

Influencia del sistema neuroendócrino en el desarrollo de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)

Macció, Daniela R.*; Ditamo, Yanina*; Degano, Alicia L.; Roth, German A.

Departamento de Química Biológica-CIQUIBIC (CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina.
E-mail: garoth@dqg.fcq.unc.edu.ar

* Ambos autores contribuyeron igualmente a la concreción de este trabajo.

RESUMEN: La influencia del sistema neuroendócrino sobre el curso clínico e inmunológico de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) fue estudiada en ratas machos envejecidas de 15 meses de edad donde naturalmente ocurren cambios hormonales y en animales machos jóvenes de 7 semanas de edad gonadectomizados quirúrgicamente. Se observó que la incidencia de la EAE en estos animales fue menor que la de los respectivos grupos controles, con una apreciable demora en la iniciación de los síntomas clínicos. Asimismo en estos animales castrados y envejecidos la respuesta de células T contra la proteína básica de mielina (PBM) no se limitó al periodo agudo como en los jóvenes sino que se mantuvo aún durante el periodo de recuperación, con una respuesta humoral anti-PBM de diferente tipo y especificidad. Estos resultados permiten evidenciar que modificaciones del sistema endócrino, por alteración exógena o mediante un proceso natural, pueden generar una respuesta celular y humoral diferente contra antígenos específicos de mielina que alterarían los mecanismos autoinmunes efectores y/o regulatorios en la EAE.

Palabras Claves: Encefalomiелitis, Autoinmunidad, Proteína básica de mielina.

SUMMARY: Influence of the neuroendocrine system in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Macció, Daniela R.; Ditamo, Yanina; Degano, Alicia L.; Roth, German A. The influence of the neuroendocrine system on the clinical and immunological development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was studied in aged male rats (15 month old) where hormonal changes occurred naturally and young male rats (7 weeks-old) surgically castrated. We observed that the incidence of EAE in these animals was lower than the respective controls with a delay in the onset of the clinical symptoms. In these aged and castrated animals the T cell response to myelin basic protein (MBP) was no restrained to the acute period as observed in young rats but it was also present during the recuperation period, with concomitant anti-MBP antibodies of different type and specificity. These results evidence that modifications of the endocrine system, by exogenous alterations or by a natural process, can generate a different cellular and humoral immune response against specific myelin antigens that could lead to alterations of the effector or regulatory mechanisms in EAE.

Key Words: Encephalomyelitis, Autoimmunity, Myelin basic protein.

Introducción

La Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es una enfermedad autoinmune desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) ampliamente utilizada como modelo de enfermedades desmielinizantes humanas como la esclerosis múltiple (EM). La EAE puede ser inducida de una manera activa en animales genéticamente susceptibles mediante una única inyección intradérmica de antígenos de mielina emulsificados en un adyuvante adecuado o en forma pasiva por transferencia de linfocitos T

Correspondencia a:

Dr. German A. Roth, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Córdoba 5000, Argentina.

Teléfonos: 54-351-4334168; Fax: 54-351-4334074

e-mail: garoth@dqg.fcq.unc.edu.ar

Nota:

Versión preliminar de este trabajo fueron presentadas en la 17ª Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Neuroquímica (Los Cocos, Córdoba 23-25 Octubre 2002) y en la 50ª Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología y 47ª Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (Mar del Plata 20-23 Noviembre 2002).

sensibilizados provenientes de ratas singénicas con EAE (1). La inducción de las manifestaciones clínicas de la EAE es un fenómeno muy complejo, y si bien no se ha dilucidado completamente el mecanismo por el cual se produce, es conocido que involucra una reacción inmune celular contra determinantes antigénicos del SNC, principalmente contra la proteína básica de mielina (PBM) (2). Previamente en nuestro grupo de trabajo hemos caracterizado la EAE en ratas Wistar inducida con mielina total en adyuvante de Freund completo (AFC). La fase aguda de la enfermedad en estos animales comienza a los 12-14 días post-inoculación (dpi) y se caracteriza clínicamente por pérdida de peso corporal, incontinencia y parálisis de las patas traseras, de los cuales se recuperan espontáneamente en 2-4 días (3). El análisis bioquímico e histopatológico del SNC durante diferentes estadios de la EAE demostró alteraciones en el contenido de glicoesfingolípidos, colesterol esterificado, PBM y de la enzima específica de mielina 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfohidrolasa (CNPasa) dependiendo del tiempo post-inoculación pero no siempre asociadas a la presencia de los síntomas neurológicos (3-6).

Por otro lado, durante los últimos años se ha observado una íntima y compleja comunicación bidireccional entre los sistemas nervioso, endócrino e inmunológico, en la cual los tres sistemas se afectan mutuamente, de tal forma que una acción sobre uno de ellos provoca reacciones en los otros dos (7). Al respecto, evidencias tanto clínicas como experimentales indican que los esteroides gonadales regulan la función inmune. Esta hipótesis está basada principalmente en el dimorfismo sexual observado en la respuesta inmune y la alteración de esta respuesta inmune por gonadectomía, administración exógena de hormonas esteroides sexuales y durante el embarazo (8,9). Las bases moleculares para esta interacción bidireccional son provistas por un gran número de moléculas regulatorias como hormonas, citocinas y neuropéptidos que son expresadas en los sistemas inmune y neuroendócrino (9,10). Asimismo, se han descrito diferencias entre el sistema inmune de individuos jóvenes y el de los envejecidos, encontrándose cambios en la mayoría de sus

componentes lo que contribuiría a una mayor morbilidad y mortalidad. Sin embargo, el proceso de involución que ocurre durante el envejecimiento no es irreversible, habiéndose propuesto distintas formas de recuperación de la función inmunológica normal mediante cambios del entorno neuroendócrino (11,12).

Teniendo en cuenta que una regulación diferencial del sistema neuroendócrino puede llevar a un cambio en el tipo de respuesta inmune que se generará, cambios en algunos parámetros hormonales podrían afectar el control de la reactividad inmunológica durante la EAE. Al respecto se ha observado que hembras de ratones SJL son más susceptibles que los machos (13) y que el tratamiento de estas hembras de ratones SJL con andrógenos reduce la incidencia y severidad de la EAE (14). Asimismo la castración de los ratones machos SJL altera el curso clínico de la EAE de monofásica a un tipo recurrente (13). Sin embargo otros estudios en ratas machos Lewis demuestran que la presencia o ausencia de testículos aparentemente no induce diferencias en el curso crónico de la enfermedad (15), pero en hámsters siberianos las hormonas esteroides sexuales aumentan la inmunidad tanto en machos como en hembras (16). Por otro parte también han sido observadas diferencias en el desarrollo de la EAE asociadas a la edad que demuestran la existencia de una ventana de susceptibilidad en esta enfermedad experimental que se asemeja a la expresión de la EM (17,18). Al respecto, factores hormonales, diferencias en la inducción de tolerancia a células T anti-PBM y cambios en el desarrollo del SNC podrían tener relevancia para explicar estas observaciones (13,18).

Considerando la influencia del entorno endócrino sobre el desarrollo de la EAE, en el presente estudio analizamos la progresión de la enfermedad, la inmunidad mediada por células y la especificidad de los anticuerpos anti-PBM en ratas Wistar que presentan alteraciones endócrinas inducidas por gonadectomización quirúrgica bilateral de ratas machos jóvenes comparativamente con ratas machos envejecidas donde naturalmente ocurren cambios hormonales.

Materiales y Métodos

Protocolo experimental

Se usaron machos de una cepa de ratas Wistar criada en nuestro laboratorio por 35 años. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándares de luz y temperatura y tratados de acuerdo a las regulaciones del N.I.H. (USA). El Comité para el Uso y Cuidado de Animales de la Facultad de Ciencias Químicas aprobó todos los procedimientos experimentales utilizados (Exp. No. 15-99-40426). La enfermedad fue inducida en forma activa en animales envejecidos (15 meses de edad) y en animales jóvenes (7 semanas de edad) intactos, con gonadectomización bilateral y con castración simulada. Para realizar la castración, ratas machos de 25 días de edad fueron anestesiadas intraperitonealmente con tiopental sódico (50 mg/kg). En condiciones asépticas se realizó una pequeña incisión de aproximadamente 2 cm en el septum escrotal y los cordones espermáticos fueron disecados, atados y cortados. Los testículos fueron cuidadosamente removidos y la incisión fue suturada. En animales controles con operaciones simuladas, la incisión escrotal fue inmediatamente suturada sin manipulación del sistema gonadal. Cuando los animales se recuperaron de la anestesia fueron vueltos a sus cajas y veinte días después de la castración se les indujo la EAE.

El efecto de la manipulación hormonal se analizó midiendo los niveles de testosterona sérica por radioinmunoensayo (RIA) usando un kit comercial (Diagnostic Products Corp., USA). Como se esperaba, después de la castración se observó una disminución significativa de la producción de testosterona, ya que el nivel de esta hormona en los animales castrados fue menor a 0,2 ng/ml, lo cual representa un 10 % de los niveles séricos de los animales intactos ó con operación simulada, siendo similar a los valores presentes en hembras. Por otro lado, considerando que cambios en los niveles de testosterona inducen alteraciones en las diferentes estructuras gonadales (19), se analizó el peso de las vesículas seminales como indicación de la manipulación gonadal. Los resultados obtenidos muestran una notable reducción del peso de las vesículas seminales en el grupo castrado (< 10 % de los valores normales). Por lo tanto, la disminución de testosterona sérica y la reducción en el peso de las vesículas seminales son evidencias con-

cretas que la castración quirúrgica fue una forma eficiente de alterar el sistema endócrino de estas ratas machos. Las ratas machos envejecidas de 15 meses de edad usadas en este trabajo presentaron niveles de testosterona sérica de aproximadamente 40% los valores detectados en ratas jóvenes ($1,06 \pm 0,24$ ng/ml vs. $2,41 \pm 0,56$ ng/ml).

Inducción de la EAE

Para inducir la respuesta inmune contra componentes de mielina, ratas machos jóvenes de 45 días de edad (J) o envejecidas de 15 meses de edad (V) y ratas jóvenes castradas (C) o con castración simulada (S) fueron anestesiadas con éter etílico e inyectadas intradérmicamente en las almohadillas de grasa de ambas patas traseras con 0,5 ml de una emulsión constituida por 0,05 ml de solución de buffer fosfato salino (PBS) y 0,45 ml de AFC (Sigma-Aldrich, USA) conteniendo 8 mg de mielina bovina (grupos EAE). Los animales controles recibieron 0,5 ml de la misma emulsión sin preparación antigénica (grupos AFC). Todos los animales fueron pesados y examinados diariamente a fin de determinar la aparición de los síntomas clínicos de la enfermedad y el grado de severidad de los mismos. Los síntomas clínicos fueron graduados de 1-4 usando la siguiente escala: 0, animales aparentemente normales, sin expresión clínica de la enfermedad; 1, flacidez de la cola y dificultad para recuperar la posición normal; 2, ataxia moderada en extremidades posteriores; 3, parálisis completa de las extremidades posteriores acompañada de incontinencia urinaria; 4, cuadriplegia severa, estado moribundo o muerte. Los animales fueron sacrificados a los 14 días post-inoculación (dpi) cuando los animales jóvenes del grupo EAE muestran los máximos síntomas clínicos de la enfermedad (período agudo) y cuando se encuentran totalmente recuperados (35 dpi). Primeramente, las ratas se sangraron por punción cardíaca, el suero fue separado e inmediatamente guardado a -20°C para luego realizar las determinaciones inmunológicas. Los nódulos linfáticos inguinales y poplíteos se removieron asépticamente para la determinación de la respuesta inmune celular *in vitro*.

Respuesta inmune celular

Para realizar los ensayos de proliferación, los nódulos linfáticos disecados se disgregaron pasán-

dolos por una malla metálica de 60-mesh y se lavaron con PBS Dulbecco. Se obtuvieron las células mononucleares (CMN) que fueron cultivadas por triplicado en placas de 96 reservorios planos. Para ello 3×10^6 células/ml fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 suplementado con buffer Hepes 12 mM, gentamicina 50 $\mu\text{g/ml}$, 2-mercaptoetanol 0,05 mM, glutamina 2 mM y 1 % de suero autólogo. La estimulación *in vitro* fue realizada en reservorios separados con 25-150 $\mu\text{g/ml}$ de PBM bovina (estimulación antigénica específica), 1 $\mu\text{g/ml}$ de Concanavalina A como control de estimulación positiva o con medio solo como control negativo. Las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada de 5 % CO_2 . Después de 72 h de cultivo, cada reservorio fue pulsado con 20 μl de medio conteniendo 1 μCi de [Metil- ^3H] Timidina (NEN Life Science Products, USA). Después de 18 h las células fueron cosechadas usando filtros de fibra de vidrio y la incorporación de radioactividad contada usando una técnica estándar de centelleo líquido. La respuesta proliferativa fue expresada como índice de estimulación (IE) calculado para cada animal como el promedio de las cuentas por minuto (cpm) del cultivo estimulado dividido el promedio de cpm del cultivo no estimulado, considerando un IE > 2,0 como positivo basado en nuestra experiencia previa (6).

Respuesta inmune humoral

Los anticuerpos anti-PBM fueron analizados por ELISA. Para ello placas de plástico de 96 reservorios planos fueron incubadas toda la noche a 4°C con 100 μl por reservorio de una solución de PBM 10 $\mu\text{g/ml}$ en buffer carbonato 0,05 M, pH 9,6. Luego las placas fueron lavadas con PBS y bloqueadas con PBS conteniendo 2 % de leche descremada en polvo (Nestlé, Argentina) por 2 h a 37°C. Después de 3 lavados con PBS-0,05 % Tween 20 (PBS-TW), se agregaron 50 μl de las muestras de suero diluidas y se incubaron 1 h a 37°C. Cada muestra fue analizada a 6 diferentes diluciones (1/10 a 1/204.800) dependiendo del anticuerpo analizado. Después de 4 lavados con PBS-TW, las placas fueron incubadas por 1 h a 37°C con un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de rata conjugado a peroxidasa de rabanito picante (Sigma-Aldrich, USA). La reacción de color se desarrolló con o-

fenilendiamina 15 mM y peróxido de hidrógeno 0,015 % en buffer fosfato-citrato pH 5,0. La reacción fue detenida después de 15 min. por adición de 100 μl de H_2SO_4 0,5 N y el color analizado con un lector de microplacas Titertek Multiscan a 490 nm. Para detectar los subtipos de IgG (IgG1, IgG2a e IgG2b) las placas fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos monoclonales apropiadamente diluidos. Las placas fueron luego incubadas con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa, excepto para el análisis de IgG1 donde se usó un anticuerpo anti-IgM de ratón conjugado a peroxidasa, desarrollándose la reacción como se indicó previamente. Los sueros fueron positivos para el anticuerpo cuando tuvieron una absorbancia mayor a 2 errores estándares (ES) sobre los valores del control negativo. El título fue determinado como la última dilución que dio un valor de absorbancia sobre el promedio del suero control más 2 ES a la misma dilución.

La especificidad de los anticuerpos contra péptidos de PBM (p1-43, p44-95, p96-128, y p129-168) fue determinada por un ensayo semicuantitativo usando un aparato de microfiltración Bio-Dot (Bio-Rad Laboratories, USA). Los péptidos preparados por clivaje de PBM de conejo con pepsina porcina y trombina humana, y purificados como se indicó previamente (20) fueron provistos por la Dra. C.G. Monferran (Córdoba, Argentina). Brevemente, se filtraron por gravedad 50 μl por reservorio de cada solución de péptido de PBM en agua destilada a través de una membrana de nitrocelulosa pre-hidratada (0,2 μm de tamaño de poro). Las membranas fueron luego removidas del aparato y bloqueadas por 2 h a 37°C con 3% de leche descremada en polvo en PBS y lavadas 2 veces con PBS. Las tiras de nitrocelulosa con los diferentes péptidos fueron incubadas por separado toda la noche con el suero de cada animal diluido 1:10. Después de lavar con PBS, las membranas fueron incubadas con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa. Después se desarrolló el color usando 0,05 % de 4-cloro-1-naftol y 0,01 % de peróxido de hidrógeno, las tiras se secaron y se analizaron en un densitómetro de barrido Duoscan T1200 (Agfa, Canadá), y los valores de densidad óptica se determinaron usando el programa Scion Image (Scion Corp., USA).

Resultados

Desarrollo clínico de la EAE

Previamente habíamos descrito que ratas Wistar desarrollan la forma monofásica de la EAE, con un estadio agudo sintomático del cual se recuperan espontáneamente en 2-3 días (3,4). El efecto de los cambios hormonales en ratas machos Wistar sobre el desarrollo de la EAE fue estudiado inmunizando ratas jóvenes castradas (C/EAE) y envejecidas (V/EAE) con mielina bovina en AFC, comparativamente con ratas jóvenes intactas (J/EAE) y con castración simulada (S/EAE). Como se observa en la Tabla 1, 78,3 % de los animales J/EAE y 75,0 % de los animales S/EAE desarrollaron los signos clínicos característicos de la enfermedad. Durante la fase aguda (12-14 dpi) estos animales mostraron los más severos síntomas de parálisis, incontinencia y una disminución del 10-15% de su peso corporal (Fig. 1 y 2). Luego los animales comenzaron a recuperarse gradualmente, volviendo a caminar a los 16-17 dpi. A los 35 dpi los animales de los grupos J/EAE y S/EAE mostraron un estado aparentemente normal, clínicamente indistinguible de los controles J/AFC. La incidencia de la enfermedad en los animales C/EAE (50%) fue relativamente menor que la de sus respectivos controles con castración simulada (S/EAE), mientras que las ratas envejecidas (V/EAE) presentan una incidencia de solo 14,5 %. Aunque la severidad máxima de los síntomas clínicos alcanzado por los animales que se enfermaron fue similar en todos los grupos analizados, tanto animales castrados como envejecidos mostraron una apreciable demora en la iniciación de los síntomas clínicos (Fig. 1, Tabla 1). Asimismo se observó una fase aguda más prolongada en los animales C/EAE los cuales no se recuperaron de la parálisis hasta los 26-27 dpi. Adicionalmente, tanto los animales C/EAE como los V/EAE mostraron un gradual y constante deterioro visualizado por la disminución del peso corporal con respecto a sus respectivos controles todavía significativa aún a los 35 dpi (Fig. 2). Asimismo, los animales envejecidos mostraron aún a 35 dpi una disminución en SNC de los niveles de la enzima CNPasa y de sulfátidos que no se observa en las ratas jóvenes (datos no mostrados), indicadores de un desarrollo subclínico de la enfermedad (6).

Inmunidad mediada por células

Se estudió la respuesta proliferativa de CMN provenientes de animales sacrificados a los 14 dpi, cuando los animales del grupo J/EAE y S/EAE mostraban los máximos síntomas clínicos, y a los 35 dpi representando la total recuperación clínica de estos animales. Las CMN provenientes de los diferentes grupos analizados mostraron un índice de proliferación similar en respuesta PBM a 14 dpi. Sin embargo a 35 dpi, las CMN de animales C/EAE y V/EAE mostraron un IE positivo en respuesta a PBM, mientras que esta proliferación no se observó en animales pertenecientes a los grupos J/EAE y S/EAE (Fig. 3). Las CMN de todos los grupos, tanto a 14 como a 35 dpi mostraron un IE positivo después de la estimulación con el mitógeno Concanavalina A (datos no mostrados).

Inmunidad humoral

Diferentes estudios han demostrado un rol de células B y anticuerpos en la inducción e inmunoregulación de la EAE (21). Por ello, a fin de entender mejor la influencia de las hormonas gonadales sobre la respuesta inmune asociada a la EAE, también caracterizamos la respuesta humoral contra PBM en los diferentes grupos de animales. Primeramente medimos la respuesta humoral total contra PBM (Tabla 2). Todos los sueros de los animales inyectados con AFC fueron negativos para anticuerpos anti-PBM (datos no mostrados), mientras que todos los animales con EAE a 14 dpi mostraron la presencia de anticuerpos anti-PBM. A 35 dpi estos títulos se vieron incrementados en todos los grupos.

Se examinó posteriormente la posibilidad que un isotipo de anticuerpos IgG anti-PBM influyera el curso clínico de la EAE. Los animales S/EAE y J/EAE mostraron principalmente anticuerpos del subtipo IgG2b a 14 dpi, los cuales disminuían a 35 dpi con un concomitante aumento del subtipo IgG1, mientras que en los grupos C/EAE y V/EAE la proporción relativa de estos subtipos no variaba. La evaluación de la relación de anticuerpos anti-PBM IgG2b/IgG1 a 35 dpi mostró un valor mayor en animales C/EAE (36,0) y V/EAE (102,5) comparada con la relación observada en controles S/EAE (4,8) y J/EAE (7,9).

Finalmente a fin de definir la especificidad de los anticuerpos anti-PBM asociados con la EAE, los sueros de los animales fueron analizados para de-

tectar la presencia de anticuerpos contra diversos péptidos de PBM (p1-43, p44-95, p96-128, p129-168). La Fig. 4 muestra que los anticuerpos anti-PBM en ratas S/EAE y J/EAE a 14 dpi están dirigidos principalmente contra el péptido p96-128, mientras que en este punto los animales C/EAE y V/EAE no mostraron esta predominancia. El análisis de estos anticuerpos a 35 dpi indica que habría una acumulación de epitopes reconocidos por las células B durante el curso de la enfermedad, ya que la reactividad de anticuerpos anti-PBM en todos los grupos se amplió a todos los péptidos analizados.

Discusión

Aunque no es completamente claro como los esteroides gonadales influyen al sistema neuroinmune, se ha sugerido un rol de los andrógenos en mantener la modulación inmune (22). Estudios previos indican una relación entre el balance de hormonas sexuales en ratas y la respuesta inmune, donde la testosterona tendría un efecto inmunosupresor (23), mientras que estrógenos promoverían las enfermedades autoinmunes (24). Nuestros resultados muestran que modificaciones del sistema endócrino por castración quirúrgica de animales machos Wistar o que ocurren naturalmente durante el envejecimiento inducen disminución de la incidencia de la EAE como así también cambios en la iniciación y duración del período agudo de los animales que se enfermaron. Por ello, a fin de analizar si este diferente curso clínico de la enfermedad está asociado a una determinada respuesta inmune, se caracterizó tanto la respuesta inmunológica celular como humoral contra la PBM. Al respecto, los resultados obtenidos sugieren que los cambios en los niveles de las hormonas sexuales no alteran la diferenciación y expansión de las células específicas anti-PBM. Sin embargo, tanto los animales C/EAE y V/EAE pero no los S/EAE y J/EAE presentaron reacción de linfocitos T contra PBM aún a 35 dpi, indicando que las diferencias en el sistema endócrino inducirían una inmunidad mediada por células de más largo alcance. La alteración de los mecanismos de regulación inmunológica que origina esta respuesta inmune prolongada correlaciona con la presencia de algunos síntomas

clínicos y bioquímicos observados aún a 35 dpi en las ratas castradas o envejecidas.

Otra correlación importante también se puede hacer entre los anticuerpos anti-PBM y el desarrollo de la enfermedad. Para ello se estudió la distribución de subclases de IgG y especificidad de los anticuerpos anti-PBM en los diferentes grupos de animales con EAE. En este sentido, la secreción de Igs del tipo IgG2b ha sido asociada en ratas con una respuesta inmunológica celular del tipo Th1, caracterizada por la secreción de citocinas proinflamatorias (25, 26). En cambio el isotipo IgG1 ha sido asociado con una respuesta Th2 (25, 27). Varios autores han demostrado que las citocinas Th1 están aumentadas durante el desarrollo de la EAE, mientras que un cambio hacia una respuesta Th2 ha sido asociado con la remisión espontánea de la enfermedad (28, 29). La distribución de las subclases de IgG aquí presentada muestra una relación IgG2b/IgG1 a 14 dpi alta en ratas de los grupos S/EAE y J/EAE, indicación de una mayor respuesta Th1, y que luego decae a valores casi nulos cuando estos animales a 35 dpi se encuentran totalmente recuperados. En cambio los animales V/EAE y C/EAE presentan una relación IgG2b/IgG1 similar a 14 dpi y 35 dpi, indicando una respuesta inmune constante asociada con una actividad Th1 en estos animales que no están aún totalmente recuperados a 35 dpi.

Por otro lado, en este estudio también observamos que durante el estadio agudo los animales C/EAE y V/EAE muestran anticuerpos con reactividad contra los epitopes p1-43, p44-95 y p96-128 de PBM, en contraste de las ratas S/EAE y J/EAE que presentan solo anticuerpos contra un epítopo dominante (p96-128). El análisis de la especificidad de los anticuerpos anti-PBM indica que habría una acumulación de epitopes reconocidos por las células B durante el curso de la enfermedad, ya que la reactividad de anticuerpos anti-PBM en todos los grupos a 35 dpi se amplió a todos los péptidos analizados. Aunque muchos trabajos se han enfocado en los determinantes encefalitogénicos observados en células T, varias evidencias indican un posible rol de reactividad de anticuerpos contra diferentes epitopes de PBM en el desarrollo de la patología. En nuestra cepa de ratas la predominancia de anticuerpos anti-péptido 96-128 de PBM podría estar asociada con el desarrollo de los síntomas clínicos y la ampliación

de la respuesta humoral podría dar cuenta de la regulación de la enfermedad. Aunque los epitopes asociados con la enfermedad parecen ser específicos

de cada cepa de animal utilizado, un fenómeno similar fue descrito en ratas Lewis susceptibles a la EAE (30).

Tabla 1: Análisis clínico de los animales con EAE

Grupo	Incidencia	%	Día de comienzo	Severidad máxima	Duración de la enfermedad
S/EAE	12/16	75,0	11,00 ± 0,48	2,83 ± 0,16	5,66 ± 0,33
C/EAE	13/26	50,0*	14,49 ± 0,69*	2,90 ± 0,10	9,27 ± 0,77*
J/EAE	18/23	78,3	12,07 ± 0,26	2,64 ± 0,35	5,00 ± 0,39
V/EAE	7/48	14,5*	18,12 ± 0,54*	2,20 ± 0,40	4,54 ± 0,88

Ratas Wistar inyectadas con mielina bovina en AFC para inducir EAE fueron divididas en los siguientes grupos: machos jóvenes intactos (J), con castración simulada (S), castrados (C) y envejecidos (V). Los correspondientes animales controles fueron inyectados solo con AFC. *P* fue calculada por el test *t* de Student para muestras agrupadas. La probabilidad de significancia con respecto al grupo control (J/EAE y S/EAE, respectivamente) fue **P* < 0,01.

Tabla 2: Determinación de anticuerpos anti-PBM

Grupo	dpi	Anticuerpos anti-PBM			
		IgG Totales	% IgG2b (Th1)	% IgG1 (Th2)	IgG2b/IgG1 (Th1/Th2)
S/EAE	14	13.780 ± 5.981	15,60	0,15	104,0
	35	64.144 ± 6.691	7,56	1,58	4,8
C/EAE	14	7.415 ± 961	9,91	0,27	36,7
	35	141.583 ± 5.471	10,44	0,29	36,0
J/EAE	14	38.457 ± 4.560	18,94	0,19	99,7
	35	183.531 ± 21.609	9,79	1,24	7,9
V/EAE	14	27.856 ± 961	8,88	0,08	111,0
	35	58.791 ± 4.140	28,71	0,28	102,5

Figura 1: Curso clínico de la EAE observado en ratas machos jóvenes intactas (J/EAE), castradas (C/EAE), con castración simulada (S/EAE) y envejecidas (V/EAE). Cada punto representa el promedio de todas las ratas enfermas estudiadas en cada grupo (ver Tabla 1) y los respectivos errores estándares de estos promedios.

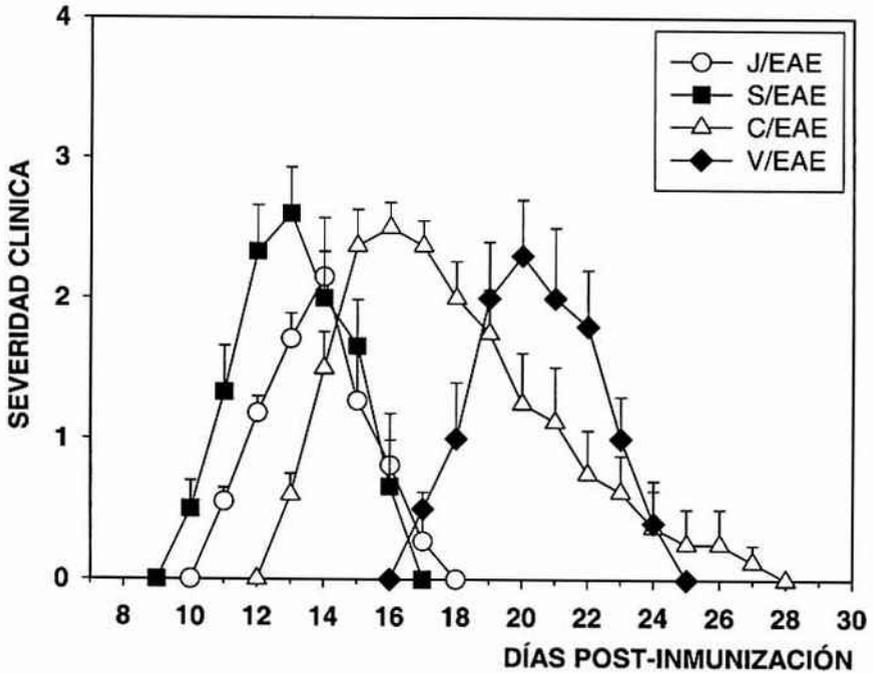


Figura 2: Comparación de la variación del peso corporal determinado como porcentaje de diferencia con respecto al día 0 de animales inyectados con adyuvante de Freund completo (AFC) o con mielina bovina/AFC (EAE) en los siguientes grupos de ratas Wistar machos: joven (J), castrados (C), con castración simulada (S) y envejecidos (V). Los resultados son el promedio de todos los animales estudiados en cada grupo como se indica en la Tabla 1.

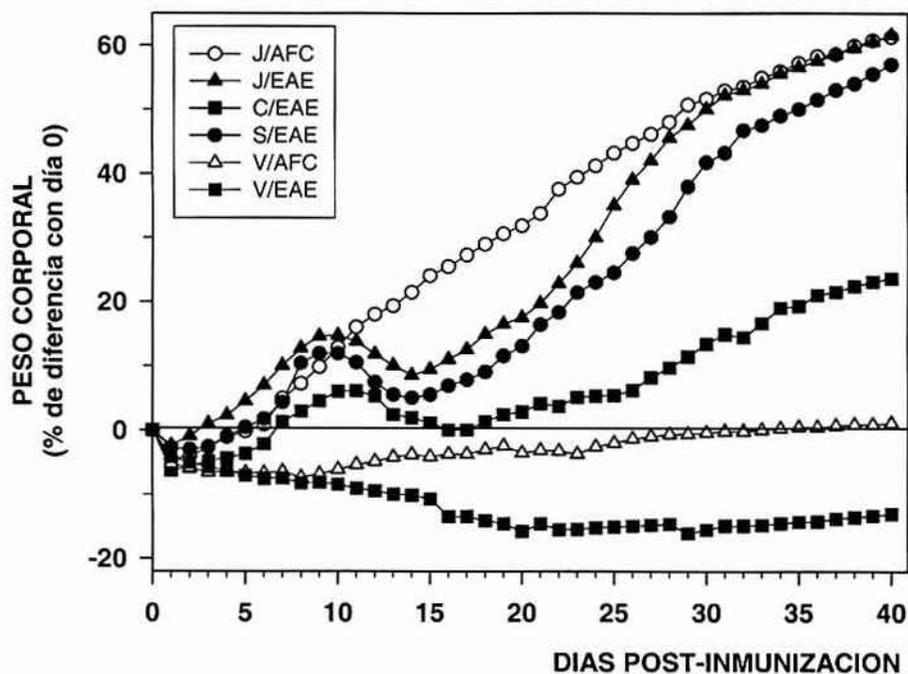


Figura 3: Respuesta inmune celular específica contra PBM a 14 y 35 dpi de CMN de nódulos linfáticos de animales con EAE jóvenes (J/EAE), castrados (C/EAE), con castración simulada (S/EAE) y envejecidos (V/EAE). El índice de estimulación (IE) se calculó como las cpm incorporadas en CMN incubadas con PBM/cpm incorporadas en CMN cultivadas con medio solamente. Cada barra representa el promedio de todos los animales con EAE estudiados en cada grupo y los respectivos errores estándares de estos promedios.

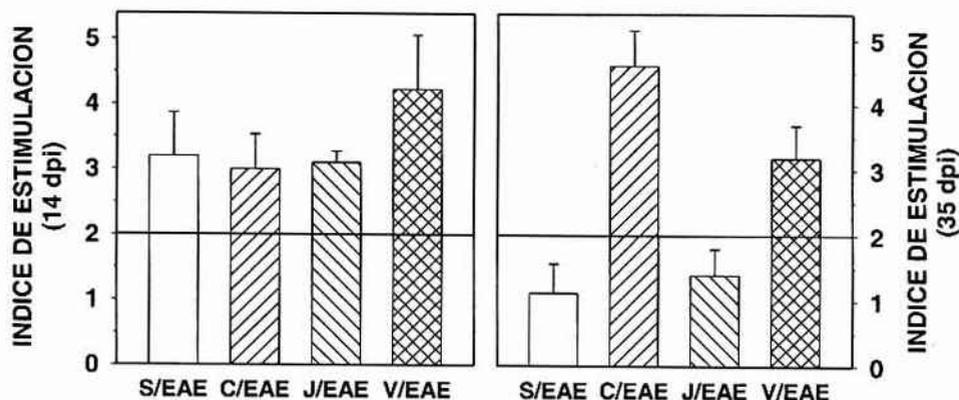
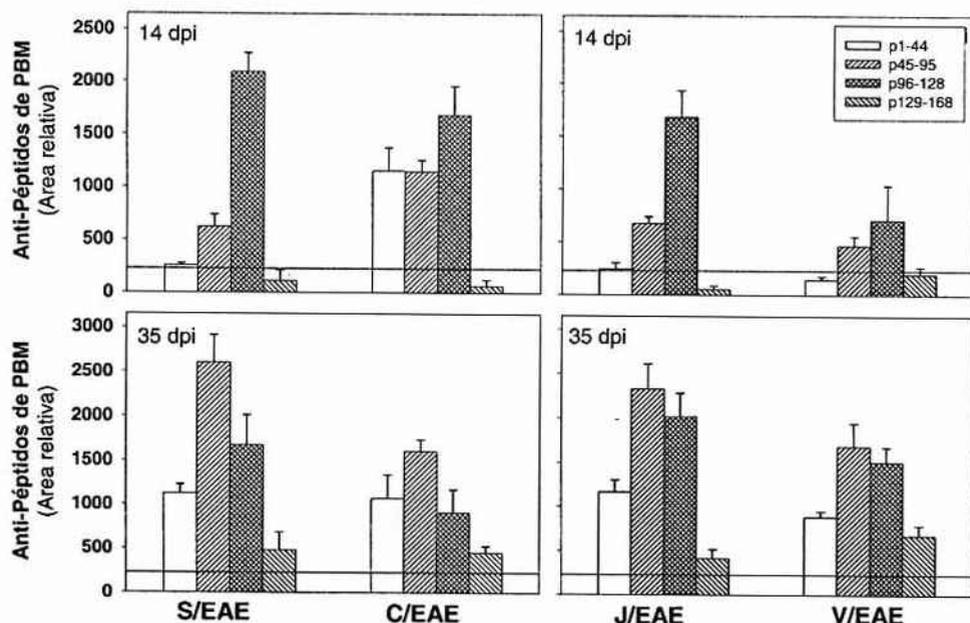


Figura 4: Respuesta inmune humoral contra diferentes péptidos de PBM: p1-43, p44-95, p96-128 y p129-168 medida a 14 dpi y 35 dpi en ratas Wistar machos jóvenes (J/EAE), castradas (C/EAE), con castración simulada (S/EAE) y envejecidas (V/EAE). Las barras representan el promedio de 7 animales estudiados en cada grupo y los respectivos errores estándares de estos promedios.



Conclusión

Tomando todo en su conjunto, las evidencias provistas en este estudio demuestran la importancia de los efectos organizacionales de una experiencia endócrina temprana sobre la respuesta inmune y por lo tanto en la regulación del desarrollo de la EAE. Considerando los bajos niveles de testosterona observados en los animales después de la castración quirúrgica como así también en los animales envejecidos, podemos interpretar de manera preliminar que la inducción de una dada respuesta inmunológica debida al desbalance en esta hormona podría ser responsable de las diferencias en el curso clínico de la enfermedad observada en estos animales, y podría en general proveer algunas claves acerca de los mecanismos que influyen la susceptibilidad de la autoinmunidad humana entre los diferentes sexos o durante el envejecimiento.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Clara G. Monferrán por proveernos de los péptidos de PBM. Este trabajo fue realizado con aportes de subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (BID 1201/OC-AR, PICT 05-04318), Agencia Córdoba Ciencia S.E., y Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC), Argentina. Y.D. es becaria de SeCyT-UNC, D.R.M. y A.L.D. becarias del CONICET; y G.A.R. es miembro de la C.I.C.yT. del CONICET.

Bibliografía

1. Paterson, P. Y. y Swanborg, R.H. 1988. Demyelinating diseases of the central and peripheral nervous system. En: Immunological Diseases. Editado por M. Samter, D.W. Talmage, M.M. Frank, K.F. Austen y H.N. Claman. Little, Brown and Company (Boston); 1877-1916.
2. Wekerle H., 1993. T-cell autoimmunity in the central nervous system. *Intervirology* **35**: 95-100.
3. Slavin, D.A.; Bucher, A.E.; Degano, A.L.; Soria, N.W. y Roth,

- G.A., 1996. Time course of biochemical and immunohistological alterations during experimental allergic encephalomyelitis. *Neurochem. Int.* **29**: 597-605.
4. Roth, G.A.; Monferrán, C.G.; Maggio, B. y Cumar, F.A., 1982. Central nervous system lipid alterations in rats with experimental allergic encephalomyelitis and its suppression by immunosuppressive drugs. *Life Sciences* **30**: 859-866.
5. Roth, G.A. y Obata, K., 1991. Experimental allergic encephalomyelitis: Dissociation of immunochemical and clinicopathological responses in two strains of rats. *Neurochem. Int.* **19**: 213-220.
6. Degano, A.L. y Roth, G.A., 2000. Passive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis in Wistar rats: dissociation of clinical symptoms and biochemical alterations. *J. Neurosci. Res.* **59**: 283-290.
7. Ader, R.; Cohen, N. y Felten, D., 1995. Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet* **345**: 99-103.
8. Homo-Delarche, F.; Fitzpatrick, F.; Christeff, N.; Núñez, E.A.; Bach, J.F. y Dardenne, M., 1991. Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **40**: 619-637.
9. Martin, J.T., 2000. Sexual dimorphism in immune function: The role of prenatal exposure to androgens and estrogens. *Eur. J. Pharmacol.* **405**: 251-261.
10. Goetzl, E.J. y Sreedharan, S.P., 1992. Mediators of communication and adaptation in the neuroendocrine and immune systems. *FASEB J.* **6**: 2646-2652.
11. Globerson, A. y Effros, R.B., 2000. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol. Today* **21**: 515-521.
12. Huseby, E.S.; Sather, B.; Huseby, P.G. y Goverman, J., 2001. Age-dependent T cell tolerance and autoimmunity to myelin basic protein. *Immunity* **14**: 471-481.
13. Bebo, B.F.; Zelinka-Vincent, E.; Adamus, G.; Amundson, D.; Vandenbark, A.A. y Offner, H., 1998. Gonadal hormones influence the immune response to PLP 139-151 and the clinical course of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **84**: 122-130.
14. Dalal, M.; Sookhyun, K. y Voskuhl, R.R., 1997. Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. *J. Immunol.* **159**: 3-6.
15. Trooster, W.J.; Teelken, A.W.; Gerrits, P.O.; Lijnema, T.H.; Loof, J.G.; Minderhoud, J.M. y otros, 1996. The effect of gonadectomy on the clinical course of chronic experimental allergic encephalomyelitis. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **98**: 222-226.
16. Bilbo, S.D. y Nelson, R.J., 2001. Sex steroid hormones enhance immune function in male and female Siberian hamsters.

- Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **280**: 207-213.
17. Endoh, M.; Rapoport, S.I., y Tabira, T., 1990. Studies of experimental allergic encephalomyelitis in old mice. *J. Neuroimmunol.* **29**: 21-31.
18. Smith, M.E.; Eller, N.L.; McFarland, H.F.; Racke, M.K. y Raine, C.S., 1999. Age dependence of clinical and pathological manifestations of autoimmune demyelination. Implications for multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* **155**: 1147-1161.
19. George, F.W.; Russell, D.W. y Wilson, J.D., 1991. Feed-forward control of prostate growth: Dihydrotestosterone induces expression of its biosynthetic enzyme, steroid 5 α -reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8044-8047.
20. López, P.H.H.; Degano, A.L.; Monferran, C.G.; Irazoqui, F.J.; Nores, G.A. y Roth, G.A., 2001. Time course of IgM antibodies which block anti-myelin basic protein IgG antibodies associated to the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in rabbits. *J. Neuroimmunol.* **119**: 30-36.
21. Myers, K.J.; Sprent, J.; Dougherty, J.P. y Ron, Y., 1992. Synergy between encephalitogenic T cells and myelin basic protein-specific antibodies in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **41**: 1-8.
22. Kocar, I.H.; Yesilova, Z.; Ozata, M.; Turan, M.; Sengul, A. y Ozdemir, I., 2000. The effect of testosterone replacement treatment on immunological features of patients with Klinefelter's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* **121**: 448-452.
23. Grossman, C.J.; Roselle, G.A. y Mendenhall, C.I., 1991. Sex steroid regulation of autoimmunity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **40**: 649-659.
24. Ahmed, S.A.; Hissong, B.D.; Verthelyi, D.; Donner, K.; Becker, K. y Karpuzoglu-Sahin, E., 1999. Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environ. Health Perspect.* **107**: 681-686.
25. Saoudi, A.; Kuhn, J.; Huygen, K.; De Kozak, Y.; Velu, T.; Goldman, M.; Druet, P. y Bellon, B., 1993. Th2 activated cells prevent experimental autoimmune uveoretinitis, a Th1-dependent autoimmune disease. *Eur. J. Immunol.* **23**: 3096-3103.
26. Rivero, V. E.; Riera, C.M. y Roth, G.A., 1999. Humoral response against myelin antigens in two strains of rats with different susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *Autoimmunity* **29**: 129-137.
27. Sayegh, M.H. y Turka, L.A., 1995. T cell costimulatory pathways: promising novel targets for immunosuppression and tolerance induction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **6**: 1143-1150.
28. Renno, T.; Lin, J.Y.; Piccirillo, C.; Antel, J. y Owens, T., 1994. Cytokine production by cells in cerebrospinal fluid during experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice. *J. Neuroimmunol.* **49**: 1-7.
29. Saoudi, A.; Simmonds, S.; Huitinga, I. y Mason, D., 1995. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in rats by targeting autoantigen to B cells: evidence that the protective mechanism depends on changes in the cytokine response and migratory properties of the autoantigen-specific T cells. *J. Exp. Med.* **182**: 335-344.
30. Figueiredo, A.C.; Cohen, I.R. y Mor, F., 1999. Diversity of the B cell repertoire to Myelin Basic Protein in rat strains susceptible and resistant to EAE. *J. Autoimmun.* **12**: 13-25.