



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

## **GRADO EN MEDICINA**

### **TRABAJO FIN DE GRADO**

**El papel de las células T<sub>H</sub>17 en las enfermedades humanas: la esclerosis múltiple.**

**The role of T<sub>H</sub>17 cells in human diseases: multiple sclerosis.**

**Autora: Dña. Andrea Bedia Raba**

**Director: D. Ramón Merino Pérez**

**Santander, Junio 2017**

# ÍNDICE

<b>Abstract</b> .....	1
<b>I. Visión global de la diferenciación de los linfocitos T CD4</b> .....	2
1. Perspectiva histórica de la diferenciación de las células T CD4. ....	2
2. La disregulación de la diferenciación conlleva patología. ....	6
<b>II. Diferenciación funcional de los linfocitos T<sub>H</sub>17</b> .....	7
1. Descubrimiento de un nuevo fenotipo celular: células T <sub>H</sub> 17.....	7
2. Mecanismo de diferenciación de las células T <sub>H</sub> 17. Papel en la respuesta inmune.....	8
3. La implicación de las células T <sub>H</sub> 17 en patología. ....	13
4. Plasticidad de la respuesta inmune. ....	14
<b>III. Papel del sistema inmune en la esclerosis múltiple</b> .....	16
1. Modelo animal para comprender la EM: EAE. ....	16
2. Principales ideas derivadas del uso de modelos EAE. ....	21
2.1. Papel de IL-23 en la dicotomía de las células T <sub>H</sub> 17. ....	23
2.2. GM-CSF, mediador de la producción de células T <sub>H</sub> encefalitogénicas.....	23
2.3. Supresor de la respuesta inmune: IL-27. ....	24
3. Células T <sub>H</sub> 17 y esclerosis múltiple en humanos. ....	25
4. Otros linfocitos T CD4 partícipes en la autoinmunidad: Treg y T <sub>H</sub> 1. ....	25
<b>IV. Dianas terapéuticas en la esclerosis múltiple. Papel de la microbiota</b> .....	28
1. Inmunomodulación de la RI. Papel del IFN-β en EM. ....	29
2. De la inmunomodulación a las terapias dirigidas. Nuevas terapias en EM. ....	30
3. Influencia de la microbiota y la autoinmunidad en el SNC. ....	32
<b>Conclusiones</b> .....	38
<b>Agradecimientos</b> .....	40
<b>Bibliografía</b> .....	41

## ABSTRACT

El sistema inmune nace con la misión de protegernos frente a sustancias y organismos nocivos, así como la defensa contra las enfermedades mediante células y moléculas efectoras. Con el fin de proporcionar un mecanismo de respuesta más eficaz y específico, los animales vertebrados han desarrollado una respuesta inmune adaptativa, donde las células T CD4<sup>+</sup> desempeñan un papel central en la coordinación de la misma. Desde el punto de vista funcional, estas células han demostrado ser extremadamente heterogéneas, existiendo distintas subpoblaciones definidas en base al tipo de antígeno que desencadena la respuesta y por la secreción de patrones específicos de citocinas que determinan su respuesta. Los procesos de diferenciación funcional de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> están regulados a múltiples niveles, pero alteraciones en los mismos, asociadas con la expansión aberrante de determinadas subpoblaciones, pueden ocasionar distintas patologías, entre las que se incluyen las enfermedades autoinmunes.

En esta revisión, nos centramos en el proceso de diferenciación de los linfocitos T<sub>H</sub>17, y su participación en la inducción de la esclerosis múltiple, principalmente a través del modelo de encefalomielitis autoinmune experimental. A su vez, revisaremos sus diferentes estrategias terapéuticas, así como el papel de la microbiota como factor de riesgo y elemento terapéutico.

**PALABRAS CLAVE:** sistema inmune, células T, esclerosis múltiple, microbiota.

## ABSTRACT

The immune system was born with the mission of protecting us against harmful substances and organisms, as well as the defense against diseases through various cells and effector molecules. In order to provide a more effective and specific response mechanism, vertebrate animals have developed an adaptive immune response, where CD4<sup>+</sup> T cells play a central role. From a functional point of view, these cells have been shown to be extremely heterogeneous, with different subpopulations defined based on the type of antigen that triggers the response and the secretion of specific cytokine patterns that determine their response. The functional differentiation processes of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes are regulated at multiple levels, but alterations in them, associated with the aberrant expansion of certain subpopulations, can cause different pathologies, including autoimmune diseases.

In this report, we will review the mechanisms of differentiation of T<sub>H</sub>17 lymphocytes, and their involvement in the induction of multiple sclerosis, mainly through the experimental autoimmune encephalomyelitis model. Finally, we will summarize the different therapeutic strategies of the disease, as well as the role of the microbiota as a risk factor and therapeutic element.

**KEY WORDS:** immune system, T cells, multiple sclerosis, microbiota.

## I. VISIÓN GLOBAL DE LA DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD4

### 1. Perspectiva histórica de la diferenciación de las células T CD4.

Desde sus orígenes, el ser humano ha formado parte de un mundo compuesto principalmente por microorganismos, los cuales han resultado esenciales para la supervivencia humana. No obstante, no todos los microorganismos son beneficiosos para la salud, de forma que durante la evolución, el hombre ha desarrollado órganos y sistemas que le permitan una correcta defensa frente a lo potencialmente dañino.

El **sistema inmunológico** se desarrolla con el propósito de aportar al organismo una defensa frente a los agentes infecciosos, la prevención de la autoinmunidad y de los procesos tumorales. El sistema inmune se compone de:

- Una **inmunidad innata o no específica**, que a través de las propias barreras del organismo (anatómicas, fisiológicas, endocíticas y fagocíticas) reconocen de una forma inmediata patrones moleculares altamente conservados, comunes a un grupo o familia de patógenos.
- Una **inmunidad adaptativa o específica**, que presente únicamente en los vertebrados, se caracteriza por ser específica (reconociendo de manera individual la amplia gama de moléculas), diversa, puesto que reacciona frente a diversos antígenos, con memoria y capaz de distinguir lo propio de lo ajeno. El sistema inmune adaptativo está compuesto por linfocitos B y T, tanto citotóxicos ( $T_C$ ) como colaboradores ( $T_H$ ).

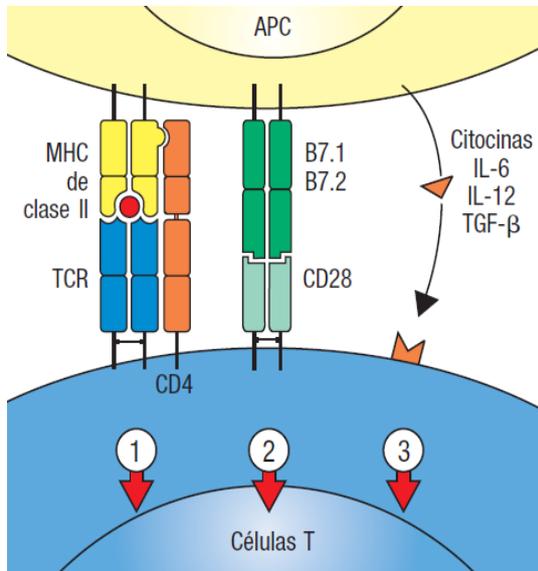
Los **linfocitos T colaboradores** (descritos a partir de ahora como linfocitos T CD4), representan un papel esencial en el mecanismo de respuesta inmunológica del organismo, puesto que ejercen una función importante tanto en la generación de respuestas por los linfocitos T citotóxicos, de anticuerpos por parte de los linfocitos B, así como el reclutamiento de otras células del sistema inmune innato.

La activación de los linfocitos T CD4 requiere la presencia de tres señales (figura 1):

1. Reconocimiento del antígeno. El linfocito T CD4 presenta en su membrana un receptor (TCR), capaz de reconocer específicamente el antígeno en forma de un péptido presentado por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) presente en la célula presentadora de antígeno (CPA) madura.
2. Moléculas coestimuladoras. Además del reconocimiento antigénico en la CPA, la activación de los linfocitos T requieren señales coestimuladoras mediadas por la interacción de una serie de receptores y sus ligandos, presentes en ambas células partícipes (CD40 – CD40L; CD28 – B7-1/2). Esta señal se entiende como un mecanismo de seguridad, puesto que su ausencia resultaría en una activación ineficiente. Las CPAs proporcionan la señal coestimuladora a los linfocitos T una vez que se han activado (maduración) tras el reconocimiento de los patógenos o señales de

peligro mediante receptores específicos de patrones (PRR) tales como los TLRs (receptores tipo Toll) y NLR (receptores tipo NOD).

3. Liberación de citocinas, que no son responsables directas de la activación de los linfocitos T CD4, sino que más bien modulan la diferenciación/función de estos.



**Figura 1. Tres tipos de señales intervienen en la activación de células T** (Murphy, Travers and Walport, 2009). La unión del MHC-II con el receptor de la célula T constituye la primera señal de activación (1). Para una activación eficaz, se requiere que la CPA envíe una segunda señal, conocida como señal coestimuladora, que garantiza un mecanismo de seguridad en la activación, permitiendo una mayor supervivencia y proliferación de las células T (2). Finalmente, se requiere una tercera señal (3), encargada de otorgar diferentes funciones a los linfocitos T CD4, a través de la presencia de diferentes citocinas.

El conocimiento actual sobre la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4 establece que existe un determinado número de subtipos funcionales bien definidos, caracterizados por la producción y secreción de patrones concretos de citocinas. La diversidad funcional de linfocitos T CD4 es controlada en gran medida por las CPA, que según el estímulo microbiano que las activa van a secretar distintas citocinas. Estas moléculas, bien directamente o promoviendo la producción de otras citocinas en células accesorias, establecen un ambiente de factores solubles concreto alrededor del linfocito T CD4 que promueven su diferenciación a través de la expresión de factores de transcripción específicos de linaje. De esta forma, la respuesta inmunológica adaptativa mediada por los linfocitos T CD4 se polariza de diversas maneras (figura 2), permitiendo así la respuesta más eficaz al estímulo que la genera.

En la década de los 80, Mosmann y Coffman demuestran por primera vez la existencia de diferentes subgrupos de linfocitos T CD4 (Mosmann et al., 1986). Este grupo de investigadores propuso la existencia de dos subtipos distintos de células T CD4, los linfocitos  $T_H1$  y los linfocitos  $T_H2$ , basándose en la producción de distintos perfiles de citocinas y el tipo de reacciones que provocaban. Mientras que el fenotipo  $T_H1$  mediaban respuestas de inmunidad celular mediante la producción de interferón gamma ( $INF-\gamma$ ) y del factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ); los linfocitos  $T_H2$ , a través de la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13, mediaban respuestas de inmunidad humoral y contra parásitos. Más tarde, a cada uno de estos subtipos se le asignó un papel patológico: la alteración de los linfocitos  $T_H1$  mediaba enfermedades autoinmunes mientras que el mal funcionamiento de los linfocitos  $T_H2$  se asociaba con enfermedades alérgicas y asma.

Esta idea permaneció inalterable hasta el descubrimiento de nuevos perfiles de linfocitos T CD4, así como el conocimiento de las señales necesarias para su diferenciación y los

mecanismos involucrados en el mismo. En este momento, además de conocer la existencia de los linfocitos  $T_H1$  y  $T_H2$ , se han descubierto nuevos subtipos, tales como  $T_H17$ ,  $T_H9$ ,  $T_H22$ , T reguladoras (Treg) y T foliculares ( $Tf_H$ ), los cuales describiremos a continuación a excepción de la diferenciación de los linfocitos  $T_H17$ , que veremos en un capítulo posterior.

En la diferenciación de los **linfocitos  $T_H1$** , las principales citocinas implicadas son IL-12 e IFN- $\gamma$ , mientras que el factor de transcripción específico de linaje es T-bet. Se demostró que la presencia en el organismo de patógenos intracelulares induce la generación por parte de las CPA de IL-12, la cual actúa a dos niveles:

- Por una parte, recluta células *Natural Killer*, que producen IFN- $\gamma$ . Éste, tras unirse a su receptor en la célula T CD4+, activa al factor de transcripción STAT-1, que una vez induce la transcripción de T-bet, pone en marcha todos los mecanismos implicados en la diferenciación.
- La inducción de T-bet potencia la expresión de IFN- $\gamma$  así como la transcripción de la cadena inducible del receptor de IL-12 (IL-12R $\beta$ 2), permitiendo así la unión de la IL-12 previamente generada por las CPA, lo que conlleva una mayor producción de IFN- $\gamma$  a través de la activación del factor STAT4.

De esta forma, la activación de los linfocitos  $T_H1$  va a generar la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , los cuales facilitan el reclutamiento de macrófagos así como el incremento de su actividad microbicida.

La existencia de microbios extracelulares y helmintos intestinales en el organismo induce la activación y diferenciación de los **linfocitos  $T_H2$** , gracias a la presencia de IL-4 en el medio y la activación del factor de transcripción específico de linaje, GATA3.

La expresión de IL-4 por células accesorias, como los basófilos y eosinófilos, y su posterior unión con su receptor en la célula T CD4, activa el factor STAT6, que tras migrar al núcleo de la célula, pone en marcha los mecanismos diferenciadores del linfocito  $T_H2$  tras la activación y transcripción de GATA3: inducción de las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. Así, la producción de estas citocinas va a favorecer la proliferación de células B y el cambio del isotipo de la inmunoglobulina a IgE, el reclutamiento de eosinófilos y el aclaramiento extracelular de parásitos.

Durante el estudio de la diferenciación del fenotipo  $T_H2$  ante la presencia de helmintos intestinales, se observó la expresión por parte de algunos de ellos de una nueva interleucina, denominada IL-9 (Uyttenhove, Brombacher and Van Snick, 2010). Más tarde, se observó *in vitro* que la presencia conjunta en el medio de IL-4 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), dirigía la diferenciación de los linfocitos T CD4 hacia un nuevo fenotipo productor principalmente de IL-9, además de pequeñas cantidades de IL-10 e IL-21, denominado **linfocito  $T_H9$** . Actualmente, no se conoce el factor de transcripción específico de la diferenciación de los linfocitos  $T_H9$  (se postula la importancia de GATA3, IRF-4, BAFT y PU.1), aunque sí se ha demostrado la activación inicial del factor STAT6 inducido por la presencia de IL-4.

IL-9 ha demostrado un papel importante en el sistema inmune, puesto que promueve la supervivencia y proliferación de células T y mastocitos, así como la modulación de la respuesta de las células B.

TGF- $\beta$  ha resultado ser una citocina esencial en la diferenciación funcional de varios subtipos de linfocitos T CD4, tales como T<sub>H</sub>9, Treg y Th17.

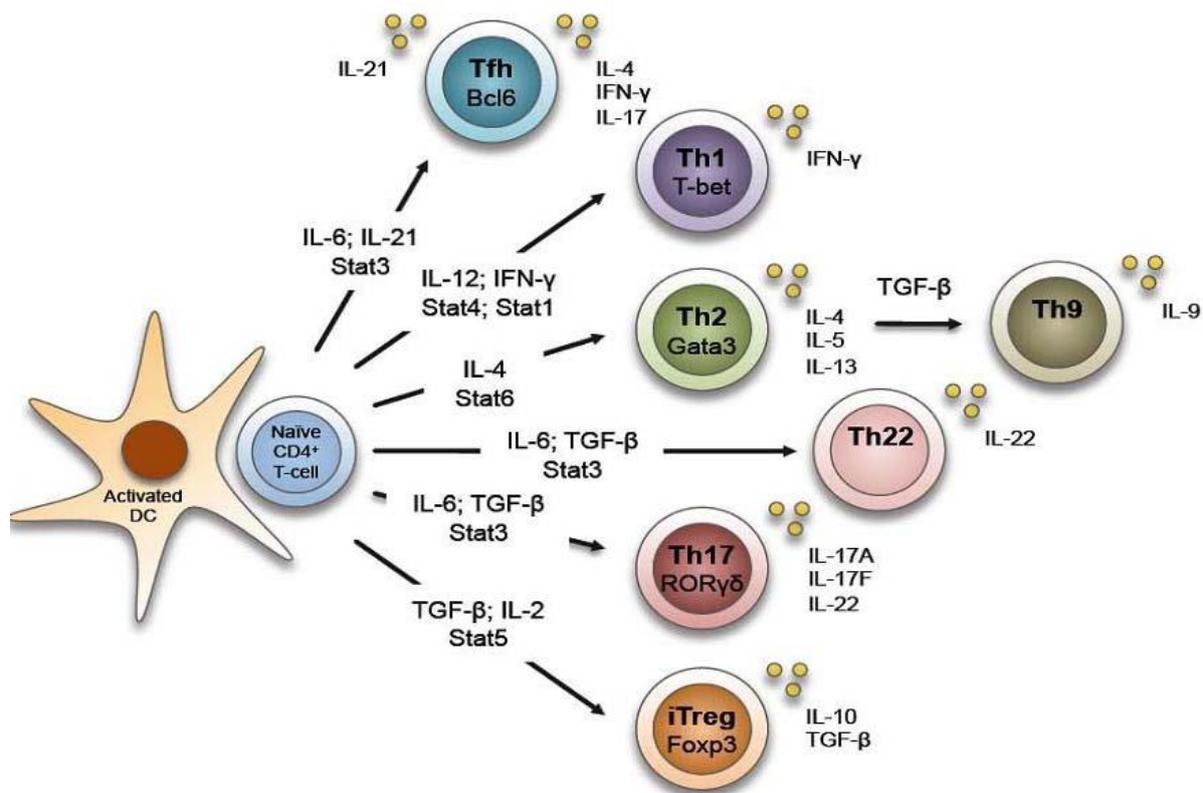
Las **células Treg** presentan un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia periférica, siendo capaces de suprimir la función de otras células T efectoras así como ser capaces de inducir la liberación de citocinas supresoras, tales como TGF- $\beta$  e IL-10. La población de células T reguladoras es heterogénea, y pueden ser divididas en células originadas en el timo, denominadas células T reguladoras naturales (nTreg) y células T reguladoras inducidas en la periferia o adaptativas (iTreg), aunque ambas expresen el factor de transcripción específico.

Son las células T reguladoras inducidas en la periferia las que se activan y diferencian ante la presencia en el medio de TGF- $\beta$  y la ausencia de otras citocinas proinflamatorias (ver en más detalle en la diferenciación T<sub>H</sub>17). Tras la unión de TGF- $\beta$  con su receptor, se van a activar diferentes proteínas intracelulares, conocidas como Smad, cuyo fin es la inducción de FoxP3. En las células iTreg, además de TGF- $\beta$ , es necesaria la presencia de IL-2, que a través del factor STAT-5, induce la expresión de FoxP3.

Las células T CD4 son necesarias para el correcto funcionamiento de los linfocitos B y la producción de anticuerpos de alta afinidad gracias al desarrollo de los centros germinales en los órganos linfoides secundarios. En los primeros estudios llevados a cabo a este respecto, se pensó que este papel era llevado a cabo por los linfocitos T<sub>H</sub>2 y su secreción principalmente de IL-4 e IL-10. No fue hasta finales del siglo XX donde se descubrió un nuevo subtipo de linfocito T CD4 presente en el tejido linfoide de los humanos, denominado **linfocito T folicular** (T<sub>fH</sub>).

Los linfocitos T<sub>fH</sub> constituyen un subgrupo celular implicado en la migración de las células B a las zonas foliculares de los centros germinales gracias a la expresión del receptor CXCR5, de IL-4 e IL-21. Su diferenciación se basa en la presencia de IL-6 e IL-21, capaces de activar el factor STAT3, que tras migrar al núcleo va a iniciar la transcripción de Bcl-6, factor de transcripción esencial en la generación de células T foliculares.

Uno de los últimos fenotipos de células T CD4 descritos ha sido la población de **linfocitos T<sub>H</sub>22**, los cuales actúan gracias a la secreción de IL-22, IL-13 y TNF- $\alpha$  entre otros, facilitando la reparación de heridas así como la protección frente a microorganismos en las superficies epiteliales, tanto la piel como el tracto gastrointestinal. El mecanismo molecular involucrado en la diferenciación de las células T<sub>H</sub>22 no está completamente esclarecido, si bien es cierto que la diferenciación de los linfocitos T<sub>H</sub>22 requiere la activación del factor de transcripción AHR, lo cual ocurre en presencia de citocinas tales como IL-6 y TNF- $\alpha$ .



**Figura 2. Diferenciación de las células T<sub>H</sub>** (Institut Pasteur of Shanghai Chinese Academy of Sciences, 2010). El reconocimiento antigénico por parte de la inmunidad innata pone en marcha los mecanismos necesarios para la diferenciación de los linfocitos T CD4, permitiendo así una respuesta dirigida frente a un antígeno concreto a través de la secreción de citocinas. En la imagen aparecen los principales subtipos de linfocitos T CD4, así como las distintas señales implicadas y los patrones de secreción de citocinas llevados a cabo por cada uno de ellos.

## 2. La disregulación de la diferenciación conlleva patología.

La función del sistema inmune es reconocer lo potencialmente dañino para el organismo con el fin de eliminarlo, mientras que a la vez debe ser capaz de reconocer e inactivarse frente a lo propio. Estas funciones primordiales son llevadas a cabo a través de la diferenciación fenotípica de los linfocitos T CD4 y su posterior producción de citocinas. Sin embargo, una alteración en la diferenciación de estas células puede inducir enfermedad.

Desde los primeros estudios que se llevaron a cabo en la diferenciación de los linfocitos T CD4 (Mosmann and Cher, 1987), se vio que el fenotipo T<sub>H</sub>1 era indispensable en la defensa frente a patógenos intracelulares así como en respuestas de hipersensibilidad retardada. No obstante, una respuesta incontrolada por parte de los linfocitos T<sub>H</sub>1 contra autoantígenos podía conducir a fenómenos de autoinmunidad, creyéndose ser éstos los principales responsables de provocar esclerosis múltiple (ver en posterior capítulo). Respecto al fenotipo T<sub>H</sub>2, se vio que siendo esenciales para la defensa de organismos extracelulares, su alteración estaba asociada a la aparición de alergias y enfermedades atópicas.

Con el paso de los años, se ha ido descubriendo no solo un mayor número de fenotipos de células T CD4, sino también su capacidad de producir enfermedad.

El fenotipo de célula T<sub>H</sub> más implicada en enfermedades autoinmunes, tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico, ha sido la célula T<sub>H</sub>17, de la cual hablaremos en sucesivos epígrafes. Sin embargo, no es el único subtipo celular implicado en dichas enfermedades. Como hemos visto, la célula T<sub>H</sub>1 fue desde un principio la señalada como responsable de inducir inmunidad organoespecífica; no obstante, tras el descubrimiento de nuevas líneas celulares, se ha visto que fenotipos como T<sub>H</sub>9 y T<sub>H</sub>22 se han asociado con la producción de enfermedades autoinmunes, aunque el papel de T<sub>H</sub>9 en la producción de enfermedades autoinmunes aún no está bien esclarecido. La relación de las células T reguladoras con la producción de enfermedades autoinmunes lo veremos en relación con las células T<sub>H</sub>17.

## II. DIFERENCIACIÓN FUNCIONAL DE LOS LINFOCITOS T<sub>H</sub>17

### 1. Descubrimiento de un nuevo fenotipo celular: células T<sub>H</sub>17.

La demostración de la existencia de distintos subtipos funcionales de linfocitos T CD4 (Mosmann *et al.*, 1986), supuso una revolución en el conocimiento del funcionamiento de la respuesta inmune adaptativa. Estas nuevas subpoblaciones, conocidas como linfocitos T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2, mediaban las respuestas de inmunidad celular y humoral, respectivamente, a través de la secreción de distintos perfiles de citocinas (T<sub>H</sub>1 secretaba IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , mientras que T<sub>H</sub>2 IL-4, IL-5 e IL-13). Más tarde, se comprobó la participación de estos subtipos celulares en distintas patologías: T<sub>H</sub>1 interviene en enfermedades autoinmunes, mientras que T<sub>H</sub>2 se asocia a enfermedades alérgicas y asma.

La observación de una aumentada prevalencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  en enfermedades autoinmunes, como en los modelos animales de esclerosis múltiple mediante la inducción de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), fomentó la hipótesis de la relevancia de las células T<sub>H</sub>1 en la patogénesis e inducción de dichas enfermedades. Apoyando esta teoría, aparecieron estudios demostrando una resistencia a la EAE en ratones deficientes en el factor STAT4 (Chitnis *et al.*, 2001) y de forma homocigota en el factor de transcripción T-bet (Bettelli *et al.*, 2004); además de una exacerbación de los síntomas y signos tras la administración de IFN- $\gamma$  en pacientes con esclerosis múltiple (Panitch *et al.*, 1987). Con este respaldo científico, el eje IL-12/T<sub>H</sub>1/IFN- $\gamma$  cobró un papel esencial en la patogénesis de la EAE/esclerosis múltiple.

Hoy día, la teoría de la participación de las células T<sub>H</sub>1 en el inicio de la patogénesis de las enfermedades autoinmunes ha sido desestimada debido a la aparición de diversos estudios, entre los cuales reseñamos los más importantes:

- A finales del siglo XX, aparecieron los primeros estudios que señalaban incongruencias en la participación de las células T<sub>H</sub>1, puesto que animales deficientes en la citocina IFN- $\gamma$  no demostraron ser resistentes, sino susceptibles al desarrollo de enfermedades autoinmunes, incluyendo EAE (Ferber, Brocke and Taylor-Edwards, 1996), uveítis experimental autoinmune

(Jones, Rizzo and Agarwal, 1997) y artritis inducida por colágeno (CIA) (Matthys *et al.*, 1998).

- Una de las líneas de evidencia que desestima la teoría de la implicación de las células T<sub>H</sub>1 en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes aparece con el estudio de la citocina IL-12, la cual, conformada por un heterodímero de las subunidades IL-12p40 e IL-12p35, promueve el desarrollo de las células T<sub>H</sub>1 y la expresión de IFN- $\gamma$  (Seder *et al.*, 1993; Trinchieri, 1995).

El estudio con ratones deficientes en las diferentes subunidades de la citocina IL-12 mostró resultados antagónicos: mientras que la deficiencia en la subunidad IL-12p40 presentaba una resistencia al desarrollo de la EAE; la ausencia de la subunidad IL-12p35 manifestaba una mayor susceptibilidad al desarrollo de dicha enfermedad. Este hecho permaneció indescifrable hasta el descubrimiento de una nueva citocina, la IL-23, la cual, está compuesta por la subunidad p40, compartida con la IL-12, y subunidad p19, específica de esta citocina (Oppmann *et al.*, 2000). Como cabría esperar, los ratones deficientes en la subunidad p19 mostraron una resistencia en el desarrollo de la EAE (Cua *et al.*, 2003).

Con todo esto, se concluyó que un mecanismo inmune independiente de la citocina IL-12 y la célula T<sub>H</sub>1 debía ser el responsable de la autoinmunidad mediada por células T CD4. Posteriormente, se observó que IL-23 participaba en la diferenciación de una subpoblación de linfocitos T<sub>H</sub> productores de IL-17, que ya había sido asociada años antes con reacciones de hipersensibilidad retardada y autoinmunidad (Langrish *et al.*, 2005). Este subtipo funcional de linfocitos T<sub>H</sub> productores de IL-17 se denominarán **linfocitos T<sub>H</sub>17**.

## **2. Mecanismo de diferenciación de las células T<sub>H</sub>17. Papel en la respuesta inmune.**

---

En 2005, dos grupos proporcionan la primera evidencia de la existencia de un nuevo subtipo de linfocito T CD4 productor de la citocina IL-17, cuyo mecanismo de generación es independiente de las citocinas y factores de transcripción necesarios en la diferenciación de T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2, denominado posteriormente **linfocito T<sub>H</sub>17** (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005).

Diferentes estudios nos ha permitido conocer el mecanismo de diferenciación de las células T<sub>H</sub>17. En presencia de hongos y bacterias extracelulares, se pone en marcha el proceso de diferenciación, el cual se desarrolla en tres fases (figura 3): diferenciación, amplificación y estabilización.

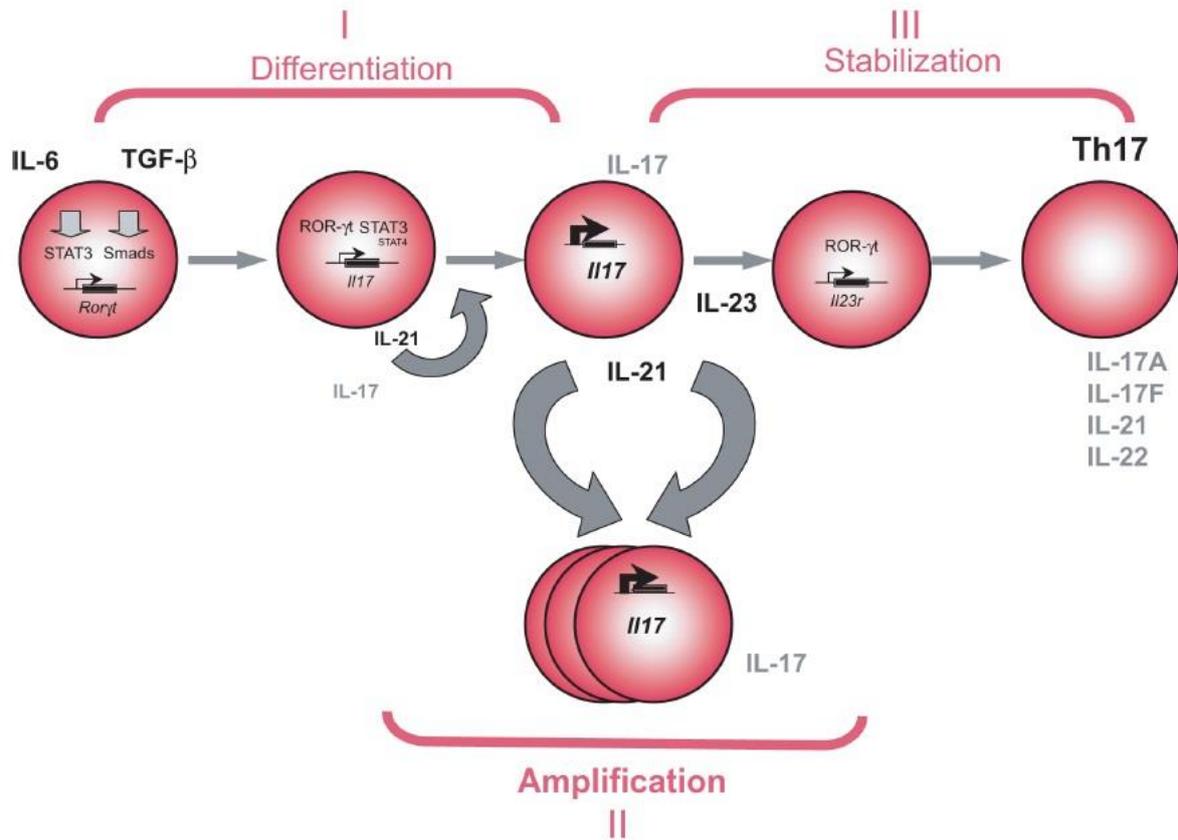
1. **Diferenciación inducida por TGF- $\beta$ 1 e IL-6.** TGF- $\beta$  se postuló como la citocina esencial en la diferenciación de dos subtipos celulares antagónicos, las células T<sub>H</sub>17 y las células Treg (figura 4).

La presencia de TGF- $\beta$  en altas concentraciones y en ausencia de otras citocinas proinflamatorias, dirige el proceso de diferenciación hacia el linaje Treg, a través de la inducción del factor de transcripción FoxP3 (Chen, Hardegen and

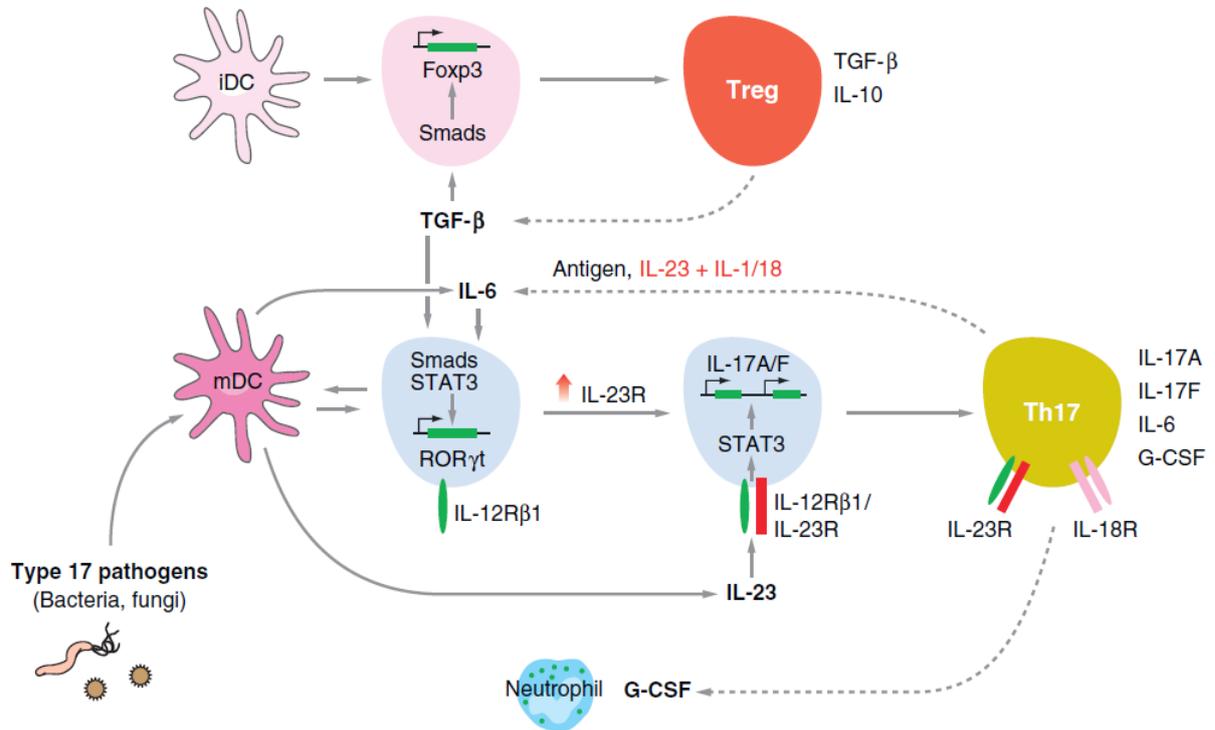
Al., 2003; Zhou, Lopes and Chong, 2008). No obstante, la existencia de bajas concentraciones de dicha citocina y la presencia de IL-6 en el medio debido a infección, inflamación o daño, inhibe la inducción de FoxP3 y simultáneamente induce la diferenciación fenotípica hacia el subtipo celular T<sub>H</sub>17. Este proceso es llevado a cabo tras la activación del factor STAT3 por parte de IL-6 e IL-21, mientras que TGF-β1 actúa de forma indirecta, puesto que no es activador de dicho factor, sino potenciador de su activación, si bien este hecho no está claramente dilucidado. La activación de STAT3 induce la activación del factor transcripción específico de linaje T<sub>H</sub>17, RORγt (Ivanov, McKenzie and Zhou, 2006; Yang, Pappu and Nurieva, 2008), que junto a la activación de RORα, dirige la diferenciación T<sub>H</sub>17 (la ausencia de dichos factores de transcripción suspende el desarrollo de células T<sub>H</sub>17); además, STAT3 estimula la producción de IL-21 y el aumento de expresión del receptor de IL-23 (IL-23R) (Bettelli, Carrier and Gao, 2006; Veldhoen, Hocking, Atkins, *et al.*, 2006; Zhou, Lopes and Chong, 2008), necesarios para las siguientes etapas de la diferenciación.

2. **Amplificación de la señal por IL-21.** Mientras que el mecanismo de diferenciación de los subtipos T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2 incluye la amplificación de los mismos gracias a la actuación de sus propias citocinas, IFNγ e IL-4, respectivamente, la principal citocina producida por las células T<sub>H</sub>17, IL-17, no es capaz de amplificar su diferenciación. Este paso es llevado a cabo por IL-21, producida en la primera etapa de la diferenciación fenotípica gracias a la presencia de TGF-β e IL-6. En este momento de la distinción fenotípica, IL-21 colabora tanto con TGF-β1 para amplificar la señal de diferenciación, como con IL-6 para la inducción de la expresión de IL-23R. De este modo, IL-21 no solo ayuda a la amplificación de la diferenciación T<sub>H</sub>17, sino que además ayuda a las células T<sub>H</sub>17 a alcanzar un fenotipo T<sub>H</sub>17 maduro.
3. **Estabilización de la señal mediada por IL-23.** La presencia de IL-6 e IL-21 favorecen la expresión de la cadena IL-23p19 en la superficie de la célula T<sub>H</sub>17 inmadura, que junto a la cadena IL-12p40, conforman el receptor de IL-23. La presencia de IL-23, producida principalmente por las APC, es necesaria para la expansión y mantenimiento de la población T<sub>H</sub>17 (Yang, Pappu and Nurieva, 2008).

Recientes estudios han observado la capacidad de diferenciación de células T CD4 naïve de ratones a células T<sub>H</sub>17 en ausencia de TGF-β1, siendo las células resultantes más proclives a la inducción de inflamación tisular autoinmune. Por una parte, se observó que ni la presencia exclusiva de IL-6 o IL-23 son capaces de generar una señal T<sub>H</sub>17, sin embargo, la combinación de dichas citocinas junto a IL-1β es capaz de dirigir la diferenciación fenotípica hacia T<sub>H</sub>17 en ausencia de TGF-β. Así mismo, la diferenciación T<sub>H</sub>17 puede ser ejecutada gracias a la combinación de TGF-β3 e IL-6 (Ghoreschi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012). El descubrimiento de estos diferentes patrones de citocinas involucradas en la diferenciación fenotípica de T<sub>H</sub>17, sugiere la existencia de diferentes subtipos de células T<sub>H</sub>17.



**Figura 3. Papel secuencial de las citocinas implicadas en la diferenciación fenotípica de T<sub>H</sub>17** (figura modificada de (Bettelli, Korn and Kuchroo, 2007)). IL-6 es la citocina responsable de iniciar el programa de diferenciación del fenotipo T<sub>H</sub>17, debido a que su presencia en el medio junto TGF- $\beta$ , activa el factor de transcripción intracelular STAT3, permitiendo así la inducción de IL-21. IL-21, estimula su propia producción de una forma autocrina a través de STAT3, y además, permite la activación de la expresión de IL-23R junto con IL-6, proceso dependiente de STAT3 y ROR $\gamma$ t. Una vez la célula T expresa IL-23R, IL-23 puede unirse a su receptor, facilitando así la inducción de ROR $\gamma$ t, lo que permitirá aumentar la expresión de IL-23R. Todas las vías de las citocinas involucradas en la diferenciación de la célula T<sub>H</sub>17 resultan en una regulación positiva de la expresión de ROR $\gamma$ t (factor de regulación maestro de la diferenciación T<sub>H</sub>17), además de la activación de STAT3, el cual se une de forma directa a los promotores de IL-17 e IL-21.



**Figura 4. Modelo de la diferenciación de las células  $T_H17$  y Treg** (Weaver *et al.*, 2007). La diferenciación de las células  $T_H17$  y Treg tienen un requisito común, la presencia de TGF- $\beta$  en el medio; no obstante, su diferenciación fenotípica variará según la presencia o no de determinadas sustancias. La interacción de una célula T naïve junto a una APC inmadura ante la presencia de patógenos, tales como bacterias y hongos, induce la diferenciación fenotípica hacia Treg gracias a la expresión de FoxP3 en presencia de TGF- $\beta$ . Sin embargo, si esta misma presentación se realiza en presencia de una APC madura, esta es capaz de producir IL-6, que junto a TGF- $\beta$ , induce la expresión de ROR $\gamma$ t y del receptor de IL23, permitiendo así la diferenciación hacia un linaje  $T_H17$  y la expresión de sus citocinas características.

La diferenciación funcional de las células  $T_H17$  va a ocurrir predominantemente en la lámina propia del tracto gastrointestinal, donde se van a poner en contacto células de la respuesta inmune con bacterias extracelulares y hongos, preferentemente. Además, se ha observado la presencia de esta subpoblación linfocítica en otros lugares del organismo, tales como la vía aérea, los pulmones y la piel. Ante estos estímulos, la célula  $T_H17$  diferenciada se va a caracterizar por la producción de citocinas proinflamatorias, incluyendo las citocinas IL-17, IL-21 e IL-22:

- Dentro de la familia de las citocinas IL-17, IL-17A (conocida como IL-17), es la citocina característica de las células  $T_H17$ , descubierta en 1993 como una nueva citocina clonada a partir de linfocitos T citotóxicos activados, siendo denominada CTLA8 (Rouvier *et al.*, 1993). A partir de este descubrimiento, un total de seis miembros de la familia fueron descubiertos y nombrados IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (también denominada IL-25) e IL-17F.

La producción de esta familia de citocinas es llevada a cabo principalmente por los linfocitos T<sub>H</sub>17, aunque se va observado su expresión en otras células de la respuesta inmune, entre ellas las células  $\gamma\delta$ , las células NK y los macrófagos.

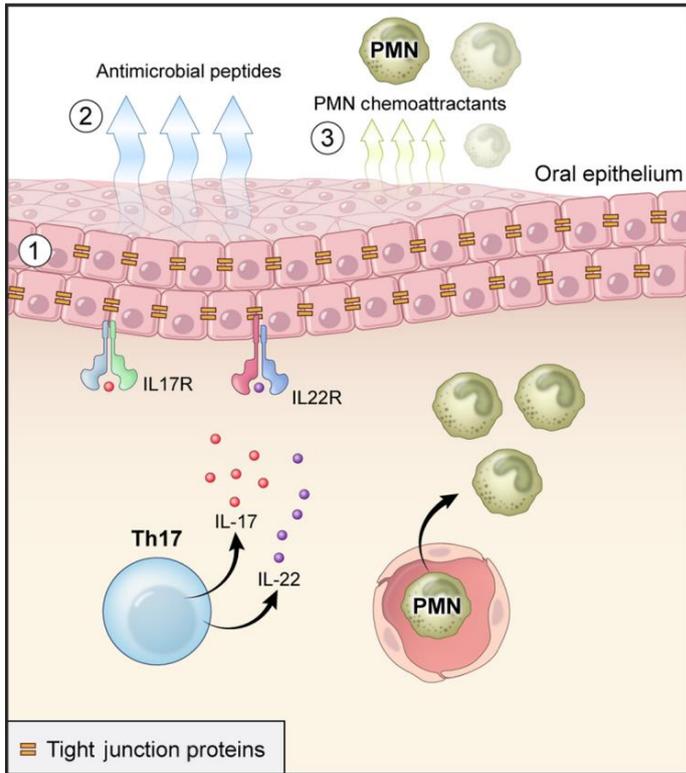
Hasta la fecha, la mayoría de estudios se han centrado en tres citocinas de esta familia: IL-17A, IL-17E e IL-17F. La principal función de estas tres moléculas es la quimiotáxis de diferentes tipos celulares a través de la inducción de otras citocinas y quimiocinas. Mientras que IL-17E induce la expresión de citocinas del fenotipo T<sub>H</sub>2 jugando un papel en las respuestas alérgicas tipo T<sub>H</sub>2; IL-17A e IL-17F realizan una función similar, puesto que su actuación la realizan a través de un mismo receptor, IL17RA. Tanto IL-17A como IL-17F, tienen propiedades proinflamatorias:

- Induce la expresión de citocinas (como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ ) y quimiocinas (factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (Matthys *et al.*, 1998)(Parsonage *et al.*, 2008), CXCL1, CXCL2 y CXCL5), capaces de atraer y activar a células polimorfonucleares. Otras quimiocinas capaces de ser activadas por IL-17 son las responsables de la atracción de linfocitos, células dendríticas y otras células del sistema inmune (CXCL9, CXCL10 y CCL20).
- La regulación de la liberación de péptidos antimicrobianos, capaces de eliminar los microorganismos invasores, está fuertemente influenciada por IL-17. Además, algunas de las quimiocinas activadas por IL-17, como CCL20, son capaces de mostrar una actividad antimicrobiana (Yang *et al.*, 2003; Kolls, McCray and Chan, 2008).

Por otra parte, IL-17 ejerce otras funciones no inflamatorias, como son el mantenimiento de la integridad de la pared celular regulando las uniones estrechas de las células epiteliales, con el fin de conservar la funcionalidad de la barrera e impedir la entrada del contenido luminal intestinal y los microorganismos comensales; y por otra parte, media la formación de tejidos linfoides secundarios tras una infección local (Rangel-Moreno *et al.*, 2011) (figura 5).

- IL-22 es una citocina perteneciente a la familia de IL-10, con capacidad para inducir la expresión de péptidos antimicrobianos en el intestino e incrementar la proliferación de las células del epitelio intestinal ante la presencia de patógenos, con el fin de ayudar a prevenir el daño tisular así como su reparación. No obstante, aunque su papel en estos casos sirve para controlar una excesiva inflamación, se ha comprobado que también posee un efecto pro-inflamatorio en diferentes enfermedades (ejemplos de ello son la psoriasis, artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras). Quizás este papel proinflamatorio de IL-22 esté en relación con su regulación por parte de IL-23 (Liang *et al.*, 2006).

- IL-21, además de ser una citocina amplificadora de la diferenciación de los linfocitos  $T_H17$ , tiene funciones pleitrópicas, entre las que se encuentran la activación de las células T, la inducción de la diferenciación de las células B a células plasmáticas y memoria y la activación de las células NK (Leonard and Spolski, 2005; Korn, Bettelli, *et al.*, 2007).



**Figura 5. IL-17 es esencial en el mantenimiento de la integridad de la mucosa y la inmunovigilancia.** Las células  $T_H17$  ejercen un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la barrera mucosa principalmente a través de su citocina efectora, IL-17, aunque también a través de IL-22. A su vez, IL-17 realiza funciones clave en la vigilancia de las mucosas, como son (1) la regulación de la expresión de uniones estrechas, (2) la inducción de péptidos antimicrobianos y (3) la liberaciones de quimiocinas capaces de atraer PMN (Abusleme and Moutsopoulos, 2016)

### 3. La implicación de las células $T_H17$ en patología.

Inicialmente, las células  $T_H1$  se consideraron primordiales en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes, hecho basado en la observación de que las células  $T_H1$  predominaban en los lugares de inflamación durante las enfermedades autoinmunes. Tras el descubrimiento de los linfocitos  $T_H17$  y su relación con IL-23, se concluyó que las células  $T_H17$  no solo tienen un papel importante en la defensa del organismo frente a infecciones, si no que se ha comprobado su importancia tanto en la inducción y propagación de la autoinmunidad en modelos animales así como en enfermedades autoinmunes humanas, tales como la psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, diabetes tipo 1 y esclerosis múltiple (Zenobia and Hajishengallis, 2000; Gaffen *et al.*, 2014).

La importancia de los linfocitos  $T_H17$  en enfermedades autoinmunes fue demostrada en estudios llevados a cabo en ratones, donde la pérdida de IL-17A, IL-17F o sus receptores, bien de forma aislada o en combinación, les hacía resistentes al desarrollo de enfermedades autoinmunes, entre las que se incluye EAE y CIA (Nakae *et al.*, 2003; Komiyama *et al.*, 2006)

Además de su papel en la inducción de enfermedades autoinmunes en modelos experimentales, tanto las células T<sub>H</sub>17 como IL-17 han sido implicadas en enfermedades autoinmunes e inflamatorias en humanos:

- » Las células T<sub>H</sub>17 infiltran con una alta frecuencia las articulaciones afectas en pacientes con artritis reumatoide; además, IL-17 activa osteoclastos que inducen una mayor reabsorción y erosión ósea (Miossec, Korn and Kuchroo, 2009).
- » IL-17 ha sido identificada en lesiones de diversas enfermedades, tales como psoriasis, síndrome de Sjögren, enfermedad inflamatoria intestinal y esclerosis múltiple (Teunissen *et al.*, 1998; Kotake *et al.*, 1999; Lock *et al.*, 2002; Fujino *et al.*, 2003).
- » En las enfermedades autoinmunes del sistema nervioso central, las células T<sub>H</sub>17 constituyen el subtipo celular T patogénico capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) (Kebir *et al.*, 2007).

Asimismo, otros datos que avalan la relación entre el fenotipo T<sub>H</sub>17 y la inducción de enfermedades autoinmunes e inflamatorias son los estudios genéticos en enfermedades autoinmunes humanas. Estudios de asociación del genoma completo (GWAS), revelaron un aumento de la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes, como psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn y esclerosis múltiple en aquellas personas que presentaban polimorfismos del receptor de IL-23 (Duerr *et al.*, 2006; Control *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008).

La importancia de la participación de las células T<sub>H</sub>17 en la patología autoinmune, y en este caso, en el desarrollo de la esclerosis múltiple/EAE, ha fomentado una gran investigación científica acerca del proceso patogénico de dichas células, así como posibles vías de actuación que puedan frenar el proceso. De estas cuestiones hablaremos en el próximo capítulo.

#### **4. Plasticidad de la respuesta inmune.**

---

En la década de 1980, se aceptó que la diferenciación de los linfocitos T CD4 hacia las subpoblaciones T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2 era un fenómeno irreversible y que estas poblaciones eran fenotípica y funcionalmente estables. Este concepto se mantuvo inicialmente tras el descubrimiento de nuevas poblaciones de T<sub>H</sub>. Sin embargo, son múltiples las evidencias que muestran que las poblaciones T<sub>H</sub> son de hecho tremendamente plásticas (Zhou, Chong and Littman, 2009; O'Shea and Paul, 2010). Ejemplos de esto lo encontramos en:

- IL-10 se pensó que era una citocina expresada por T<sub>H</sub>2. No obstante, se ha demostrado su producción en distintos fenotipos, tales como T<sub>H</sub>1, Treg y T<sub>H</sub>17. Lo mismo ocurre con la producción de IL-9, que aunque en su origen era expresada por T<sub>H</sub>2, posteriormente se ha observado su expresión en células T<sub>H</sub>17 y T<sub>H</sub>9.
- Las células T<sub>H</sub>17 pueden adquirir el potencial de expresar simultáneamente IFN- $\gamma$  e IL-17, especialmente in vivo (Wilson *et al.*, 2007), incluso se ha observado la capacidad de las células T<sub>H</sub>17 de apagar la producción de su citocina característica y convertirse en células productoras de IFN- $\gamma$  (Shi *et al.*, 2008; Lee,

Turner, *et al.*, 2009). Mientras que IL-22 ha sido una citocina característica de la diferenciación T<sub>H</sub>17, en los últimos años se ha comprobado la existencia de un subtipo celular capaz de generar IL-22 pero no IL-17 (Duhén *et al.*, 2009; Trifari *et al.*, 2009).

- Aunque no se ha demostrado la conversión del fenotipo T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>17, bajo unas circunstancias adecuadas, las células T<sub>H</sub>1 puede llegar a expresar IL-23.

Otro de los grandes descubrimientos en torno a la diferenciación de las células T CD4 es la capacidad de éstas de expresar más de un factor de transcripción específico de linaje (O'Shea and Paul, 2010). Un ejemplo de este proceso es el descubrimiento de la capacidad de las células FoxP3<sup>+</sup> Treg pueden expresar T-bet, Gata3, ROR $\gamma$ t y Bcl6:

- » La presencia de IFN- $\gamma$  en el medio, hace que algunas de las células Treg expresen el factor de transcripción T-bet, promoviendo así la presencia de estas células en lugares de inflamación (Koch *et al.*, 2009).
- » La expresión del factor de transcripción GATA3 en células Treg se produce en aquellos lugares del organismo que actúan como barrera, como el tracto gastrointestinal y la piel. No obstante, su producción también es estimulada en presencia de IL-2 (Wang, Su and Wan, 2011; Wohlfert *et al.*, 2011). La expresión de estas células es necesaria durante la respuesta inflamatoria donde se mantiene la expresión de FoxP3 y se limita la conversión de las células Treg en otro fenotipo T efector.
- » Un número considerable de células T CD4 son capaces de expresar simultáneamente FoxP3 y ROR $\gamma$ t. La diferenciación hacia un subtipo celular u otro se efectuará según el ambiente de citocinas presente en dicho momento (Lee, Mukasa, *et al.*, 2009): la presencia de concentraciones elevadas de TGF- $\beta$  canalizará el proceso de diferenciación hacia Treg, mientras que bajos niveles de TGF- $\beta$  junto a la presencia de citocinas proinflamatorias, como IL-6, IL-21 e IL-23, promueven la inducción de ROR $\gamma$ t y la diferenciación al fenotipo T<sub>H</sub>17.
- » Las células FoxP3 pueden adquirir el fenotipo de células T foliculares en las placas de Peyer del intestino, gracias a la expresión del factor de transcripción Bcl6 (Chung *et al.*, 2011).

En su conjunto, estos datos aportados sobre la diferenciación de las células T CD4 ha provocado la aparición de un nuevo concepto, la **plasticidad celular**, entendido como la capacidad de un linfocito T CD4 de adquirir las características de algunos subtipos de células T CD4 simultáneamente o en momentos diferentes durante su ciclo de vida. Esta nueva propiedad de las células T CD4 parece contribuir tanto a la defensa inmune del organismo frente a microorganismos, así como jugar un papel importante en el desarrollo de autoinmunidad.

### III. PAPEL DEL SISTEMA INMUNE EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Las respuestas inmunes contra los antígenos propios del sistema nervioso central (SNC) son el fundamento de varias enfermedades, como la esclerosis múltiple (EM), la neuromielitis óptica y la encefalomiелitis aguda diseminada. La EM es una enfermedad crónica, desmielinizante, inflamatoria y degenerativa del SNC que afecta aproximadamente a 2-2.5 millones de personas en todo el mundo y que conduce a una discapacidad progresiva crónica en la mayoría de los casos (Milo and Kahana, 2010). La EM es una enfermedad heterogénea, tanto clínica como histopatológicamente, sugiriendo la participación de diferentes células efectoras y mecanismos moleculares en la inducción de la destrucción tisular (Lucchinetti *et al.*, 2000). Entre las formas clínicas de la EM encontramos:

- La forma **recurrente – remitente** en un 80-85% de los casos los pacientes, caracterizada por episodios recurrentes y transitorios de discapacidad, incluyendo pérdida de visión, equilibrio y movilidad; así como por síntomas sensitivos dolorosos.
- De los pacientes que padecen una forma clínica recurrente – remitente, al cabo de 10 – 15 años, la mitad de ellos van a empezar a progresar de una forma continua más o menos rápida, conocida como forma **secundaria progresiva**.
- Una proporción no desdeñable de pacientes con EM experimentará una progresión constante de la enfermedad (forma **primaria progresiva**), lo que conducirá a fatiga extrema, deterioro de la cognición y parálisis.

La EM tiene enormes cargas, tanto físicas como psicosociales y económicas, no sólo para los pacientes, sino también para sus familias, puesto que el debut de esta enfermedad se encuentra entre la segunda y tercera década de la vida.

A día de hoy, la etiología de esta enfermedad incapacitante sigue sin conocerse. Sin embargo, es indudable que tanto los factores genéticos como ambientales (y quizás infecciones), juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Martin, McFarland and McFarlin, 1992; Sadovnick and Ebers, 1993). La presencia de infiltrados de células mononucleares perivasculares y desmielinización en las lesiones cerebrales tanto de pacientes con EM como de modelos animales, han llevado la hipótesis, generalmente aceptada, de que la enfermedad está mediada inmunológicamente por células T patogénicas frente a antígenos de la mielina (Compston and Coles, 2008).

En este capítulo, se recogen las principales evidencias de la hipótesis autoinmune de la EM, tanto en los distintos modelos animales de la enfermedad, como aquellos hallazgos encontrados en los seres humanos.

#### 1. Modelo animal para comprender la EM: EAE.

---

El avance en el desarrollo de la hipótesis inmunológica en la EM se ha debido a los estudios llevados a cabo en modelos animales capaces de simular tanto las características clínicas como histopatológicas de la inflamación desmielinizante del SNC. El modelo

animal preferido de la EM es la **encefalomielitis autoinmune experimental** (EAE), capaz de imitar varios aspectos de la EM humana (Gold, Linington and Lassmann, 2006), lo que ha permitido proponer una teoría inmunológica común a ambas enfermedades, donde la presencia de células T CD4 reactivas específicas del SNC desencadenan una cascada de eventos dando lugar a inflamación, desmielinización y finalmente neurodegeneración (Martin and McFarland, 1995).

Aunque la EAE presenta ciertas limitaciones como modelo de la EM (diferencias entre especies, modo de desarrollo de la enfermedad, variabilidad de manifestaciones tanto clínicas como patológicas, etc...), ésta se considera una herramienta inestimable para comprender la fisiopatología de la enfermedad, si bien es cierto que a día de hoy no existe un modelo único que abarque el espectro completo de la EM.

De una forma histórica, la EAE puede inducirse en ratones con diferentes antecedentes genéticos, tales como SJL/J, C57BL/6 y NOD, ya sea mediante inmunización activa con proteína o péptido, o mediante transferencia pasiva de células T encefalitogénicas. En los últimos años han surgido nuevos modelos, entre los que destaca el modelo espontáneo de EAE. En todos ellos, el fenotipo clínico resultante de la EAE depende principalmente de la fuente de antígeno y del trasfondo genético de la especie y cepa animal. La EAE ha sido inducida en numerosas cepas de animales susceptibles, sin embargo, desde mediados de los años 60 se ha priorizado el empleo de ratones y ratas para evaluar tanto la EAE recurrente-remitente como la crónica progresiva, en parte debido a la disponibilidad de diferentes cepas genéticas de dichos animales.

La EAE fue inducida por primera vez, aunque de forma involuntaria, en seres humanos tras la administración de una vacuna antirrábica creada por Louis Pasteur en la década de 1880 (Stuart and Krikorian, 1928), en forma de un trastorno neuromuscular agudo conocido como encefalomielitis diseminada aguda. El hecho de que dicha vacuna consistiera en el virus de la rabia inactivado cultivado en tejido del SNC de conejos infectados y que la clínica que presentaban los pacientes no concordase con las manifestaciones típicas de la rabia, llevó al planteamiento de que esa clínica incapacitante que presentaban los pacientes tras la administración de la vacuna, pudiera ser causada por componentes del SNC del conejo que hubiesen contaminado la vacuna. Posteriormente, se demostró que este trastorno post-vacunación antirrábica estaba asociado con componentes de la médula espinal presentes en el inóculo, principalmente con la **proteína básica de la mielina** (MBP), que a principios de la década de 1960 se demostró su capacidad encefalitogénica (Laatsch *et al.*, 1962). Los numerosos estudios realizados con la MBP han contribuido inmensamente a la comprensión que hoy día tenemos sobre la patogénesis de la EM, tal y como se expone a continuación.

El primer estudio experimental que reprodujo la EAE en animales fue llevado a cabo por Levine y Sowinski (Levine and Sowinski, 1973), tras la inmunización con tejido neural completo. Posteriormente, se observó la inducción de la EAE tras la inmunización con MBP en diferentes cepas de ratones (Bernard and Carnegie, 1975; Pettinelli *et al.*, 1982) y se demostró que un péptido derivado del extremo N-terminal acetilado de MBP era suficiente para inducir EAE (Zamvil *et al.*, 1986). Estos resultados plantearon a la MBP como el único antígeno encefalitogénico en la EM y por consiguiente, a la EM como enfermedad autoinmune del SNC dirigida contra la MBP.

A principios de los años 80, Ben-Nun *et al.* describieron la primera selección *ex vivo* de células T patogénicas reactivas a MBP procedentes de nódulos linfáticos de ratas previamente inmunizadas y su posterior expansión *in vitro*, dando como resultado líneas de células T CD4 con reactividad exclusiva frente a MBP, y su capacidad encefalitogénica de provocar una EAE aguda con parálisis ascendente caudo-rostral severa (Ben-Nun, Wekerle and Cohen, 1981a, 1981b) tras su inyección en ratas singénicas naïve, previa activación por su antígeno específico (Naparstek *et al.*, 1983). Estos hallazgos indicaron por primera vez que las células T CD4 reactivas a antígenos del SNC por sí solas, tras su activación, eran suficientes para iniciar el desarrollo de una enfermedad en modelos animales con una clínica y patología similar a la EM, lo que supuso un respaldo en la hipótesis de la implicación de células T específicas del SNC en la patogénesis de la EM, y por tanto, el apoyo de la teoría inmunológica de la EM.

Otro hallazgo importante en estos estudios fue la demostración de la capacidad de selección de células T potencialmente patogénicas específicas de MBP de ratones naïve (Schluesener and Wekerle, 1985), que tras su activación, podían inducir el desarrollo de EAE en receptores singénicos naïve. Estos hallazgos, apoyaron el concepto de la presencia de clones de células T autoinmunes quiescentes potencialmente patógenos en el SI normal, que tras su activación aberrante inducen enfermedades autoinmunes.

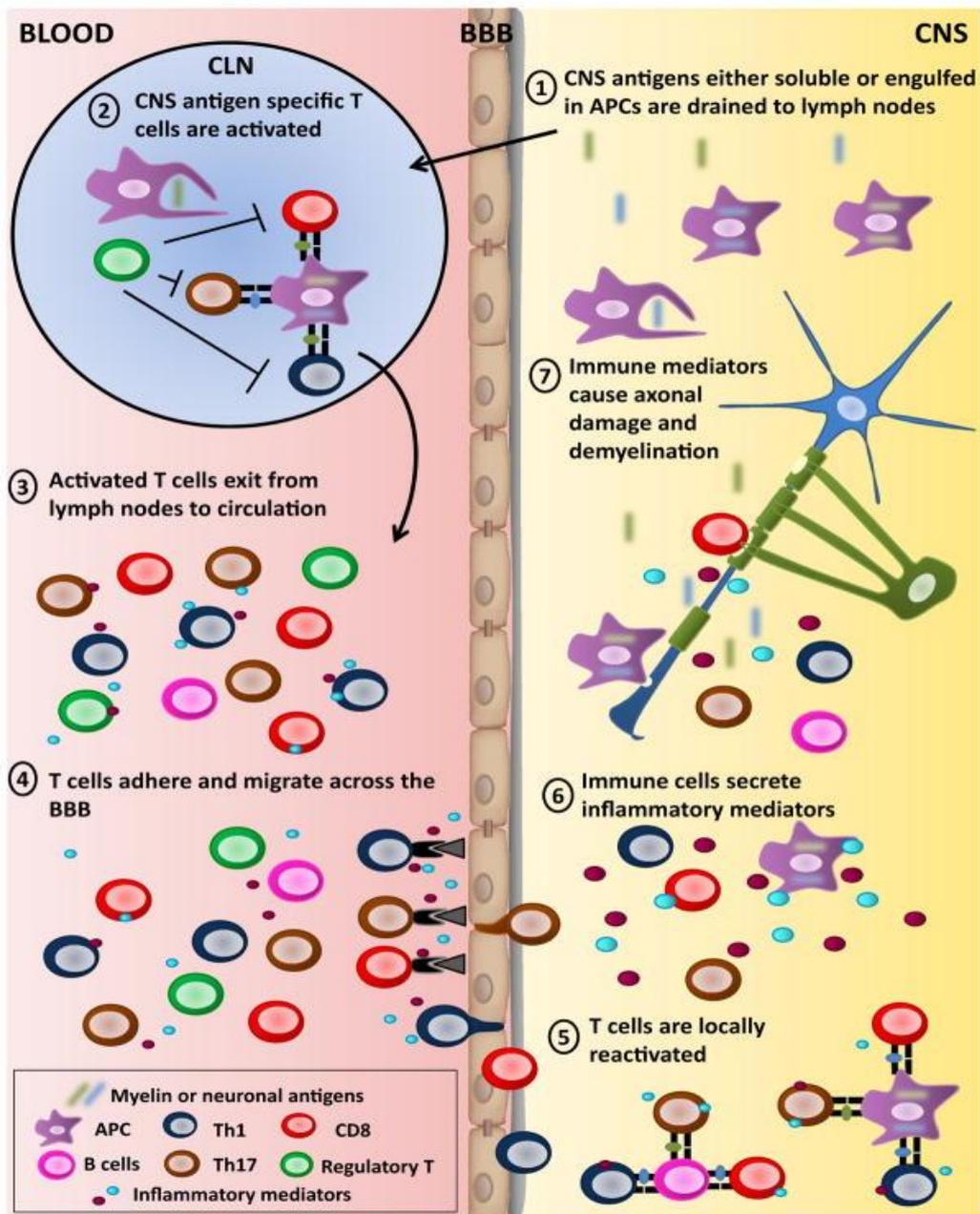
Durante muchos años, la existencia de distintos componentes de la mielina con capacidad encefalitogénica, como la **proteína proteolipídica (PLP)** (Waksman *et al.*, 1954), se consideraban contaminaciones con MBP, siendo ésta considerada como única proteína del SNC encefalitogénica y única diana de la EM. A mediados de los años 80, se demostró la capacidad encefalitogénica de PLP purificada (Williams *et al.*, 1982; Sobel, van der Veen and Lees, 1986), aunque dicha capacidad fue finalmente reconocida cuando se consiguieron aislar células T reactivas frente a PLP que no mostraban reactividad cruzada con MBP (Sato *et al.*, 1987). Posteriormente, la identificación del epítipo inmunodominante de PLP, PLP<sub>139-151</sub>, demostró su capacidad encefalitogénica en ratones (Tuohy *et al.*, 1988). La inmunización activa de ratones con PLP<sub>139-151</sub> o mediante transferencia pasiva de células T CD4 inmunizadas frente a PLP<sub>139-151</sub> inducía un curso de la enfermedad recurrente – remitente, utilizado de manera rutinaria como un modelo experimental de enfermedad recurrente – remitente tipo EM.

Aunque la investigación sobre MBP y PLP como antígenos diana de la EM aportó una gran información, diferentes estudios demostraban que una proporción significativa de pacientes con EM no exhibían reactividad frente a los mismos. Esto condujo a una fase de investigación, en donde se examinaron diferentes antígenos mielínicos y no mielínicos del SNC en su posible papel en la iniciación de la EM. Finalmente, además de MBP y PLP, hasta el momento sólo MOG (glicoproteína de la mielina del oligodendrocito), MOBP (proteína mielínica básica asociada a oligodendrocitos) y OSP/claudin-11 han demostrado causar una EAE en animales de laboratorio (Kaye *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000) siendo antígenos diana de células T autoinmunes en pacientes con EM (Kerlero de Rosbo *et al.*, 1993; Holz *et al.*, 2000; Vu *et al.*, 2001), y por lo tanto pueden considerarse como antígenos diana primarios en la EM.

De los antígenos del SNC más recientemente definidos en la EM, **MOG** ha sobresalido como uno de los más importantes. La importancia MOG en la patogénesis de la EM,

aparece tras el estudio de la respuesta proliferativa de células T a MBP, PLP, MAG y MOG (Kerlero de Rosbo *et al.*, 1993), con el fin de evaluar la contribución relativa de cada uno de los antígenos a la autorreactividad de las células T. Los resultados mostraron una reactividad de células T predominantemente frente a MOG. Subsiguientes estudios corroboraron la respuesta predominante a MOG en la EM (Wallstrom *et al.*, 1998; Saez-Torres *et al.*, 2002). Se definieron regiones de MOG que contenían epítomos para las células T, y uno de ellos, MOG<sub>35-55</sub>, se estableció como epítomo encefalitogénico, siendo el causante del desarrollo de una EAE crónica recurrente, con una expresión y progresión del deterioro neurológico impredecibles (Kerlero de Rosbo, Mendel and Ben-Nun, 1995), recordando más a la EM que la parálisis ascendente caudo-rostral observada en la EAE inducida por MBP o PLP.

El aislamiento de células T CD4 encefalitogénicas y su propagación abrió el camino a estudios detallados sobre el comportamiento de los linfocitos autoinmunes en el desarrollo de la EAE (figura 6) (Legroux and Arbour, 2015). Mientras que las células T CD4 reactivas contra Ag específicos del SNC se encuentran de forma habitual en la población sana, se desconoce el mecanismo por el cual se activan y dirigen al SNC. Una de las teorías propuestas incluye la activación de dichas células en los ganglios linfáticos, debido a la presencia en éstos de células APC maduras procedentes del SNC. Mientras que el encéfalo y la médula espinal no contienen canales linfáticos definidos, el drenaje linfático del SNC ocurre a través de la vía rostral migratoria hacia los ganglios linfáticos cervicales. Esta vía sería la utilizada por las APC para alcanzar dichos lugares desde el SNC y así poder interactuar con los linfocitos T reactivos. Una vez se ha producido la interacción APC – linfocito T CD4, se produce su activación y expansión clonal. Posteriormente, estos linfocitos T CD4 activados van a pasar al torrente sanguíneo, donde modificarán su fenotipo, aumentando la expresión de receptores de quimiocinas, moléculas de adhesión, integrinas, metaloproteinasas de la matriz y especies reactivas de oxígeno que le permite la adhesión al endotelio de la BHE y su extravasación al SNC. Una vez han atravesado la barrera, estas células T CD4 se van a reactivar tras su interacción con APC maduras presentes en el medio (fundamentalmente la microglía y quizá los astrocitos por su capacidad de expresar MHC-II). Esta reactivación, genera una serie de acontecimientos mediados tanto por citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y que dañan las estructuras nerviosas (oligodendrocitos/mielina y axones/neuronas). Este daño causado, va a potenciar la liberación de Ag del SNC adicionales, que pueden ser fagocitados y presentados a nuevas oleadas de linfocitos T CD4 específicos del SNC.



**Figura 6. Activación y funciones de los linfocitos T en la patogénesis de la EM y EAE** (Legroux and Arbour, 2015). Antígenos solubles del SNC o las APC maduras que han fagocitado Ag neuronales o mielina son capaces de viajar desde el SNC hasta nódulos linfáticos, donde activan linfocitos T reactivos. Estos linfocitos T, una vez activados, son capaces de penetrar en el torrente sanguíneo y cruzar la BHE gracias a la expresión de diferentes mediadores. Una vez penetran la barrera, estos linfocitos T reactivos pueden ser activados por APC locales, siendo el resultado de esta interacción una invasión por parte de los mismos del parénquima nervioso y la posterior secreción de diferentes mediadores capaces de dañar las diferentes estructuras del SNC. Este daño ocasionado va a conllevar la liberación de Ag adicionales del SNC que pueden ser fagocitados y presentados a nuevas oleadas de linfocitos T específicos del SNC.

Mientras que estos modelos de EAE activamente inducidos y pasivamente transferidos han sido útiles para conocer la patogénesis de la enfermedad, no han resultado

beneficiosos en el estudio de las fases iniciales de las respuestas autoinmunes del SNC. Una alternativa a estos modelos fueron los ratones transgénicos que sobreexpresan receptores de células T o B específicos de mielina, capaces de desarrollar síntomas neurológicos espontáneos, conocidos como **modelos espontáneos de EAE**. El primer modelo de ratón transgénico específico de la mielina fue desarrollado por Goverman et al., capaz de expresar un TCR específico de MBP en la mayoría de sus células T (Goverman et al., 1993). Posteriores estudios fueron realizados con ratones modificados genéticamente capaces de expresar un TCR específico, bien de PLP<sub>139-151</sub> o de MOG<sub>35-55</sub>. Esta EAE espontánea observada en estos modelos transgénicos con TCR específicos de antígenos del SNC, indicaba que las células T eran las principales responsables de la autoinmunidad en el SNC. Sin embargo, estos modelos espontáneos han tenido un papel importante en la investigación del papel de la microbiota intestinal en la inducción de inflamación cerebral (Berer, Mues, Koutrolas, Z. Rasbi, et al., 2011).

## **2. Principales ideas derivadas del uso de modelos EAE.**

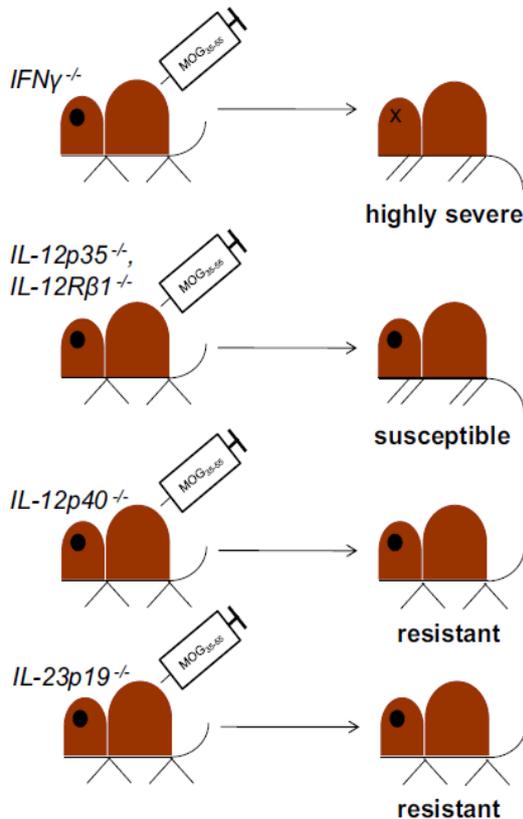
---

La descripción hace más de 30 años de dos subtipos de células T CD4 en base a la producción de citoquinas, supuso una revolución en el entendimiento de la inmunidad adaptativa, demostrando la capacidad de las células T<sub>H1</sub> de producir IFN- $\gamma$  e IL-2, mientras que las células T<sub>H2</sub> se describían como productoras de interleucina, IL-4, IL-5 e IL-13 (Mosmann et al., 1986; Cherwinski et al., 1987). Así mismo, se demostró que las células T<sub>H1</sub> eliminaban patógenos intracelulares, mientras que las células T<sub>H2</sub> eliminaban patógenos extracelulares e infecciones parasitarias (Lucey, 1999). En el contexto de la autoinmunidad, se pensó que la respuesta T<sub>H1</sub> promovía la patología, mientras que la T<sub>H2</sub> la inhibía (Adorini, Guery and Trembleau, 1996).

Una serie de estudios mostraron que las células T<sub>H1</sub> específicas de la mielina, pero no T<sub>H2</sub>, eran capaces de inducir la EAE tras la transferencia pasiva de las mismas. Estos hallazgos, junto con la expresión de la citoquina principal de T<sub>H1</sub>, IFN- $\gamma$ , en las lesiones del SNC en la EAE, ayudaron a construir el paradigma de que la EAE era una enfermedad mediada por T<sub>H1</sub>. Estudios posteriores mostraron que ratones deficientes en IFN- $\gamma$  desarrollaban una EAE más severa (Ferber, Brocke and Taylor-Edwards, 1996; Krakowski and Owens, 1996; Chu, Wittmer and Dalton, 2000), mientras que la interrupción del factor de transcripción de T-bet (Bettelli et al., 2004) y la deficiencia en una subunidad de la IL-12 (IL-12p40) (Becher, Durell and Noelle, 2002), factores clave en la diferenciación del fenotipo T<sub>H1</sub>, hacía a los ratones completamente resistentes a la EAE.

Esta controversia en cuanto a la participación de las células T<sub>H1</sub> en las enfermedades autoinmunes, comenzó a resolverse tras el descubrimiento de la citoquina IL-23, un heterodímero formado por la subunidad p40 de la IL-12 con una nueva subunidad, p19 (Oppmann et al., 2000). Así, la resistencia de ratones deficientes en IL-12p40 a la EAE podría ser reinterpretada, demostrando un papel crítico de IL-23 y no IL-12. De hecho, los ratones deficientes en la vía de señalización de IL-12, bien por la falta en la otra subunidad de IL-12, IL-12p35, como en el receptor de IL-12, eran susceptibles al desarrollo de la EAE tras la inmunización activa con MOG<sub>35-55</sub>, mientras que aquellos ratones deficientes en la subunidad IL-23p19 eran resistentes (Cua et al., 2003). Por tanto, los resultados obtenidos en los distintos modelos de EAE insinuaban la existencia

de un subconjunto de células T<sub>H</sub> distinto, potencialmente inducido por la IL-23, que podría promover la autoinmunidad (resumido en la figura 7).



**Figura 7. Empleo de la inmunización activa con MOG<sub>35-55</sub> en cepas de ratones con genes *knockout* para el conocimiento de la autoinmunidad del SNC** (Rangacharia and Kuchroo, 2013). Ratones deficientes en IFN- $\gamma$  desarrollaban una enfermedad muy grave, a pesar del papel de dicha citoquina en la respuesta T<sub>H</sub>1. Además, la deficiencia en IL-12p35 y del receptor de IL-12, careciendo así de la señalización necesaria para la diferenciación de T<sub>H</sub>1 a través de la deficiencia de IL-12, demostraban una mayor susceptibilidad al desarrollo de la EAE; mientras que ratones deficientes en la subunidad IL-12p40, mostraron resistencia a la enfermedad. Finalmente, la deficiencia en ratones en la subunidad IL-23p19, que carecen de IL-23 exclusivamente, son resistentes a la EAE. Por tanto, las respuestas dirigidas por IL-23, y no por IL-12, son esenciales para la patología de EAE.

Estudios posteriores identificaron un papel fundamental de la citoquina inflamatoria IL-17, y por tanto de las células T productoras de dicha citoquina, en la patogénesis autoinmune mediada por IL-23 (Becher, Durell and Noelle, 2003). Además, el bloqueo in vivo de IL-17, pero no de IFN- $\gamma$  (Langrish *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005), reducía la gravedad de la EAE.

Estas pruebas sugirieron que IL-23 debía ser el factor diferenciador de las células T productoras de IL-17 (denominadas T<sub>H</sub>17), pudiendo promover la autoinmunidad en el SNC. Sin embargo, las células T naïve no expresan el receptor de IL-23 (IL-23R) (Parham *et al.*, 2002), y son poco sensibles a la IL-23 (Oppmann *et al.*, 2000). Diferentes estudios a este respecto (Mangan, Harrington and O'Quinn, 2006; Veldhoen, Hocking, Flavell, *et al.*, 2006) demostraron que la IL-23 no es un factor de diferenciación en las células T<sub>H</sub>17, sino más bien, dicha diferenciación se consigue tras la combinación de TGF- $\beta$  e IL-6. En este sentido, la diferenciación T<sub>H</sub>17 es un proceso secuencial: tras la inducción de la diferenciación por TGF- $\beta$  e IL-6, la respuesta es amplificada por IL-21 (Korn, Bettelli, *et al.*, 2007; Nurieva *et al.*, 2007) y el fenotipo se estabiliza por IL-23 (Bettelli, Korn and Kuchroo, 2007). Entonces, **¿qué mecanismos influyen en la diferenciación encefalitogénica de las células T<sub>H</sub>17?**

Los mecanismos mediante los cuales las células T<sub>H</sub>17 ejercen su potencial proinflamatorio siguen siendo un reto hoy día, sin embargo, diversos estudios están arrojando cierta luz al

respecto. A continuación, se exponen aquellos elementos que representan una mayor importancia.

### **2.1. Papel de IL-23 en la dicotomía de las células T<sub>H</sub>17.**

La demostración del papel de IL-23 en la capacidad encefalitogénicas de las T<sub>H</sub>17 fue demostrado por el grupo de Cua (Cua *et al.*, 2003), donde identificaron subconjuntos de células T<sub>H</sub>17 basándose en su distinta patogenicidad en la EAE: mientras que la reestimulación de células T<sub>H</sub>17 específicas de la mielina con una combinación de TGF- $\beta$  e IL-6 se acumulaban en escasa cuantía en el SNC y no inducían EAE, las células T<sub>H</sub>17 tratadas con IL-23 fueron altamente encefalitogénicas y se localizaban en grandes números en las áreas afectadas. Estos datos sugieren que la ausencia de patogenicidad de las células T<sub>H</sub>17 tratadas con TGF- $\beta$  e IL-6 puede ser debido a su incapacidad para acumularse en número suficiente en el SNC o a su incapacidad para atraer otras células inmunes e iniciar la inflamación. Sin embargo, incluso cuando se inyectaban en el cerebro de receptores naïve, estas células no indujeron enfermedad, demostrando que su incapacidad para inducir autoinmunidad no estaba en relación con su deficiente localización en el SNC. La expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 define a este subconjunto de células T<sub>H</sub>17 no patogénicas, lo que puede explicar, al menos en parte, por qué estas células, incluso cuando están presentes en el SNC, no inducen inflamación (McGeachy *et al.*, 2007). Sin embargo, aquellas células T<sub>H</sub>17 reestimuladas con TGF- $\beta$  e IL-6 y tratadas con un anticuerpo monoclonal anti IL-10, no condujo al desarrollo de la EAE, lo que sugiere que otros factores producidos por células T<sub>H</sub>17, esenciales para sus funciones efectoras, podrían verse afectados por la exposición a TGF- $\beta$  e IL-6. En conjunto, estos datos demuestran un papel crucial para la IL-23 en la promoción de las funciones efectoras de las células T<sub>H</sub>17.

### **2.2. GM-CSF, mediador de la producción de células T<sub>H</sub> encefalitogénicas.**

Aunque la IL-17 es en gran medida dispensable para el desarrollo de EAE, la creciente evidencia de la existencia de más factores solubles producidos por las células T<sub>H</sub> polarizadas con IL-23, llevó a la búsqueda de un mediador inflamatorio capaz de dotarlas de dicha capacidad encefalitogénica. Recientemente, se ha planteado la posibilidad de que el **factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos** (GM-CSF) lleve a cabo dicha acción.

GM-CSF se definió originalmente por su capacidad para promover la proliferación y diferenciación de macrófagos, granulocitos y células dendríticas a partir de sus precursores en la médula ósea (Burgess and Metcalf, 1980). Su producción puede ser llevada a cabo por células del SI innato, así como por células T (Ponomarev *et al.*, 2007) y por los tipos celulares residentes en tejidos en respuesta a estímulos inflamatorios tales como IL-1, TNF y LPS (Sieff, Niemeyer and Faller, 1988; Hamilton, 2008). Además de sus funciones fisiológicas, GM-CSF ha demostrado ser partícipe del desarrollo de enfermedades autoinmunes específicas de órgano. Así, en prácticamente todos los modelos de inflamación y autoinmunidad que han sido probados, la eliminación de GM-CSF resultó en la supresión de la enfermedad (Rostami and Ciric, 2013). Se ha establecido el papel de GM-CSF en artritis, inflamación autoinmune del SNC, nefritis, enfermedades pulmonares, aterosclerosis y lesión vascular, obesidad y diabetes mellitus tipo 1.

En el contexto de la autoinmunidad del SNC, se ha demostrado que la capacidad encefalitogénica tanto de las células  $T_H17$  como de las  $T_H1$ , depende de la producción de GM-CSF (El-Behi *et al.*, 2011). Los ratones deficientes en GM-CSF o que habían recibido un anticuerpo anti-GM-CSF, desarrollaban una EAE atenuada (McQualter *et al.*, 2001; Kroenke *et al.*, 2008), mientras que la administración local de dicho factor conducía a una enfermedad exacerbada (Marusic *et al.*, 2002).

IL-23 estimula la expresión de GM-CSF por las células  $T_H17$ , mientras que TGF- $\beta$ 1 lo suprime (Rostami and Ciric, 2013). Este hallazgo podría explicar la dicotomía en la patogenicidad de las células  $T_H17$ , donde aquellas células T CD4 estimuladas únicamente con TFG- $\beta$  e IL-6 no mostraron un incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias cruciales para la inflamación del SNC, y por ende una función patogénica; mientras que la estimulación de dichas células con IL-23, además de TFG- $\beta$  e IL-6, promovió la expresión de IL-17 y citoquinas proinflamatorias, adquiriendo así un perfil patogénico. Con todo, estos datos sugieren que la plena adquisición de la función patógena de la célula efectora  $T_H17$  está mediada por IL-23 en lugar de por TFG- $\beta$  e IL-6 (McGeachy *et al.*, 2007).

Además, se ha definido un lazo de retroalimentación positiva, donde la producción de IL-23 por parte de las APC induce la producción de GM-CSF por las células  $T_H17$ , que a su vez cierra el círculo estimulando la producción de IL-23 por las APC (El-Behi *et al.*, 2011). Así, **GM-CSF parece desempeñar un papel proinflamatorio del SNC**, probablemente mejorando la expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras de APC locales o infiltrantes.

### 2.3. Supresor de la respuesta inmune: IL-27.

En los últimos años, la citocina IL-27 ha emergido como un potente regulador de las respuestas inmunitarias, y en particular, aquellas mediadas por las células  $T_H17$ . Tras su producción, principalmente llevada a cabo por APC activadas, IL-27 se une a su receptor presente en la célula T CD4 naïve, e induce la activación del factor de transcripción específico de  $T_H1$ , T-bet, estimulando así la expresión por parte de estas células de IL-12R $\beta$ 2 e IFN- $\gamma$ , induciendo así la maduración hacia un fenotipo  $T_H1$ .

Se ha observado que IL-27 suprime directamente el desarrollo de las células  $T_H17$  (Batten *et al.*, 2006; Stumhofer *et al.*, 2006) mediante la inhibición de la expresión de ROR $\gamma$ t (Ivanov, Zhou and Littman, 2007). Además, también se ha observado su efecto inhibitorio en la diferenciación de  $T_H2$  (Yoshimoto *et al.*, 2007) mediante la disminución de la expresión de GATA3 y la regulación positiva de T-bet, así como en el desarrollo de las células T reguladoras (Huber *et al.*, 2008) y las APC (Wang *et al.*, 2007). Así, la **IL-27 parece desempeñar un papel principalmente supresor en la autoinmunidad**. En este sentido, los ratones deficientes en IL-27R desarrollan una EAE más grave, mientras que la administración de IL-27 exógena puede suprimir el desarrollo de la EAE en ratones normales (Fitzgerald *et al.*, 2007). Además, IL-27 se ha visto que suprime tanto la producción de IL-22 como de GM-CSF, efectores de la respuesta  $T_H17$  (J. Yang *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2012). Sin embargo, existen estudios que sugieren que también puede contribuir en algunos casos a la patogénesis de diferentes enfermedades (Cao *et al.*,

2008; Guo, Chang and Cheng, 2008; Miyazaki *et al.*, 2008), por lo que se requieren estudios adicionales para aclarar su función en la respuesta inmune.

### **3. Células T<sub>H</sub>17 y esclerosis múltiple en humanos.**

---

Tras los estudios descritos previamente, que sugirieron el papel de las células T<sub>H</sub>17 en la EAE, varios hallazgos de diferentes grupos han proporcionado pruebas sustanciales de que el fenotipo T<sub>H</sub>17 también desempeña un papel crítico en la patogénesis de la EM. A continuación, se exponen los estudios más importantes realizados hasta el momento:

- Aumento de la expresión en sangre y LCR de IL-17 en aquellos pacientes con un fenotipo clínico recurrente – remitente, especialmente durante las recaídas (Matusevicius *et al.*, 1999), en comparación con pacientes con enfermedades neurológicas no inflamatorias.
- Mayor proporción de células T<sub>H</sub>17, así como mayores niveles de IL-17A, en el tejido cerebral de pacientes con EM, especialmente en lesiones agudas y crónicas activas, en comparación con controles sanos (Tzartos *et al.*, 2008).
- Elevación de los niveles de GM-CSF, esencial para la respuesta encefalitogénica de las células T<sub>H</sub>17, tanto en el LCR como en la sangre de pacientes con EM (Perrella *et al.*, 1993; Carrieri *et al.*, 1998).
- Estudios *in vitro* demostraron que la cantidad de IL-17 producida tras el cultivo de células mononucleares de pacientes con EM después de la estimulación con MBP, se correlacionaba con el número de lesiones en la Resonancia Magnética Nuclear (Hedegaard *et al.*, 2008).
- Finalmente, como veremos en el último capítulo de esta revisión, estudios en fase II de un anticuerpo monoclonal frente a IL-17, reduce las lesiones en la RMN (Havrdov'a, Belova and Goloborodko, 2012).

Con todo, parece que las células T<sub>H</sub>17 no solo juegan un papel importante en la inmunopatogenia de la EAE, sino también de la EM. Sin embargo, la inmunopatogénesis, tanto de la EAE como de la EM no es tan sencilla, pues se ha observado la participación de más subtipos de linfocitos T CD4, así como otras células del sistema inmune.

### **4. Otros linfocitos T CD4 partícipes en la autoinmunidad: Treg y T<sub>H</sub>1.**

---

La EM es una enfermedad inflamatoria y desmielinizante del SNC mediada por mecanismos inmunológicos. Aunque la mayoría de estudios se han realizado sobre la mediación de las células T CD4 en la patogénesis de la enfermedad, recientes estudios muestran la participación de otros elementos celulares y humorales de la respuesta inmune, como son las células T CD8 y los linfocitos B.

En este epígrafe, vamos a resumir brevemente la participación de otros elementos celulares de la respuesta inmune, en concreto, el papel fundamentado de los linfocitos T<sub>H</sub>1 y los Treg en la patogénesis de la EM.

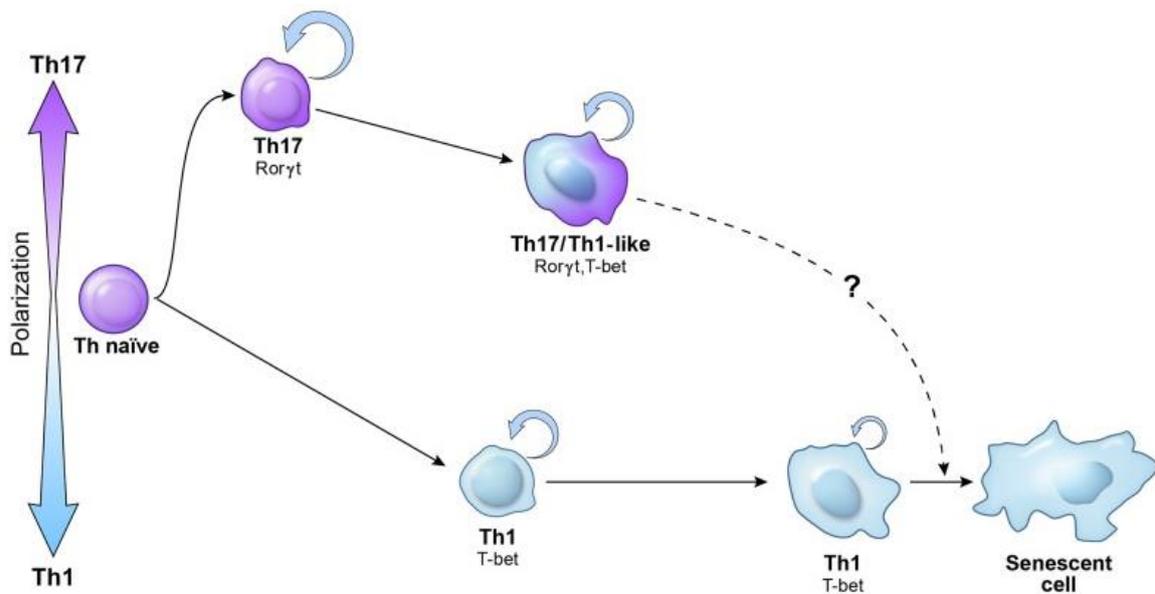
A día de hoy, sigue existiendo debate sobre que subconjunto de células T CD4 es más crítico en la patogénesis de la EAE. La existencia de ratones deficientes en ROR $\gamma$ t o T-bet resistentes a la inducción de la EAE, apoya la visión de que ambas células, **T<sub>H</sub>17 y T<sub>H</sub>1**, respectivamente, **están implicadas en la autoinmunidad del SNC** (Bettelli *et al.*, 2004). Aunque ambos subtipos celulares se han aislado en el tejido nervioso de ratones con EAE, se han observado diferencias entre los dos fenotipos:

- Según el estímulo antigénico que estimule la respuesta inmune, el ratio celular T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17 varía, estando este hecho correlacionado con el fenotipo de la enfermedad: el predominio de T<sub>H</sub>1 se asocia con afectación de la médula espinal; mientras que una mayor participación de las células T<sub>H</sub>17 se correlacionaba con afectación preferentemente del encéfalo (Stromnes *et al.*, 2008).
- En modelos de transferencia pasiva, se ha observado la capacidad de ambos subtipos de inducir enfermedad, pero con una histopatología distinta, puesto que la enfermedad mediada por T<sub>H</sub>1 se basaba en una activación de macrófagos, mientras que aquella mediada por T<sub>H</sub>17 estaba mediada por neutrófilos (Kroenke *et al.*, 2008).

El hallazgo más importante realizado hasta la fecha ha sido el descubrimiento de células T que expresan simultáneamente INF- $\gamma$  e IL-17 en vivo, tanto bajo condiciones homeostáticas como inflamatorias. Estas células, secretoras tanto de IL-17 como INF- $\gamma$ , son detectables en el SNC de ratones con EAE (Abromson-Leeman, Bronson and Dorf, 2009). El estudio de ratones con TCR transgénicos, reveló que aquellos que expresaban tanto T-bet+/ROR $\gamma$ t- como T-bet+/ROR $\gamma$ t+, inducían la EAE, indicando que ambos tipos celulares probablemente contribuían a la autoinmunidad del SNC (Abromson-Leeman, Bronson and Dorf, 2009)

Un grupo (Korn, Reddy, *et al.*, 2007) ha observado que en los primeros estadios de la enfermedad, las células T<sub>H</sub>17 infiltran el SNC, mientras que aquellas células productoras de INF- $\gamma$  e IL-17, son detectadas en aproximadamente el 30% de los casos durante el pico de la enfermedad. Durante la evolución de la enfermedad y durante la remisión, la frecuencia de células CD4 productoras de IL-17 en el SNC disminuye, a la vez que la fracción de células T CD4 productoras de INF- $\gamma$  aumenta.

A día de hoy, no se conoce el mecanismo que conduce al desarrollo de estas células INF- $\gamma$ + IL-17+. Sin embargo, se ha encontrado que la IL-12 tiene un gran efecto sobre las células T<sub>H</sub>17, aumentando la expresión del factor de transcripción T-bet, convirtiendo estas células en T<sub>H</sub>1 (figura 8).



**Figura 8. Relación entre la polarización de las células  $T_H1$  y  $T_H17$**  (figura modificada de (Muranski and Restifo, 2013)). Mientras que las células  $T_H1$  son relativamente estables y no pueden ser reprogramadas tan fácilmente, aquellas células  $T_H17$  generadas a partir de la presencia en el medio de TGF- $\beta$  e IL-6, pueden cambiar su diferenciación al fenotipo  $T_H1$  cuando IL-12 está presente en el medio en ausencia de IL-6. Estas nuevo fenotipo, productor de IL-17 + INF- $\gamma$  y capaz de co-expresar T-bet y ROR $\gamma$ t, pueden representar un estado intermedio durante el desarrollo de  $T_H1$  a partir de sus precursores  $T_H17$  (Wilson, Rowell and Sekimata, 2009). Estas células  $T_H1/T_H17$  en un entorno inflamatorio, pueden polarizarse adicionalmente para convertirse en células  $T_H1/exT_H17$ , capaces de producir INF- $\gamma$  y GM-CSF. Se especula que esta plasticidad de las células  $T_H17$  podría proporcionar un conjunto de células involucradas en enfermedades autoinmunes crónicas.

La función general de las **células T CD4+ reguladoras** es el mantenimiento de la homeostasis inmune. Esta labor la ejercen previniendo la autoinmunidad y ejerciendo su efecto supresor sobre las respuestas inmunes proinflamatorias. De esta forma, son capaces de limitar la respuesta proinflamatoria tras la desaparición del antígeno iniciador; así como evitar el desarrollo de una respuesta inmune exacerbada (Rostami and Ciric, 2013).

El papel de Tregs en la modulación de la inflamación autoinmune del SNC ha sido ampliamente estudiado en EAE. La capacidad de Tregs para suprimir la EAE se confirmó en un estudio en el que la transferencia de células T con fenotipo regulador confería protección contra la EAE (Kohm *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la susceptibilidad al desarrollo de la EAE está inversamente relacionada con la frecuencia de células T reguladoras; y que la reducción de las células Treg hace susceptible a una cepa de ratón que previamente no lo era al desarrollo de EAE (Reddy *et al.*, 2004). Los ratones deficientes en IL-6, que no desarrollan células  $T_H17$ , presentan un repertorio periférico dominado por células Treg, siendo resistentes a la inducción de EAE. Sin embargo, la disminución de las células Tregs en estos ratones mutantes permite el desarrollo de células  $T_H17$  a través de TGF- $\beta$  e IL-21, y la inducción EAE (Korn, Bettelli, *et al.*, 2007).

Además, se ha observado que hasta un tercio de los linfocitos T CD4 presentes en la fase de recuperación de la EAE en ratones corresponde a los linfocitos Treg (McGeachy, Stephens and Anderton, 2005; Liu *et al.*, 2006; Korn, Reddy, *et al.*, 2007). Una disminución en el número de células Tregs impide una recuperación de la EAE, lo que indica el papel importante que estas células desempeñan en el proceso de recuperación (McGeachy, Stephens and Anderton, 2005).

Esta actividad de las células T reguladoras ha supuesto multitud de investigaciones en torno a su potencial terapéutico. Sin embargo, diferentes estudios plantean inconvenientes a este respecto, debido a la plasticidad que presentan las células Treg:

- En primer lugar, las células Treg y T<sub>H</sub>17 requieren para su diferenciación la presencia de TGF- $\beta$  en el medio, si bien es cierto que la diferenciación de T<sub>H</sub>17 requiere además la presencia de citocinas proinflamatorias como IL-6. De hecho, durante la diferenciación inicial de la célula T CD4 naïve, ésta puede expresar FoxP3 y ROR $\gamma$ t al mismo tiempo (Zhou, Lopes and Chong, 2008). También se ha demostrado que las células Tregs comienzan a producir IL-17 después del tratamiento con IL-6, tanto *in vitro* (X. Yang *et al.*, 2008) como *in vivo* (Lochner *et al.*, 2008). Del mismo modo, las células Tregs también puede adquirir la expresión de T-bet y comenzar a producir IFN- $\gamma$  (Oldenhove *et al.*, 2009).
- En segundo lugar, se ha demostrado que muchas células T efectoras derivan de células T reguladoras (Zhou *et al.*, 2009).

Estos hallazgos demuestran que las células T reguladoras pueden ser bastante plásticas y no sólo pueden perder sus funciones inmunosupresoras sino también convertirse en células T efectoras, posibilidad que debe considerarse cuidadosamente si se van a utilizar células Treg en la terapia de enfermedades autoinmunes (Jäger and Kuchroo, 2010).

#### IV. DIANAS TERAPÉUTICAS EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE. PAPEL DE LA MICROBIOTA

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune crónica del SNC, considerada producto de la ruptura de la tolerancia inmune periférica, dando lugar a diversos ataques autoinmunes contra los elementos del SNC y, finalmente, a la neurodegeneración (Kavrochorianou, Markogiannaki and Haralambous, 2016).

La patogénesis de la EM es compleja y su etiología sigue siendo desconocida, aunque varios factores genéticos, ambientales e infecciosos se han propuesto como causas de esta enfermedad. No obstante, los linfocitos T CD4 se han aceptado como elementos clave en la patogénesis de la enfermedad, y por tanto, se considera que **la EM una enfermedad del SNC mediada inmunológicamente por linfocitos T patogénicos contra antígenos de la mielina** (Compston and Coles, 2008). La teoría actual sobre la patogénesis de la EM apoya la idea de que las células T<sub>H</sub>17 desempeñan un papel esencial en las fases iniciales de la enfermedad, mientras que las células T<sub>H</sub>1 tienen un papel más importante en fases subsiguientes de la enfermedad (Murphy *et al.*, 2010). Además, las células Treg ejercen una función importante en la patogénesis de la enfermedad debido a su

incapacidad de revertir el desequilibrio entre las respuestas pro- y anti-inflamatorias. Las características inmunológicas de la EM se encuentran sintetizadas en el principal modelo animal de la enfermedad, la EAE, inducido bien por inmunización activa con antígenos derivados de proteínas específicas de la mielina o mediante la transferencia pasiva de células T encefalíticas de ratones inmunizados.

Desde finales del siglo XX, son múltiples las terapias que se han diseñado para frenar el curso de la enfermedad, sin embargo, a día de hoy, aún no se dispone de una herramienta terapéutica que pueda retrasar o impedir la progresión de la enfermedad, mientras que los tratamientos aprobados capaces de disminuir la actividad de los brotes y el número de lesiones en la RMN se han ampliado durante las últimas décadas. Muchas de las terapias actualmente aprobadas están dirigidas directamente contra los linfocitos T (por ejemplo, natalizumab o fingolimod) o indirectamente a través de diferentes efectos sobre el sistema inmunológico (por ejemplo, acetato de glatirámico e IFN- $\beta$ ). Cabe destacar que estos tratamientos están dirigidos contra la forma recurrente – remitente de la enfermedad, pues el resto de fenotipos clínicos, la forma primaria progresiva y la progresiva secundaria, no disponen de tratamientos modificadores de la enfermedad, siendo su única solución el tratamiento sintomático.

Esta revisión del tratamiento de la EM no tiene como fin describir en detalle todos los fármacos aprobados, sino que de una forma histórica, vamos a considerar aquel que supuso el inicio de la terapia moduladora de la enfermedad, y como, a raíz de la incapacidad de los distintos fármacos de impedir el avance de la enfermedad, nuevos enfoques terapéuticos están siendo estudiados, entre los que destacaremos las terapias inmunológicas dirigidas y el enérgico auge que está suponiendo la microbiota como futuro tratamiento de las enfermedades autoinmunes.

## **1. Inmunomodulación de la RI. Papel del IFN- $\beta$ en EM.**

Los **interferones** (IFNs), fueron descritos en primer lugar por su capacidad para interferir e inhibir la replicación viral, aunque posteriormente se ha reconocido su papel en funciones antiproliferativas, antitumorales e inmunorreguladoras. Basándose en el tipo de receptor a los que se ligan, los IFN se han clasificado en tres categorías: tipo I, tipo II y tipo III. La familia de IFN tipo I, en la cual vamos a centrar esta revisión, está producida principalmente por APC, estando su receptor expresado en casi todos los tipos celulares. Esta familia de IFN comprende varios miembros, pero los más estudiados han sido IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , por sus propiedades antivirales, inmunomoduladoras y su capacidad de regular procesos homeostáticos.

La familia tipo I de IFNs se utilizan para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades, y en particular, IFN- $\beta$  se emplea como tratamiento de primera línea en la EM tras su aprobación a principios de la década de 1990 (Paty and Li, 1993). Aunque los mecanismos subyacentes implicados en el efecto inmunomodulador de IFN- $\beta$  no se conocen, dichos efectos se ejercen de una manera variable en el sistema inmune, en vez de actuar de forma selectiva y específica contra una célula T (Kieseier, 2011). Los diferentes datos acumulados a este respecto, indican que el tratamiento con IFN- $\beta$  en pacientes con EM actúa a diferentes niveles en la respuesta inmune (tabla 1). Así, el IFN- $\beta$  es capaz de:

- Aumentar la producción de citocinas anti-inflamatorias (como IL-4 e IL-10).
- Disminuir la producción de citocinas pro-inflamatorias (como IL-17, IL-23, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ).
- Modular la función de las células Treg, al tiempo que induce su expansión.
- Inducir la apoptosis de las células T autorreactivas.
- Disminuir la migración de los linfocitos a través de la BHE.

**Tabla 1. Efecto de la administración endógena y exógena de IFN- $\beta$  en los fenotipos más destacados de células T en EAE y EM** (tabla modificada de (Kavrochorianou, Markogiannaki and Haralambous, 2016)).

	EAE		EM	
	IFN- $\beta$ endógeno	IFN- $\beta$ exógeno	IFN- $\beta$ endógeno	IFN- $\beta$ exógeno
<b>T<sub>H</sub>1</b>	↓ Producción IFN- $\gamma$ <sup>1</sup>	↓ Producción IFN- $\gamma$ ↓ Infiltración TH1 en el SNC ↓ Expresión citoquinas y receptores de T <sub>H</sub> 1 en el SNC		↓ Expresión génica T-bet e IFN- $\gamma$ en sangre ↑ ARNm de marcadores de T <sub>H</sub> 1 en CMSP
<b>T<sub>H</sub>17</b>	↓ Producción IL-17 ↓ Células CD4+ Th17+ en NL	↓ Producción IL-17 ↓ ARNm IL-17 ↓ Frecuencia células T CD4+ IL-17+ en SNC ↑ Producción IL-27 ↓ Citoquinas y receptores de T <sub>H</sub> 17 en el SNC	↓ Producción IL-17A e IL-17F por células T CD4+ en NL	↓ Diferenciación T <sub>H</sub> 17 en CMSP ↓ Niveles ARNm IL-17 ↓ Proporción células T CD4+ IL-17A+ e IL-17F+ en CMSP
<b>Tregs</b>		↑ Producción IL-10 ↑ ARm de IL-10 ↑ Proliferación Treg	↑ ARNm IL-10 y FoxP3	↑ Función y proporción Treg en SP ↑ ARNm IL-10 en CMSP y LCR ↑ Producción IL-10 ↑ Células IL-10+ en CMSP

<sup>1</sup> Aunque la administración de IFN- $\beta$  en animales con EAE parece disminuir la expresión de IFN- $\gamma$ , diversos estudios no han demostrado diferencias significativas en dicha producción.

CMSP: células mononucleares de sangre periférica; NL: nódulo linfático; SP sangre periférica

## 2. De la inmunomodulación a las terapias dirigidas. Nuevas terapias en EM.

Aunque IFN- $\beta$  demostró tener un importante efecto sobre las células del sistema inmune durante la EM, muchos pacientes no respondían de forma óptima a este fármaco. Este hecho ha propiciado el desarrollo de distintos métodos terapéuticos en el tratamiento de la enfermedad autoinmune. Uno de estos enfoques terapéuticos ha sido el empleo de **Ac monoclonales**, que a diferencia de los tratamientos iniciales que ejercían su efecto de una manera global sobre la respuesta inmune, éstos se dirigen contra una molécula específica dentro de la cascada inflamatoria de la EM. A día de hoy, los dos Ac monoclonales más

empleados en el tratamiento de la forma recurrente – remitente son natalizumab y alemtuzumab:

- **Natalizumab:** inhibe la migración de linfocitos a través de la BHE bloqueando la integrina  $\alpha 4$ , componente de VLA-4 presente en los linfocitos, e inhibiendo así la interacción entre VLA-4 y la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM) en las células endoteliales.
- **Alemtuzumab:** probablemente sea el tratamiento modificador de la enfermedad más efectivo. Está dirigido contra la proteína CD52, presente fundamentalmente en la superficie de linfocitos, aunque también se haya presente, aunque en niveles inferiores, en monocitos, macrófagos, eosinófilos y células NK. Al unirse a CD52, alemtuzumab provoca una reducción prolongada de los linfocitos, tanto por citotoxicidad mediada por Ac y complemento como por apoptosis.

Tras la aprobación de Natalizumab, diferentes Ac monoclonales han sido aprobados en pacientes con EM, la mayoría desarrollados originalmente para el tratamiento de enfermedades malignas. En la actualidad, diversas moléculas se encuentran en ensayos clínicos con el fin de comprobar su eficacia como dianas terapéuticas en la enfermedad.

Cabe reseñar, que la mayoría de estudios realizados hasta el momento han dedicado sus esfuerzos en **terapias dirigidas contra los linfocitos B**, partícipes igualmente en la patogenia de la respuesta inmune en la EM. Mencionamos aquí por su relevancia **ocrelizumab**, el cual, aprobado en marzo de 2017 por Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), es la primera y única terapia hoy día existente capaz de actuar tanto en las formas recurrente – remitente como en la forma primaria progresiva de la EM (FDA, 2017).

Referente a los estudios actuales de **Ac monoclonales en ensayos frente a los linfocitos T**, la mayoría de los esfuerzos están dirigidos contra las células  $T_H17$  y sus citocinas asociadas:

- **Ustekinumab:** Ac monoclonal anti IL-12 + IL-23, ha demostrado gran eficacia en distintos procesos autoinmunes, tales como artritis reumatoide y psoriasis, si bien un ensayo en fase II no resultó eficaz para prevenir la formación de nuevas lesiones en la EM (Segal *et al.*, 2008).
- **Secukinumab:** Ac monoclonal completamente humano dirigido contra IL-17A, ha sido estudiado en diferentes ensayos clínicos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Su eficacia ha sido estudiada en enfermedades tales como psoriasis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante y EM. En lo referente a la EM, secukinumab ha demostrado en un ensayo clínico de fase II, la reducción significativa del número de lesiones en el SNC y una tendencia a la disminución del número de brotes.
- Recientemente, se están evaluando diferentes aproximaciones al tratamiento del fenotipo  $T_H17$  en enfermedades autoinmunes. De este modo **MOR103**, un Ac monoclonal recombinante humano de alta afinidad que bloquea la interacción de GM-CSF con su receptor, ha sido evaluado en un ensayo clínico

Ib, demostrando su tolerabilidad en pacientes con EM (Constantinescu *et al.*, 2015).

De este modo, mientras que el eje IL-17/IL-23 ha demostrado una gran importancia en el desarrollo de la EM, su posible potencial terapéutico necesita de una mayor evaluación.

En general, los esfuerzos principales se han centrado en la búsqueda de moléculas capaces de suprimir la respuesta inmune, lo que en muchos casos pone en riesgo la salud del paciente debido a su acción sistémica sobre el organismo. No obstante, están apareciendo **nuevos enfoques terapéuticos dirigidos a la polarización de las células T hacia fenotipos tolerogénicos** sin provocar dicha supresión. A este respecto, en la 253ª Reunión Nacional de la Sociedad Estadounidense de Química (ACS) en abril de este mismo año, se expuso el trabajo de un grupo de investigación de la Universidad de Maryland (Tostanoski *et al.*, 2016), cuyos esfuerzos se han centraron en la función de los ganglios linfáticos como elemento crítico en la definición de las funciones inflamatorias o reguladoras de las células T y la posibilidad de redirigir la diferenciación hacia un fenotipo más tolerogénico. Para ello, han desarrollado una molécula compuesta por polímeros que actúan como portador, un agente inmunosupresor (en este caso rapamicina) y un Ag de la mielina, capaz de reprogramar la diferenciación de los linfocitos hacia un fenotipo regulador tras su inyección de manera directa en los nódulos linfáticos de modelos de ratones con EAE, demostrando una inversión permanente de la parálisis presente en los mismos. Este tipo de terapia destaca por el modo de actuación más específico, puesto que el tamaño de la partícula inyectada es demasiado grande para abandonar el lugar de infiltración.

Con todo, estas terapias actúan intentando controlar el avance de la enfermedad. Sin embargo, hasta el momento no existe ningún fármaco que actúe antes del comienzo de la enfermedad. A este respecto, están apareciendo nuevos enfoques que podrían detener no solo esta enfermedad, sino muchas de las enfermedades autoinmunes existentes.

### **3. Influencia de la microbiota y la autoinmunidad en el SNC.**

---

Como una enfermedad incurable, la EM supone importantes cargas médicas y financieras a los pacientes, sus familiares y la sociedad, que a menudo conduce a resultados devastadores. A pesar de los grandes avances en nuestra comprensión de la fisiopatología de la enfermedad, sigue siendo ampliamente desconocido por qué las personas inicialmente desarrollan esta enfermedad. Tal falta de conocimiento sobre la causa exacta se traduce en nuestra incapacidad para curarla y, en el mejor de los casos, sólo podemos ofrecer ciertos tratamientos para frenar la progresión de la enfermedad y posponer el comienzo de la incapacidad inevitable que crea una enfermedad neurológica rápidamente progresiva.

Mencionada previamente en esta revisión, la creencia actual de cómo se inicia la enfermedad incluiría tres factores: genéticos, ambientales e inmunológicos (anteriormente descritos). Esta enfermedad, se entendería, por tanto, como la incidencia, en un individuo genéticamente predispuesto, de factores ambientales que desencadenarían una respuesta inmune anormal, dando así lugar a la enfermedad. Mientras que en apartados anteriores nos hemos referido a los factores inmunológicos

que originan la enfermedad, en esta sección vamos a revisar principalmente el papel de la microbiota como posible factor ambiental causante de la esclerosis múltiple, así como la teoría que aboga por el probable papel terapéutico de la misma en la enfermedad.

Durante mucho tiempo, se sospechó que las infecciones virales y bacterianas eran los desencadenantes de la EM tras observar que ciertas infecciones en animales daban lugar a una enfermedad inflamatoria desmielinizante similar a la EM. En el caso de los virus, las investigaciones se centraron en aquellos capaces de inducir una infección persistente en humanos, destacando el virus del herpes humano 6 (HHV-6) y el virus de Epstein-Barr (VEB). Así, se desarrollaron diferentes modelos animales de la enfermedad, donde destaca el **virus de la encefalomiелitis murina de Theiler** (TMEV), capaz de inducir una encefalomiелitis aguda en la mayoría de animales infectados de forma intracerebral con el virus. Además de los virus, diferentes bacterias patógenas fueron consideradas iniciadoras de la EM, sin embargo, los datos resultantes fueron controvertidos.

Con todo, a pesar del interés en la relación de los microbios patógenos con la inducción de la autoinmunidad del SNC, esta teoría no perduró debido en parte a que su implicación en las enfermedades humanas no está bien establecida. Recientemente, la atención se ha dirigido hacia la **microbiota comensal como modulador de la autoinmunidad del SNC**.

La **microbiota intestinal** se entiende como el conjunto de microbios (bacterias, arqueas, eucariotas, hongos y virus) que pueblan nuestro tracto gastrointestinal. En general, se estima la presencia de más de 100 billones ( $10^{14}$ ), localizados la gran mayoría en el colon, en torno a  $10^{11} - 10^{12}$ . Esta diversidad se encuentra influenciada por diversos factores, destacando de manera importante la dieta, la medicación, el estrés y las infecciones. Aunque a día de hoy resulte imposible definir el concepto de microbiota saludable, sí sabemos que la riqueza y diversidad de la misma constituye un indicador de salud gracias a su función protectora, pues reducen la invasión de bacterias potencialmente patógenas, mientras que su empobrecimiento se asocia a obesidad y alteraciones metabólicas (Castillo-Álvarez and Marzo-Sola, 2017).

Referente a la función de la microbiota intestinal en la respuesta inmune, se ha visto el importante papel de ésta en la respuesta inmunológica del organismo. Entre sus funciones se encuentra:

- La prevención de la colonización y crecimiento de microorganismos patógenos en la barrera intestinal.
- La maduración de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, así como la secreción de mucinas, péptidos antimicrobianos, defensinas e IgA.
- El desarrollo de las células T efectoras y la producción de citocinas, destacando su influencia sobre los linfocitos  $T_H17$  y Treg.

A pesar de sus funciones fisiológicas, la microbiota se ha implicado en enfermedad. Aunque en un primer momento su disfunción se ha relacionado con trastornos relacionados con el intestino, un creciente número de evidencias sugiere que estos microorganismos pueden modular los trastornos autoinmunes en órganos remotos al intestino, como el SNC. Así, recientemente, se ha puesto de relieve el **papel de la**

**microbiota comensal intestinal como un posible factor de riesgo ambiental para la EM** (Berer and Krishnamoorthy, 2014).

Diferentes estudios en modelos animales han demostrado la influencia de la modulación de la microbiota intestinal en la susceptibilidad a la EAE:

- a) Ratones expuestos previamente a un régimen de antibióticos por vía oral, los cuales reducían drásticamente las poblaciones bacterianas gastrointestinales, eran significativamente menos susceptibles a la inducción de EAE en comparación con los controles (Berer *et al.*, 2011; Ochoa-Repáraz *et al.*, 2011).
- b) Ratones libres de gérmenes eran altamente resistentes al desarrollo de la EAE, además de tener un curso de la enfermedad más leve cuando desarrollaban EAE (Lee *et al.*, 2011). Esta protección inducida tras la erradicación de la microbiota se ha relacionado con distintos mecanismos: aumento del número de linfocitos T reguladores FoxP3, reducción de las poblaciones de linfocitos T<sub>H</sub>1 (productoras de IFN- $\gamma$ ) y T<sub>H</sub>17 (productoras de IL-17), así como la deficiencia de las células dendríticas para activar la diferenciación T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>17. La colonización de los ratones libres de gérmenes con bacterias filamentosas segmentadas (BFS) condujo a un marcado incremento en la gravedad de la EAE, evidenciándose por histología en el tejido nervioso de estos ratones, un incremento en las poblaciones de células T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>17 infiltrantes.
- c) Ratones transgénicos para un TCR específico de MOG, que en condiciones normales desarrollan una EAE espontánea, son resistentes al desarrollo de la enfermedad si son criados en condiciones libres de gérmenes. En estos ratones, se encontró una menor proporción de células T<sub>H</sub>17, así como una menor producción de IL-17 e IFN- $\gamma$ . La recolonización de estos ratones libres de gérmenes con microbiotas condujo a la reversión de estos efectos (Berer, Mues, Koutrolas, Z. A. Rasbi, *et al.*, 2011).

Tras el reconocimiento de la importancia de la microbiota intestinal en la susceptibilidad y severidad de la EAE, se evaluó el efecto de los microbios comensales o sus productos en el curso de EAE (tabla 2). En conjunto, estos estudios proveen una fuerte evidencia de la modulación de la respuesta inmunológica en la EAE por parte de la microbiota. Se ha observado que tanto la administración de bacterias (como el factor antigénico de colonización de *E. coli* enterotoxigénico, *B. fragilis* y *Pediococcus acidilactici*) como de levaduras (*Candida kefir*), ocasionaba en los ratones una enfermedad más leve, de la que se recuperaban. Histológicamente, se comprobó que en conjunto, estos microorganismos ocasionaban una reducción de los efectores inmunopatogénicos en el SNC y sus principales citocinas, así como un aumento del fenotipo regulador. No obstante, también se han estudiado microorganismos responsables de generar la enfermedad, entre los que destacan la bacteria filamentosas segmentada, capaz de ocasionar un empeoramiento clínico de la enfermedad tras la inducción de una respuesta autoinmune T<sub>H</sub>17.

**Tabla 2. Resumen de los principales microorganismos moduladores del curso de la EAE** (Castillo-Álvarez and Marzo-Sola, 2017).

Intervención	Resultado	Respuesta inmune
Administración de CFA/I de <i>E. coli</i>	Mejoría clínica Mejoría histológica	Disminución de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ Aumento de IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- $\beta$
Administración de <i>B. fragilis</i> /PSA oral	Mejoría clínica	Aumento de linfocitos TregFoxp3+ Aumento de IL-10
Colonización con BFS	Empeoramiento clínico	Aumento de IL-17 Aumento de Th17
Administración de <i>P. acidilactici</i>	Mejoría clínica Mejoría histológica	Aumento de IL-10 Disminución de IL-17, IFN- $\gamma$ Aumento de Treg
Administración de <i>C. kefir</i>	Mejoría clínica	Aumento de CD103+ y Treg Alteración de la microbiota Descenso de IL-6

A diferencia de los modelos experimentales en ratones, los estudios de la microbiota en EM se encuentran en las primeras fases de investigación. La bibliografía de la que disponemos, procede fundamentalmente de comunicaciones en congresos, evidencias indirectas y algún estudio publicado. En la tabla 3, se expone un resumen de los principales hallazgos encontrados hasta la fecha.

**Tabla 3. Resumen de los estudios de microbiota en esclerosis múltiple** (Castillo-Álvarez and Marzo-Sola, 2017).

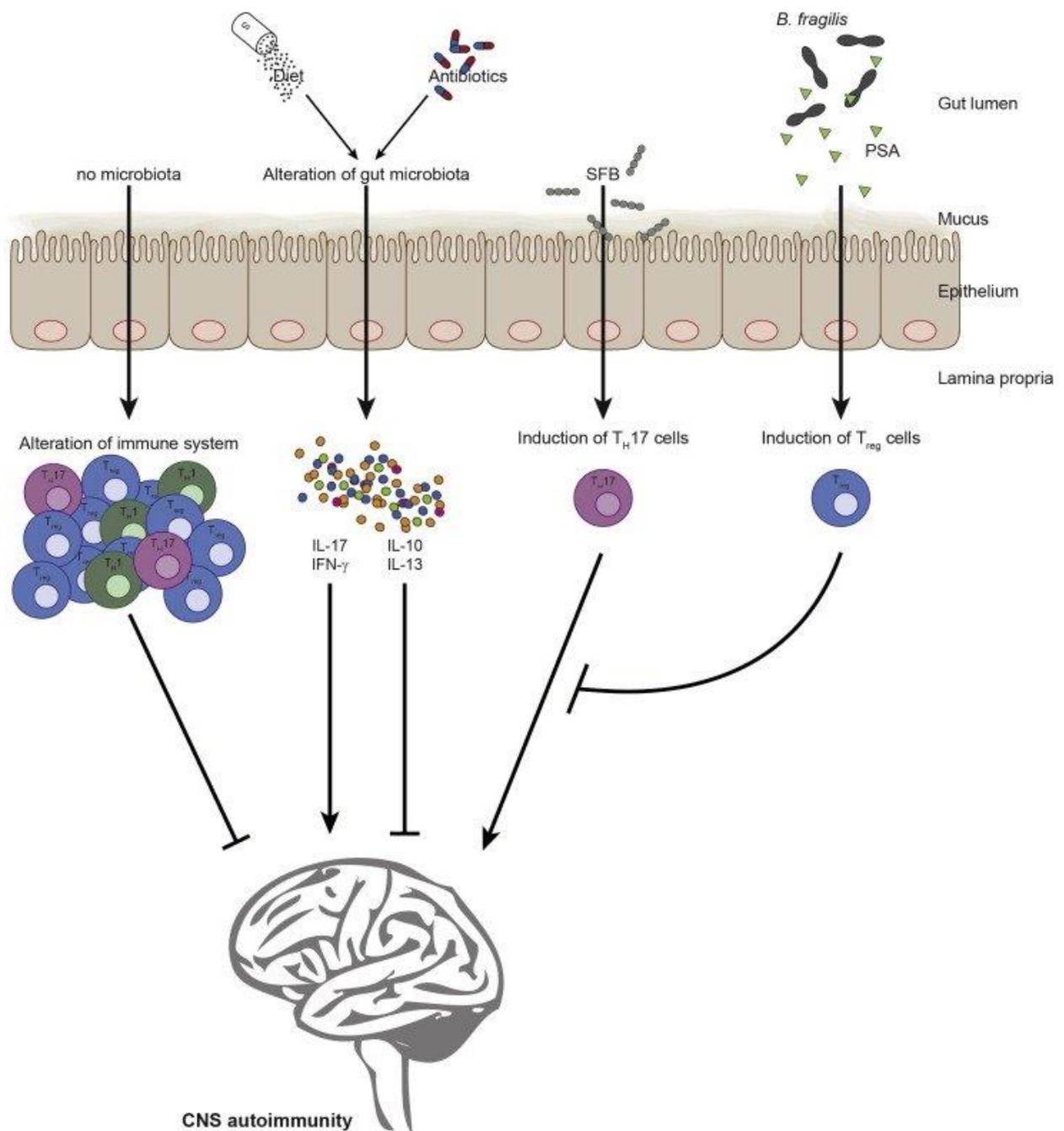
Estudio	Muestra	Resultados
Caso control	30 pacientes EM 31 sujetos control	Mayor proporción de <i>C. perfringens</i> tipo A en sujetos sanos (50% vs 23%)
Caso control	53 pacientes con EM 44 sujetos control	Aumento en EM de <i>Methanobrevibacteriaceae</i> y disminución de <i>Butyricimonas</i> y <i>Lachnospiraceae</i> , aumentado en pacientes que recibían tratamiento
Caso control	7 pacientes con EM 8 sujetos control	Diferencias en <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> y proteobacterias sin alcanzar significación estadística
Caso control pediátrico	20 pacientes con EM 16 sujetos control	Aumento en los casos en <i>Shigella</i> y <i>Escherichia</i> Disminución en <i>Eubacterium rectale</i> y <i>Corynebacterium</i>
In vivo		Inducción de linfocitos Treg y de IL-10 por el PSA de <i>B. fragilis</i>
Caso control en mujeres	4 pacientes con EM 7 sujetos control	Disminución en <i>Faecalibacterium</i> en los pacientes con EM. Diferencias en los tratados con AG en <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Clostridium</i> y otros clostridiales

La pregunta que cabe formularse ahora es, **¿cuáles son las contribuciones de la flora intestinal a la patogénesis de la EM?** Hasta la fecha, no existe evidencia directa que respalde el papel de la microbiota intestinal ni en la incidencia ni en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, varios datos indirectos sugieren una implicación potencial de

la misma (figura 9), debido a que estos factores estudiados pueden alterar los microorganismos intestinales:

- La incidencia de EM se ha asociado positivamente con el consumo de leche, grasa y carne; mientras que los ácidos grasos poliinsaturados, así como las fibras vegetales pueden disminuir el riesgo de desarrollo de EM (Manzel *et al.*, 2014).
- Recientemente, se ha vinculado el riesgo de enfermedad a factores del estilo de vida que han demostrado interferir con el establecimiento de una población microbiana sana en el tracto gastrointestinal, como son la antibioterapia precoz (Norgaard *et al.*, 2011), la alimentación artificial (Conradi *et al.*, 2013) y la cesárea (Maghzi *et al.*, 2012).

A día de hoy no se conocen los mecanismos que expliquen cómo la microbiota puede iniciar la autoinmunidad del SNC. Existen dos propuestas de cómo se produce esta activación inmune: bien podría deberse a mimetismo molecular o por la activación colateral de células inmunes no específicas del antígeno que desencadenó la respuesta (efecto “bystander”). Es teóricamente posible que algunos antígenos bacterianos posean epítomos similares a autoantígenos del SNC, aunque estos epítomos en las bacterias intestinales no han sido identificados todavía. En cambio, los datos actuales favorecen la hipótesis de la activación “bystander”, siendo plausible la activación colateral de células T<sub>H</sub>17 auto-reactivas en el intestino, tras una activación potente y secreción de citocinas por parte de las APC en el contexto de una respuesta específica frente a un microorganismo de la microbiota intestinal.



**Figura 9. Influencia de la microbiota intestinal en la autoinmunidad del SNC** (Berer and Krishnamoorthy, 2014). La microbiota intestinal tiene grandes efectos sobre el sistema inmunológico. La ausencia de microbios intestinales (es decir, condiciones libres de gérmenes) o la alteración de la composición de las comunidades microbianas intestinales a través del tratamiento con antibióticos conduce a un cambio en las respuestas de las células T: las poblaciones de células T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>17 proinflamatorias se reducen, mientras que las células T<sub>reg</sub> están presentes en un mayor número y se observa un aumento en la producción de IL-10, así como IL-13. Los factores dietéticos desempeñan un doble papel: mientras que la alta ingesta de grasa o alto contenido de sal dio lugar a una mayor proporción de células T<sub>H</sub>17 intestinales y por lo tanto, EAE más grave; las vitaminas, los ácidos grasos poliinsaturados o la fibra pueden establecer una microbiota intestinal, capaz de suprimir la autoinmunidad en el SNC. Las bacterias específicas o sus productos

pueden influir directamente en la patogénesis de la autoinmunidad del SNC. A través de la inducción de las respuestas de células T<sub>H</sub>17, las bacterias filamentosas segmentadas (BFS) exacerbaban la EAE, mientras que la producción del polisacárido A (PSA) por la *Bacteroides fragilis* dio lugar a la inducción de una respuesta Treg, que puede suprimir la EAE.

A raíz de esta plausible implicación de la microbiota en la susceptibilidad a la enfermedad, son diversos los esfuerzos orientados hacia la manipulación de la misma para el beneficio terapéutico de la EM. Aunque actualmente no dispongamos de tratamientos aprobados para la EM mediante la manipulación de la microbiota, son numerosos los estudios preclínicos y los ensayos clínicos en curso que muestran esperanza en la modulación terapéutica de la microbiota intestinal en la EM.

¿Sería posible eliminar las bacterias potencialmente patógenas mediante terapias con antibióticos? Teniendo en cuenta la coexistencia de patógenos junto con bacterias protectoras en el intestino, un régimen erradicador con antibióticos podría conducir a resultados no controlables. De hecho, los ensayos realizados hasta la fecha ofrecen resultados ambivalentes: el tratamiento a largo plazo con penicilina mostró resultados favorables en un ensayo (Alonso *et al.*, 2006), pero perjudiciales en otro (Van Nood *et al.*, 2013).

Si bien los efectos de los tratamientos antibióticos sobre la microbiota intestinal siguen siendo inciertos, otras aproximaciones han sido examinadas. Entre ellas, destaca el reciente impulso en los **tratamientos probióticos**, entendidos como la introducción de microorganismos vivos exógenos, con el fin de corregir un desequilibrio microbiano y así ser capaces de ejercer un beneficio en la salud del huésped. Estas terapias probióticas han sido ampliamente usadas en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales; aunque más recientemente, su papel terapéutico se ha extendido a trastornos extraintestinales. En el caso de la EAE, su uso ha proporcionado resultados mixtos, con algunos grupos mostrando un aumento de la respuesta T<sub>H</sub>1 asociada a una EAE exacerbada, otros mostrando una falta de efecto y uno mostrando un efecto protector en la sintomatología de la enfermedad (Von Geldern and Mowry, 2012).

Por último, como una forma radical de manipular una flora intestinal potencialmente patógena, el **trasplante fecal** se ha utilizado para mitigar la enfermedad inflamatoria intestinal severa causada por bacterias patógenas, más concretamente la infección por *C. difficile* (Smits *et al.*, 2013). Este procedimiento ha demostrado la posibilidad de reducir la sintomatología en aquellas personas afectas por esta infección a los seis meses del trasplante, así como la reducción significativa de los organismos patógenos de *C. difficile* y la introducción de una flora comensal estable (Van Nood *et al.*, 2013). Sin embargo, se requieren más estudios para evaluar la durabilidad de este cambio durante un tiempo más largo y su uso en enfermedades extraintestinales, como la EM.

## CONCLUSIONES

En este trabajo, hemos revisado los mecanismos de diferenciación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4 reconocidos hasta la actualidad, haciendo un especial énfasis en el mecanismo involucrado en la diferenciación de los linfocitos T<sub>H</sub>17, así como

sus principales citocinas efectoras y sus funciones principales. Además, hemos centrado nuestro ánimo en intentar discernir el mecanismo por el cual la alteración de la diferenciación de estas células conduce a la aparición de la esclerosis múltiple.

Aunque el mecanismo iniciador de la patogénesis de la esclerosis múltiple no está completamente entendido, se ha establecido un papel primordial de las células T<sub>H</sub>17, gracias principalmente a los estudios realizados en modelos de ratones de encefalomiелitis autoinmune experimental, principal modelo animal de esta enfermedad.

Son muchas las terapias moduladoras de la respuesta inmune desarrolladas hasta la fecha, sin haber conseguido una curación completa de la enfermedad. Actualmente, están siendo estudiadas nuevas terapias biológicas específicas de la vía de diferenciación y actuación de los linfocitos T<sub>H</sub>17, cuyos resultados, que están empezando a conocerse, arrojan grandes esperanzas. En los últimos años además, el papel de la microbiota está empezando a ser reconocido no solo como un factor de riesgo de la enfermedad, sino como un elemento terapéutico más, como han reconocido múltiples ensayos en animales. No obstante, necesitamos más estudios puesto que podríamos estar ante la puerta que nos permita tratar desde un inicio no solo la esclerosis múltiple, sino la mayoría de enfermedades autoinmunes, permitiéndonos la curación total de estas enfermedades.

## **AGRADECIMIENTOS**

Especial dedicación a Ramón Merino Pérez, director de este trabajo, por su constante ayuda y dedicación, especialmente en los momentos duros donde todo se hacía difícil. Sin él, este trabajo nunca hubiera sido posible.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abromson-Leeman, S., Bronson, R. and Dorf, M. (2009) 'Encephalitogenic T cells that stably express both T-bet and ROR[ $\gamma$ ]t consistently produce IFN[ $\gamma$ ] but have a spectrum of IL-17 profiles', *Journal of Neuroimmunology*, 215, pp. 10–24.
- Abusleme, L. and Moutsopoulos, N. (2016) 'IL-17: overview and role in oral immunity and microbiome', *Oral Diseases*.
- Adorini, L., Guery, J. and Trembleau, S. (1996) 'Manipulation of the Th1/Th2 cell balance: an approach to treat human autoimmune diseases?', *Autoimmunity*, 23, pp. 53–68.
- Alonso, A., Jick, S., Jick, H. and Hernán, M. (2006) 'Antibiotic use and risk of multiple sclerosis', *American Journal of Epidemiology*, 163, pp. 997–1002.
- Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N., Danilenko, D. and Lucas, S. (2006) 'Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells', *Nature Immunology*, 7(9), pp. 929–936.
- Becher, B., Durell, B. and Noelle, R. (2002) 'Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12', *Journal of Clinical Investigation*, 110, pp. 493–497.
- Becher, B., Durell, B. and Noelle, R. (2003) 'IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Clinical Investigation*, 112, pp. 1186–1191.
- Ben-Nun, A., Wekerle, H. and Cohen, I. (1981a) 'The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis', *European Journal of Immunology*, 11(3), pp. 195–199.
- Ben-Nun, A., Wekerle, H. and Cohen, I. (1981b) 'Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein', *Nature*, 292(5818), pp. 60–61.
- Berer, K. and Krishnamoorthy, G. (2014) 'Microbial view of central nervous system autoimmunity', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 588, pp. 4207–4213.
- Berer, K., Mues, M., Koutrolos, M., Rasbi, Z., Boziki, M., Johner, C., Wekerle, H. and Krishnamoorthy, G. (2011) 'Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination', *Nature*, 479, pp. 538–541.
- Bernard, C. and Carnegie, P. (1975) 'Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: immunologic response to mouse spinal cord and myelin basic proteins', *Journal of Immunology*, 114(5), pp. 1537–1540.

Bettelli, E., Carrier, Y. and Gao, W. (2006) 'Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells', *Nature*, 441(7090), pp. 235–238.

Bettelli, E., Korn, T. and Kuchroo, V. (2007) 'Th17: The third member of the effector T cell Trilogy', *Current Opinion in Immunology*, 19(6), pp. 652–657.

Bettelli, E., Sullivan, B., Szabo, S., Sobel, R., Glimcher, L. and Kuchroo, V. (2004) 'Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Experimental Medicine*, 200(1), pp. 79–87.

Burgess, A. and Metcalf, D. (1980) 'The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF', *Blood*, 56(6), pp. 947–958.

Cao, Y., Doodes, P., Glant, T. and Finnegan, A. (2008) 'A. IL-27 induces a Th1 immune response and susceptibility to experimental arthritis', *Journal of Immunology*, 180(2), pp. 922–930.

Carrieri, P., Provitiera, V., De Rosa, T., Tartaglia, G., Gorga, F. and Perrella, O. (1998) 'Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity', *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 20(3), pp. 373–382.

Castillo-Álvarez, F. and Marzo-Sola, M. (2017) 'Papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de la esclerosis múltiple', *Neurología*, 322(3), pp. 175–184.

Chen, W., Hardegen, N. and Al., E. (2003) 'Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor foxp3', *Journal of Experimental Medicine*, 198(12), pp. 1875–1886.

Cherwinski, H., Schumacher, J., Brown, K. and Mosmann, T. (1987) 'Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies', *Journal of Experimental Medicine*, 166, pp. 1229–1244.

Chitnis, T., Najafian, N., Benou, C., Salama, A., Grusby, M. and Sayegh, M. (2001) 'Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Clinical Investigation*, 108(5), pp. 739–747.

Chu, C., Wittmer, S. and Dalton, D. (2000) 'Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Experimental Medicine*, 192, pp. 123–128.

Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R., Martinez, G., Rawal, S., Wang, Y., Lim, H., Reynolds, J. and Zhou, X. (2011) 'Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions', *Nature Medicine*, 17, pp. 983–988.

Compston, A. and Coles, A. (2008) 'Multiple sclerosis', *Lancet*, 372, pp. 1502–1517.

Conradi, S., Malzahn, U., Paul, F., Quill, S., Harms, L., Then Bergh, F., Ditzenbach, A., Georgi, T., Heuschmann, P. and Rosche, B. (2013) 'Breastfeeding is associated with lower risk for multiple sclerosis', *Multiple Sclerosis*, 19(5), pp. 553–558.

Constantinescu, C., Asher, A., Fryze, W., Kozubski, W., Wagner, F., Aram, J., Tanasescu, R., Korolkiewicz, R., Dirnberger-Hertweck, M., Steidl, S., Libretto, S., Sprenger, T. and Radue, E. (2015) 'Randomized phase 1b trial of MOR103, a human antibody to GM-CSF, in multiple sclerosis', *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 2(4), p. 117.

Control, C. W. T. C., (TASC), A.-A.-A. S. C., Burton, P. and Clayton, D. (2007) 'Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants', *Nature genetics*, 39(11), pp. 1329–1337.

Cua, D., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. and B, J. (2003) 'Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain', *Nature*, 421(6924), pp. 744–748.

Duerr, R., Taylor, K., Brant, S., Rioux, J., Silverberg, M., Daly, M., Steinhart, A., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T., Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L., Kistner, E., Schumm, L., Lee, A., Gregersen, P., Barmada, M., Rotter, J., Nicolae, D. and Cho, J. (2006) 'A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene', *Science*, 314(5804), pp. 1461–1463.

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2009) 'Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells', *Nature Immunology*, 10(8), pp. 857–863.

El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., Zhang, G., Dittel, B. and Rostami, A. (2011) 'The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF', *Nature Immunology*, 12(6), pp. 568–575.

FDA (2017) *FDA approves new drug to treat multiple sclerosis*. Available at: <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm549325.htm>.

Ferber, I., Brocke, S. and Taylor-Edwards, C. (1996) 'Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Immunology*, 156, pp. 5–7.

Fitzgerald, D., Ciric, B., Touil, T., Harle, H., Grammatikopolou, J., Das Sarma, J., Gran, B., Zhang, G. and Rostami, A. (2007) 'Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Immunology*, 179(5), pp. 3268–3275.

Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T. and Fujiyama, Y. (2003) 'Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease', *Gut*, 52(65–70).

Gaffen, S., Jain, R., Garg, A. and Cua, D. (2014) 'The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing', *Nature Reviews Immunology*, 14, pp. 585–600.

Von Geldern, G. and Mowry, E. (2012) 'The influence of nutritional factors on the prognosis of multiple sclerosis', *Nature Reviews Neurology*, 8(12), pp. 678–689.

Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X., Tato, C., McGeachy, M., Konkel, J., Ramos, H., Davidson, T. and Bouladoux, N. (2010) 'Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- $\beta$  signalling', *Nature*, 467, pp. 967–971.

Gold, R., Linington, C. and Lassmann, H. (2006) 'Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research', *Brain*, 139, pp. 1953–1971.

Goverman, J., Woods, A., Larson, L., Weiner, L., Hood, L. and Zaller, D. (1993) 'Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity', *Cell*, 72(4), pp. 551–560.

Guo, B., Chang, E. and Cheng, G. (2008) 'The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice', *Journal of Clinical Investigation*, 118(5), pp. 1680–1690.

Hamilton, J. (2008) 'Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity', *Nature Reviews Immunology*, 8, pp. 533–544.

Harrington, L., Hatton, R., Mangan, P., Turner, H., Murphy, T. and Murphy, K. (2005) 'Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages', *Nature Immunology*, 6(11), pp. 1123–1132.

Havrdov'a, E., Belova, A. and Goloborodko, A. (2012) 'Positive proof of concept of AIN457, an antibody against interleukin-17A, in relapsing-remitting multiple sclerosis', *Multiple Sclerosis Journal*, 18(4), pp. 509–520.

Hedegaard, C., Krakauer, M., Bendtzen, K., Lund, H., Sellebjerg, F. and Nielsen, C. (2008) 'T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis', *Immunology*, 125(2), pp. 161–169.

Holz, A., Bielekova, B., Martin, R. and Oldstone, M. (2000) 'Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: identification of an encephalitogenic epitope and association with multiple sclerosis', *Journal of Immunology*, 164(2), pp. 1103–1109.

Huber, M., Steinwald, V., Guralnik, A., Brüstle, A., Kleemann, P., Rosenplänter, C., Decker, T. and Lohoff, M. (2008) 'IL-27 inhibits the development of regulatory T cells via STAT3', *International Immunology*, 20(2), pp. 223–234.

Institut Pasteur of Shanghai Chinese Academy of Sciences. 2010. *Hematopoietic stem cell and transgenic animal model*. [Consultado el 3 de mayo]. Disponible en: [http://english.shanghaipasteur.cas.cn/rh/ru/Hematopoietic/201003/t20100324\\_52147.html](http://english.shanghaipasteur.cas.cn/rh/ru/Hematopoietic/201003/t20100324_52147.html)

Ivanov, I., McKenzie, B. and Zhou, L. (2006) 'The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells', *Cell*, 126(6), pp. 1121–1133.

Ivanov, I., Zhou, L. and Littman, D. (2007) 'Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation', *Seminars in Immunology*, 19(6), pp. 409–417.

Jäger, A. and Kuchroo, V. (2010) 'Effector and regulatory T cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation', *Scandinavian Journal of Immunology*, 72(3), pp. 173–184.

Jones, L., Rizzo, L. and Agarwal, R. (1997) 'IFN-gamma-deficient mice develop experimental autoimmune uveitis in the context of a deviant effector response', *Journal of Immunology*, 158, pp. 5997–6005.

Kavrochorianou, N., Markogiannaki, M. and Haralambous, S. (2016) 'IFN- $\beta$  differentially regulates the function of T cell subsets in MS and EAE', *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd, 30, pp. 47–54.

Kaye, J., Kerlero de Rosbo, N., Mendel, I., Flechter, S., Hoffman, M. and Yust, I. (2000) 'The central nervous system-specific myelin oligodendrocytic basic protein (MOBP) is encephalitogenic and a potential target antigen in multiple sclerosis (MS)', *Journal of Neuroimmunology*, 102(2), pp. 189–198.

Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B. and Prat, A. (2007) 'Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation', *Nature Medicine*, 13(1173–1175).

Kerlero de Rosbo, N., Mendel, I. and Ben-Nun, A. (1995) 'Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with a delayed onset and an atypical clinical course, induced in PL/J mice by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-derived peptide: preliminary analysis of MOG T cell epitopes', *European Journal of Immunology*, 25(4), pp. 985–993.

Kerlero de Rosbo, N., Milo, R., Lees, M., Burger, D., Bernard, C. and Ben-Nun, A. (1993) 'Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein', *Journal of Clinical Investigation*, 92(6), pp. 2602–2608.

Kieseier, B. (2011) 'The mechanism of action of interferon- $\beta$  in relapsing multiple sclerosis', *CNS drugs*, 25, pp. 491–502.

Koch, M., Tucker-Heard, G., Perdue, N., Killebrew, J., Urdahl, K. and Campbell, D. (2009) 'The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation', *Nature Immunology*, 10, pp. 595–602.

Kohm, A., Carpentier, P., Anger, H. and Miller, S. (2002) 'Cutting edge: CD4 + CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central

nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Immunology*, 169(9), pp. 4712–4716.

Kolls, J., McCray, P. J. and Chan, Y. (2008) 'Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins', *Nature Reviews Immunology*, 8(11), pp. 829–835.

Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K. and Iwakura, Y. (2006) 'IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Immunology*, 177(566–573).

Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T., Oukka, M. and Kuchroo, V. (2007) 'IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells', *Nature*, 448(7152), pp. 484–487.

Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T., Backstrom, B., Sobel, R., Wucherpfennig, K., Strom, T., Oukka, M. and Kuchroo, V. (2007) 'Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation', *Nature Medicine*, 13, pp. 423–431.

Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S. and Inoue, K. (1999) 'IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis', *Journal of Clinical Investigation*, 103(1345–1352).

Krakovski, M. and Owens, T. (1996) 'Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis', *European Journal of Immunology*, 26, pp. 1641–1646.

Kroenke, M., Carlson, T., Andjelkovic, A. and Segal, B. (2008) 'IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition', *Journal of Experimental Medicine*, 205(7), pp. 1535–1541.

Laatsch, R., Kies, M., Gordon, S. and Alvord, E. J. (1962) 'The encephalomyelitic activity of myelin isolated by ultracentrifugation', *Journal of Experimental Medicine*, 115, pp. 777–788.

Langrish, C., Chen, Y., Blumenschein, W., Mattson, J. and Basham, B. (2005) 'IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation', *Journal of Experimental Medicine*, 201(2), pp. 233–240.

Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D., Sobel, R., Regev, A. and Kuchroo, V. (2012) 'Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells', *Nature Immunology*, 13(10), pp. 991–999.

Lee, Y., Menezes, J., Umesaki, Y. and Mazmanian, S. (2011) 'Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, pp. 4615–4622.

- Lee, Y., Mukasa, R., Hatton, R. and Weaver, C. (2009) 'Developmental plasticity of Th17 and Treg cells', *Current Opinion in Immunology*, 21(3), pp. 274–280.
- Lee, Y., Turner, H., Maynard, C., Oliver, J., Chen, D., Elson, C. and Weaver, C. (2009) 'Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage', *Immunity*, 30(1), pp. 92–107.
- Legroux, L. and Arbour, N. (2015) 'Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story', *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 10(4), pp. 528–546.
- Leonard, W. and Spolski, R. (2005) 'Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation', *Nature Reviews Immunology*, 5(9), pp. 688–698.
- Levine, S. and Sowinski, R. (1973) 'Experimental allergic encephalomyelitis in inbred and outbred mice', *Journal of Immunology*, 110(1), pp. 139–143.
- Liang, S., Tan, X., Luxenberg, D., Karim, R. and Dunussi-Joannopoulos, K Collins, M. (2006) 'Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides', *Journal of Experimental Medicine*, 203(10), pp. 2271–2279.
- Liu, Y., Helms, C., Liao, W., Zaba, L., Duan, S., Gardner, J., Wise, C., Miner, A., Malloy, M., Pullinger, C., Kane, J., Saccone, S., Worthington, J., Bruce, I., Kwok, P., Menter, A., Krueger, J., Barton, A., Saccone, N. and Bowcock, A. (2008) 'A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci', *Public Library of Science genetics*, 4(3).
- Liu, Y., Teige, I., Birnir, B. and Issazadeh-Navikas, S. (2006) 'Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE', *Nature Medicine*, 12(5), pp. 518–525.
- Lochner, M., Peduto, L., Cherrier, M., Sawa, S., Langa, F., Varona, R., Riethmacher, D., Si-Tahar, M., Di Santo, J. and Eberl, G. (2008) 'In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgammat+ T cells', *Journal of Experimental Medicine*, 205, pp. 1381–1393.
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H. and Langer-Gould, A. (2002) 'Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis', *Nature Medicine*, 8, pp. 500–508.
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M. and Lassmann, H. (2000) 'Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination', *Annals of Neurology*, 47, pp. 707–717.
- Lucey, D. (1999) 'Evolution of the type-1 (Th1)-type-2 (Th2) cytokine paradigm', *Infectious Disease Clinics of North America*, 13, pp. 1–9.
- Maghzi, A., Etemadifar, M., Heshmat-Ghahdarjani, K., Nonahal, S., Minagar, A. and Moradi, V. (2012) 'Caesarean delivery may increase the risk of multiple sclerosis', *Multiple Sclerosis*, 18, pp. 468–471.

- Mangan, P., Harrington, L. and O'Quinn, D. (2006) 'Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the TH17 lineage', *Nature*, 441(7090), pp. 231–234.
- Manzel, A., Muller, D., Hafler, D., Erdman, S., Linker, R. and Kleinewietfeld, M. (2014) 'Role of "Western diet" in inflammatory autoimmune diseases', *Current Allergy and Asthma Reports*, 14(1), p. 404.
- Martin, R. and McFarland, H. (1995) 'Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis', *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 32, pp. 121–182.
- Martin, R., McFarland, H. and McFarlin, D. (1992) 'Immunological aspects of demyelinating diseases', *Annual Review of Immunology*, 10, pp. 153–187.
- Marusic, S., Miyashiro, J., Douhan 3rd, J., Konz, R., Xuan, D., Pelker, J., Ling, V., Leonard, J. and Jacobs, K. (2002) 'Local delivery of granulocyte macrophage colony-stimulating factor by retrovirally transduced antigen-specific T cells leads to severe, chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in mice', *Neuroscience Letters*, 332, pp. 185–189.
- Matthys, P., Vermeire, K., Mitera, T., Heremans, H., Huang, S. and Billiau, A. (1998) 'Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice', *European Journal of Immunology*, 28(2143–2151).
- Matusevicius, D., Kivisäkk, P., He, B., Kostulas, N., Ozenci, V., Fredrikson, S. and Link, H. (1999) 'Interleukin-17mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis', *Multiple Sclerosis*, 5(2), pp. 101–104.
- McGeachy, M., Bak-Jensen, K., Chen, Y., Tato, C., Blumenschein, W., McClanahan, T. and Cua, D. (2007) 'TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology', *Nature Immunology*, 8, pp. 1390–1397.
- McGeachy, M., Stephens, L. and Anderton, S. (2005) 'Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system', *Journal of Immunology*, 175(5), pp. 30225–3032.
- McQualter, J., Darwiche, R., Ewing, C., Onuki, M., Kay, T., Hamilton, J., Reid, H. and Bernard, C. (2001) 'Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis', *Journal of Experimental Medicine*, 194, pp. 873–882.
- Milo, R. and Kahana, E. (2010) 'Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment', *Autoimmunity Reviews*, 9, pp. 387–394.
- Miossec, P., Korn, T. and Kuchroo, V. (2009) 'Interleukin-17 and type 17 helper T cells', *The New England Journal of Medicine*, 361(888–898).
- Miyazaki, Y., Shimano, Y., Wang, S. and Yoshida, H. (2008) 'Amelioration of delayed-type hypersensitivity responses by IL-27 administration', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(3), pp. 397–402.

Mosmann, T. R. and Cher, D. (1987) 'Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones', *The Journal of Immunology*, 138(11), pp. 3688–3694.

Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M., Giedlin, M. and Coffman, R. (1986) 'Two types of murine helper T cell clone. I. definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins', *The Journal of Immunology*, 136(7), pp. 2348–2357.

Muranski, P. and Restifo, N. (2013) 'Essentials of Th17 cell commitment and plasticity Review Article Essentials of Th17 cell commitment and plasticity', *Blood*, 121(13), pp. 2402–2414.

Murphy, A., Lalor, S., Lynch, M. and Mills, K. (2010) 'Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis', *Brain, Behavior, and Immunity*, 24, pp. 641–651.

Murphy, K., Travers, P. and Walport, M. (2009) *Inmunobiología de Janeway*. 7ª edición. McGraw-Hill Education.

Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K. and Iwakura, Y. (2003) 'Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice', *Journal of Immunology*, 171, pp. 6373–6177.

Naparstek, Y., Ben-Nun, A., Holoshitz, J., Reshef, T., Frenkel, A. and Rosenberg, M. (1983) 'T lymphocyte lines producing or vaccinating against autoimmune encephalomyelitis (EAE). Functional activation induces peanut agglutinin receptors and accumulation in the brain and thymus of line cells', *European Journal of Immunology*, 13(5), pp. 418–423.

Van Nood, E., Vriese, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E., de Vos, W., Visser, C., Kuijper, E., Bartelsman, J., Tijssen, J., Speelman, P., Dijkgraaf, M. and Keller, J. (2013) 'Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*', *The New England Journal of Medicine*, 368, pp. 407–415.

Norgaard, M., Nielsen, R., Jacobsen, J., Gradus, J., Stenager, E., Koch-Henriksen, N., Lash, T. and Sorensen, H. (2011) 'Use of penicillin and other antibiotics and risk of multiple sclerosis: a population-based case-control study', *American Journal of Epidemiology*, 174, pp. 945–948.

Nurieva, R., Yang, X., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S. and Jetten, A. (2007) 'Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells', *Nature*, 448, pp. 480–483.

O'Shea, J. and Paul, W. (2010) 'Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells', *Science*, 327(5969), pp. 1098–1102.

Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D., Begum-Haque, S. and Kasper, L. (2011) 'Gut, bugs, and brain: Role of commensal bacteria in the control of central nervous system disease', *Annals of Neurology*, 69, pp. 240–247.

Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E., Hall, J., Chou, D., Dos Santos, L., O'Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., Kastenmayer, R., Hunter, C., Grigg, M. and Belkaid, Y. (2009) 'Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection', *Immunity*, 31, pp. 772–786.

Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. and XU, Y. (2000) 'Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct form IL-12', *Immunity*, 13(5), pp. 715–725.

Panitch, H., Hirsch, R., Schindler, J. and Johnson, K. (1987) 'Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system', *Neurology*, 37, pp. 1097–1102.

Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K. and Vega, F. (2002) 'A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R', *Journal of Immunology*, 168, pp. 5699–5708.

Park, H., Li, Z., Yang, X., Chang, S., Nurieva, R. and Wang, Y. (2005) 'A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17', *Nature Immunology*, 6(11), pp. 1133–1141.

Parsonage, G., Filer, A., Bik, M., Hardie, D., Lax, S., Howlett, K., Church, L., Raza, K., Wong, S., Trebilcock, E., Scheel-Toellner, D., Salmon, M., Lord, J. and Buckley, C. (2008) 'Prolonged, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent, neutrophil survival following rheumatoid synovial fibroblast activation by IL-17 and TNFalpha', *Arthritis Research & Therapy*, 10(2), p. R47.

Paty, D. and Li, D. (1993) 'Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group', *Neurology*, 43, pp. 662–667.

Perrella, O., Carrieri, P., DeMercato, R. and Buscaino, G. (1993) 'Markers of activated T lymphocytes and T cell receptor gamma/delta+ in patients with multiple sclerosis', *European Neurology*, 33(2), pp. 152–155.

Pettinelli, C., Fritz, R., Chou, C. and McFarlin, D. (1982) 'Encephalitogenic activity of guinea pig myelin basic protein in the SJL mouse', *Journal of Immunology*, 129(3), pp. 1209–1211.

Ponomarev, E., Shriver, L., Maresz, K., Pedras-Vasconcelos, J., Verthelyi, D. and Dittel, B. (2007) 'GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Immunology*, 178(1), pp. 39–48.

Rangacharia, M. and Kuchroo, V. (2013) 'Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology', *Journal of Autoimmunity*, 45, pp. 31–39.

Rangel-Moreno, J., Carragher, D., de la Luz Garcia-Hernandez, M., Hwang, J., Kusser, K., Hartson, L., Kolls, J., Khader, S. and Randall, T. (2011) 'The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17', *Nature Immunology*, 12(7), pp. 639–646.

Reddy, J., Illes, Z., Zhang, X., Encinas, J. and Pyrdol, J. (2004) 'Myelin proteolipid protein-specific CD4 + CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(43), pp. 15434–15439.

Rostami, A. and Ciric, B. (2013) 'Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination', *Journal of the Neurological Sciences*, 333, pp. 76–87.

Rouvier, E., Luciani, M., Mattéi, M., and Denizot, F. (1993) 'CTLA-8, Cloned from an Activated T Cell, Bearing AU-Rich Messenger RNA Instability Sequences, and Homologous to a Herpesvirus Saimiri Gene', *Journal of Immunology*, 150(12), pp. 5445–5456.

Sadovnick, A. and Ebers, G. (1993) 'Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview', *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 20, pp. 17–29.

Saez-Torres, I., Brieva, L., Espejo, C., Barrau, M., Montalba, X. and Martinez-Caceres, E. (2002) 'Specific proliferation towards myelin antigens in patients with multiple sclerosis during a relapse', *Autoimmunity*, 35(1), pp. 45–50.

Satoh, J., Sakai, K., Endoh, M., Koike, F., Kunishita, T. and Namikawa, T. (1987) 'Experimental allergic encephalomyelitis mediated by murine encephalitogenic T cell lines specific for myelin proteolipid apoprotein', *Journal of Immunology*, 138(1), pp. 179–184.

Schluesener, H. and Wekerle, H. (1985) 'Autoaggressive T lymphocyte lines recognizing the encephalitogenic region of myelin basic protein: in vitro selection from unprimed rat T lymphocyte populations', *Journal of Immunology*, 135(5), pp. 3128–3133.

Seder, R., Gazzinelli, R., Sher, A. and WE, P. (1993) 'Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(21), pp. 10188–10192.

Segal, B., Constantinescu, C., Raychaudhuri, A., Kim, L., Fidelus-Gort, R. and Kasper, L. (2008) 'Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing- remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo- controlled, randomised, dose-ranging study', *The Lancet Neurology*, 7, pp. 796–804.

Shi, G., Cox, C., Vistica, B., Tan, C., Wawrousek, E. and Gery, I. (2008) 'Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells', *Journal of Immunology*, 181(10), pp. 7205–7213.

Sieff, C., Niemeyer, C. and Faller, D. (1988) 'Human colony-stimulating factors and stromal cell function', *Society of General Physiologists*, 43, pp. 47–55.

Smits, L., Bouter, K., de Vos, W., Borody, T. and Nieuwdorp, M. (2013) 'Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation', *Gastroenterology*, 145, pp. 946–953.

Sobel, R., van der Veen, R. and Lees, M. (1986) 'The immunopathology of chronic experimental allergic encephalomyelitis induced in rabbits with bovine proteolipid protein', *Journal of Immunology*, 136(1), pp. 157–163.

Stromnes, I., Cerretti, L., Liggitt, D., Harris, R. and Goverman, J. (2008) 'Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17', *Nature Medicine*, 14(3), pp. 337–342.

Stuart, G. and Krikorian, K. (1928) 'The neuro-paralytic accidents of anti-rabies treatment', *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 22, pp. 327–377.

Stumhofer, J., Laurence, A., Wilson, E., Huang, E., Tato, C. and Johnson, L. (2006) 'Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system', *Nature Immunology*, 7(9), pp. 937–945.

Teunissen, M., Koomen, C., de Waal Malefyt, R., Wierenga, E. and Bos, J. (1998) 'Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes', *Journal of Investigative Dermatology*, 111(645–649).

Tostanoski, L., Chiu, Y., Gammon, J., Simon, T., Andorko, J., Bromberg, J. and Jewell, C. (2016) 'Reprogramming the Local Lymph Node Microenvironment Promotes Tolerance that Is Systemic and Antigen Specific', *Cell Reports*. Elsevier Company., 16, pp. 2940–2952.

Trifari, S., Kaplan, C., Tran, E., Crellin, N. and Spits, H. (2009) 'Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells', *Nature Immunology*, 10(8), pp. 864–871.

Trinchieri, G. (1995) 'Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptative immunity', *Annual Review of Immunology*, 13, pp. 251–276.

Tuohy, V., Lu, Z., Sobel, R., Laursen, R. and Lees, M. (1988) 'A synthetic peptide from myelin proteolipid protein induces experimental allergic encephalomyelitis', *Journal of Immunology*, 141(4), pp. 1126–1130.

Tzartos, J., Friese, M., Craner, M., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M. and Fugger, L. (2008) 'Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis', *The American Journal of Pathology*, 172(1), pp. 146–155.

Uyttenhove, C., Brombacher, F. and Van Snick, J. (2010) 'TGF- $\beta$  interactions with IL-1 family members trigger IL-4-independent IL-9 production by mouse CD4<sup>+</sup> T cells', *European Journal of Immunology*, 40, pp. 2230–2235.

Veldhoen, M., Hocking, R., Atkins, C., Locksley, R. and Stockinger, B. (2006) 'TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17 producing T cells', *Immunity*, 24, pp. 179–189.

Veldhoen, M., Hocking, R., Flavell, R. and B, S. (2006) 'Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease', *Nature Immunology*, 7, pp. 1151–1156.

Vu, T., Myers, L., Ellison, G., Mendoza, F. and Bronstein, J. (2001) 'T-cell responses to oligodendrocyte-specific protein in multiple sclerosis', *Journal of Neuroscience Research*, 66(3), pp. 506–509.

Waksman, B., Porter, H., Lees, M., Adams, R. and Folch, J. (1954) 'A study of the chemical nature of components of bovine white matter effective in producing allergic encephalomyelitis in the rabbit', *Journal of Experimental Medicine*, 100(5), pp. 451–471.

Wallstrom, E., Khademi, M., Andersson, M., Weissert, R., Linington, C. and Olsson, T. (1998) 'Increased reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides and epitope mapping in HLA DR2(15) $\beta$  multiple sclerosis', *European Journal of Immunology*, 28(10), pp. 3329–3335.

Wang, S., Miyazaki, Y., Shinozaki, Y. and Yoshida, H. (2007) 'Augmentation of antigen-presenting and Th1-promoting functions of dendritic cells by WSX-1(IL-27R) deficiency', *Journal of Immunology*, 179(10), pp. 6421–6428.

Wang, Y., Su, M. and Wan, Y. (2011) 'An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells.', *Immunity*, 35, pp. 337–348.

Weaver, C., Hatton, R., Mangan, P. and Harrington, L. (2007) 'IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages Key Words', *Annual Review of Immunology*, 25, pp. 821–852.

Williams, R., Lees, M., Cambi, F. and Macklin, W. (1982) 'Chronic experimental allergic encephalomyelitis induced in rabbits with bovine white matter proteolipid apoprotein', *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 42(5), pp. 508–521.

Wilson, B., Rowell, E. and Sekimata, M. (2009) 'Epigenetic control of T-helper-cell differentiation', *Nature Reviews Immunology*, 9(2), pp. 91–105.

Wilson, N., Boniface, K., Chan, J., McKenzie, B., Blumenschein, W., Mattson, J., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F. and Lecron, J. (2007) 'Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells', *Nature Immunology*, 8(9), pp. 950–957.

Wohlfert, E., Grainger, J., Bouladoux, N., Konkel, J., Oldenhove, G., Ribeiro, C., Hall, J., Yagi, R., Naik, S. and Bhairavabhotla, R. (2011) 'GATA3 controls Foxp3 regulatory T cell fate during inflammation in mice', *Journal of Clinical Investigation*, 121, pp. 4503–4515.

- Yang, D., Chen, Q., Hoover, D., Staley, P., Tucker, K., Lubkowski, J. and Oppenheim, J. (2003) 'Many chemokines including CCL20/MIP-3 $\alpha$  display antimicrobial activity', *Journal of Leukocyte Biology*, 74(3), pp. 448–455.
- Yang, J., Yang, M., Htut, T., Ouyang, X., Hanidu, A., Li, X., Sellati, R., Jiang, H., Zhang, S., Li, H., Zhao, J., Ting, A., Mayer, L., Unkeless, J., Labadia, M., Hodge, M., Li, J. and Xiong, H. (2008) 'Epstein-Barr virus-induced gene 3 negatively regulates IL-17, IL-22 and ROR $\gamma$ t', *European Journal of Immunology*, 38, pp. 1204–1214.
- Yang, X., Nurieva, R., Martinez, G., Kang, H., Chung, Y., Pappu, B., Shah, B., Chang, S., Schluns, K., Watowich, S., Feng, X., Jetten, A. and Dong, C. (2008) 'Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs', *Immunity*, 29, pp. 44–56.
- Yang, X., Pappu, B. and Nurieva, R. (2008) 'THelper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ ', *Immunity*, 28(1), pp. 29–39.
- Yoshimoto, T., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Mizuguchi, J. and Nakanishi, K. (2007) 'IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation', *Journal of Immunology*, 179(7), pp. 4415–4423.
- Young, A., Linehan, E., Hams, E., O'Hara, H., McClurg, A., Johnston, J., Hunter, C., Fallon, P. and Fitzgerald, D. (2012) 'Cutting edge: suppression of GM-CSF expression in murine and human T cells by IL-27', *Journal of Immunology*, 189, pp. 2079–2083.
- Zamvil, S., Mitchell, D., Moore, A., Kitamura, K., Steinman, L. and Rothbard, J. (1986) 'T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis', *Nature*, 324(6069), pp. 258–260.
- Zenobia, C. and Hajishengallis, G. (2000) 'Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation', *Periodontology*, 69, pp. 142–159.
- Zhong, M., Cohen, L., Meshorer, A., Kerlero de Rosbo, N. and Ben-Nun, A. (2000) 'T-cells specific for soluble recombinant oligodendrocyte-specific protein induce severe clinical experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2(b) and H-2(s) mice', *Journal of Neuroimmunology*, 105(1), pp. 39–45.
- Zhou, L., Chong, M. and Littman, D. (2009) 'Plasticity of CD4<sup>+</sup> T Cell Lineage Differentiation', *Immunity*. Elsevier Inc., 30(5), pp. 646–655.
- Zhou, L., Lopes, J. and Chong, M. (2008) 'TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ t function', *Nature*, 453(7192), pp. 236–240.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S., Jeker, L., Penaranda, C., Martínez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W. and Bluestone, J. (2009) 'Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo', *Nature Immunology*, 10, pp. 1000–1007.

