo dentro de nuestras casas, sino también en las fachadas de las casas, a veces ocupándolas por completo oscureciendo el color de las pinturas y haciendo que estas se descamen. Esto se debe a que las paredes no ofrecen ninguna barrera a su crecimiento, barrera que sí ofrecen las plantas con su sistema inmune en los bosques o en el medio rural. De ahí que el moho pueda crecer a sus anchas y prevalecer, con poca competencia por parte de otros seres biológicos.

Ya que el moho crece con la humedad podemos ver en imágenes la relación de la humedad con la prevalencia de EM. En los EEUU (**Figura 9**) se aprecian diferentes prevalencias entre estados adyacentes. Dakota del Sur (**Figura 9a**) por ejemplo, se encuentra entre dos estados con mucha mayor prevalencia, que son Minnesota y Wyoming. Estas diferencias no se atribuyen a la latitud, pero se pueden atribuir a la humedad, ya que por ejemplo Dakota del Sur tiene una temperatura media anual más cálida (**Figura 9c**) y la temperatura media del agua subterránea (**Figura 9d**) es mayor. Otro estado que tiene menor prevalencia es Nevada (**Figura 9a**), zona en la que el ambiente, es el más seco del país (**Figura 9e**). Otra diferencia curiosa es que en el sur de los EEUU a pesar de que la mayoría de los lugares tienen muy poca prevalencia, Louisiana y Arkansas la tienen más elevada (**Figura 9a**). Esto enlaza con el hecho de que están bañadas por las aguas del río Mississippi, por lo que las hace ser zonas más húmedas (**Figura 9e**). Florida a pesar de ser una zona muy húmeda también es una zona con una temperatura media muy elevada (**Figura 9c**) por lo que su prevalencia es mucho menor.

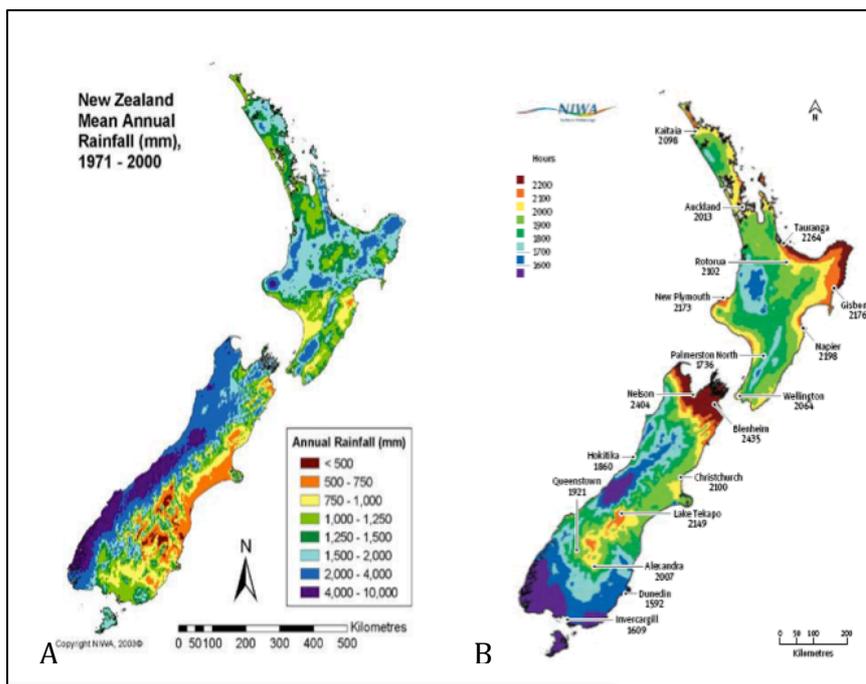


**Figura 9.** En las figuras A y B se observa la prevalencia de la EM en los diferentes estados de los EEUU, siendo las zonas más oscuras las de mayor prevalencia.

En la imagen C, aparece la media anual de temperatura (azul-baja temperatura; rojo-alta) y la imagen D muestra la temperatura de las aguas subterráneas.

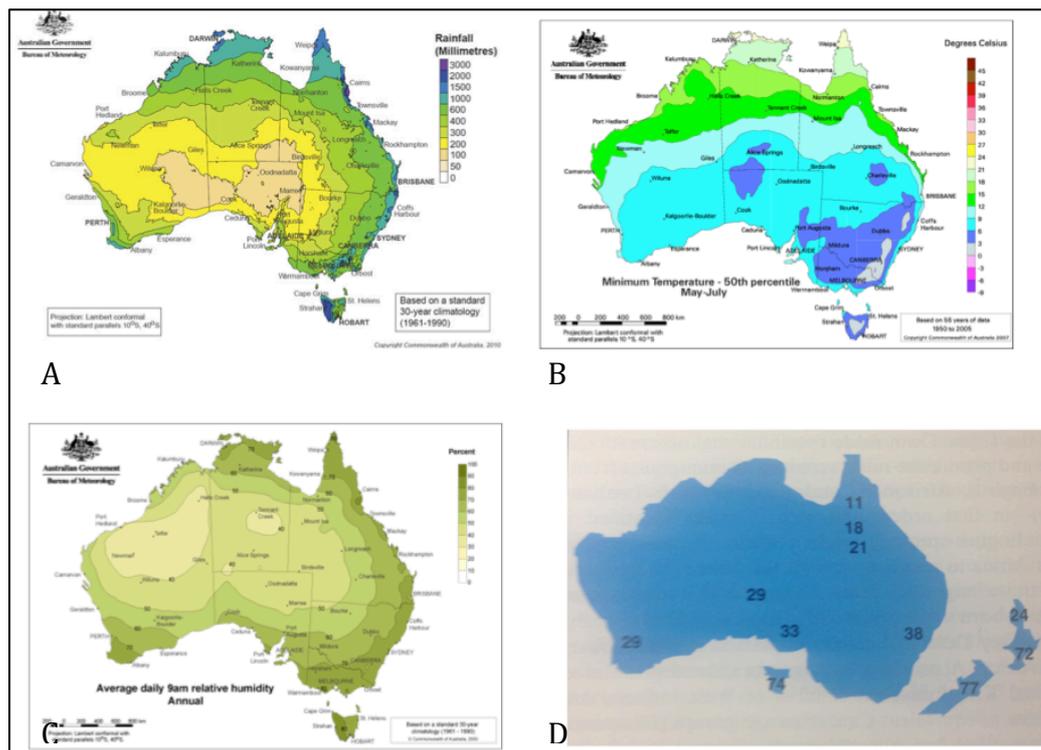
Por último, la imagen E muestra la media de la humedad relativa anual, siendo el color rojo correspondiente a áreas muy secas y el verde oscuro a húmedas.

Nueva Zelanda (**Figura 10**) es otro país que muestra grandes diferencias entre el norte y el sur de la isla Norte. Esto puede explicarse mediante una gran diferencia de la media anual de precipitaciones (**Figura 10a**) y de la exposición solar media anual (**Figura 10b**) entre ambas regiones, siendo la zona norte la que menos lluvia y más sol tiene, así como una incidencia menor de esclerosis múltiple.



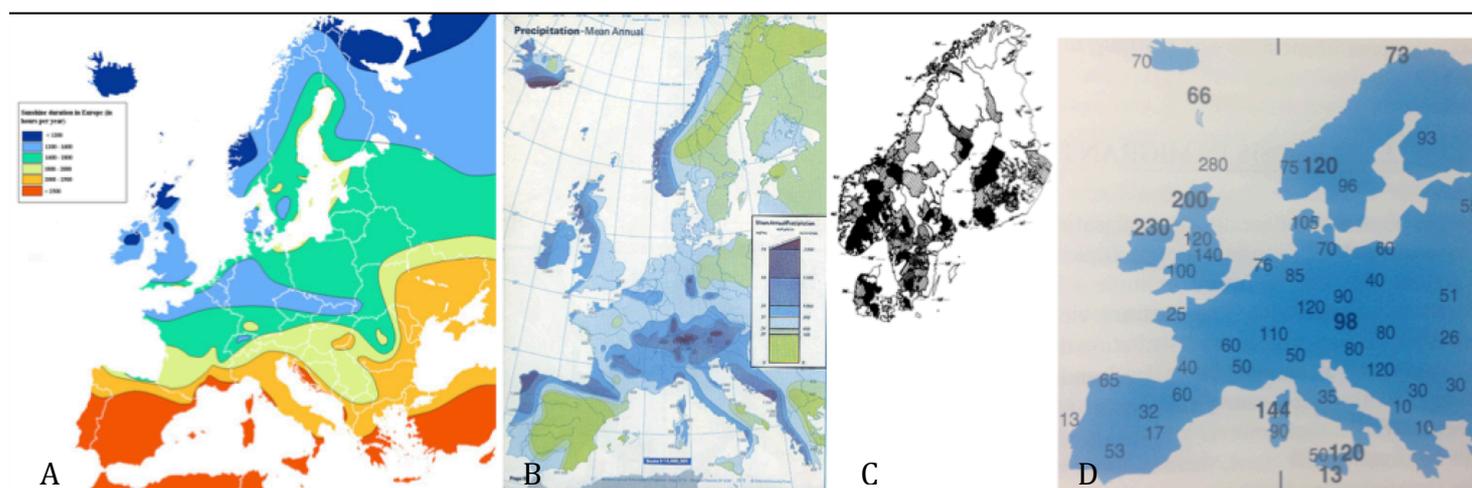
**Figura 10.** La imagen A muestra la media de precipitaciones anuales en mm entre los años 1971-2000 (morado corresponde a mucha lluvia, rojo a poca) La imagen B muestra la media anual de horas de sol ente los años 1971-2000 (rojo corresponde a mucho sol, morado a poco)

En Australia (**Figura 11**) ocurre lo mismo, siendo la zona sur y Tasmania las zonas donde mayor prevalencia hay de EM siendo éstas, las zonas que más mm de precipitación media anual tienen, menor temperatura media (Mayo-Julio) y mayor humedad media anual.



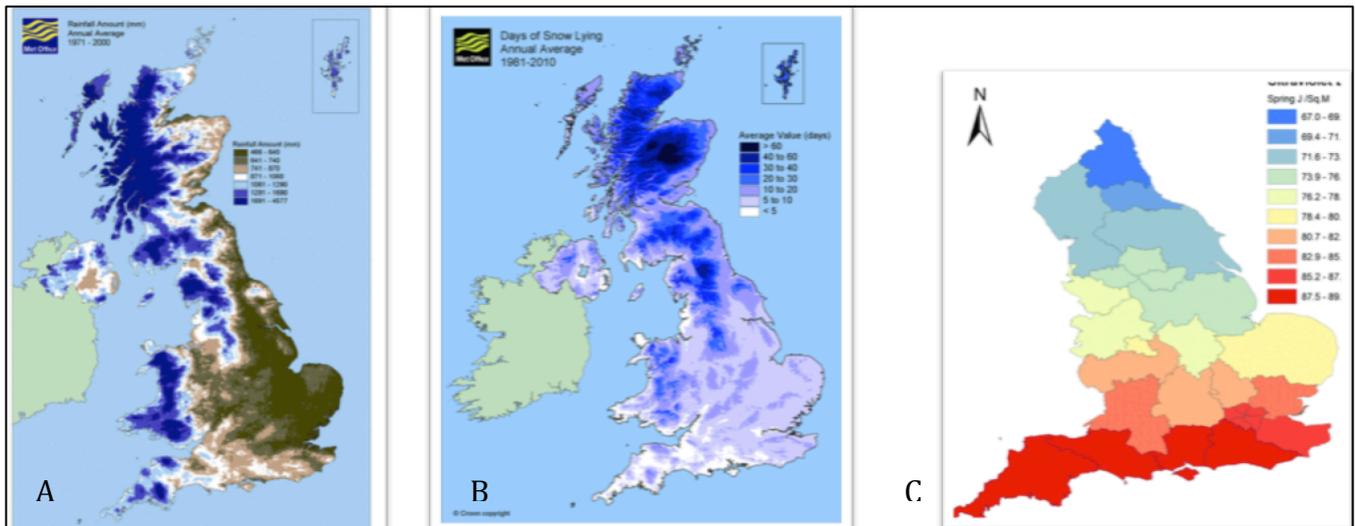
**Figura 11.** La imagen A muestra la media anual de precipitaciones en mm entre los años 1961-1990 (siendo el morado equivalente a las mayores lluvias y el ocre a la de menos). La imagen B muestra la temperatura entre mayo-julio haciendo la media desde 1950-2005 (morado equivale a frío, ocre al área más caliente). La imagen C muestra la humedad anual media desde los años 1961-1990 (siendo el verde oscuro la zona más húmeda). Por último, la imagen D muestra la prevalencia de la EM n° enfermos/10.000, datos publicados en 1998.

En Europa (**Figura 12**), vemos que las regiones con mayor prevalencia de EM son la zona centro-norte de Alemania (85-120/10<sup>5</sup>), Dinamarca (105/10<sup>5</sup>), República Checa (98/10<sup>5</sup>), Eslovaquia (80/10<sup>5</sup>), Irlanda (230/10<sup>5</sup>), Reino Unido (100-200/10<sup>5</sup>), Noruega (75-120/10<sup>5</sup>), Suecia (95/10<sup>5</sup>), Finlandia (93/10<sup>5</sup>) e Islandia (70/10<sup>5</sup>). En la **Figura 12a** se aprecia que las zonas con menor exposición solar son Islandia, Irlanda, Reino Unido, Noruega, Suecia, Finlandia, Dinamarca, Norte de Francia, República Checa, Eslovaquia, Suiza y Alemania Central. Asimismo como se aprecia en la **Figura 12b** las zonas con mayores medias anuales de precipitaciones son Reino Unido, Irlanda, Islandia, países nórdicos, centro de Europa, norte de la península ibérica. Por último, en la **Figura 12d**, es característica la diferencia de prevalencia de la enfermedad en ciertas regiones. Por ejemplo, en la Aquitania francesa hay una prevalencia de 40/10<sup>5</sup> mientras que en el norte de España es de 60-65/10<sup>5</sup>. Este es otro ejemplo de excepción latitudinal dentro del gradiente norte-sur, donde las regiones más al norte deberían tener mayor prevalencia. Esta excepción puede ser explicada por mapas climáticos.



**Figura 12.** A) Duración de horas de luz en Europa datos en horas/año (el color rojo equivale al máximo y el azul oscuro al mínimo). B) Media anual de precipitaciones en Europa. C) Distribución de EM en Noruega, Suecia, Escandinavia y Dinamarca (a mayor oscuridad, mayor la prevalencia) D) Distribución de EM en Europa nº enfermos/10.000 datos publicados en 1998.

En el Reino Unido (**Figura 13**), Escocia ( $200/10^5$ ) es la región que presenta mayor prevalencia de EM, siendo la región del reino Unido en la que la media anual de precipitaciones es muy alta y mayor permanencia de nieve tiene (en días/año). El sur ( $100/10^5$ ) que tiene menor prevalencia tiene además la mayor tasa de rayos UVA tipo B del país, a diferencia de Escocia.



**Figura 13.** A) Media anual de precipitaciones en mm tomando como datos desde el año 1971-2000 (color azul equivale a mucha lluvia, marrón a poca)

B) Media anual de días que perdura la nieve entre los años 1981-2010 (a más oscuro más días, a mayor claridad menos).

C) Media de rayos ultravioletas tipo B en primavera.

## 6. CONCLUSIONES

Se ha demostrado la importancia de los modelos experimentales animales en el entendimiento de la EM. Tanto en su fisiopatología ayudando a comprender mejor la implicación celular y molecular, como en el hecho de incentivar la búsqueda de terapias novedas. Además, el hecho de tener un gran abanico de modelos experimentales permite entender la enfermedad como un rompecabezas en el que cada modelo experimental nos da una pieza clave, revelando esta un aspecto concreto de la enfermedad. El modelo EAE nos ayuda a comprender mejor la neuroinflamación y la activación del sistema inmune, así como a estudiar los patrones EMRR, EMPP y EMSP. El modelo TMEV (de Theiler) nos ayuda a comprender el daño axonal y la desmielinización inducida por la inflamación. Por último, los modelos de la cuprizona y de la lisolecitina nos ayudan a comprender los procesos de desmielinización y remielinización.

Asimismo, es vital seguir indagando en los factores exógenos que parecen tener tanta importancia en el desarrollo de la enfermedad, integrando la explicación en un mapamundi de prevalencia de EM. La EM presenta una distribución asimétrica que parece tener relación con la humedad. Ejemplo de ello son las diferencias patentes de prevalencia entre Escocia / Sur de Inglaterra, región norte de las islas de Nueva Zelanda respecto a la zona sur, sur de Australia / Tasmania, Dakota del Sur / Minnesota y Córcega-Cerdeña / Costa azul francesa. Son las regiones adyacentes entre sí con distinta prevalencia las que nos dan mayor información a la hora de plantear una hipótesis.

La futura resolución de la EM depende por un lado, de un continuo desarrollo y mejora de los modelos experimentales animales, minimizando sus limitaciones y por otro lado, de plantear modelos teóricos epidemiológicos que expliquen la distribución mundial asimétrica de la enfermedad. La experimentación animal y la epidemiología van íntimamente ligadas. Es por eso que se deben seleccionar los factores ambientales más susceptibles de ser los causantes y crear a partir de ellos modelos experimentales animales en los que poder desarrollar terapias novedas que en principio deberían ser más efectivas en humanos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abe S, Takagi K, Yamamoto T, Okuhata Y, Kato T. Semiquantitative assessment of myelination using magnetic resonance imaging in normal fetal brains. *Prenatal Diagnosis*. 2004;24(5):352-357.
- Ablashi DV, Lapps W, Kaplan M et al. Human herpesvirus -6 (HHV-6) infection in multiple sclerosis: A preliminary report. *Multiple Sclerosis*. 1998; 4: 490-496.
- Aboul-Enein F, Rauschka H, Kornek B, Stadelmann C, Stefferl A, Brück W et al. Preferential Loss of Myelin-Associated Glycoprotein Reflects Hypoxia-Like White Matter Damage in Stroke and Inflammatory Brain Diseases. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2003;62(1):25-33.
- Adams RD, Kubik CS. The morbid anatomy of the demyelinating diseases. *Am J Med*. 1952; 12: 510-546.
- Andersen O, Lygner PE, Berstrom T, Andersson M, Vahlne A. Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: A prospective seroepidemiological study. *J.Neurology*. 1991; 240: 417-422.
- Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, *et al*. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994; 57: 897-902.
- Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci*. 2001; 4(11):1116-1122.
- Ascherio A, Zhang SM, Hernan MA et al. Hepatitis B vaccination and the risk of multiple sclerosis. *New England J. Medicine*. 2001; 34: 327-332.
- Bauer HJ. Multiple sclerosis in Europe. Symposium Report. *J. Neurology* 1987; 234: 195-206.
- Baxter A. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(11):904-912.
- Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen I. The rapid isolation of clonable antigen-specific T

lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *European Journal of Immunology*. 1981;11(3):195-199.

-Bettelli E, Kuchroo VK. IL-12- and IL-23-induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together. *J Exp Med*. 2005; 201: 169-171.

-Binder MD, Cate HS, Prieto AL, Kemper D, Butzkueven H, Gresle MM, Cipriani T, Jokubaitis VG, Carmeliet P, Kilpatrick TJ. Gas6 deficiency increases oligodendrocyte loss and microglial activation in response to cuprizone-induced demyelination. *J Neurosci*. 2008 May 14; 28: 5195-206.

-Blakemore WF. Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *J Neurocytol*. 1972; 1: 413-26.

-Blakemore, W. F., Eames, R. A., Smith, K. J., McDonald, W. I. Remyelination in the spinal cord of the cat following intraspinal injections of lysolecithin. *J. Neurol. Sci*. 1977; 33: 31-43.

-Cabarrocas J, Bauer J, Piaggio E, Liblau R, Lassmann H. Effective and selective immune surveillance of the brain by MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 2003; 33: 1174- 1182.

-Chaudhuri A, Behan P. Multiple Sclerosis Is Not an Autoimmune Disease. *Archives of Neurology*. 2004;61(10):1610.

-Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008; 25: 1502-17.

-Confavreux C, Hutchinson M, Hours M. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *The New England J. Medicine*. 1998; 339: 285-291.

-Confavreux C, Suissa S, Saddinger P et al. Vaccinations and the risk of relapse in multiple sclerosis. *The New England J. Medicine*. 2001; 344: 319-326.

-Correale J, Farez M. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis Progression. *Frontiers in Neurology*. 2015;6.

-Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, Stastny P, Douek DC, Koup RA, Racke MK, Karandikar NJ. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood*. 2004; 103: 4222-4231.

- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003; 421: 744-748.
- Duncan, I. D., Brower, A., Kondo, Y., Curlee, J. F. Jr, Schultz, R. D. Extensive remyelination of the CNS leads to functional recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106: 6832-6836
- El Behi M, Dubucquoi S, Lefranc D, Zéphir H, De Seze J, Vermersch P, Prin L. New insights into cell responses involved in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Lett*. 2005; 96: 11-26.
- Feldman D, Pike J, Adams J. *Vitamin D (Third Edition)*. 1st ed. London: Academic Press; 2011.
- Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG, *et al.* Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol*. 1996; 156: 5-7.
- Friedman JE, Lyons MJ, Cu G *et al.* The association of the human -herpesvirus-6 and MS. *Multiple sclerosis*. 1999; 5: 335-362.
- Frohman E, Racke M, Raine C. *Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis*. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(9):942-955.
- Fuller KG, Olson JK, Howard LM, Croxford JL, Miller SD. Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Methods Mol Med*. 2004; 102: 339-361.
- Gold R. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 2006;129(8):1953-1971.
- Goodin D. The pathogenesis of multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2015;6:2-22.
- Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, O'Connor KC, De Jager P, Baecher-Allan C. Multiple sclerosis. *Immunol Rev*. 2005; 204: 208-231.

-Harbo HF, Lie BA, Sawcer S, Celius EG, Dai KZ, Otu- rai A, Hillert J, Lorentzen AR, Laaksonen M, Myhr KM, Ryder LP, Fredrikson S, Nyland H, Sørensen PS, Sandberg-Wollheim M, Andersen O, Svejgaard A, Edland A, Mellgren SI, Compston A, Vartdal F, Spurkland A. Genes in the HLA class I region may contribute to the HLA class II-associated genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Tissue Antigens*. 2004; 63: 237-247.

-Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*. 1986; 19: 578-587.

-Hemmer B, Cepok S, Nessler S, Sommer N. Pathogenesis of multiple sclerosis: an update on immunology. *Curr Opin Neurol*. 2002; 15: 227-231.

-Herrero-Herranz E, Pardo L, Gold R, Linker R. Pattern of axonal injury in murine myelin oligodendrocyte glycoprotein induced experimental autoimmune encephalomyelitis: Implications for multiple sclerosis. *Neurobiology of Disease*. 2008;30(2):162-173.

-Hibbits N, Pannu R, Wu TJ, Armstrong RC. Cuprizone demyelination of the corpus callosum in mice correlates with altered social interaction and impaired bilateral sensorimotor coordination. *ASN Neuro*. 2009; 14: 3.

-Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting JP, Suzuki K, Matsushima GK.

-Hohlfeld R, Wekerle H. Immunological update on multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2001; 14: 299- 304

-Hurst EW. The effects of the injection of normal brain emulsion into rabbits, with special reference to the aetiology of the paralytic accidents of antirabic treatment. *J Hyg*. 1932; 32: 33-44.

-Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlén C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2001; 194: 669-676.

-Jablonski N, Chaplin G. Human skin pigmentation, migration and disease susceptibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2012;367(1590):785-792.

- Jakovcevski I, Mo Z, Zecevic N. Down-regulation of the axonal polysialic acid–neural cell adhesion molecule expression coincides with the onset of myelination in the human fetal forebrain. *Neuroscience*. 2007;149(2):328-337.
- Jeffery, N. D., Blakemore, W. F. Remyelination of mouse spinal cord axons demyelinated by local injection of lysolecithin. *J. Neurocytol.* 1995; 24: 775-781.
- Ji Q, Goverman J. Experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by CD8+ T cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1103: 157-166.
- Jiang H, Zhang SI, Pernis B. Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science*. 1992; 256: 1213-1215.
- Jin YP, de Pedro-Cuesta J, Soderstrom M. Seasonal patterns in optic neuritis and multiple sclerosis: A meta-analysis. *J.Neurol.Sci.* 2000; 181: 56-64.
- Jurevics H, Hostettler J, Muse ED, Sammond DW, Matsushima GK, Toews AD, Morell P. Cerebroside synthesis as a measure of the rate of remyelination following cuprizone-induced demyelination in brain. *J Neurochem.* 2001; 77: 1067-76.
- Kaufman M, Gaydos CA, Sriram S et al. Is *Chlamydia pneumoniae* found in spinal fluid samples from multiple sclerosis patients? Conflicting results. *Multiple sclerosis*. 2002; 8: 289-294.
- Keough M, Jensen S, Yong V. Experimental Demyelination and Remyelination of Murine Spinal Cord by Focal Injection of Lysolecithin. *Journal of Visualized Experiments*. 2015;(97).
- Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res.* 2005; 81: 302-13.
- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006; 177: 566-573.
- Koritschoner RS, Schweinburg F. Induktion von Paralyse und Rückenmarksentzündung durch Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem Rückenmarksgewebe. *Z Immunitätsf Exp Therapie.* 1925; 42: 217-283.
- Kotter MR, Setzu A, Sim FJ, Van Rooijen N, Franklin RJ. Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination. *Glia.* 2001; 35: 204-12.

- Koutsoudaki PN, Skripuletz T, Gudi V, Moharregg-Khiabani D, Hildebrandt H, Trebst C, Stangel M. Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model. *Neurosci Lett*. 2009; 451: 83-8.
- Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1975;51: 110-136; 137-157.
- Kurtzke JF. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 1993;6: 382-427.
- Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001; 7: 115–21.
- Lauer K, Firnhaber W. Multiple sclerosis in Europe: An epidemiological update. Leuchturn-Verlag/LTV Press, Darmstadt. 1994.
- Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today*. 1995; 16: 34-38.
- Lindner M, Heine S, Haastert K, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, Grothe C, Baumgärtner W, Stangel M. Sequential myelin protein expression during remyelination reveals fast and efficient repair after central nervous system demyelination. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2008; 34:105-14.
- Lucchinetti C, Brock W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology*. 2000;47(6):707-717.
- Martyn CN, Cruddas M, Compston DAS. Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis. *J. Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. 1993; 56: 167-168.
- Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK. Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci*. 2001; 21: 7046-52.
- Mason JL, Toews A, Hostettler JD, Morell P, Suzuki K, Goldman JE, Matsushima GK. Oligodendrocytes and progenitors become progressively depleted within chronically demyelinated lesions. *Am J Pathol*. 2004; 164: 1673-82.
- Matsushima GK, Morell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol*. 2001; 11: 107-16.

- Matute C, Pérez-Cerdá F. Multiple sclerosis: novel perspectives on newly forming lesions. *Trends in Neurosciences*. 2005;28(4):173-175.
- Mei F, Fancy S, Shen Y, Niu J, Zhao C, Presley B et al. Micropillar arrays as a high-throughput screening platform for therapeutics in multiple sclerosis. *Nature Medicine*. 2014;20(8):954-960.
- Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol*. 1998; 92: 38-49.
- Mierzwa AJ, Zhou YX, Hibbits N, Vana AC, Armstrong RC. FGF2 and FGFR1 signaling regulate functional recovery following cuprizone demyelination. *Neurosci Lett*. 2013; 548: 280-5.
- Morell P, Barrett CV, Mason JL, Toews AD, Hostettler JD, Knapp GW, Matsushima GK. Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Mol Cell Neurosci*. 1998; 12: 220-7.
- Norkute A, Acs P, Kipp M, Johann S, Clarner T, Braun A et al. 17 $\beta$ -estradiol and progesterone prevent cuprizone provoked demyelination of corpus callosum in male mice. *Glia*. 2009;57(8):807-814.
- Nylander A, Hafler D. Multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(4):1180-1188.
- Oksenberg J, Panzara M, Begovich A, Mitchell D, Erlich H, Murray R et al. Selection for T-cell receptor V $\beta$ -D $\beta$ -J $\beta$  gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. *Nature*. 1993;362(6415):68-70.
- Olitsky PK, Yager RH. Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice. *J Exp Med*. 1949; 90: 213-223.
- Palumbo S, Toscano CD, Parente L, Weigert R, Bosetti F. Time-dependent changes in the brain arachidonic acid cascade during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2011; 85: 29-35.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005; 6: 1133-1141.
- Paterson PY. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J exp Med*. 1960; 111: 119-136.

- Powers B, Sellers D, Lovelett E, Cheung W, Aalami S, Zapertov N et al. Remyelination reporter reveals prolonged refinement of spontaneously regenerated myelin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(10):4075-4080.
- Prins M, Schul E, Geurts J, van der Valk P, Drukarch B, van Dam A. Pathological differences between white and grey matter multiple sclerosis lesions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015;1351(1):99-113.
- Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med*. 1933; 58: 39-53.
- Roach E. Is Multiple Sclerosis an Autoimmune Disorder?. *Archives of Neurology*. 2004;61(10):1615.
- Robertson NP, Compston DAS. Surveying multiple sclerosis in the United Kingdom. *J. Neurology* 1995; 58:2-6.
- Rosato Siri MV, Badaracco ME, Pasquini JM. Glatiramer promotes oligodendroglial cell maturation in a cuprizone-induced demyelination model. *Neurochem Int*. 2013; 63:, 10-24.
- Schlitt B, Felrice M, Jelachich M, Lipton H. Apoptotic Cells, Including Macrophages, Are Prominent in Theiler's Virus-Induced Inflammatory, Demyelinating Lesions. *Journal of Virology*. 2003;77(7):4383-4388.
- Schluesener HJ, Wekerle H. Autoaggressive T lymphocyte lines recognizing the encephalitogenic region of myelin basic protein: in vitro selection from unprimed rat T lymphocyte populations. *J Immunol*. 1985; 135: 3128-3133.
- Shevach EM. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med*. 2001; 193: F41-46.
- Sibley WA, Bamford CR, Clark K, Smith MS, Laguna JF. A prospective study of physical trauma and multiple sclerosis. *J. Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. 1991; 54: 584-589.
- Sibley WA, Bamford CR, Clark K. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet*. 1985;i: 1313-1315.
- Simard AR, Rivest S. Neuroprotective effects of resident microglia following acute brain injury. *J Comp Neurol*. 2007; 504: 716-29.

- Siva A, Radhakrishnan K, Kurland LT, O'Brien PC, Swanson JW, Rodriguez M. Trauma and multiple sclerosis: A population based cohort study from Olmsted County, Minnesota. *Neurology*. 1993; 43: 1878-1882.
- Skrípuletz T, Bussmann JH, Gudi V, Koutsoudaki PN, Pul R, Moharreg-Khiabani D, Lindner M, Stangel M. Cerebellar cortical demyelination in the murine cuprizone model. *Brain Pathol*. 2010; 20: 301-12.
- Skrípuletz T1, Lindner M, Kotsiari A, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, Trebst C, Stangel M. Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *Am J Pathol*. 2008; 172: 1053-61.
- Smith, K. J., Blakemore, W. F., McDonald, W. I. Central remyelination restores secure conduction. *Nature*. 1979; 280: 395-396.
- Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 683-747.
- Sriram S, Stratton CW, Yao S, et al. Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. 1999. *Annals of Neurology*; 46: 6-14.
- Srivastava R, Aslam M, Kalluri S, Schirmer L, Buck D, Tackenberg B et al. Potassium Channel KIR4.1 as an Immune Target in Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2012;367(2):115-123.
- Staples J, Ponsonby AL, Lim L. Low maternal exposure to ultraviolet radiation in pregnancy, month of birth, and risk of multiple sclerosis in offspring: longitudinal analysis. *BMJ*. 2010;340:1640.
- Steelman AJ, Thompson JP, Li J. Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication. *Neurosci Res*. 2012; 72: 32-42.
- Steelman AJ1, Thompson JP, Li J. Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication. *Neurosci Res*. 2012; 72: 32-42.
- Stidworthy MF, Genoud S, Suter U, Mantei N, Franklin RJ. Quantifying the early stages of remyelination following cuprizone-induced demyelination. *Brain Pathol*. 2003; 13: 329-39.
- Stuart G, Krikorian KS. The neuromyolytic accidents of antirabies treatment. *Ann Trop*

Med Parasitol. 1928; 22: 327-377.

-Sturrock, R. R. Myelination of the mouse corpus callosum. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1980; 6: 415-420.

-Swanborg RH. Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995; 77: 4-13.

-Terayama R, Bando Y, Jiang Y, Mitrovic B, Yoshida S. Differential expression of protease M/neurosin in oligodendrocytes and their progenitors in an animal model of multiple sclerosis. *Neuroscience Letters.* 2005; 382: 82-87.

-Traugott U, Reinherz EL, Raine CS. Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia positive macrophages in lesions of different ages. *J Neuroimmunol.* 1983; 4: 201-221.

-Turrin NP, Rivest S. Tumor necrosis factor alpha but not interleukin 1 beta mediates neuroprotection in response to acute nitric oxide excitotoxicity. *J Neurosci.* 2006; 26: 143-51.

-Voss EV, Škuljec J, Gudi V, Skripuletz T, Pul R, Trebst C, Stangel M. Characterisation of microglia during de- and remyelination: can they create a repair promoting environment? *Neurobiol Dis.* 2012; 45: 519-28.

-Walker DG, Lue LF. Investigations with cultured human microglia on pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *J Neurosci Res.* 2005; 81: 412-25.

-Weiner H. Multiple Sclerosis Is an Inflammatory T-Cell-Mediated Autoimmune Disease. *Archives of Neurology.* 2004;61(10):1613.

-Willer C. Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study. *BMJ.* 2005;330(7483):120-0.

-Williams A, Piaton G, Lubetzki C. Astrocytes-Friends or foes in multiple sclerosis?. *Glia.* 2007;55(13):1300-1312.

-Woodruff, R. H., Franklin, R. J. Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: a comparative study. *Glia.* 1999; 25: 216-228.

- Wu QZ, Yang Q, Cate HS, Kemper D, Binder M, Wang HX, Fang K, Quick MJ, Marriott M, Kilpatrick TJ, Egan GF. MRI identification of the rostral-caudal pattern of pathology within the corpus callosum in the cuprizone mouse model. *J Magn Reson Imaging*. 2008; 27: 446-53.
- Young K, Psachoulia K, Tripathi R, Dunn S, Cossell L, Attwell D et al. Oligodendrocyte Dynamics in the Healthy Adult CNS: Evidence for Myelin Remodeling. *Neuron*. 2013;77(5):873-885.
- Zhang J. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*. 1994;179(3):973-984.
- Zipp F, Weil JG, Einhaupl KM. No increase in demyelinating diseases after hepatitis B vaccination. *Nature Medicine*. 1999; 5: 964-965

## 8. ANEXO

Tabla 2. Resumen de los modelos experimentales de la EM.

<b>Modelos de EM</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Células implicadas</b>	<b>Valor del estudio</b>
EAE con patrón RR en ratón SJL/J	Inmunización con PLP	Estudio de la neuroinflamación y activación del sistema inmune	CD8, CD4, Th17, monocitos, macrófagos, células B, células de Tregg	EMRR, estudio de la tasa de recaída, testar fármacos noveles
EAE crónico en ratón C57/6J	Inmunización con MOG	Estudio de la neuroinflamación y activación del sistema inmune	CD8, CD4, Th17, monocitos, macrófagos, células B, células de Tregg	EMPP, EMSP, Testar fármacos noveles
EAE en ratones transgénicos	Clon de células T (2D2) con cadenas reactivas específicas a MOG	Estudio de la neuroinflamación y activación del sistema inmune	CD8, CD4, Th17, monocitos, macrófagos, células B, células de Tregg	Estudio in vitro de la activación y función de células autoinmunes
TMEV	Infección con un picornavirus, en concreto el TMEV	Estudio del daño axonal y desmielinización inducida por inflamación	Macrófagos, microglía, oligodendrocitos, astrocitos, CD4, CD8	Ensayos clínicos diseñados para regresar la desmielinización o para acelerar la mielinización
Cuprizona	Alimentando a ratones C57BL/6 con 0,2% de cuprizona durante 6 semanas	Estudio de los procesos de desmielinización y remielinización	Oligodendrocitos, astrocitos, microglía	Ensayos clínicos diseñados para regresar la desmielinización o para acelerar la mielinización
Lisolecitina	Inyección de lisolecitina en ratones SJL/J	Estudio de los procesos de desmielinización y remielinización	Oligodendrocitos, astrocitos, microglía	Ensayos clínicos diseñados para regresar la desmielinización o para acelerar la mielinización