Encefalomiелitis por infección con el virus de Theiler como modelo experimental de esclerosis múltiple: citocinas y posibles mecanismos patogénicos

E. Molina-Holgado, A. Areválo-Martín, J.M. Vela, C. Guaza

THEILER'S VIRUS ENCEPHALOMYELITIS INFECTION AS A MODEL FOR MULTIPLE SCLEROSIS: CYTOKINES AND PATHOGENIC MECHANISMS

Summary. Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) disease is induced following intracerebral inoculation of TMEV, a member of picornavirus family, in susceptible animals. The pathogenesis of paralytic syndrome is associated with a chronic progressive demyelinating disease characterized by perivascular of immune inflammatory cells. Although TMEV induced demyelinating disease (TMEV-IDD) is initiated by virus specific CD4⁺ T cells targeting CNS-persistent virus, CD4⁺ T-cell responses against self myelin epitopes activated via epitope spreading contribute to chronic disease pathogenesis. In the present report we delineated possible pathogenic mechanisms related with inflammatory process, leading to demyelination and axonal loss. The importance of proinflammatory cytokines in sustaining the inflammatory process and cause direct oligodendrotoxicity is emphasized. Different approaches in therapeutic strategies affecting cytokines are also presented. [REV NEUROL 2002; 35: 973-8]

Key words. Cytokines. Multiple sclerosis. Theiler's virus.

INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad desmielinizante más frecuente en adultos jóvenes y, aunque su etiología se desconoce, estudios epidemiológicos apuntan a una infección vírica como su posible causa [1]. Así, la inoculación de cepas susceptibles de ratones con el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV, del inglés *Theiler's murine encephalomyelitis virus*) conduce al desarrollo de una enfermedad crónica desmielinizante, caracterizada por lesiones multifocales en la sustancia blanca, con infiltrados inflamatorios, similar a la patología observada en EM [2]. El TMEV es un picornavirus entérico patógeno en ratones y lo constituye una cadena positiva simple de ARN, cuyo receptor todavía se desconoce [3]. Este virus infecta diferentes tipos celulares en el sistema nervioso central (SNC), incluyendo neuronas, astrocitos, microglia y oligodendrocitos, aunque son los macrófagos/microglia la principal reserva del virus, y quienes determinan su persistencia en el SNC durante toda la vida del animal [4]. Los ratones clínicamente afectados presentan paraparesia espástica, producida por la desmielinización que se localiza principalmente en la médula espinal [5] (Fig. 1). La susceptibilidad de padecer la enfermedad está determinada por un sistema multigénico, que incluye genes clase I del CMH y el gen que codifica la porción constante de la cadena b del RCT [6]. Según estudios del laboratorio de Brahic y Bureau [7], la persistencia vírica en el ratón susceptible viene determinada por una región en el cromosoma 10, cerca del locus del interferón- γ (IFN- γ). Además, estudios de nuestro grupo también sugieren la implicación de la interleucina-1 (IL-1) en fases tempranas postinfección, como posible factor regulador del grado de resistencia/susceptibilidad

de padecer la enfermedad [8]. El modelo experimental producido por la inoculación del virus de Theiler reproduce las características de la EM crónica progresiva y presenta una serie de ventajas a tener en cuenta en la elección del modelo experimental más adecuado para abordar el estudio de posibles estrategias terapéuticas en el tratamiento de EM. En primer lugar, apoyaría la teoría etiológica vírica. En segundo lugar, la existencia de un margen de tiempo entre la infección vírica y la aparición de la sintomatología clínica coincide con los estudios epidemiológicos según los cuales la noxa que va a desencadenar la enfermedad debe actuar en la edad infantil-juvenil. Además, al igual que en los humanos, existe una predisposición genética y de incidencia debida al sexo; por último, la eficacia de terapias utilizadas en el tratamiento de EM en clínica correlaciona bien con la observada en el modelo de Theiler, por lo que constituye una buena plataforma para el diseño de futuros ensayos.

POSIBLES MECANISMOS PATOGENICOS DE DESMIELINIZACIÓN

La patogénesis de desmielinización en la infección con TMEV parece ser dependiente de la respuesta inmunológica del individuo frente al virus. Existen dos teorías que se vienen considerando en la actualidad: que la causa de desmielinización sea la muerte lítica de oligodendrocitos infectados mediante el ataque de células T citotóxicas, o que los oligodendrocitos y la mielina sean diana de factores solubles citotóxicos liberados por linfocitos CD4⁺ del subtipo Th1, en respuesta a un fenómeno de hipersensibilidad retardada (HTR) contra el virus, así como por la microglia y astrogliá cerebral activada [9]. Mientras la primera hipótesis implicaría un importante nivel de infección oligodendroglial, la segunda no es necesariamente dependiente de la infección directa del oligodendrocito, aunque implica la presencia del virus en el SNC para que tenga lugar la respuesta de HTR. Un importante número de estudios ha permitido saber que el daño al espectador inocente, característico de cualquier respuesta inflamatoria, es el mecanismo principal o primario de

Recibido: 05.11.01. Aceptado: 12.11.01.

Instituto Cajal. CSIC. Madrid, España.

Correspondencia: Dra. Carmen Guaza. Instituto Cajal. CSIC. Dr. Arce, 37. E-28002 Madrid. E-mail: cgjb@cajal.csic.es

© 2002, REVISTA DE NEUROLOGÍA

Figura 1. Desmielinización observada en la sustancia blanca de la médula espinal (nivel torácico) en ratones susceptibles (SJL/J) infectados con TMEV (tres meses postinfección), en comparación con una sección obtenida en ratones no infectados (izquierda).

lesión a la mielina en este modelo [10,11]. Probablemente, la destrucción de la mielina se inicie por células $CD4^+$ específicas contra el virus, que de manera persistente infecta células presentadoras de antígenos (APC) residentes en el SNC, y posteriormente se produzca la activación de células T contra epítomos de la mielina. Por tanto, no se excluye que en fases crónicas de la infección se produzca una respuesta de hipersensibilidad retardada contra antígenos de la mielina, debido al fenómeno de la expansión de epítomos [12,13]. Por tanto, cronológicamente, primero tendría lugar la presentación de antígenos víricos a cargo de células APC, fundamentalmente de microglia, y esta respuesta duraría toda la vida del animal. Después, una vez producido el daño a la mielina, se presentarían antígenos de la misma que habrían quedado descubiertos durante su destrucción (Fig. 2).

CITOCINAS Y MEDIADORES INFLAMATORIOS

La interacción de macrófagos tisulares con células residentes del SNC y con linfocitos T induce la liberación de gran número de mediadores inflamatorios, entre ellos citocinas proinflamatorias, óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno, proteasas y otras moléculas que, en mayor o menor grado, pueden contribuir al daño a la mielina o a la muerte del oligodendrocito. Parte de nuestros estudios se han encaminado a investigar el papel del daño directo al oligodendrocito por acción de citocinas proinflamatorias, liberadas clásicamente en respuestas del tipo HTR, y de la inducción del enzima óxido nítrico sintasa II (iNOS) [14]. Las citocinas producidas en el SNC por células de origen inmune o bien por células residentes del cerebro desempeñan un importante papel, determinando la naturaleza y extensión de la desmielinización, tanto en humanos como en modelos animales. La interleucina-12 (IL-12) es una citocina fundamentalmente derivada de macrófagos, que conduce a la producción de $IFN-\gamma$ y al desarrollo de una respuesta inmunológica de tipo Th1. Estudios recientes sugieren que la expresión de IL-12 en el SNC y en órganos linfoides en ratones con encefalitis alérgica experimental (EAE), otro modelo murino de EM, se correlaciona con el comienzo del síndrome de parálisis [15]. En el modelo de Theiler, el bloqueo de la actividad de IL-12 mediante la administración de anticuerpos contra la misma resulta beneficioso, observándose una incidencia menor y una reducción en la inflamación y en la gravedad de la enfermedad [16,17]. Hay que tener en cuenta que los linfocitos $CD4^+$ del subtipo Th1

Figura 2. Esquema patogénico del modelo de infección con el virus de Theiler (TMEV).

producen IL-2, $IFN-\gamma$ y $TNF-b$ /linfotóxina, y que estas células reclutan y activan monocitos/macrófagos que liberan citocinas como IL-1 β y $TNF-\alpha$. Con objeto de clarificar el papel de las citocinas en el modelo de Theiler, se viene intentando caracterizar la expresión de citocinas en médula espinal de ratones resistentes y susceptibles a la desmielinización en la fase inicial de inducción y en la fase final efectora. Sin duda, lo más significativo de estos estudios es la observación de una mayor expresión de ARNm de IL-12 p40, en las cepas susceptibles en la fase inicial, y la continua expresión de citocinas proinflamatorias sólo en cepas susceptibles, en la fase de desmielinización junto con genoma viral [18]. Actualmente, conocemos que las quimioquinas, citocinas quimioatrayentes, cuya síntesis y secreción se produce en respuesta a $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ e IL-1 β , muestran un patrón de expresión coordinado y restringido a determinadas regiones del cerebro y médula espinal, lo que explicaría cómo se establece el proceso inflamatorio [19]. En lo concerniente a otros mediadores inflamatorios, los estudios relativos al óxido nítrico (NO) en los que se ha implicado a la microglia y astroglía cerebral como generadores de importantes cantidades de esta molécula, sugieren que el NO podría mediar daño tisular en EM [20]. De hecho, se ha descrito una sobreexpresión de NO sintasa inducible (iNOS) en diversas enfermedades inflamatorias del SNC, como la EAE o la propia EM [21,22]. Estudios realizados en el modelo de Theiler muestran una inducción de ARNm de iNOS en el cerebro y médula espinal de ratones en fases tempranas postinfección, pero no en fases avanzadas de desmielinización, lo que podría sugerir que esta molécula no participaría en el proceso patogénico [23]. No obstante, diversos estudios reve-

lan resultados contradictorios, ya que muestran que la inhibición de iNOS previene y atenúa los déficit neurológicos observados tanto en EAE [24] como en TMEV-IDD [25]. Es posible que, dependiendo del estado de la enfermedad, el NO pueda comportarse de manera beneficiosa o dañina. Algunos autores sostienen que la apoptosis de linfocitos T y de macrófagos debida a la acción del NO en lesiones de EAE tiene resultados beneficiosos, y en ese caso la inhibición de iNOS conduce a un agravamiento de los síntomas neurológicos [26,27].

LA INFECCIÓN DE CÉLULAS GLIALES ES CRÍTICA PARA LA PERSISTENCIA DEL VIRUS EN EL SNC

Puesto que uno de los mecanismos principales de daño en este modelo implica la existencia de un reservorio del virus en el SNC, para que se produzca una respuesta de tipo HTR, resulta de gran interés determinar el grado de infección de los diferentes tipos de células gliales. Mientras que no se pone en duda que los macrófagos/microglia constituyen el tipo celular mayoritario infectado por el virus [28], la posible infección de astrocitos y oligodendroglía y la incidencia que pueda tener en el establecimiento y desarrollo de desmielinización/remielinización es un tema importante. Aun cuando el virus infecta oligodendrocitos de manera persistente [29], en cultivos primarios enriquecidos de astrocitos y de oligodendrocitos de ratones susceptibles a padecer la enfermedad se ha demostrado que ambos tipos celulares son infectados por TMEV, pero curiosamente son los astrocitos y los progenitores, y no los oligodendrocitos maduros, los que presentan los títulos víricos más altos, con una tasa de replicación vírica muy prominente [30]. Esta diferencia de infectabilidad sugeriría la dificultad de establecer un proceso de remielinización con éxito en este modelo. Estudios de nuestro grupo han mostrado cómo la infección de astrocitos de ratones susceptibles por TMEV conduce a la expresión de moléculas inflamatorias del tipo TNF- α , óxido nítrico sintasa-2 y ciclooxigenasa-2 [31,32]. Actualmente, estamos caracterizando la cascada de señalización intracelular que ocurre tras la infección con TMEV en cultivos primarios de astrogliá; a este respecto, podemos afirmar que incluye una rápida activación de la cascada de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), con la posterior translocación al núcleo del factor de transcripción NF κ B [33].

OLIGODENDROCITO COMO CÉLULA DIANA FINAL

La importancia del oligodendrocito como célula productora de la mielina adquiere especial interés en enfermedades desmielinizantes del tipo de EM. Tanto desde el punto de vista de la preservación de la viabilidad de las células ya diferenciadas maduras, como desde la perspectiva de restablecer un proceso de remielinización gracias a la proliferación y diferenciación de células progenitoras, el estudio de la fisiología del oligodendrocito puede aportar claridad en el planteamiento de nuevas estrategias terapéuticas para impedir el daño a la mielina. En el modelo de infección con TMEV, conviene hacer dos consideraciones: por un lado, la propia infección vírica del oligodendrocito conduciría a la lisis del mismo, que aunque se produzca, no parece ser el mecanismo principal de daño celular de manera crónica progresiva, como es el caso en nuestro modelo; por otro lado, consideramos que la muerte del oligodendrocito es secundaria a la acción de citocinas inflamatorias primarias y otros mediadores proinflamatorios, consecuencia de la inmu-

nidad específica y esencial para la perpetuación del proceso inflamatorio. Los estudios de Tsunoda et al [34] aportan algo de luz a esta problemática. En fases crónicas de la infección, cuando la desmielinización es muy patente, las células apoptóticas, entre las que se encuentran células de estirpe oligodendroglial, nunca colocalizan con antígenos víricos, indicando que el daño al oligodendrocito es secundario a la liberación de factores citotóxicos por otros tipos celulares. Nuestro grupo ha investigado la posibilidad de que tanto las citocinas IFN- γ o TNF- α , que se encuentran en las lesiones desmielinizantes en médula espinal de ratones susceptibles [35], como endotoxina bacteriana, que aumenta la patogénesis del virus [36], ejerzan apoptosis en células maduras y en progenitores. De acuerdo con nuestros resultados [14], los oligodendrocitos mueren por apoptosis tras la exposición de las anteriores citocinas, siendo mucho más susceptibles al daño los progenitores. Además, el IFN- γ tiene un claro efecto antiproliferativo en los mismos, lo que explicaría la dificultad de remielinización en un ambiente inflamatorio (Fig. 2). Quizá uno de los hallazgos más interesantes de nuestro estudio es la capacidad del oligodendrocito de interactuar con el medio que le rodea de una manera activa; por ejemplo, produciendo NO que, en el caso de las células maduras, parece estar implicado en la muerte de los mismos, aunque no es el único mecanismo. Es más, la citocina antiinflamatoria IL-10 bloquea la expresión de iNOS y evita la muerte de los oligodendrocitos lo que podría explicar en parte los efectos beneficiosos del tratamiento con esta citocina en EAE y en la infección con TMEV [37,38].

DAÑO AXONAL EN EL MODELO DE LA INFECCIÓN CON TMEV

El reciente énfasis del daño axonal en la EM ha conducido a una más detallada evaluación de los parámetros que subyacen o que contribuyen a la sintomatología neurológica observada en esta enfermedad. El interés en la patología neuronal proviene, en parte, de los estudios realizados con resonancia magnética (RM), que muestran una modesta correlación entre los parámetros de desmielinización inflamatoria (DI) y los parámetros clínicos [39]. Por otra parte, recientes estudios han demostrado la existencia de daño axonal caracterizado por la acumulación intra-axonal de la proteína precursora de amiloide [40] o por la presencia de ovoides axonales [41]. En el modelo de encefalomiелitis por infección con TMEV, las lesiones inflamatorias con desmielinización se expanden varios meses sin una remielinización significativa, y la sintomatología clínica –pérdida de equilibrio, parálisis e incontinencia– se desarrolla progresivamente durante la vida del animal. La naturaleza crónica y progresiva de la DI y del síndrome neurológico hace que este modelo constituya una oportunidad única para el estudio de la EM progresiva. Hoy sabemos que, en el modelo de Theiler, la desmielinización en médula espinal conduce a una pérdida axonal de fibras de calibre mediano y ancho, y que la intensidad del daño axonal correlaciona con el grado de atrofia medular y de deficiencias neurológicas [42]. En un estudio más detallado, Ure y Rodríguez [43] muestran por marcaje retrógrado una pérdida de la integridad neuronal de fibras descendentes que excede las predicciones basadas en medidas meramente morfológicas, de manera que, de todas las poblaciones neuronales estudiadas, aproximadamente el 70% no adquiere marcaje por transporte axonal retrógrado, siendo las poblaciones más afectadas las co-

respondientes a los núcleos vestibuloespinal y complejo rafe/reticular. La desmielinización crónica observada en este modelo podría por sí misma producir la disfunción axonal y, secundariamente, la pérdida del axón. No hay que olvidar que en los ratones infectados las lesiones son amplias y la remielinización mínima, con lo que algunos axones permanecen desmielinizados durante largos períodos y en múltiples sitios; este hecho puede producir cambios en la estructura y estabilidad del citoesqueleto que afectaría al tráfico axonal y, según algunos estudios, en última instancia, a la degeneración del axón [44]. Éste sería, por tanto, un escenario probable en nuestro modelo: la consecuencia de la desmielinización conduciría a la exposición del axón desnudo a factores citotóxicos tales como moléculas del complemento, radicales libres, citocinas inflamatorias, anticuerpos o proteasas, de manera que la disfunción axonal se debería a la acción de moléculas relacionadas con la inflamación. De modo alternativo, las vías inflamatorias podrían dañar al axón por una ruta más directa, mediante excitotoxicidad debida a liberación de glutamato por linfocitos, según han sugerido recientemente Pitt et al [45]. Todas estas observaciones parecen indicar que la limitación de la extensión de degeneración axonal debería ser un punto prioritario en la EM, y estrategias terapéuticas como la inmunosupresión selectiva, la remielinización o el tratamiento con antioxidantes o moléculas neurotróficas podrían resultar útiles. Sin embargo, el modelo de Theiler también nos recuerda que, cuando existe DI en respuesta a un agente infeccioso, es tan importante controlar el agente como limitar la respuesta inmunopatológica.

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS UTILIZADAS EN EL MODELO DE THEILER

Como en el caso de la EM, en este modelo la desmielinización puede ocurrir mediante mecanismos celulares y humorales; sólo es necesaria la persistencia del virus en el SNC y, primariamente, el resultado de daño mediado por el sistema inmune. De manera que tratamientos inmunosupresivos no específicos, como el tratamiento con ciclofosfamida o ciclosporina, tratamientos con suero contra timocitos, o anticuerpos monoclonales contra CD40 y contra moléculas del CMH clase II, suelen prevenir o disminuir los síntomas clínicos [11,46]. Pero este artículo pretende revisar fundamentalmente los tratamientos que intervienen sobre el sistema de citocinas, bien inhibiendo las proinflamatorias o bien estimulando las antiinflamatorias, para una mejor comprensión del papel desempeñado por éstas en el modelo de la infección con el virus de Theiler. Es de gran interés el empleo del tratamiento con IL-6 como sistema de prevención de la desmielinización. La administración de IL-6 recombinante humana a ratones susceptibles un día antes de la infección y durante los siguientes 28 días postinfección, protege a los animales de la desmielinización [47]. En este caso, los efectos de la IL-6 podrían deberse a sus acciones antiinflamatorias, como es la supresión de TNF- α o la inducción del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) [48]. Resultados nuestros indican que la inhibición de la producción de IL-1 mediante la administración de dexametasona en fases iniciales, tras la infección con TMEV, es suficiente para que se supriman los síntomas neurológicos en las fases tardías de la infección [8]. Esto se corroboró por la replicación de resultados cuando se bloquea la acción de la IL-1 mediante la administración de IL-1Ra. Otros objetivos incluyen el tratamiento con citocinas antiinflamatorias. La utiliza-

ción del factor TGF-b-2, potente inmunorregulador a la baja, puesto que inhibe la proliferación de linfocitos T y B, bloquea la activación de macrófagos disminuyendo la secreción de TNF- α y de IL-1, o inhibe la expresión de moléculas del CMH de clase II; en el modelo del TMEV demuestra las ventajas de esta aproximación, dado que reduce la desmielinización y disminuye el número de células con antígenos víricos y la apoptosis en médula espinal [49]. También la terapia de administrar IL-4, IL-10, o la combinación de ambas, se muestra favorable, disminuyendo la sintomatología mediada por TMEV [33]. Puesto que actualmente los interferones tipo I (IFN- α ; IFN- β) son los agentes terapéuticos más habituales para el tratamiento de EM, es interesante saber que en el modelo del TMEV, el tratamiento a corto plazo con IFN- α/β favorece drásticamente la remielinización, mientras que el tratamiento a largo plazo resulta perjudicial. En este estudio queda claro que los efectos del tratamiento se deben a acciones inmunomoduladoras del IFN- α/β , ya que se observa una disminución de infiltrados de linfocitos T y B en el SNC de los ratones tratados [50], y no varía el número de células infectadas por el virus. Los hallazgos realizados hasta ahora, tanto en la propia EM como en el modelo de Theiler, sugieren que potenciar la remielinización y proteger el axón neuronal son los retos más importantes con el que se enfrenta la investigación en este campo. A este respecto, es interesante destacar las terapias basadas en el tratamiento con inmunoglobulinas, y que en uno de los últimos trabajos de M. Rodríguez con el modelo de Theiler se muestra tan eficaz, estimulando la remielinización mediante la estrategia experimental de utilizar anticuerpos monoclonales humanos que se unen a la superficie de progenitores de oligodendrocitos de ratón [51].

CONCLUSIONES

La EM es la enfermedad inflamatoria crónica del SNC más frecuente en jóvenes adultos en los que se daría una predisposición genética y, posiblemente, la exposición a edad temprana a uno o más agentes ambientales, entre los que destacarían infecciones de tipo vírico. El modelo de la encefalomielite murina por infección con el virus de Theiler es, por tanto, un modelo de EM particularmente atractivo, ya que contempla las anteriores características. En este modelo, los hallazgos patológicos e inmunológicos indican que la desmielinización es dependiente de la respuesta inmunológica del individuo frente al virus. Por un lado, podría acontecer la muerte de oligodendrocitos infectados con el virus mediante el ataque de células T citotóxicas; por otro, los oligodendrocitos o la mielina podrían ser diana de factores solubles citotóxicos liberados por células inmunológicas, en respuesta a un fenómeno de hipersensibilidad retardada (HTR) contra el virus, así como por la microglia y astrogliá cerebral. El daño al espectador inocente, característico de cualquier respuesta inflamatoria, también es el mecanismo principal o primario de lesión a la mielina en este modelo. En fases crónicas de la infección existe un componente autoinmune, ya que se desarrolla una respuesta de hipersensibilidad retardada contra antígenos de la mielina, debido al fenómeno de la expansión de epítomos. En este escenario, el balance entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias desempeña también su papel al determinar la naturaleza y extensión de la desmielinización. Nuestros datos indican que los oligodendrocitos en cultivo mueren por apoptosis en presencia de citocinas proinflamatorias, siendo mucho más susceptibles al daño los progenitores.

La capacidad del oligodendrocito de interactuar con el medio que le rodea de una manera activa, por ejemplo, produciendo NO, o expresando receptores para citocinas antiinflamatorias, le confieren un papel desconocido hasta ahora, que amplía las posibilidades de estudio de esta célula, cuya función no es úni-

camente producir mielina. En el modelo de Theiler, la desmielinización en médula espinal va seguida de una pérdida axonal de fibras de calibre mediano y ancho, y la intensidad del daño axonal se correlaciona con el grado de atrofia medular y de deficiencias neurológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Kurtze JF. Epidemiological evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 382-98.
- Dal Canto MC, Lipton HL. Primary demyelination in Theiler's virus infection. *Lab Invest* 1976; 33: 626-37.
- Hertzler S, Luo M, Lipton HL. Mutation of predicted virion pit residues alters binding of Theiler's virus to BHK-21 cells. *J Virol* 2000; 74: 1994-2004.
- Lipton HL, Kratochvil J, Sethi P, Dal Canto MC. Theiler's virus antigen detected in mouse spinal cord 2 1/2 years after infection. *Neurology* 1986; 34: 1117-9.
- Clatch RJ, Lipton HL, Miller SD. Characterization of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-specific delayed-type hypersensitivity responses in TMEV-induced demyelinating disease: correlations with clinical signs. *J Immunol* 1986; 136: 920-7.
- Monteney P, Bureau JF, Brahic M. The infection of mouse by Theiler's virus: from genetics to immunology. *Immunol Rev* 1997; 159: 163-75.
- Brahic M, Bureau JF. Genetics of susceptibility to Theiler's virus infection. *Bioassays* 1998; 20: 627-35.
- Lledó A, Borrell J, Guaza C. Dexamethasone regulation of interleukin-1 receptors in the hippocampus of Theiler's virus-infected mice: effects on virus mediated demyelination. *Eur J Pharmacol* 1999; 372: 75-83.
- Tsunoda I, Fujinami RS. Two models for multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis and Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 673-86.
- Rodríguez M, Pavelko KD, Njenga MK, Logan WC, Wettstein PJ. The balance between persistent virus infection and immune cells determines demyelination. *J Immunol* 1996; 157: 5699-709.
- Pope JG, Karpus WJ, Vanderlugt C, Miller SD. Flow cytometric and functional analyses of central nervous system infiltrating cells in SJL/J mice with Theiler's virus-induced demyelinating disease. Evidence for CD4⁺ T cell-mediated pathology. *J Immunol* 1996; 156: 4050-8.
- Miller SD, Vanderlugt CL, Begolka WS, Pao R, Yauth L, Neville KL, et al. Persistent infection with Theiler's virus lead to autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med* 1997; 3: 1133-6.
- Katz-Levy Y, Neville KL, Padilla J, Rahbe S, Begolka WS, Girvin AM, et al. Temporal development of autoreactive Th1 responses and endogenous presentation of self myelin epitopes by central nervous system-resident APC in Theiler's virus-infected mice. *J Immunol* 2000; 165: 5304-14.
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martín A, Guaza C. LPS/IFN- γ cytotoxicity in oligodendroglial cells. Role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 492-503.
- Bright JJ, Musuro BF, Sriram S. Expression of IL-12 in CNS and lymphoid organs of mice with experimental allergic encephalitis. *J Neuroimmunol* 1998; 82: 22-30.
- Inoue A, Koh CS, Yamazaki M, Yahikozawa H, Ichikawa M, Yagita H, et al. Suppressive effect on Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease by the administration of anti-IL-12 antibody. *J Immunol* 1998; 194: 186-93.
- Bright JJ, Rodríguez M, Sriram S. Differential influence of interleukin-12 in the pathogenesis of autoimmune and virus-induced central nervous system demyelination. *J Virol* 1999; 73: 1637-9.
- Sato S, Reiner SL, Jensen MA, Roos RP. Central nervous system mRNA expression following Theiler's murine encephalomyelitis virus infection. *J Neuroimmunol* 1996; 76: 213-32.
- Murray PD, Krivacic K, Chernosky A, Ransohoff RM, Rodríguez M. Biphasic and regionally-restricted chemokine expression in nervous system in the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *J Neurovirol* 2000; 6: 44-52.
- Merril JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* 1993; 151: 2132-41.
- Bo L, Wesselingh DT, Mork S, Choi S, Kong PA, Hanley D, et al. Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Ann Neurol* 1994; 36: 778-86.
- De Groot CJA, Ruuls SR, Theeuwes JWM, Dijkstra CD, Vandervalk P. Immunocytochemical characterization of the expression of the inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 10-20.
- Oleszak EL, Katsetos CD, Kuzmak J, Varadhachary A. Inducible nitric oxide synthase in Theiler's murine encephalomyelitis virus infection. *J Virol* 1997; 71: 3228-35.
- Cross AH, Misko TP, Lin RF, Hickey WF, Trotter JL, Tilton RG. Aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *J Clin Invest* 1994; 63: 16270.
- Rose JW, Hill KE, Wada Y, Jurtz CI, Tsunoda I, Fujinami RS, et al. Nitric oxide synthase inhibitor, aminoguanidine, reduces inflammation and demyelination produced by Theiler's virus infection. *J Neuroimmunol* 1998; 81: 82-9.
- Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, Yanagihara T. Nitric oxide via an inducible isoform of nitric oxide synthase is a possible factor to eliminate inflammatory cells from the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1995; 62: 103-12.
- Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, Yanagihara T. Aminoguanidine, a selective inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, has different effects on experimental allergic encephalomyelitis in the induction and progression phase. *J Neuroimmunol* 1998; 81: 201-10.
- Rossi CP, Delcroix M, Huitinga I, et al. Role of macrophages during Theiler's virus infection. *J Virol* 1997; 71: 8592-601.
- Rodríguez M, Leibowitz JL, Lampert PW. Persistent infection of oligodendrocytes in Theiler's virus-induced encephalomyelitis. *Ann Neurol* 1983; 13: 426-33.
- Qi Y, Dal Canto MC. Effect of Theiler's murine encephalomyelitis virus and cytokines on cultured oligodendrocytes and astrocytes. *J Neurosci Res* 1996; 45: 364-74.
- Molina-Holgado F, Lledó A, Guaza C. Anandamide suppresses nitric oxide and TNF- α responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. *Neuroreport* 1997; 8: 1929-33.
- Molina-Holgado E, Arévalo-Martín A, Ortiz S, Vela JM, Guaza C. Theiler's virus infection induces the expression of cyclooxygenase-2 in murine astrocytes: inhibition by the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10. *Neurosci Lett* 2002; 324: 327.
- Molina-Holgado E, Arévalo-Martín A, Castrillo A, Boscá L, Vela JM, Guaza C. Interleukin-4 and interleukin-10 modulate nuclear factors kB activity and nitric oxide synthase-2 expression in Theiler's virus-infected brain astrocytes. *J Neurochem* 2002; 81: 1242.
- Tsunoda I, Kurtz CIB, Fujinami RS. Apoptosis in acute and chronic central nervous system disease induced by Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Virology* 1997; 228: 388-9.
- Begolka WS, Vanderlugt CL, Rahbe SM, Miller SD. Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis. *J Immunol* 1998; 161: 4437-46.
- Palma JP, Park SH, Kim BS. Treatment with lipopolysaccharide enhances the pathogenicity of a low-pathogenic variant of Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J Neurosci Res* 1996; 45: 776-85.
- Betelli E, Prabhu-Das M, Howard ED, Weiner HL, Sober RA, Kuchroo VK. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10 and IL-4 deficient and transgenic mice. *J Immunol* 1998; 161: 3299-306.
- Hill KE, Pigman M, Fujinami RS, Rose JW. Gender variations in early Theiler's virus induced demyelinating disease: differential susceptibility and effects of IL-4, IL-10 and combined IL-4 with IL-10. *J Neuroimmunol* 1998; 85: 44-51.
- Miller DH, Grossman RI, Reingold SC, McFarland HF. The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. *Brain* 1998; 121: 3-24.
- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997; 120: 393-9.
- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 278-85.
- McGavern DB, Murray PD, Rivera-Quinones C, Schmelzer JD, Low

- PA, Rodríguez M. Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis. *Brain* 2000; 123: 519-31.
43. Ure D, Rodríguez M. Extensive injury of descending neurons demonstrated by retrograde labeling in a virus-induced murine model of chronic inflammatory demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 664-78.
 44. Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, et al. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 1998; 280: 1610-3.
 45. Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 2000; 6: 67-70.
 46. Friedmann A, Frankel G, Lorch Y, Steimann L. Monoclonal anti-I-A antibody reverses chronic paralysis and demyelination in Theiler's virus infected mice: critical importance of timing treatment. *J Virol* 1987; 61: 898-902.
 47. Rodríguez M, Pavelko KD, Mc Kinney CW, Leibowitz JL. Recombinant human IL-6 suppresses demyelination in a viral model of multiple sclerosis. *J Immunol* 1994; 153: 3811-21.
 48. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 1997; 83: 113-8.
 49. Drescher KM, Murray PD, Lin X, Carlino JA, Rodríguez M. TGF- β 2 reduces demyelination, virus antigen expression and macrophage recruitment in a viral model of multiple sclerosis. *J Immunol* 2000; 164: 3207-13.
 50. Njenga MK, Coenen MJ, Decuir N, Yeh H, Rodríguez M. Short-term treatment with interferon- α/β promotes remyelination, whereas long-term treatment aggravates demyelination in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 2000; 59: 661-70.
 51. Warrington AE, Asakura K, Bieber AJ, Bojoltub C, Van Keulen V, Kaveru SV, et al. Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. *PNAS USA* 2000; 97: 6820-5.

ENCEFALOMIELITIS POR INFECCIÓN CON EL VIRUS DE THEILER COMO MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE: CITOCINAS Y POSIBLES MECANISMOS PATOGENÉTICOS

Resumen. La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad desmielinizante más frecuente en adultos jóvenes, y aunque su etiología es desconocida, estudios epidemiológicos apuntan a una infección vírica como posible causa de la enfermedad. La inoculación de cepas susceptibles de ratones con el virus de la encefalomyelitis murina de Theiler (TMEV, del inglés Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus) conduce al desarrollo de una enfermedad crónica desmielinizante caracterizada por lesiones multifocales en la sustancia blanca, con infiltrados inflamatorios similares a la patología observada en la EM en su fase crónica progresiva. Los oligodendrocitos o la mielina son diana de factores solubles citotóxicos liberados por linfocitos CD4⁺ del subtipo Th1, en respuesta a un fenómeno de hipersensibilidad retardada contra el virus, así como por la microglía y astrogliá cerebral activada. En los estadios más avanzados de la infección, se produce una respuesta de inmunidad específica contra antígenos de la mielina, debido al fenómeno de la expansión de epítomos. En la presente revisión, tratamos de delinear los mecanismos patogénicos que conducen a la desmielinización y daño axonal en este modelo. Se destaca la importancia de las citocinas proinflamatorias para el mantenimiento del proceso inflamatorio, y se describen estrategias terapéuticas relacionadas con el sistema de citocinas pro y antiinflamatorias. [REV NEUROL 2002; 35: 973-8]

Palabras clave. Citocinas. Esclerosis múltiple. Modelo de Theiler.

ENCEFALOMIELITE, POR INFECÇÃO COM O VÍRUS DE THEILER, COMO MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLE: CITOCINAS E POSSÍVEIS MECANISMOS PATOGENÉTICOS

Resumo. A esclerose múltipla (EM) é a doença desmielinizante mais frequente em adultos jovens, e embora a sua etiologia seja desconhecida, estudos epidemiológicos apontam para uma virose como possível causa da doença. A inoculação de estirpes susceptíveis em ratos com o vírus da encefalomyelite murina de Theiler (TMEV, Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus) leva ao desenvolvimento de uma doença crónica desmielinizante, caracterizada por lesões multifocais da substância branca, com infiltrados inflamatórios similares e à patologia observada na EM na fase crónica progressiva. Os oligodendrócitos ou a mielina são o alvo de factores solúveis citotóxicos libertados por linfócitos CD4⁺ do subtipo Th1, em resposta a um fenómeno de hipersensibilidade retardada contra o vírus, assim como, pela microglia e astrogliá cerebral activada. Nos estádios mais avançados da infecção, é produzida uma resposta de imunidade específica contra antígenos da mielina, devido ao fenómeno da expansão de epítomos. Na presente revisão, tratamos de delinear os mecanismos patogénicos que conduzem à desmielinização e lesão axonal neste modelo. Destaca-se a importância das citocinas pró-inflamatórias para a manutenção do processo inflamatório, e descrevem-se estratégias terapêuticas relacionadas com o sistema de citocinas pró- e anti-inflamatórias. [REV NEUROL 2002; 35: 973-8]

Palavras chave. Citocinas. Esclerose múltipla. Modelo de Theiler.