



**Universidad Nacional Autónoma de México  
Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

**CORTICOESTEROIDES INTRANASALES COMO TRATAMIENTO DE RECAÍDAS DE  
ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

**Tesis**

**Que para optar por el grado de  
Doctora en Ciencias**

**Presenta:**

**Dunia Rassy Kuri**

**Directora de Tesis**

**Dra. Edda Sciutto Conde  
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

**Comité Tutor**

**Dra. Agnès Odile Marie Fleury  
Facultad de Medicina**

**Dra. Gohar Gevorgyan  
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

**Ciudad de México, junio de 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La realización de este proyecto de tesis fue posible gracias al apoyo de:

Posgrado en Ciencias Biomédicas de la UNAM, de manera particular a Azucena Ayala, Ivonne Torres y Marisol Villafañez.

CONACyT por el apoyo recibido mediante el proyecto SALUD-2013-01-201448 y por la beca CONACyT nacional, número de becario 594491.

Fundación Miguel Alemán por el Estímulo a Investigaciones Médicas "Miguel Alemán Valdés" recibido en 2017.

UNAM por los fondos recibidos a través de DGAPA, proyecto IN211917 y por medio del "Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos" (PROVACADI) del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Secretaría de Salud, en especial a la Dra. Yamel Rito, la Dra. Teresita Corona Vázquez, y el Dr. José de Jesús Flores Rivera.

Dr. Miguel Tapia (Unidad de Microscopía), Dra. Tzipe Govezensky (Apoyo Estadístico) y Pedro Medina del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Como familiar de un paciente con una enfermedad crónica, siempre nos estamos preguntando si ese ser querido está recibiendo la mejor atención posible de entre aquello que existe en la faz de este planeta. ¿Se habría podido hacer algo diferente? Sin querer, y un poco queriendo, terminé realizando un proyecto de esclerosis múltiple, justamente esclerosis múltiple remitente recurrente. Ese proceso de investigación, en libros, en pláticas con médicos, escuchando de otros pacientes, fue también un proceso de catarsis emocional. Hoy estoy segura y tranquila de que mi mamá recibió el mejor tratamiento disponible mientras vivió. También quiero que otros familiares de pacientes con esclerosis múltiple sientan lo mismo que yo independientemente de su situación económica y de su origen. Por eso me ilusionaría que un poco de los conocimientos adquiridos de este proyecto puedan impactar en la calidad de vida de los pacientes.

Hablando de un poco de conocimiento, pospuse por mucho tiempo hacer un doctorado porque me parecía inverosímil tanto esfuerzo para hacer una contribución tan especializada en un campo tan específico, y de poca importancia en el mundo. Sin embargo, en un doctorado vi la oportunidad de compartir conocimientos, ya fuera mediante la divulgación o por la docencia, áreas donde a mi juicio, podrían involucrarse más los investigadores de nuestro país. Y bueno... acompañada de las frases "ten cuidado con lo que deseas, podría hacerse realidad" y "la vida tiene formas misteriosas de llevarte a donde debes llegar", heme hoy como Asistente académico y Profesor de Asignatura en la Escuela Nacional de Lenguas, Lingüística y Traducción de la UNAM. No pude caer más "en blandito"; en un lugar donde mi espíritu todólogo se ajusta a la perfección. Miles de gracias a Carmen Contijoch, Diana Hirschfeld y Guillermo Jiménez; millones de gracias a Sussy Rodríguez por acogerme.

Mi doctorado fue sin duda un gran escalón para encontrarme donde hoy estoy y una etapa de muchos aprendizajes. No hubiera logrado subir al siguiente peldaño sin la ayuda de Marcel Bautista y Brandon Bárcena. Son polos opuestos, pero muy a su manera dieron de ustedes para lograr esto. Alejandro Espinosa, sin ti los proyectos de Neuroinflamación no tendrían pies ni cabeza. Los cafecitos, las comiditas y leer muestras en el Magpix con Laura Montero y Diana Torres también hicieron llevadera esta etapa.

Aunque hoy estoy segura de que la investigación biomédica básica no es para mí, agradezco la confianza que la doctora Edda Sciutto me tuvo de regresar al laboratorio, aún y cuando llevaba un tiempo considerable fuera de ellos. Le agradezco también que me haya ayudado a graduarme aún y cuando estuvo consciente de este cambio de intereses. En este mismo sentido agradezco al doctor Luis Bernardo Tovar que más allá de lo académico con sus palabras me ayudó a dejar de sentirme mal por estarle siendo infiel a las ciencias biomédicas.

Nadie vivió tan de cerca este doctorado, literal y metafóricamente, como Rocío Navarro, mi Chorri. Experimentaste conmigo los éxitos, los fracasos y hasta los corajes. Lo veo en retrospectiva y no sé cómo aceptaste ir al laboratorio, y en fines de semana, a ayudarme o de menos, echarme porras. Además, quería que me dieras tu "juicio experto" de mis proyectos, presentaciones y figuras cuando ni siquiera son tu área de especialidad. Yo, seguramente no me voy a ganar el Nobel, no de Medicina ni de Química, por lo menos, pero tú sin duda te mereces tu doctorado Honoris Causa. Ya lo estoy gestionando, pronto llegará. Te amo.

En la segunda fila, pero no por ello menos importante, estuvo mi abuela. Para ella, ya soy doctora desde hace mucho. No lo he hecho tan frecuentemente, y quizá no me alcance el tiempo para darle las gracias por su amor incondicional, por preocuparse de sobremanera y siempre estar ahí.

# Índice

<b>Lista de Tablas y Figuras</b> .....	<b>4</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Resumen</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1. Esclerosis múltiple</b> .....	<b>8</b>
2.1.1. Manifestaciones clínicas y epidemiología .....	8
2.1.2. Factores de riesgo .....	9
2.1.3. Evolución y tipos de esclerosis múltiple .....	13
2.1.4. Inmunopatología de la esclerosis múltiple remitente recurrente.....	14
2.1.5. Modelos experimentales de la EMRR: EAE .....	17
<b>2.2. Tratamiento de la EMRR</b> .....	<b>20</b>
2.2.1. Tratamiento modificador de la enfermedad .....	20
2.2.2. Tratamiento de recaídas .....	21
<b>2.3. La vía intranasal (IN) como opción de administración de la MP</b> .....	<b>26</b>
2.3.1. Breve historia de la vía IN como ruta hacia el SNC.....	26
2.3.2. Ventajas de la vía IN.....	27
2.3.3. Requisitos para la administración intranasal.....	28
2.3.4. Distribución de fármacos desde la cavidad nasal hasta el SNC.....	29
<b>3. Justificación</b> .....	<b>37</b>
<b>4. Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1. Hipótesis</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2. Objetivo principal</b> .....	<b>39</b>
4.2.1. Objetivos particulares.....	39
<b>5. Metodología</b> .....	<b>40</b>
<b>5.1. Encefalomiелitis autoinmune experimental</b> .....	<b>40</b>
<b>5.2. Cálculo de la dosis equivalente de MP</b> .....	<b>40</b>
<b>5.3. Preparación y administración de tratamientos</b> .....	<b>40</b>
<b>5.4. Obtención y procesamiento de muestras</b> .....	<b>42</b>
<b>5.5. Descripción histológica de la infiltración celular y el epitelio nasal</b> .....	<b>42</b>
<b>5.6. Inmunofluorescencia</b> .....	<b>44</b>
<b>5.7. Medición de citocinas</b> .....	<b>45</b>
<b>5.8. Análisis estadístico</b> .....	<b>45</b>
<b>6. Resultados</b> .....	<b>46</b>

6.1.	La administración de MP IN reduce la severidad asociada al modelo de EAE.....	46
6.2.	El tratamiento de MP IN reduce la infiltración celular hacia la médula espinal.....	50
6.3.	La MP IN atenúa la desmielinización por EAE.....	52
6.4.	La migración de linfocitos y la activación de macrófagos/microglia y astrocitos se reduce con el tratamiento de MP IN .....	53
6.5.	Modificación de la morfología de microglia/macrófagos y astrocitos tras la exposición a MP IN	56
6.6.	Disminución de citocinas pro-inflamatorias en la médula espinal de ratones tratados con MP IN	58
6.7.	Presencia extendida de MP en la médula espinal tras la administración IN .....	60
6.8.	Dosis menores de MP IN son igual de efectivas en EAE.....	62
6.9.	La administración IN de MP no conlleva daño severo a la cavidad nasal.....	65
7.	Discusión .....	67
8.	Conclusiones .....	80
9.	Referencias .....	81
10.	Lista de anexos .....	98
Anexo I	Términos de Búsqueda Pubmed Tabla 1.....	99
Anexo II	Escala EDSS .....	100
Anexo III	Escala de Evaluación EAE.....	105
Anexo IV	Solicitud de patente ante el IMPI.....	106
Anexo V	Patente en sitio web de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual .....	107
Anexo VI	Carta de aprobación del Comité de Investigación del INNN.....	108
Anexo VII	Carta de aprobación del Comité de Ética del INNN.....	109
Anexo VIII	Artículos publicados durante el desarrollo de este proyecto.....	110

## Lista de Tablas y Figuras

<b>Tipo</b>	<b>Título</b>
Figura 1.	Evolución y tipos de esclerosis múltiple
Figura 2.	Respuesta inmune durante recaídas en EMRR
Tabla 1.	Principales modelos animales de la EMRR.
Tabla 2.	Tratamientos modificadores de la enfermedad (TME) disponibles para EMRR.
Tabla 3.	Efectos adversos de la administración de MP IV en múltiples estudios.
Figura 3.	Rutas de la administración intranasal desde la cavidad nasal hacia el SNC.
Figura 4.	Posibilidades de transporte desde el epitelio hacia la lámina propia.
Figura 5.	Administración intranasal en ratones.
Tabla 4.	Combinaciones de anticuerpos empleados para los ensayos de inmunofluorescencia.
Tabla 5.	No existieron diferencias en cuanto a los grados de EAE y peso corporal de los grupos al inicio de los tratamientos.
Figura 6.	Los ratones tratados con MP no experimentaron el pico de actividad característico de la EAE.
Figura 7.	El tratamiento con MP IN acumuló una menor severidad a lo largo del periodo de seguimiento.
Figura 8.	Los ratones tratados con MP IV e IN experimentaron una menor baja de peso.
Figura 9.	Los tratamientos con MP IV e IN resultaron en una menor infiltración de células inmunes hacia el SNC.
Figura 10.	La mielina mostró alteraciones moderadas cuando los ratones recibieron MP IV e IN.
Figura 11.	Los ratones tratados con MP IV e IN tuvieron una menor infiltración de linfocitos (fila superior) y presentaron una menor intensidad de fluorescencia media (IMF) para Iba1 (fila intermedia) y GFAP (fila inferior).
Figura 12.	La glía de los grupos tratados con MP presenta una morfología intermedia entre aquella de los grupos naive y EAE+SS.
Figura 13.	La MP IV e IN actúa principalmente en la médula espinal reduciendo la secreción de citocinas pro-inflamatorias.
Figura 14.	La marca correspondiente a MP es más evidente en el grupo que la recibió por vía IN.
Figura 15.	La concentración de MP detectada mediante HPLC es 9 veces mayor cuando se administra por vía IN.
Figura 16.	No hay diferencias cuando se administra la dosis de MP sin diluir para obtener un volumen final constante.
Figura 17.	Las dosis inferiores de MP tienen una capacidad similar de reducir los signos de la EAE.
Figura 18.	Las dosis inferiores de MP IN redujeron la severidad acumulada en el periodo de seguimiento.
Figura 19.	La administración IN de MP no genera daño tisular en la cavidad nasal.

## Lista de Abreviaturas

ACF	Adyuvante completo de Freud
ARN	Ácido ribonucleíco
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina de suero bovino
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
EM	Esclerosis múltiple
EMRR	Esclerosis múltiple remitente-recurrente
EMSP	Esclerosis múltiple secundaria progresiva
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GR	Receptor de glucocorticoides
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
Iba1	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado tipo 1
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN- $\gamma$	Interferón- $\gamma$
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IN	Intranasal
IT	Intratecal

IV	Intravenoso(a)
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MBP	Proteína básica de mielina
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
miRNA	MicroARN
MOG	Glicoproteína de oligodendrocitos asociados a la mielina
MP	Metilprednisolona
NEDA	No evidencia de actividad de la enfermedad
PTX	Toxina de <i>Bacillus pertussis</i>
SNC	Sistema nervioso central
SS	Solución salina
TBS	Solución salina tamponada con Tris
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante- $\beta$
TME	Tratamiento modificador de la enfermedad
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
UV	Ultravioleta
v.c.	Volumen constante
VEB	Virus de Epstein-Barr

# 1. Resumen

La esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR) es una enfermedad crónica autoinmune y degenerativa del sistema nervioso central (SNC) que se caracteriza por episodios agudos de neuroinflamación conocidos como recaídas. Aunque en años recientes se han desarrollado tratamientos que buscan reducir su frecuencia, estas siguen siendo una realidad de los pacientes y su adecuado manejo determina la evolución. El tratamiento estándar para las recaídas consiste en altas dosis (1-2 g) de metilprednisolona (MP) intravenosa (IV) por 3 a 5 días que requiere atención hospitalaria, es invasiva y conlleva múltiples efectos adversos por la gran exposición sistémica necesaria para alcanzar concentraciones mínimas efectivas en el SNC. Muchas de estas desventajas se podrían evitar a través de la administración intranasal (IN). Al ser una ruta más directa hacia el SNC, dosis menores pueden ser igualmente efectivas sin presentar efectos adversos.

Tomando en cuenta lo anterior este trabajo explora la eficacia de la administración IN de MP para reducir la neuroinflamación en un modelo murino de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), el modelo más empleado de EMRR.

El tratamiento IN logró suprimir el pico de actividad de la EAE al igual que la administración IV. A nivel histológico se observó una reducción en el número de focos de inflamación y menores evidencias de desmielinización que en el grupo que no recibió tratamiento. Por medio de inmunofluorescencia, se corroboró la menor infiltración de linfocitos hacia la médula espinal y una reducción en la expresión de Iba1 en macrófagos/microglia y de GFAP en los grupos que recibieron MP. La morfología de las células gliales en los grupos tratados sugiere una respuesta antiinflamatoria sustentada en menores niveles de citocinas pro-inflamatorias (IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ ).

Al comparar la distribución y concentraciones alcanzadas en el SNC, se encontró que empleando la vía IN a las 24 horas posteriores a la administración, la concentración de MP era 9 veces superior. Dosis menores de 100 mg/kg y 25 mg/kg fueron capaces de reducir los grados de EAE. Los resultados de este trabajo apuntan además a que la administración intranasal no inflige daños en la cavidad nasal.

En conjunto, los resultados indican que la administración IN de MP es por lo menos igual de efectiva que la administración IV para el control de la neuroinflamación en la EAE.

## Summary

Relapsing Remitting Multiple Sclerosis (RRMS) is a chronic, autoimmune and degenerative disease affecting the central nervous system (CNS). It is characterized by acute episodes of neuroinflammation known as relapses. Despite the existence of disease-modifying therapies seeking to reduce relapse frequency, these are still a reality for RRMS patients. Adequate relapse management determines patient evolution. The recommended treatment for these acute neuroinflammation episodes consists of high doses (1-2 g) of intravenous (IV) methylprednisolone (MP) for 3-5 days. Nevertheless, this administration route is invasive and involves systemic exposure with multiple unwanted side effects. Many of the undesirable characteristics of IV administration can be addressed through intranasal (IN) drug administration. As a more direct route into the CNS, higher concentrations can be reached with less side effects. The purpose of this study was to assess the feasibility of IN MP to control neuroinflammation in EAE model, the most frequently used experimental model of RRMS.

Intranasal MP administration suppressed the activity peak normally observed in EAE as effectively as IV MP. Histopathological analysis revealed that both, IN and IV-treated groups had reduced immune cell infiltration and demyelination in the CNS compared to controls. The treatments also reduced expression of Iba1 on macrophages/microglia and GFAP on astrocytes. Their morphology suggests an ongoing anti-inflammatory response backed by the reduction of pro-inflammatory cytokine levels (IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ ).

HPLC and immunofluorescence revealed a higher presence and concentration of MP in the CNS after IN administration. MP levels were up to 9 times higher when administered through this route. When smaller doses (25 mg/kg and 100 mg/kg) were given to mice with EAE, these were also able to contain the severity associated to the model. A preliminary side effect evaluation revealed no damage in the nasal cavity after intranasal administration.

Altogether, this study demonstrates that IN delivery of MP is as efficient as the IV route to treat neuroinflammation in EAE.

## 2. Introducción

Esta sección tiene la intención de presentar los conocimientos previos a partir de los cuales se partió para plantear y desarrollar este trabajo. La primera parte se enfoca en ofrecer una perspectiva general sobre la esclerosis múltiple. Se describen primero sus manifestaciones clínicas y factores de riesgo. A continuación, se introducen los diferentes tipos de esta enfermedad y se hace énfasis en la esclerosis múltiple remitente recurrente, la más frecuente de ellas, y sobre la cual este proyecto busca incidir. Para esta forma, se describe lo que sucede a nivel inmunológico y se relaciona con lo que sucede en el modelo experimental más común de este tipo de esclerosis múltiple.

La segunda parte incluye los tratamientos disponibles para lidiar con la inflamación en el largo plazo, pero también cuando ocurren recaídas. Debido al riesgo que conllevan estas últimas de dejar secuelas, es necesario intervenir. Hasta la fecha la metilprednisolona intravenosa es el tratamiento estándar para el tratamiento de recaídas a pesar de estar asociado a múltiples efectos adversos. Todo esto, además del mecanismo de acción de la metilprednisolona, se especifica en esta parte.

La tercera parte trata sobre el uso de la vía intranasal para llegar al SNC. Aquí se incluyen las ventajas, desventajas, características de las moléculas que se desean administrar por esta ruta. Se describen también las hipótesis sobre cómo se transportan las moléculas de la cavidad nasal al cerebro y médula. Esta sección resume además los antecedentes publicados más relevantes para la realización de este trabajo; aquellos que emplean la administración intranasal para el control de la neuroinflamación en modelos experimentales de la esclerosis múltiple, así como en la enfermedad misma. Finalmente, se vislumbran algunos efectos que la administración intranasal de metilprednisolona pudiera tener en pacientes.

### 2.1. Esclerosis múltiple

#### 2.1.1. Manifestaciones clínicas y epidemiología

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, inflamatoria y degenerativa del sistema nervioso central (SNC) en la que una respuesta autoinmune genera lesiones desmielinizantes. La EM se manifiesta y evoluciona de formas heterogéneas en la que los signos clínicos correlacionan con el sitio, tamaño y diseminación de las lesiones desmielinizantes en el SNC (Filippi et al., 2018). Las lesiones pueden estar tanto en la sustancia gris como en la blanca. Frecuentemente se detectan en la región periventricular, el nervio óptico, el tallo cerebral, el cerebelo y la médula espinal (Kutzelnigg & Lassmann,

2014). Las lesiones aparecen como zonas ovoides de mayor intensidad en imágenes de resonancia magnética (Wilson & Islam, 2019).

En etapas tempranas de la EM, estas lesiones dan lugar a episodios agudos de déficits neurológicos temporales e inflamación que se manifiestan con síntomas sensoriales (parestesia, signo de Lhermitte), motores (híperreflexia, debilidad muscular, espasticidad), y/o cognitivos (fatiga, depresión, demencia). Conforme la EM avanza, los déficits neurológicos se convierten en daños permanentes por el deterioro de axones (Dendrou et al., 2015). La acumulación de lesiones, aunada al daño axonal, conduce a que los pacientes experimenten una pérdida gradual de sus funciones motoras y, por ende, una discapacidad progresiva (Reynolds et al., 2011).

En el mundo, según el censo más reciente, existen 2.3 millones de personas con EM, siendo más común en mujeres con una proporción de tres mujeres por cada hombre diagnosticado (Filippi et al., 2018). La mayor incidencia en mujeres se ha intentado explicar como causa de factores hormonales y genéticos (Golden et al., 2019; Ysraelit & Correale, 2019), pero también como una interacción de estos con factores ambientales como la ocupación, la composición de la microbiota, uso de tintes o barniz de uñas y uso de anticonceptivos (Ceribelli et al., 2019; Filippi et al., 2018). En México, no se han hecho estudios epidemiológicos a nivel nacional, pero de acuerdo a los pocos estudios de prevalencia local, se ha estimado que la tasa es de 7-8 casos por cada 100 mil habitantes (Negrotto & Correale, 2018). Esto daría alrededor de 10 mil pacientes en el país, aunque otras fuentes aseguran que pudiera ser el doble (Rivera & Macias, 2017). La edad promedio en que se desencadena la esclerosis múltiple es de 30 años, por lo que representa la causa más importante de discapacidad neurológica no traumática en adultos jóvenes a nivel mundial (Dobson & Giovannoni, 2019). Asimismo, la EM representa un gran impacto económico. En México, donde alrededor del 60% de los pacientes no cuenta con seguridad social, los tratamientos implican un gasto mínimo de 240 mil pesos al año (Segunda Comisión de Trabajo de la Comisión Permanente del Honorable Congreso de la Unión, 2015).

### 2.1.2. Factores de riesgo

La EM se describió por primera vez a finales del siglo XIX por el neurólogo francés Jean-Martin Charcot. Han pasado décadas completas, pero hasta hoy, no se conoce la etiología de esta enfermedad ni se puede prevenir su aparición. Con los conocimientos acumulados, se puede aseverar que la EM se considera una enfermedad multifactorial en la que interactúan factores genéticos y ambientales.

La EM no es una enfermedad hereditaria, pero si existe cierta predisposición genética. Se sabe por estudios epidemiológicos en gemelos monocigóticos, que los genes únicamente pueden hacer a un individuo alrededor de un 35% más susceptible de desarrollar esta enfermedad (Cree, 2014). La predisposición proviene de polimorfismos o variantes en genes que codifican proteínas clave de la respuesta inmune. Por medio de estudios de asociación de genoma completo, se han encontrado polimorfismos asociados a la esclerosis múltiple en más de 200 regiones genéticas (Baranzini & Oksenberg, 2017). De estos, el polimorfismo que mayor evidencia y asociación tiene con el riesgo de desarrollar EM es el alelo HLA-DRB1\*15:01 del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Filippi et al., 2018). Este alelo está especialmente presente en población europea, en la cual existe una mayor prevalencia de la enfermedad (Hollenbach & Oksenberg, 2015). También se han identificado variantes en los genes que codifican los receptores de las citocinas IL-2 e IL-7, y en el gen *TNFRF1A* que conlleva a la producción de una forma soluble del receptor de TNF- $\alpha$  (Didonna & Oksenberg, 2017). Otras variantes reportadas en pacientes son en genes asociados a la producción de citocinas, como IL-7 e IL-12, de moléculas co-estimuladoras para la presentación de antígenos como CD37, CD40 y CD80; y en componentes de vías de señalización como polimorfismos en la tirosina cinasa 2 y MAP cinasa 1 (Cotsapas et al., 2018; Cree, 2014). Además de genes involucrados en el sistema inmune, se han encontrado polimorfismos en genes que codifican enzimas dentro de la síntesis de vitamina D, cuyos niveles reducidos constituyen otro factor de riesgo para padecer EM (M. Lu et al., 2018).

Otro grupo de factores genéticos, el cual ha cobrado en años recientes mayor relevancia son los ARNs no codificantes, especialmente los microARN (miRNAs), que participan en la regulación post-transcripcional (Piket et al., 2019). En la EM se han encontrado consistentemente en diferentes estudios alrededor de 60 miRNAs cuyos patrones de expresión varían respecto a individuos sanos, entre ellos miR-155, miR-223, miR-21 y miR-146. (Juźwik et al., 2019; Mohammed, 2020). Las vías de señalización más afectadas en la EM por estos microARN son la de TGF- $\beta$  (un factor de crecimiento y citocina clave para la diferenciación de linfocitos T) y las de uniones adherentes en epitelios (Piket et al., 2019). Además se han identificado miRNAs provenientes de diferentes virus como Epstein Barr, enfermedad de Marek (hepatitis aviar), y virus del simio 40 (SV40), los tres asociados con el riesgo de desarrollar la EM (Juźwik et al., 2019).

Como se menciono arriba, el poseer un polimorfismo, variante genética, o diferentes patrones de expresión de los miRNAs mencionados arriba, no es suficiente para desarrollar EM. En conjunto con ellos se requiere una condición o estímulo ambiental que desencadene episodios de inflamación. Los más frecuentemente asociados, por estudios

epidemiológicos, son el tabaquismo, la obesidad, y algunas infecciones, especialmente la mononucleosis (Filippi et al., 2018).

Fumar o simplemente ser un fumador pasivo puede aumentar el riesgo de padecer EM hasta un 17% (Alfredsson & Olsson, 2019). Entre mayor sea la frecuencia y cuanto más tiempo se lleve fumando, mayor es el riesgo. El tabaquismo por sí solo contribuye a la generación de un ambiente inflamatorio generando especies reactivas de oxígeno y favoreciendo la liberación de citocinas como IL-8 y TNF- $\alpha$  (Lee et al., 2012). Fumar puede ocasionar además cambios a nivel epigenético; por ejemplo, cambios en los patrones de metilación del ADN. Una metilación disminuida en el promotor del gen para la arginina deiminasa genera una variante citrulinada de la proteína básica de mielina que resulta mucho más lábil y vulnerable a enzimas proteolíticas (Z. Wang et al., 2019).

La obesidad, en específico entre los 18 y 25 años de edad, se considera otro factor de riesgo, aunque frecuentemente la obesidad viene desde la infancia. Una estimación señala que si se previene la obesidad desde edades tempranas, se podría evitar el 15% de casos de EM (Gianfrancesco & Barcellos, 2016). La obesidad se considera un estado de inflamación de bajo grado que a largo plazo puede desregular la respuesta inmune y permitir la entrada de microorganismos o células inmunes hiperreactivas al SNC (Van Dyken & Lacoste, 2018). Esta inflamación puede estar dada por las acciones de adipocinas (leptina, resistina y visfatina) (Guerrero-García et al., 2016). Otra explicación de esta inflamación persistente es que los adipocitos en el tejido adiposo blanco pueden actuar como células presentadoras de antígenos y secretar quimiocinas que atraen monocitos. En el contexto local de inflamación, estos monocitos se diferencian hacia macrófagos que producen citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y pudieran desencadenar respuestas inflamatorias en otros tejidos (Palavra et al., 2016).

La búsqueda de factores ambientales por muchos años estuvo ligada a los patrones observados en estudios globales de prevalencia de la EM. Los porcentajes de la población afectados por esta enfermedad aumentaban conforme la latitud aumentaba; es decir que el mayor número de casos estaba en países cercanos a los polos. Esa distribución se explicó por una reducida exposición a microorganismos durante la infancia en estas zonas y se conoce como la hipótesis de la higiene. Es cierto que la exposición a microorganismos patógenos y comensales puede prevenir la diferenciación y mejorar la regulación de linfocitos autorreactivos y la desensitización de receptores tipo *Toll* que suelen desencadenar respuestas inflamatorias (Bach, 2018). Sin embargo, la evidencia impide seguir considerando la latitud y la exposición temprana a microorganismos como factores de riesgo para la EM: no hay asociación entre el número de infecciones en la infancia y el riesgo de desarrollar EM, la inducción de un modelo animal de EM, la encefalomiелitis

autoinmune experimental (EAE), no se puede realizar en ambientes libres de patógenos; los estudios de prevalencia de EM en un mayor número de países han roto el patrón previamente descrito, (Arndt et al., 2014; Wendel-Haga & Celius, 2017).

Lo que sí es posible considerar como un factor de riesgo, independientemente de su distribución, son las infecciones por el virus del Epstein Barr (VEB). Varias infecciones virales se han implicado como causa de la EM, pero esta es la que tiene mayor evidencia (Ahmed et al., 2019). Son múltiples los estudios que arrojan una seropositividad mayor al 97% para el VEB en pacientes diagnosticados con EM (D. S. Goodin, 2014a). A pesar de que es bastante sencillo infectarse con este virus, únicamente representa un factor de riesgo si la persona desarrolla mononucleosis. Esto ocurre en una cuarta parte de los casos. Es plausible que este virus pudiera tener un rol en el desarrollo de la EM, además de por la presencia de miRNAs, porque el VEB tiene homología con la secuencia de la proteína básica de mielina y podría participar en la generación de linfocitos autorreactivos por una activación cruzada (Ahmed et al., 2019; Filippi et al., 2018). También se conoce que el VEB se aloja en el SNC y es capaz de activar linfocitos B (Hassani et al., 2018).

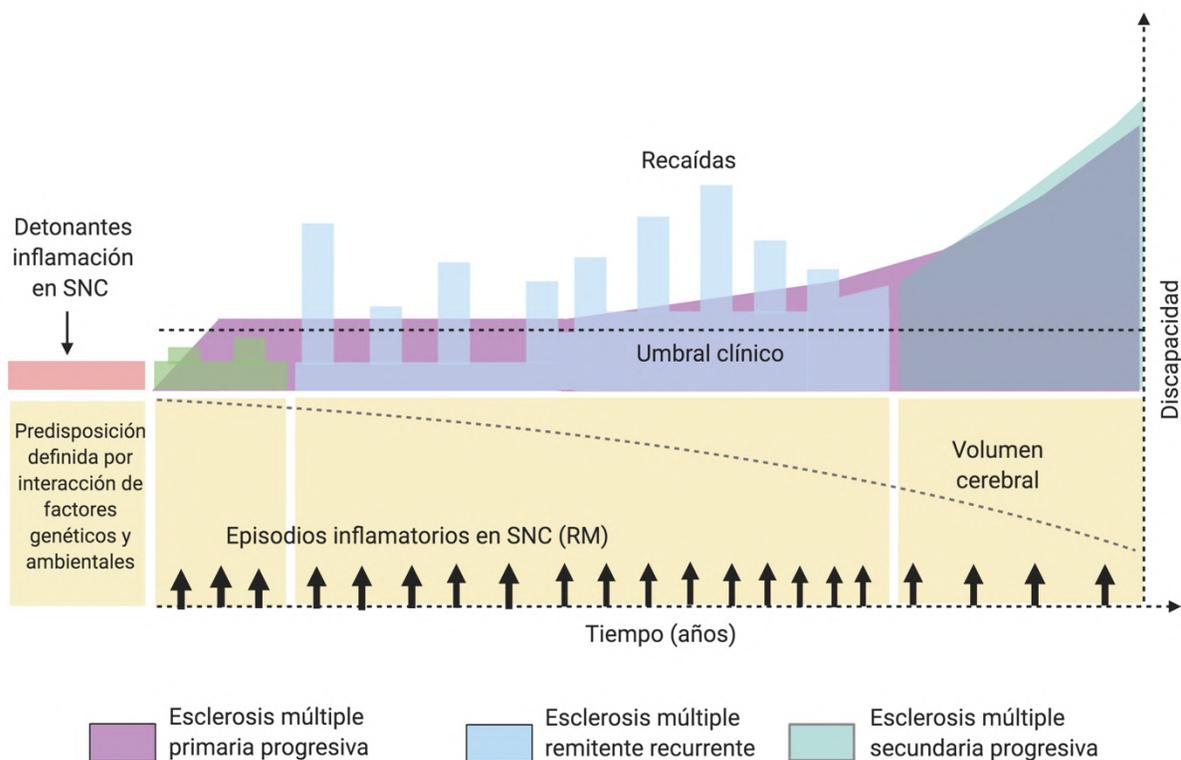
También derivado de los patrones geográficos de prevalencia de la EM, se establecieron como factores de riesgo la exposición solar y los niveles de vitamina D. Los rayos UV son necesarios para la síntesis de esta vitamina. Las regiones que reciben menor luz del sol, y que probablemente tienen una producción deficiente de vitamina D, son aquellas donde inicialmente se registró una mayor prevalencia de la EM. Algunos estudios en el modelo de EAE han demostrado que la radiación UV puede tener un papel por sí sola: puede prevenir la migración de células inflamatorias hacia el SNC y la desmielinización (Tarlinton et al., 2019). Sin embargo, la vitamina D es necesaria para regular funciones inmunes como reducir la producción de IL-2, IL-17 e IFN- $\gamma$  y atenuar la proliferación de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, así como la actividad citotóxica en estos últimos (Sintzel et al., 2018). Un estudio epidemiológico en personal del ejército de los Estados Unidos de América encontró que las personas con niveles de 25-hidroxi vitamina D (el metabolito que provee con mayor exactitud la cantidad de vitamina D producida y almacenada) mayores a 40 ng/ml, tenía 62% menos probabilidades de desarrollar EM (Munger et al., 2006).

La investigación sobre factores de riesgo ha explorado en años recientes el papel que tiene la composición de nuestra dieta y del microbioma en la etiología de la EM (Bhise & Dhib-Jalbut, 2016). Hay evidencia de que las dietas altas en sales y en ácidos grasos de cadena larga pueden promover respuestas inflamatorias de tipo Th17 (Katz Sand, 2018). La dieta también puede tener efectos sobre la composición de la microbiota (Gilbert et al., 2018). Más allá de que existan especies que protejan o que incrementen la

susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple, el microbioma tiene la capacidad de regular la tolerancia y la respuesta inmune innata (Wasko et al., 2020).

### 2.1.3. Evolución y tipos de esclerosis múltiple

Los factores anteriormente descritos pueden aumentar la susceptibilidad de que una persona desarrolle EM, pero se requiere de un evento inflamatorio considerable en el SNC para desencadenarla. Las teorías sobre el origen de este evento inflamatorio se describen más adelante. Pueden pasar años desde este evento hasta que el paciente note los primeros síntomas y sea diagnosticado. Considerando la evolución desde el diagnóstico, pueden distinguirse tres tipos de EM: primaria progresiva, remitente recurrente y secundaria progresiva. Sólo un 10% padece la forma primaria progresiva en donde el daño aparece desde el inicio y es continuo. La evolución de este tipo de EM se muestra en rosa en la Figura 1. Entre 80% y 85% de los pacientes desarrollan la forma remitente recurrente (EMRR), en azul en la misma figura, (Steinman, 2014; Vollmer, 2007). En este tipo se presentan episodios agudos de neuroinflamación, cuando aparecen o se agravan los síntomas neurológicos, llamados recaídas o brotes. Las recaídas se definen a partir de hallazgos clínicos y de acuerdo con un panel internacional se define como "síntomas reportados por el paciente u objetivamente medidos típicos de un evento desmielinizante con inflamación aguda en el SNC con una duración de al menos 24 horas, en ausencia de fiebre o infecciones" (Polman et al., 2011). La aparición de los brotes es impredecible, aunque hay autores que sugieren que las infecciones, el aumento en los niveles de cortisol y/o osteopontina, los bajos niveles de vitamina D, y la estación del año pueden influir (Berkovich, 2016; Deckx et al., 2013; D. S. Goodin et al., 2016; Kalincik, 2015; Yadav et al., 2015). En promedio, los pacientes experimentan una recaída al año, aunque los tratamientos más recientes incluso han logrado disminuir la frecuencia de estas. Los síntomas, la severidad y la duración de los brotes, que puede ser de días a semanas, es variable; es por esto que en ocasiones los pacientes experimentan secuelas irreversibles incluso cuando reciben tratamiento para la recaída (Vollmer, 2007). A estos episodios de neuroinflamación aguda, le siguen periodos de remisión donde la inflamación se controla y puede haber una remielinización parcial (Dendrou et al., 2015). Con el paso del tiempo, conforme se acumula la discapacidad, la inflamación se vuelve crónica, aumenta la degeneración del tejido nervioso y se pierde la capacidad de reparar los daños en el SNC, los pacientes avanzan a la forma secundaria progresiva de la EM (EMSP). Este tipo se ilustra en color turquesa en la Figura 1. Alrededor de 10 años después de ser diagnosticados con EMRR, 25% de los pacientes progresan a EMSP; tras 30 años el porcentaje aumenta a 75% (Khurana & Medin, 2017).



**Figura 1.**

### **Evolución y tipos de esclerosis múltiple**

Antes de la aparición de los síntomas, existe un evento que desencadena la inflamación en el SNC. La severidad y la respuesta del sistema inmune a este episodio depende de la interacción de los factores de riesgo. Las barras representan las recaídas, que en algunos casos pasan desapercibidas por los pacientes. Las flechas representan episodios de inflamación que se registran en el SNC, registrados mediante resonancia magnética y suelen ser más frecuentes que las recaídas. Imagen adaptada de Olsson et al., 2017.

#### **2.1.4. Inmunopatología de la esclerosis múltiple remitente recurrente**

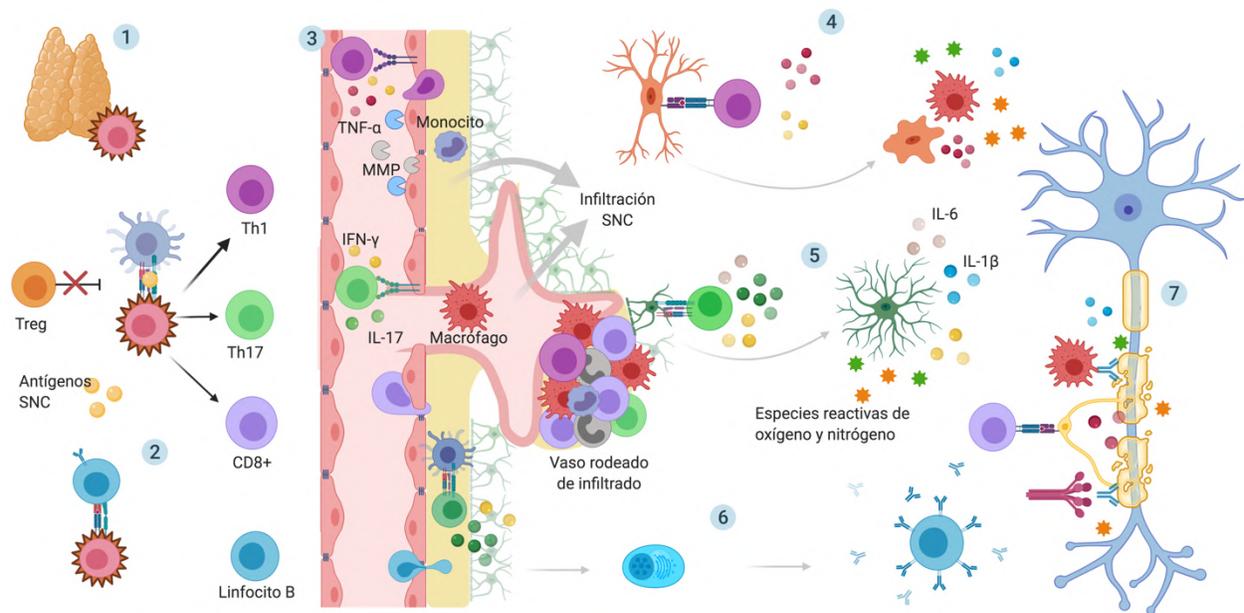
La EMRR se ha considerado por mucho tiempo una patología mediada por linfocitos T autorreactivos, CD4<sup>+</sup> principalmente, que se activan en la periferia y posteriormente migran hacia el SNC (modelo extrínseco) (Dendrou et al., 2015). Esta activación se podría dar por un mimetismo molecular, la co-expresión de receptores en linfocitos T con diferentes especificidades, o por una activación inespecífica tras un evento inflamatorio (Naegle & Martin, 2014). Pero la presencia de linfocitos autorreactivos en periferia no es suficiente para explicar el origen de esta enfermedad, pues no son exclusivos de pacientes; también existen en personas sanas (Louveau et al., 2016). Además, una vez en el SNC, los linfocitos CD4<sup>+</sup> no son la población celular dominante ni las que sufren una mayor expansión clonal (Bhise & Dhib-Jalbut, 2016). Dadas estas observaciones, otra posibilidad es que se den eventos dentro del SNC que generen daño y desencadenen

neuroinflamación. Estos eventos podrían ser defectos primarios, como mutaciones en los oligodendrocitos, eventos como estrés oxidativo exacerbado, disfunciones mitocondriales, o una comunicación deficiente entre los axones y la glia. Todos estos eventos causan que los oligodendrocitos aumenten su producción de  $\alpha\beta$ -cristalina (Tunland, 2018; van Noort & Amor, 2013). La liberación de  $\alpha\beta$ -cristalina activa células inmunes residentes del SNC, principalmente la microglia, la cual aumenta su expresión de MHC de tipos I y II, produciendo citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas que reclutan células inmunes: linfocitos T ( $CD4^+$  y  $CD8^+$ ) y B, monocitos, macrófagos y células dendríticas (Dargahi et al., 2017). Una tercera posibilidad sería una combinación de los 2 modelos anteriores: antígenos del SNC podrían llegar a los nódulos linfáticos y activar una respuesta periférica. Para generar linfocitos autorreactivos, se cree necesario que el drenaje de antígenos suceda dentro de un contexto de inflamación o neurodegeneración (Louveau et al., 2016). Otra opción es que linfocitos específicos para mielina que participen en la vigilancia inmunológica del SNC, se activen al ingresar a un SNC inflamado (Tunland, 2018).

Las alteraciones en la respuesta inmune en pacientes con EM pueden propiciar eventos inflamatorios que permitan la activación de linfocitos autorreactivos en la periferia (Bhise & Dhib-Jalbut, 2016). Anteriormente se mencionaron varias mutaciones en citocinas, receptores de citocinas, moléculas co-estimuladoras, así como la existencia de miRNAs que pueden contribuir con este efecto. Pero quizá el componente más reconocido en esta patología es la pérdida de tolerancia inmunológica por defectos en los linfocitos T reguladores. En la literatura se menciona la deficiencia o ausencia de linfocitos T reguladores naive ( $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD45RA^+$ ) y algunas otras poblaciones como Tr1, células efectoras reguladoras  $CD39^+$  y células reguladoras foliculares (Filippi et al., 2018; Mohr et al., 2018; Yadav et al., 2015). Para compensar estas deficiencias (número o función efectora), hay una expansión de células T reguladoras de memoria ( $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD45RA^{low}$ ), pero aún así es insuficiente por su menor capacidad supresora (Bhise & Dhib-Jalbut, 2016).

Independientemente del origen de la EMRR, se considera que una recaída inicia con la activación de linfocitos T ( $CD4^+$  y  $CD8^+$ ) y B en los órganos linfoides. Para que esta activación suceda se necesita que reconozcan antígenos en la periferia. También puede ocurrir por una inactivación inespecífica en un contexto de inflamación (Figura 2). Los linfocitos T se diferencian y proliferan hacia los tipos Th1 y Th17. Estos linfocitos secretan citocinas pro-inflamatorias, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17, y metaloproteinasas que rompen las uniones estrechas en la barrera hematoencefálica o BHE (Naegele & Martin, 2014). La secreción de estos mediadores provoca además que aumente la expresión de moléculas

de adhesión tanto en la superficie de los linfocitos, como en el endotelio de la BHE, permitiendo que los linfocitos se adhieran e inicien su tránsito hacia el SNC.



**Figura 2.**

### **Respuesta inmune durante recaídas en EMRR**

1) Linfocitos autorreactivos escapan hacia la periferia desde el timo. 2) Debido a defectos en los mecanismos supresores de linfocitos T reguladores, los linfocitos autorreactivos son activados por células dendríticas o linfocitos B en presencia de antígenos del SNC. Dependiendo de las señales de mediadores en el entorno, pueden diferenciarse hacia linfocitos CD4<sup>+</sup> Th1 o Th17. También se activan linfocitos CD8<sup>+</sup> autorreactivos. 3) Los linfocitos activados secretan citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 que aumentan la permeabilidad de la BHE y la expresión de moléculas de adhesión; también secretan metaloproteinasas que ayudan a desintegrarla. En los espacios perivasculares puede haber reactivación de linfocitos con una mayor liberación de citocinas. 4) La microglia puede reactivar también linfocitos. La microglia activada como respuesta a la neuroinflamación produce especies reactivas y citocinas como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  y es indistinguible de los macrófagos que se infiltran. 5) Los astrocitos pueden participar también presentando antígenos; el entorno inflamatorio modifica su morfología y secreta IL-6, IFN- $\gamma$ , e IL-1 $\beta$ . 6) Los linfocitos B que migran al SNC se diferencian hacia células plasmáticas que producen anticuerpos. Estos anticuerpos contribuyen a la desmielinización a través de fagocitosis o activación del sistema de complemento. 7) Los linfocitos CD8<sup>+</sup> atacan directamente a los oligodendrocitos. Las especies reactivas y citocinas pro-inflamatorias contribuyen a la desmielinización. Adaptado de Yadav et al. (2015).

Una vez dentro del SNC, los linfocitos CD4<sup>+</sup> reconocen antígenos en el MHCII en la superficie de microglia, macrófagos, células dendríticas o linfocitos B y se reactivan. Esta reactivación libera más citocinas pro-inflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-17) y quimiocinas, que permiten por un lado la infiltración del parénquima, y por otro, la activación de la microglia/macrófagos M1 (pro-inflamatorios). Esta microglia M1 puede producir daño

tisular por la liberación de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Al-Badri & Castorina, 2018). La microglia/macrófagos pueden secretar además citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-1 $\beta$  (J. J. J. Wang et al., 2019). Los linfocitos CD8<sup>+</sup> citotóxicos reconocen el MHC I, expresado únicamente en condiciones de neuroinflamación, en neuronas, oligodendrocitos y astrocitos (Yadav et al., 2015). Por sí solos, los linfocitos CD8<sup>+</sup> son capaces de producir lesiones desmielinizantes y daño axonal. De hecho, se suele encontrar un mayor número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en las lesiones (Dendrou et al., 2015). Los linfocitos B que penetran al SNC se activan como células plasmáticas y también pueden funcionar como células presentadoras de antígenos o liberar anticuerpos. Estos anticuerpos tienen la capacidad de actuar como opsoninas y activar el sistema del complemento (Wekerle, 2017).

Todavía no se conoce qué señales o eventos promueven la respuesta anti-inflamatoria y reparadora de tejidos que se observa en las remisiones. Dentro de esta fase, los macrófagos pasan a un perfil anti-inflamatorio (M2), tras fagocitar mielina y activar sus receptores PPAR (Bogie et al., 2013). Esta microglia/macrófagos M2 secreta IL-4, la citocina principal en respuestas anti-inflamatorias (Ponomarev et al., 2007). En la remisión se ha observado que existe deposición de proteínas amiloides,  $\alpha\beta$ -cristalina y tau, entre otras, que inhiben moléculas pro-inflamatorias en los sitios de desmielinización (Steinman, 2014). En esta fase incrementan las Tregs (CD39<sup>+</sup>) en circulación que por un lado inhiben a los linfocitos Th17 y, por otro, producen IL-10 (Sambucci et al., 2019).

### 2.1.5. Modelos experimentales de la EMRR: EAE

Muchos de los conocimientos sobre la inmunopatología de la EMRR se han obtenido a través del uso de modelos animales. Además, ante la imposibilidad de tomar biopsias de las lesiones en SNC en los pacientes o muestras repetidas de líquido cefalorraquídeo, prácticamente todos los estudios preclínicos de la EMRR se han realizado en modelos animales (Denic et al., 2011).

En la Tabla 1 se muestran los modelos más empleados para el estudio de la EMRR. No todos los modelos permiten estudiar adecuadamente todos los aspectos ni replican al 100% lo que ocurre en pacientes. No obstante, el más empleado, por ser el modelo más robusto, relativamente fácil de inducir y reproducible es la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Giralt et al., 2018). Este modelo es comúnmente empleado para evaluar nuevas estrategias terapéuticas.

Inducción	Modelo animal	Fortalezas	Limitaciones	Número referencias*
Autoinmune	EAE (Encefalomiелitis autoinmune experimental)	Modelo más empleado	Uso de adyuvantes	16,633
		Imita síntomas de EMRR	Alta complejidad: múltiples células involucradas.	
		Sistema sensible de evaluación	Suceptibilidad variable	
Viral- autoinmune	Virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV)	Apoya componente ambiental EM	Cirugía Cepas especiales de ratón	434
	Virus de la hepatitis murina (MHV)			70
	Virus del bosque Semliki (SFV)			32
Tóxicos	Cuprizona	Reproducible y predecible	Daño irreversible	508
		Fácil de detectar y evaluar	No considera linf. B y T	
		Inducción sencilla	BHE intacta	
	Lisolecitina y bromuro de etidio	Reproducible y predecible	Daño irreversible	400
Útil para estudiar remielinización y componente celular.		No considera linf. B y T Daño a tejido.		
Genéticos	Transgénicos y cepas especiales	Efectos consistentes en mielinización.	Sin inflamación.	994
		Permite aislar función de moléculas.	Baja relevancia para EM.	

**Tabla 4.**  
**Principales modelos animales de la EMRR.**

Modificada de: Gudi et al. 2014, *Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned*. \* Menciones del modelo en búsqueda en Pubmed, septiembre 2020. Los términos de búsqueda empleados se encuentran en el Anexo I.

La EAE se puede inducir mediante una inmunización con auto-antígenos de mielina, conocida como forma activa, o mediante la transferencia de linfocitos T activados reactivos para mielina (forma pasiva) (Stromnes & Goverman, 2006). La forma activa es la más recurrida, pero tiene múltiples variantes. Dependiendo de la especie, cepa y el péptido encefalitogénico empleado, se producen diferentes patrones de susceptibilidad, severidad y cursos de evolución (Burrows et al., 2019). La inducción de la EAE en ratones requiere adicionalmente el uso de un adyuvante y de toxina de *Bordetella pertussis*, PTX por sus iniciales en inglés (Lassmann & Bradl, 2017).

La cepa de ratones con mayor susceptibilidad y comúnmente disponible para investigación es la C57BL6/J. Para inducir EAE en esta especie, se usa un péptido de 20 aminoácidos cuya secuencia proviene de la glicoproteína de oligodendrocitos asociados

a la mielina (MOG<sub>35-55</sub>). Esta proteína forma parte de la membrana externa de la mielina en el SNC (Glatigny & Bettelli, 2018). El péptido se inyecta subcutáneamente con adyuvante completo de Freund (ACF), una emulsión de agua y aceite con micobacterias muertas, que además de permitir que el antígeno permanezca por mayor tiempo en el sitio de inoculación y se transporte más efectivamente hacia ganglios linfáticos, genera un ambiente pro-inflamatorio necesario para la activación de linfocitos autorreactivos específicos para el péptido MOG<sub>35-55</sub> (Billiau & Matthys, 2001). Adicionalmente, los ratones reciben por vía intraperitoneal la PTX que tiene efectos sobre la inmunidad innata y adaptativa; también actúa sobre la BHE. Esta toxina tiene la capacidad de mejorar la presentación antigénica, de inhibir la anergia de linfocitos T y de suprimir la función de células T reguladoras (Lassmann & Bradl, 2017). Respecto a la BHE, la PTX puede inhibir la expresión de moléculas de unión estrecha, incrementando su permeabilidad. La ruptura de la BHE en la EAE favorece la llegada al SNC de células efectoras y autorreactivas (Weber et al., 2010).

Al seguir este protocolo, los ratones desarrollan una EAE de forma monofásica que asemeja una recaída seguida de una remisión. La estimulación con el ACF y la PTX activan linfocitos específicos para mielina CD4<sup>+</sup>, Th1 y Th17, en la periferia que logran atravesar la BHE y posteriormente reactivarse por células presentadoras de antígeno principalmente de tipo MHCII como microglia y macrófagos (Kurschus, 2015). A nivel inmunopatológico, se genera una respuesta inflamatoria similar a la observada en pacientes: la microglia/macrófagos adquieren un perfil M1 y liberan citocinas pro-inflamatorias como como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 y especies reactivas. La expresión de moléculas de adhesión, por ejemplo ICAM-1, igualmente se eleva (Zhao et al., 2008). Las lesiones que se suelen observar en la EAE son principalmente en la sustancia blanca de la médula espinal con múltiples focos de infiltrado de células mononucleares (linfocitos y macrófagos especialmente) (Constantinescu et al., 2011).

La EAE replica muchos de los aspectos inmunopatológicos de la EMRR, pero no constituye un modelo perfecto. Una de las grandes críticas que se le hace al modelo de la EAE es que se genera artificialmente un ambiente pro-inflamatorio originado por componentes bacterianos que se reconocen por medio de patrones de reconocimiento de patógenos ('t Hart et al., 2011). Así, este modelo únicamente simula la hipótesis extrínseca del origen de la EM. En contraste con los infiltrados en pacientes donde la mayoría son linfocitos CD8<sup>+</sup> y macrófagos, en la EAE predominan los linfocitos CD4<sup>+</sup> (Kurschus, 2015). Otra gran diferencia es que mientras en los pacientes las lesiones pueden estar en el encéfalo y en la médula espinal y no siguen un mismo patrón de evolución, en la EAE murina, las lesiones aparecen principalmente en la médula espinal y siguen siempre un patrón ascendente (Lassmann & Bradl, 2017; Simmons et al., 2013).

## 2.2. Tratamiento de la EMRR

### 2.2.1. Tratamiento modificador de la enfermedad

Gracias a modelos experimentales como la EAE, hoy se cuentan con múltiples tratamientos que pueden modificar la evolución previamente presentada de la EMRR. Independientemente de un tratamiento sintomático, actualmente el enfoque del tratamiento de la EMRR es reducir en la mayor medida posible, a través de tratamientos modificadores de la enfermedad (TME), la actividad de la enfermedad, un estado conocido por sus siglas en inglés como NEDA (no evidencia de actividad de la enfermedad) (Pandit, 2019). En el estado NEDA, los pacientes deben de estar libres de recaídas y no deben experimentar síntomas más severos o nuevos.

TME	Mecanismo de acción	Disminución tasa de recaída anual	Efectos adversos
<b>Interferón-beta</b>	Estabiliza BHE, promueve diferenciación hacia Th2.	15-36%	Síndrome resfriado
<b>Acetato de glatiramer</b>	Presentación antígenos, promueve diferenciación de linfocitos Th2.	29-35%	Malestar zona inyección
<b>Teriflunomida</b>	Inhibe síntesis pirimidinas inhibiendo proliferación de linfocitos T activados.	31-36%	Teratogénico, alopecia, náusea, diarrea
<b>DMF (Dimetilfumarato)</b>	Anti-oxidación, promueve diferenciación Th2, modula células dendríticas.	29-53%	Linfopenia, riesgo de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LPM), molestias gastrointestinales
<b>Fingolimod</b>	Inhibe migración de linfocitos desde ganglios linfáticos.	48%-60%	Riesgo LMP, infecciones y arritmias
<b>Natalizumab</b>	Inhibe migración de linfocitos hacia SNC.	69%	Riesgo LMP, reacciones alérgicas
<b>Alemtuzumab</b>	Anti-CD52: depleción prolongada de linfocitos T y B.	49-69%	Riesgo de afecciones autoinmunes secundarias, reacciones alérgicas, infecciones
<b>Mitoxantrone</b>	Bloquea topoisomerasa II, inhibe síntesis de ADN, reduce número de linfocitos.	60-70%	Riesgo de cardiomiopatía y leucemia, alopecia, náusea
<b>Cladribina</b>	Análogo purinas, interfiere síntesis de ADN, inhibe proliferación de linfocitos B y T.	58%	Linfopenia, infecciones, alopecia, cáncer
<b>Ocrelizumab</b>	Anticuerpo monoclonal CD20 (linfocitos B)	46%	Reactivación de herpes, reducción niveles de anticuerpos en sangre, infecciones, cáncer

**Tabla 5.**

### **Tratamientos modificadores de la enfermedad (TME) disponibles para EMRR.**

Recopilada a partir de datos de Faissner & Gold, 2018; Filippi et al., 2018; Fogarty, Schmitz, Tubridy, Walsh, & Barry, 2016; Torkildsen et al., 2016

El principal objetivo de los TME es controlar la neuroinflamación, ya sea inhibiendo la migración de linfocitos hacia el SNC, promoviendo la diferenciación de linfocitos Th2 o restableciendo la BHE, como se puede observar en la Tabla 2.

Los TME se clasifican como de primera, segunda o tercera línea de acuerdo a su eficacia, su seguridad y la accesibilidad a los tratamientos (Filippi et al., 2018). Entre los de primer línea se encuentran el interferón beta y el acetato de glatiramer, además del dimetilfumurato y teriflunomida (Torkildsen et al., 2016). Debido a que los últimos 2 son tratamientos diarios orales el apego suele ser menor. En caso de que estos tratamientos fallen, o se quiera iniciar con una terapia más agresiva, puede recurrirse a los TME de segunda línea, con mayor eficacia, aunque con un menor perfil de seguridad y extremadamente costosos: fingolimod, natalizumab y alemtuzumab (Filippi et al., 2018). Pese a la gran variedad de TME, es necesario recalcar que ninguna de estas terapias previene por completo la aparición de recaídas y todas se enfocan en controlar la inflamación desde la periferia, y no dentro del SNC.

En la Tabla 2, además de los mecanismos, se muestran las tasas de disminución anual de recaídas. Los TME pueden alcanzar tasas de efectividad de entre el 15 al 70% (Faissner & Gold, 2018; Filippi et al., 2018; Fogarty et al., 2016; Torkildsen et al., 2016) pero el riesgo de infiltración celular, especialmente la mediada por linfocitos autorreactivos contra el SNC, así como la aparición de nuevas lesiones o recaídas sigue siendo latente.

### 2.2.2. Tratamiento de recaídas

La posibilidad de que un paciente experimente recaídas sigue siendo considerable. Por ejemplo, un estudio indica que una quinta parte de los pacientes pueden experimentar recaídas dentro del primer año de uso de un TME (Kantor et al., 2020). A pesar de que a la mayoría de las recaídas le sigue un periodo de reparación en el SNC, especialmente en etapas tempranas de la enfermedad, es importante tratar las recaídas para acortar su duración y reducir la discapacidad asociada a ellas. El tratamiento de elección contra recaídas consiste en la administración de 1 g de metilprednisolona (MP) por vía intravenosa (IV) cada 24 h, de 3 a 5 dosis dependiendo de la severidad de los síntomas (CENETEC, 2010). Desde la década de los 70s, en que se inició el tratamiento con MP, se ha reportado que este favorece la recuperación en los brotes respecto a aquellos pacientes que sólo reciben placebo. Entre los estudios al respecto destacan el de Milligan, Newcombe, & Compston (1987) en el que reportan mejoras físicas de los pacientes después de la primera y cuarta semanas posteriores al tratamiento utilizando la escala EDSS (Escala de Discapacidad y Sistemas Funcionales o Expanded Disability Status Scale,

por sus siglas en inglés). Esta escala se basa en la cuantificación de la afectación de ocho sistemas funcionales (visual, tallo cerebral, motor, sensitivo, cerebelo-vestibular, mental, vésico-esfinteriano y sexual), donde 0 es un paciente sin discapacidad y 10 representa la muerte (Anexo II). Al mes posterior al tratamiento con MP, el 77% de los pacientes que sufrió un brote tuvo una reducción en el EDSS de por lo menos un punto, mientras que sólo 22% del grupo placebo experimentó esta reducción. Adicionalmente, un meta-análisis de estudios sobre el efecto de la MP en la EMRR, indica que este tratamiento favorece la recuperación de una recaída y reduce hasta en un 60% las probabilidades de que los síntomas permanezcan o empeoren dentro de las siguientes 5 semanas (Filippini et al., 2009)

### *2.2.2.1. MP y sus efectos anti-inflamatorios*

La MP es un glucocorticoide sintético de duración intermedia (vida media de 12-36 h) con baja actividad mineralocorticoide, 5 veces más potente que la hidrocortisona (D. S. Goodin, 2014b). El hecho de que tenga baja actividad mineralocorticoide significa, además de no unirse a estos receptores, que su administración no ocasiona retención de agua y sodio. La MP actúa a través de su unión a receptores de glucocorticoides en la superficie de las células. Existen receptores en prácticamente todas las células, incluyendo las relevantes para este trabajo: linfocitos, macrófagos, microglia, astrocitos e incluso oligodendrocitos y neuronas (Witt & Sandoval, 2014; Zen et al., 2011). La MP puede entrar además a las células por difusión pasiva al citosol y desacoplando complejos del receptor glucocorticoide (GR) y chaperonas (Schweingruber et al., 2012). Una vez en el citosol interactúa con proteínas citosólicas de señalización como PI3K y se transloca al núcleo. En el núcleo puede funcionar uniéndose a regiones conocidas como elementos de respuesta a glucocorticoides, acoplarse con factores de transcripción o una mezcla de las 2. De esta manera puede inhibir a factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, AP-1, Fos y NFAT. También puede modular la actividad de I $\kappa$ B $\alpha$  (inhibidor de NF- $\kappa$ B) y de los cierres de leucina inducidos por glucocorticoides (Desmet & De Bosscher, 2017). A través de esta vía de señalización se dan los efectos genómicos de la MP: inducción de apoptosis de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, inhibición de la expresión de moléculas del MHCII y disminución en la producción de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (Tischner & Reichardt, 2007). Adicionalmente, a través de estos efectos genómicos aumenta la expresión de proteínas de uniones estrechas en el endotelio de la BHE, restaurando su función y disminuyendo la expresión de moléculas de adhesión (Salvador et al., 2014). Otro efecto genómico, recientemente demostrado en monocitos es que los glucocorticoides inducen un fenotipo anti-inflamatorio (M2) (Fischer et al., 2019).

Existe otra serie de efectos tras la administración de glucocorticoides, que se pueden observar incluso antes que los genómicos y se dan por la interacción de los GR con cinasas en el citosol. Ejemplos de estos efectos, conocidos como efectos rápidos, son la remodelación del citoesqueleto, que impide la migración hacia el SNC (Fischer et al., 2013) y la apoptosis de linfocitos T (Cruz-Topete & Cidlowski, 2018). Ambos tipos de efectos, tanto los rápidos como los genómicos, son deseables para combatir la inflamación asociada a las recaídas.

#### *2.2.2.2. Rutas de administración de la MP y sus inconvenientes*

Si bien la vía IV es la más recurrida para la administración de MP en recaídas, probablemente porque permite alcanzar altas concentraciones en plasma en cuestión de minutos, podría no ser la mejor para llegar al SNC. Como parte de las desventajas de esta vía está la unión a proteínas plasmáticas. En el caso de la MP, un 78% de la dosis administrada se queda en el plasma, unida a proteínas (Brunton et al., 2011). Otro obstáculo de la vía IV para acceder al SNC son las glucoproteínas P o ABCB1 en la BHE. Estas proteínas pueden expulsar de regreso a la circulación los glucocorticoides (Witt & Sandoval, 2014).

El único estudio de farmacocinética en pacientes de EMRR que se les dio tratamiento para recaídas tampoco permite advertir una entrada sustancial de MP al SNC. Defer, Barré, Ledudal, Tillement, & Degos (1995) reportan que cuando se administran 1500 mg de MP IV, a las 6 horas se alcanza una concentración máxima en líquido cefalorraquídeo (LCR) de 0.64 mg/l. Considerando un volumen aproximado de 150 ml de LCR, y que de lo que llega al LCR, la mayoría se va hacia la circulación y no hacia el SNC, esto implica que menos del 0.001% de lo que se administró acabó en el tejido nervioso. El fármaco puede llegar por difusión del LCR al tejido nervioso, pero su eficacia está limitada por la baja velocidad del proceso y por la distancia que pueda existir de la superficie del SNC al foco de inflamación; entre mayor es la distancia, menor es la concentración alcanzada (Pardridge, 2016).

Otro conjunto de desventajas relacionados al uso de la MP IV son las asociadas a esta vía de administración: es una vía invasiva que requiere condiciones de asepsia y que únicamente se puede realizar por personal capacitado (médicos o enfermeras). Incluso así, en el 35 a 50% de los procedimientos puede haber complicaciones como flebitis/tromboflebitis, infiltración, extravasación, hematomas y daño a nervios e infecciones (Dychter et al., 2012; Helm et al., 2015). Los pacientes que sufren recaídas constantes a menudo experimentan un colapso de venas o problemas con la permeabilidad de estas. Ante la incapacidad de encontrar una vena para realizar la

administración, el personal médico recurre al uso de catéteres centrales, incrementando el riesgo de infecciones. Aunado a esto, para administrar 1 g de MP por esta vía se requieren por lo menos entre 10 y 30 minutos para evitar el riesgo de arritmias, arresto cardiaco o colapso circulatorio (FDA, 2011). Por lo general, en la práctica, la administración de MP IV, se hace en 1-2 horas, sin incluir el tiempo invertido para trasladarse al centro de salud en los 3 o 5 días consecutivos en los que se recibe el tratamiento.

Como se mencionó anteriormente, para que la MP llegue al SNC mediante la vía IV, se necesitan altas dosis que representan una gran exposición sistémica. Al haber receptores de glucocorticoides en prácticamente todas las células del cuerpo humano, la MP actúa sobre múltiples órganos y no únicamente en el SNC (Whirledge & DeFranco, 2017). Esta exposición sistémica inevitablemente está ligada a efectos adversos a corto y largo plazo. En el corto plazo, diferentes estudios mencionan que hasta el 90% de los pacientes experimentan al menos un efecto adverso durante y/o después de recibir MP (Jongen et al., 2016; Le Page et al., 2015; Martinelli et al., 2009; Ramo-Tello et al., 2014; Shaygannejad et al., 2013). Los efectos adversos más frecuentemente reportados son: alteración del gusto, dispepsia, bochornos, insomnio y palpitaciones. Sus frecuencias en diferentes estudios se muestran en la Tabla 3.

Adicionalmente, se sabe que en el largo plazo, la administración repetida de altas dosis de glucocorticoides puede desencadenar problemas de salud crónicos como hipertensión, pérdida de masa ósea, aumento de peso, síndrome de Cushing iatrogénico, insuficiencia adrenal, aumento de susceptibilidad a infecciones y riesgo de desarrollar diabetes mellitus, cataratas y glaucoma (Bevan & Gelfand, 2015; Thrower, 2009).

Específicamente en la EMRR se han reportado múltiples casos de hepatotoxicidad tras el tratamiento intravenoso con MP (Adamec et al., 2018; Cottin et al., 2020; Nociti et al., 2018). Algunos casos incluso evolucionaron hacia hepatitis (Cação et al., 2018). También existen diversos reportes de choque anafiláctico (Deruaz et al., 2007; Takahashi et al., 2018), necrosis avascular (Carulli et al., 2015; Sahraian et al., 2012) y problemas cardíacos, entre estos, arritmias y fibrilación atrial (Moretti et al., 2000; Pavičić et al., 2019; Vasheghani-Farahani et al., 2011).

Debido a todo lo anterior, se han explorado otras vías para administrar la MP. Una de ellas es la vía intratecal (IT). El fármaco administrado por esta ruta se inyecta en el espacio subaracnoideo, evitando el paso por la BHE (Bernat, 1981; Müller, 2009). Al ser una aplicación directa al SNC requiere menores dosis que generan menores efectos sistémicos (Müller, 2009). Esta vía se usó para tratar recaídas en la segunda mitad del siglo XX, pero posteriormente se abandonó. Los pocos estudios ciegos y controlados comparando la vía IT con otras vías no demostraron que fuera superior, haciendo injustificable el uso de esta

vía invasiva (Heun et al., 1992; Rocchelli et al., 1982). Sin embargo, el desuso de la vía IT se debió en mayor medida a que en pacientes con EMRR se asoció a efectos adversos como meningitis, aracnoiditis y vejiga neurógena (Nelson et al., 1973; Nelson & Landau, 2001). En la actualidad esta vía se usa en la EM únicamente como tratamiento para la espasticidad en los tipos progresivos (Abu-Mugheisib et al., 2012).

<b>Efectos adversos de metilprednisolona intravenosa</b>							
<b>Efecto Adverso</b>	<b>Número de pacientes por estudio.</b>						<b>Promedio</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	
	<b>64</b>	<b>59</b>	<b>99</b>	<b>24</b>	<b>66</b>	<b>20</b>	
Insomnio	35%	44%	64%	67%	54%	20%	<b>47%</b>
Dispepsia	40%	53%	45%	25%	NR	45%	<b>42%</b>
Alteración gusto	28%	61%	81%	67%	48%	5%	<b>48%</b>
Palpitaciones	20%	29%	29%	21%	7%	NR	<b>21%</b>
Bochornos/ enrojecimiento cara	40%	61%	59%	25%	55%	27%	<b>45%</b>
Ansiedad	4%	36%	37%	9%	NR	27%	<b>23%</b>
Dolor de Cabeza	10%	NR	64%	54%	NR	NR	<b>43%</b>
Náusea	1%	NR	34%	29%	NR	NR	<b>21%</b>
<b>Total pacientes que reportaron EA %</b>	<b>90.6%</b>	<b>96.6%</b>	<b>97%</b>	<b>98%</b>	<b>NR</b>	<b>65%</b>	<b>89%</b>

**Tabla 6.**

**Efectos adversos de la administración de MP IV en múltiples estudios.**

A: Shaygannejad et al. 2013; B: Jongen et al. 2016; C: Le Page et al. 2015; D: Ramo-Tello et al. 2014; E: Lienert et al. 2013; F: Martinelli et al. 2009. NR: No reportado. Los porcentajes en las columnas no suman 100%, pues no se incluyeron otros efectos adversos menos comunes.

Otra ruta ampliamente explorada es la vía oral. De acuerdo con un meta análisis, la administración de glucocorticoides por esta vía ha demostrado una eficacia similar a la de la vía IV en términos clínicos (Burton et al., 2012). Los estudios publicados emplearon dosis de entre 500 y 1250 mg de MP. Aquellos que administraron dosis inferiores probablemente no tomaron en cuenta que la biodisponibilidad por vía oral de la MP es de alrededor de 82% (Groenewoud et al., 1994). Los niveles de MP que finalmente podrían llegar al SNC tras la administración oral se reducen también debido al metabolismo de primer paso (Burton et al., 2012). Este metabolismo de primer paso provoca además que la MP oral tarde 2 horas en alcanzar su concentración máxima, mientras que la MP IV lo

hace en 30-40 minutos (Repovic & Lublin, 2011). La concentración máxima que alcanza la MP oral en plasma es de alrededor de una quinta parte de aquella alcanzada por vía IV (Antal et al., 1983). Incluso con esta menor concentración máxima, los pacientes reportan prácticamente los mismos efectos adversos asociados a la vía IV (Le Page et al., 2015; Ramo-Tello et al., 2014).

La vía oral no ha ganado popularidad pues, aunque la administración es sencilla, genera otro tipo de problemas: no existe MP en tabletas en el mercado mexicano. El otro glucocorticoide oral que se ha propuesto para el tratamiento de recaídas es la prednisona; la dosis planteada es de 1250 mg que equivaldrían a 1000 mg de MP (Morrow et al., 2004). Para la prednisona, la dosis más alta disponible en nuestro país es de 50 mg, lo que significa que los pacientes tendrían que ingerir 25 tabletas (PLM Latinoamérica, 2020). En condiciones controladas se puede verificar cuántas tabletas se ingieren, pero sin supervisión, el apego al tratamiento tiende a disminuir conforme aumenta el número de tabletas (M. T. Brown & Bussell, 2011). Otra consideración importante antes de optar por corticoesteroides orales es que en conjunto con anti-inflamatorios no esteroideos, pueden aumentar el riesgo de desarrollar úlceras pépticas y otras complicaciones gastrointestinales (Caplan et al., 2017; Hernández-Díaz & Rodríguez, 2001).

La vía IV, IT y oral han sido ampliamente exploradas dentro del contexto de recaídas de EMRR. Sin embargo, existe otra vía que promete una mejor distribución de fármacos hacia el SNC: la vía intranasal.

### **2.3. La vía intranasal (IN) como opción de administración de la MP**

#### **2.3.1. Breve historia de la vía IN como ruta hacia el SNC**

El descubrimiento de una vía directa desde la nariz hasta el cerebro no es reciente. El descubrimiento en 1912 de que el virus de la poliomielitis podía llegar al cerebro por esta vía fue sólo el primer paso para averiguar que se trataba de una ruta de acceso común para microorganismos hacia el SNC (D. S. Quintana et al., 2016). Varios modelos experimentales de infecciones virales que producen encefalitis explotan este principio, inoculando el virus directamente en la nariz (Durrant et al., 2016). Incluso, algunos autores proponen que la EM podría desencadenarse por virus o bacterias que acceden al SNC mediante la cavidad nasal (Blackmore et al., 2017; Ebringer et al., 2012; Leibovitch et al., 2018).

En 1986 Baker y Spencer (H. Baker & Spencer, 1986) observaron que si administraban hemaglutinina de germen de trigo (38kDa) marcada con peroxidasa de rábano por la nariz, esta se absorbía por el nervio olfatorio y podía llegar al bulbo olfatorio. Tres años

después, William H. Frey II patentaría la vía IN como una forma de hacer llegar fármacos al SNC, evadiendo la BHE (Frey II, 1989). Los hallazgos de la década de los 80s permitieron comprender que no se necesitaba pasar por la circulación para eventualmente llegar al SNC ni se necesitaban formulaciones especiales para que una molécula llegara de la nariz a al cerebro o a la médula espinal.

Las hipótesis sobre los mecanismos que participan en la vía IN se sentaron en los años siguientes y poco a poco fueron aumentando las publicaciones hasta rebasar las cien publicaciones alrededor de 2011 y 250 en 2019 (NCBI, 2020). Hoy en día no sólo se han publicado trabajos en modelos experimentales, sino que se han reportado varios ensayos clínicos e incluso han salido algunos productos al mercado que usan la vía IN para tratar condiciones neurológicas como la migraña. Un hallazgo común en estos estudios, independientemente de la etapa de desarrollo, fue un rápido efecto terapéutico y una concentración mayor en LCR que cuando se administra por la vía IV u oral (Diener & Evers, 2007; Morgan & Soh, 2017; Rao et al., 2016).

### 2.3.2. Ventajas de la vía IN

Varias de las ventajas asociadas a esta vía, incluida la rápida absorción y mayores concentraciones, tienen que ver con el hecho de que el paso de fármacos es directamente de la cavidad nasal al SNC, evitando la BHE. Para cuestiones farmacocinéticas, esto tiene varias implicaciones. Por ejemplo, en comparación con la vía oral, en la vía IN los fármacos no sufren metabolismo de primer paso en el tracto gastrointestinal ni en el hígado, permitiendo que se administren dosis menores y que aún lleguen al SNC. La amplia superficie que representa la nariz permite una rápida absorción, tal y como la observada en las pruebas clínicas (Mittal et al., 2014).

Cuando el objetivo es que una molécula llegue al SNC a través de esta vía, al evitar la circulación, una mínima parte de la dosis sufriría la unión a proteínas plasmáticas. Esto ayuda a que se prolongue la duración y la intensidad de la acción de un fármaco (Chapman et al., 2013). La relativa cercanía entre nariz y SNC permite que se puedan alcanzar concentraciones elevadas rápidamente, al igual que en la vía IV. Sin embargo, por medio de la vía IN se puede controlar mejor la dosis, manteniéndose dentro de los márgenes terapéuticos y evitando aumentos abruptos en la concentración en el LCR del fármaco administrado.

Asimismo, el hecho de que sea una vía directa de la nariz al SNC evitaría los efectos adversos de la MP en la periferia. La probabilidad de sufrir efectos adversos se podría disminuir aún más si se considera que por esta vía está reportado que alrededor del 1%

del fármaco administrado llega al SNC (Illum, 2015). Esto permitiría reducir las dosis recomendadas y disminuir la exposición sistémica

Quizá la mayor ventaja de la vía IN es que no es invasiva. Esto la convierte en una vía con complicaciones mínimas; su riesgo de desarrollar infecciones y transmitirlos de un individuo a otro es mínimo (Lochhead & Thorne, 2012). Esta administración es mucho más sencilla, pues toma segundos y por lo general los dispositivos son fáciles de usar. Tampoco se requiere de una gran capacitación del personal, de múltiples insumos, ni condiciones de esterilidad.

A pesar de todos estos beneficios, si esta vía no se ha empleado extensivamente para el tratamiento de desórdenes del SNC es porque no cualquier molécula tiene las propiedades necesarias para ser transportada por esta ruta de administración.

### 2.3.3. Requisitos para la administración intranasal

Las propiedades fisicoquímicas de un fármaco y su formulación influyen en la eficiencia para llegar al SNC a través de la vía IN. Entre estas propiedades, el peso molecular, la lipofiliidad y su solubilidad son las más importantes (Bitter et al., 2011). A través de los años, se ha experimentado con moléculas de varios tipos cuyos tamaños van desde los cientos hasta miles de daltones (Da), pero su concentración en SNC disminuye conforme el tamaño incrementa (Pathak, 2018). Las moléculas de alrededor de 400 Da tienden a absorberse fácilmente y transportarse entre la nariz y cerebro. Sin embargo, la naturaleza fisicoquímica también define su trayectoria de la cavidad nasal hacia el SNC. La liposolubilidad de una molécula, por ejemplo, determina su tasa de difusión pasiva a través de epitelios y por ende qué tan bien se absorbe, se distribuye y se elimina. El método más común para cuantificar la liposolubilidad es usando el logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua o  $\log P$ , que en términos sencillos mide la proporción en que una molécula en solución se disuelve en agua y en un solvente orgánico o lipídico (Bhal, 2007). Un valor de  $\log P$  positivo indica que el compuesto es lipofílico, mientras que uno negativo indica que es hidrofílico. Para un transporte eficiente hacia el SNC, se requieren moléculas lipofílicas con un  $\log P$  de entre 1.5 y 2.7 (van Woensel et al., 2013).

La combinación de propiedades fisicoquímicas permite que una molécula lipofílica de bajo peso molecular (<500 Da) tenga la facilidad para absorberse por los capilares hacia la circulación sistémica y atravesar la BHE con biodisponibilidades de cerca del 90 % (Frey II, 1989). Adicionalmente a la fracción absorbida en la circulación, estas moléculas pueden llegar al SNC por vías directas desde la cavidad nasal con efectos en cuestión de minutos (Dhuria et al., 2010). Este último sería el caso de la MP, particularmente el succinato sódico de MP, que tiene un  $\log P$  de 2.53 y un peso molecular de 496.53 Da (Drugbank, 2020).

Otro punto a favor del succinato sódico de MP es que en solución tiene un pH entre 7 y 8, dentro del rango para evitar daños a la mucosa (Pires et al., 2009).

Adicionalmente, la solubilidad del fármaco puede determinar el éxito de su administración por vía IN. La solubilidad está ligada a la absorción y determina el volumen que se administra. Un fármaco ideal para administrar por la vía intranasal es aquel que puede solubilizarse en un volumen mínimo y puede absorberse rápidamente sin necesidad de disolverse (Erdő et al., 2018). Los volúmenes máximos a administrar por vía intranasal son 20  $\mu\text{L}$  en ratones, en ratas 100  $\mu\text{L}$  y en humanos 200  $\mu\text{L}$  (Per G Djupesland et al., 2014). Estos volúmenes se suelen dividir equitativamente entre las 2 fosas nasales para tener la mayor superficie de absorción posible. Para que la dosis tenga la suficiente potencia, se recomienda una solubilidad mayor a 50 mg/ml (Bitter et al., 2011). El succinato sódico de MP tiene una solubilidad mínima en agua 667 mg/ml que representaría la posibilidad de administrar, por lo menos, 133 mg en una dosis para el volumen recomendado en humanos (Yalkowsky & He, 2003).

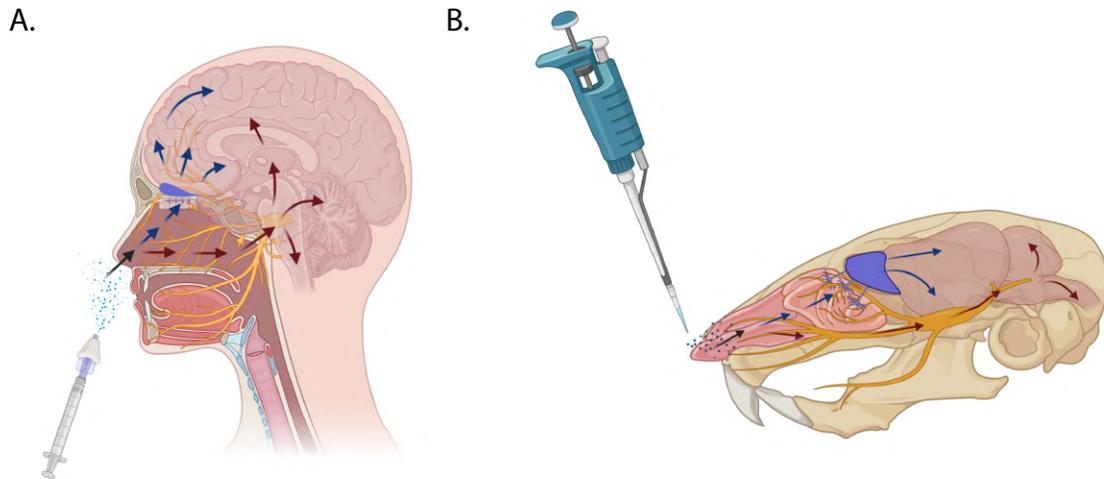
Una vez tomando en cuenta estos factores, y asegurándose que una molécula cubra en gran parte los requisitos, cobra importancia el saber cómo llega el fármaco al SNC a través de la vía IN.

#### 2.3.4. Distribución de fármacos desde la cavidad nasal hasta el SNC

Son dos las regiones de interés principal en cuanto a la administración IN. Por un lado, se encuentra la región olfatoria, inervada por el nervio olfatorio, cuyas dendritas están en contacto con cavidad nasal (regiones moradas en la Figura 3, paneles A y B). La otra región de interés es la región respiratoria, inervada por el nervio trigémino que llega a tallo cerebral (regiones en amarillo de los paneles A y B en la Figura 3). Algunas de sus terminaciones libres se encuentran cerca de la superficie epitelial (Lochhead & Thorne, 2012).

Dependiendo de si una sustancia utiliza primordialmente el nervio trigémino o olfatorio para viajar hacia el SNC, es donde se pueden encontrar las mayores concentraciones de fármaco tras la administración IN (Gänger & Schindowski, 2018). Una concentración mayor en el bulbo olfatorio indica un transporte mediante el nervio olfatorio (Figura 3, flechas azules). Por el contrario, si se detecta una concentración más elevada en el tronco encefálico, probablemente la sustancia haya llegado a través del nervio trigémino (Figura 3, flechas rojas). Posterior a su llegada a estas zonas anatómicas, las sustancias pueden distribuirse en minutos a otras zonas del SNC mediante flujo convectivo en espacios perivasculares o a través del LCR (Lochhead & Davis, 2019). Las zonas donde frecuentemente se puede encontrar altas concentraciones de una molécula después de

su administración IN son: hipocampo, núcleo estriado, puente troncoencefálico, corteza (en un gradiente rostral-caudal) y la médula espinal cervical (Chung et al., 2020; Fan et al., 2019; Hanson et al., 2009; Johnson et al., 2010; Kumar et al., 2018).



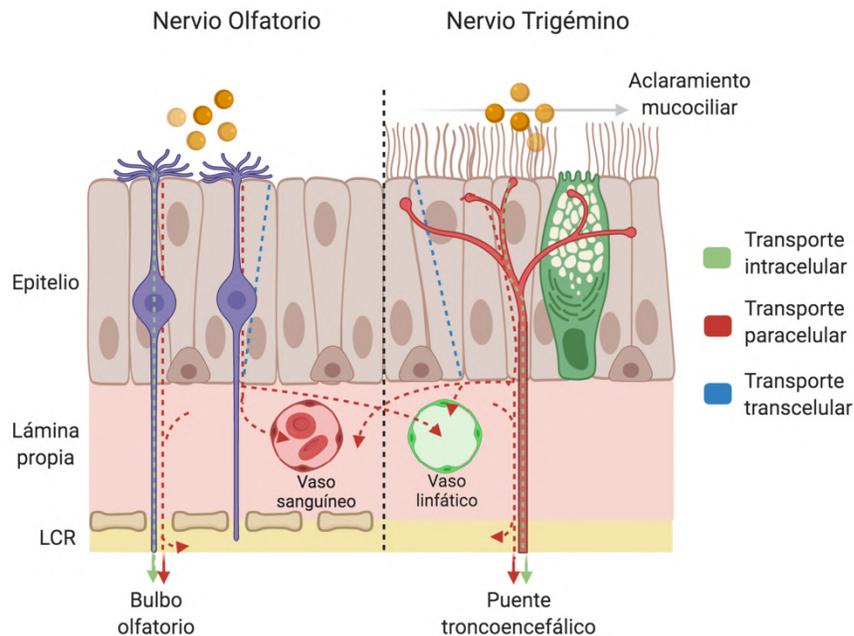
**Figura 3.**

**Rutas de la administración intranasal desde la cavidad nasal hacia el SNC.**

Administración IN en humanos (A) y en ratón (B). Para ambos casos, el bulbo olfatorio y las neuronas que emanan de él están en morado. El nervio trigémino se muestra en amarillo. Tras la administración IN el fármaco puede llegar al SNC a través del nervio olfatorio (flechas azules) o trigémino (flechas rojas). C) Posibilidades de transporte desde el epitelio hacia la lámina propia. Adaptada de Selvaraj, Gowthamarajan, & Karri, 2017 y Veronesi et al., 2020.

Una vez que un fármaco se encuentra en contacto con el epitelio o con las terminaciones nerviosas, hay 2 vías que puede seguir para llegar al SNC: la extracelular y la intracelular (Illum, 2015). El transporte extracelular de la nariz hacia el SNC se da en dos etapas. En la primera, el reto es que el fármaco atraviese el epitelio nasal y llegue a la lámina propia. El mecanismo principal es la difusión paracelular, por espacios entre las células del epitelio (Figura 4, flechas rojas). A pesar de que las uniones estrechas pudieran presentar un obstáculo, la alta tasa de recambio permite que moléculas tan grandes como la albúmina (65kDa) puedan pasar (Crowe et al., 2018). Otra posibilidad, como se muestra en el mismo panel de la Figura 4 en azul, es que el fármaco atraviese el epitelio por transcitosis. Una vez que este llega a la lámina propia, hay varias posibilidades para que alcance el SNC. Quizá la más directa es la difusión o convección en canales perineurales, perivasculares o linfáticos asociados a las fibras nerviosas que liberan las moléculas en el espacio subaracnoideo o directamente al compartimiento craneal. Otras opciones son que se absorban por capilares linfáticos o sanguíneos (Witt & Sandoval, 2014)

En la vía intracelular, también ilustrado en la Figura 4 en verde, el mecanismo principal es la endocitosis. Involucra la internalización del fármaco a la neurona, y a pesar de que puede estar mediado por receptores, el amplio rango de dimensiones de moléculas que se sabe puede usar esta vía hace pensar que es más común la pinocitosis. Las moléculas viajan a través del soma y el axón de las neuronas. Este es un proceso extremadamente lento, tomando hasta 24 horas para que el fármaco se pueda detectar en el cerebro (Crowe et al., 2018).



**Figura 4.**  
**Posibilidades de transporte desde el epitelio hacia la lámina propia.**  
 Adaptada de Dhuria et al., 2010; Lochhead & Thorne, 2012.

Aunque la vía intracelular y extracelular representan procesos disímiles, no resulta tan simple distinguir la vía que un fármaco sigue, no sólo por las técnicas que se requieren, sino porque una rama del nervio trigémino, confluye en la placa cribiforme con el nervio olfatorio (H. Baker & Spencer, 1986). Además, son pocos los trabajos que se preocupan por establecer o al menos ofrecer una hipótesis sobre la vía de entrada hacia el SNC (Frey II, 1989; Stein & Thiel, 2017). No obstante, cuando lo hacen, la mayoría de los trabajos reportan la presencia del fármaco en el SNC en cuestión de minutos o un par de horas. Esto apuntaría a que el transporte es más bien extraneuronal o extracelular.

### 2.3.5 Desventajas de la vía IN

La vía IN, al igual que otras rutas de administración, tiene sus propias desventajas. Los mecanismos fisiológicos que ayudan a remover cuerpos extraños de la nariz pueden

actuar en contra de la administración IN. Estos mecanismos son el aclaramiento mucociliar y la degradación enzimática (Serralheiro et al., 2014). La tasa de aclaramiento mucociliar se puede modificar tras la administración de fármacos ya sea mediante alteraciones del ritmo con que los cilios se mueven o por la producción de moco. Cualquier compuesto que irrite la mucosa, por ejemplo, hace que el aclaramiento se incremente y que su permanencia en la cavidad nasal se reduzca (Gänger & Schindowski, 2018; Gizurarson, 2015). Se estima que si una formulación carece de mucoadhesivos, el mecanismo de aclaramiento la remueve de la cavidad nasal en 20 minutos (I.-D. Kim et al., 2012). Si esto no fuera suficiente, en la cavidad nasal existen exopeptidasas y endopeptidasas que pueden degradar el fármaco (Sarkar, 1992).

Esta vía no puede usarse en cualquier paciente; hay condiciones que afectan la absorción de un fármaco en la cavidad nasal. El aclaramiento mucociliar puede ser afectado en padecimientos como la fibrosis quística, asma y diabetes (Pires et al., 2009). Las alergias e infecciones pueden producir una hipertrofia de cornetes que impide una adecuada exposición al fármaco y su distribución en la cavidad nasal (Grassin-Delyle et al., 2012). Condiciones como un tabique nasal desviado o perforado también afectarían la eficiencia de la vía IN (Frank et al., 2012; Suman, 2013).

Más allá de las características de los pacientes, no cualquier molécula o formulación se puede administrar por vía IN. Anteriormente se comentó de las características fisicoquímicas necesarias para que una molécula se pueda administrar por esta vía. Además es necesario considerar que una formulación por debajo de un pH de 5.5 o mayor de 6.5 puede irritar la nariz y afectar la absorción (Bitter et al., 2011). Un pH mayor a 6.5 puede favorecer el crecimiento de bacterias dentro de la cavidad nasal (Suman, 2013). Las formulaciones también pueden incluir preservadores o agentes promotores de permeación que produzcan irritación o daño en la cavidad nasal (Dhuria et al., 2010; Quadir et al., 1999).

La alta variabilidad de eficiencia entre individuos se suele citar como otra desventaja de la vía IN. Esta variabilidad, más allá de alteraciones o padecimientos evidentes, se puede deber a las diferencias en dimensiones de la cavidad nasal entre pacientes: Las personas con válvulas nasales más anchas tienen mayor posibilidad de responder favorablemente a un tratamiento IN (D S Quintana et al., 2015). Otra fuentes de variabilidad puede ser la técnica de administración que se emplea (gotas vs. spray) y la pérdida de dosis asociada a la técnica y su dominio (Per G Djupesland, 2018). Para minimizar la variabilidad, se han diseñado diferentes dispositivos cuyo blanco es la cavidad nasal superior, donde se encuentran las inervaciones del nervio olfatorio. Estos dispositivos también toman en cuenta la anatomía y los movimientos de las válvulas nasales (Per G Djupesland et al.,

2014; Erdő et al., 2018). Sin embargo, se necesita capacitar a los pacientes en el uso de estos dispositivos para que no se pierda parte de la dosis por una inhalación o deglución.

Dentro de los efectos adversos que se suelen reportar para medicamentos administrados por la vía IN está un sabor amargo, epistaxis (hemorragia nasal), irritación nasal y de la garganta (Erdő et al., 2018; Grassin-Delyle et al., 2012; Quadir et al., 1999). El uso frecuente de esta ruta podría causar a la larga daños en la mucosa nasal que representarían una pérdida del olfato o una mayor susceptibilidad a infecciones (Campbell et al., 2012). Los efectos adversos relacionados al uso de corticoesteroides IN se describen más adelante.

Habiendo presentado un panorama sobre la ruta de administración IN y la idoneidad de la MP para administrarse por ella, la última parte de esta introducción detalla las experiencias previas usando esta ruta. Este proyecto no es el primero en explorar la vía IN en modelos experimentales de EMRR, pero sí es de los pocos que busca usarla para el tratamiento de las recaídas.

### 2.3.5. Antecedentes clínicos y preclínicos de la vía IN

#### 2.3.6.1. *Antecedentes de la vía IN en modelos experimentales de EM*

La vía IN se empezó a explorar en modelos de la EM, en la década de los 90s. El primer estudio que empleó esta ruta fue en un modelo de rata donde se observó que al administrar péptidos de proteínas de la mielina a través de la nariz antes de la inducción de la EAE, se podía inducir tolerancia contra linfocitos autorreactivos (Bai et al., 1997). Al evaluar ARN mensajero de citocinas en SNC, encontraron que TNF- $\alpha$  disminuía y TGF- $\beta$  e IL-4 aumentaban su expresión. A pesar de que se siguieron realizando estudios de administración IN de estos péptidos, el análisis se enfocó a sus efectos en la periferia y no a lo que estaba ocurriendo en el SNC.

La ruta IN se concibió como una forma de controlar la neuroinflamación de la EM hasta 2004, cuando en ratas sanas, se evaluó el efecto del interferón beta, el tratamiento modificador de la enfermedad más común en EMRR, por la vía IN (Ross et al., 2004). Por medio de una autorradiografía los investigadores reportaron que no sólo el interferón beta llegaba a todo el cerebro, sino que lo hacía en concentraciones muy superiores (98 %) a las alcanzadas por la vía IV. También reportaron que hallaron el fármaco en los ganglios cervicales profundos. El experimento se repitió en monos, donde se reportó que, tras la administración IN, el interferón se concentraba en el encéfalo, especialmente en los bulbos olfatorios y ganglios basales (Thorne et al., 2008). Recientemente se retomó la exploración de este fármaco por vía IN. Al encapsularlo en nanopartículas se demostró

que estas eran más efectivas para revertir el daño causado por la EAE que la administración peritoneal (González et al., 2020).

Usando la vía IN se han estudiado diferentes estrategias para reducir la neuroinflamación en modelos de EM. Por ejemplo, se encontró que un péptido derivado del fibrinógeno, al administrarse por la vía IN, inhibía la activación de la microglia y suprimía la parálisis asociada a la EAE (Adams et al., 2007). Asimismo hubo intentos de administrar por la nariz fagos o virus no patógenos, modificados para que expresaran la proteína básica de mielina o interferón beta, pero ambos intentos se usaron de manera preventiva y no terapéutica, teniendo resultados poco alentadores (Quinn et al., 2008; Rakover et al., 2010). La vía IN se empleó también para el trasplante de células: linfocitos T reguladores, células mononucleares, microglia, y células mesenquimales estromales modificadas para mejorar la respuesta inmunosupresora y anti-inflamatoria o para promover la remielinización (Beigi Boroujeni et al., 2020; Fransson et al., 2012, 2014; Guo et al., 2019; Mayo et al., 2016; Zhang et al., 2014). En los últimos años se ha buscado el desarrollo de nanopartículas con fármacos como la teriflunomida (Gadhav & Kokare, 2019) o con ARNs de silenciamiento (Youssef et al., 2019). Estos estudios no han evaluado el efecto sobre la neuroinflamación, sino sobre la remielinización.

Otro grupo de estrategias empleando la vía IN, en la que por cierto contribuye este proyecto, es la administración de fármacos anti-inflamatorios. Un par de inhibidores de las cascadas de inflamación han demostrado efectos protectores en la EAE; se trata de inhibidores de STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) y ROCK (cinasa asociadas a rho), JSI-124 (Zhuang et al., 2011) y FSD-C10 respectivamente (Li et al., 2014). Al inhibir STAT3, la diferenciación de linfocitos CD4<sup>+</sup> hacia un fenotipo Th17 se ve impedida y las células mieloides (monocitos y macrófagos) pierden su capacidad de funcionar como células presentadoras de antígeno (Egwuagu & Larkin, III, 2013; H. C. Lu et al., 2020). Bloquear la actividad de ROCK también interfiere con la activación, proliferación, diferenciación y migración de linfocitos autorreactivos, pero además contribuye a la generación de linfocitos T reguladores y microglia/macrófagos M2 (Yan et al., 2019).

Específicamente hablando del uso de glucocorticoides por vía IN en el modelo de EAE existen una publicación previa. Duchi, Ovadia, & Touitou (2013) administraron prednisolona de manera preventiva (antes de inducir el modelo) en la EAE. La dosis que emplearon fue mínima, equivalente a 1.2 mg/kg de MP. No obstante, con ella pudieron retrasar la aparición de la EAE y los signos correspondieron a menores grados de severidad que el grupo que recibió prednisolona subcutánea (control). También observaron que los niveles de citocinas pro-inflamatorias disminuyeron comparado con

los controles. Las diferencias entre este trabajo publicado y el que se describe en esta tesis, se explican en la Justificación.

### *2.3.2.1. Antecedentes de la vía intranasal en EMRR*

Hasta el momento de la escritura de esta tesis, no había trabajos publicados empleando la vía IN en pacientes con EMRR como una forma de controlar la neuroinflamación en recaídas. Lo que sí se encontró fue un par de registros en la base de datos de ensayos clínicos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América. El primero de ellos, registrado en 2008, detalla un estudio piloto en 10 pacientes usando dexametasona para las recaídas (Touitou & Karussis, 2008). Sin embargo, este estudio no recibió autorización del Ministerio de Salud de Israel y no se llevó a cabo. El segundo de ellos, en desarrollo, busca mejorar la función cognitiva de los pacientes con EM mediante la administración IN de insulina (Newsome & Mowry, 2016). Como objetivo secundario tiene averiguar si la administración IN de insulina modifica las mediciones de estrés oxidativo, daño axonal, estrés celular y el metabolismo en la EM.

Otro uso de la vía IN en la EMRR es como tratamiento de un síntoma secundario, la enuresis nocturna y la disfunción de la vejiga. Para esto se puede administrar desmopresina IN (Ferreira & Letwin, 1998; Fredrikson, 1996). La desmopresina se concibió desde el principio para tener un efecto sistémico y no en el SNC (Gänger & Schindowski, 2018). Sus propiedades como una molécula hidrofílica, de alto peso molecular y baja absorción no la hacen un buen candidato para llegar al SNC, pero no se puede descartar que tras la administración IN una fracción pudiera llegar al cerebro (Merkus, 2006).

### *2.3.2.2. Experiencias en el uso de esteroides nasales en pacientes: posibles efectos adversos*

A falta de un antecedente directo del uso de glucocorticoides IN para el tratamiento de neuroinflamación, por lo menos las experiencias previas en el uso de glucocorticoides nasales pueden darnos una idea de los alcances y posibles efectos adversos que se podrían observar al usar MP IN para tratar recaídas.

El uso de un corticoesteroide por vía IN ciertamente no es novedoso. Los esteroides intranasales en pacientes llevan en uso desde mediados de la década de los 50s. Son el tratamiento recomendado para rinitis alérgica, asma, y pólipos nasales, aunque también se utilizan en rinosinusitis aguda y crónica, hipertrofia de adenoides y conjuntivitis alérgica (Sastre & Mosges, 2012). Además de reducir la inflamación de vías respiratorias, el uso de

glucocorticoides intranasales tiene beneficios como regenerar y restaurar la función de la mucosa (Samoliński et al., 2014).

No obstante, los glucocorticoides IN actualmente disponibles tienen como objetivo actuar directamente sobre la mucosa nasal (acción tópica), por lo que las formulaciones buscan la menor absorción y distribuirse principalmente en la cavidad nasal anterior (Per Gisle Djupesland, 2013; Marx et al., 2015). Por ello, no hay exposición sistémica y no presentan los efectos adversos de las otras vías de administración de corticoesteroides, aunque sí tienen efectos a nivel local.

Incluso y cuando carecen de la formulación ideal, existe evidencia de que los corticoesteroides nasales que existen en el mercado podrían tener como efecto secundario fortuito el proteger al SNC de eventos inflamatorios y degenerativos. Al menos esto es lo que los autores concluyeron tras evaluar la incidencia de enfermedad de Alzheimer entre usuarios de un spray nasal de propionato de fluticasona (Lehrer & Rheinstein, 2018).

Dentro de tantos años de uso, los efectos adversos reportados son relativamente leves y transitorios. La terapia IN con corticoesteroides frecuentemente produce irritación menor en la cavidad nasal. Además de esta irritación, los efectos adversos más comunes son la epistaxis, inflamación de la garganta, sequedad nasal, sensación de quemazón y picazón (Gupta & Fonacier, 2016). En la mayoría de los casos estos efectos son moderados y se resuelven solos sin discontinuar el tratamiento. Una revisión sistemática donde se incluyeron 34 estudios o reportes de caso concluyó que no hay evidencia histológica que corresponda a una atrofia de las mucosas tras el uso de corticoesteroides IN (Verkerk et al., 2015). Los pocos casos de atrofia de la mucosa nasal y la perforación o ulceración del tabique nasal probablemente se originan por una técnica inapropiada de administración (Lambert, 2013).

Vale la pena mencionar que mientras en los padecimientos como rinitis y asma el tratamiento es crónico, para la EM se contempla un uso esporádico, únicamente dentro de las recaídas. Es posible que incluso estos efectos adversos reportados para la administración IN de corticoesteroides no sean experimentados por pacientes que los usen por 3 o 5 días, entre 1 y 3 veces al año.

### 3. Justificación

Existen miles de esfuerzos alrededor del mundo para reducir la discapacidad y la neurodegeneración ligada a la EMRR. Son buenas intenciones; la mayoría de los tratamientos que se han desarrollado buscan reducir el número de recaídas en el largo plazo (Faissner & Gold, 2018). Sin embargo, en la actualidad las recaídas son todavía parte de la realidad de la EMRR y son escasos los esfuerzos que buscan mejorar su tratamiento incluso sabiendo que determinan la evolución de la EMRR (D. S. Goodin et al., 2016).

Aunado a esto, el tratamiento estándar actual de las recaídas por la vía IV representa en sí un impacto económico para los pacientes en México. Los pacientes tienen que dedicar tiempo no sólo para ir a una consulta donde les confirmen que están atravesando una recaída, sino que además necesitan asistir al centro de salud por tres o cinco días consecutivos para recibir el tratamiento. Los pacientes acuden aún y cuando saben que la MP IV frecuentemente implica efectos adversos importantes e incomodidad.

Hasta que los tratamientos modificadores de la enfermedad alcancen tasas de disminución de recaídas cercanas al 100%, será necesario un tratamiento para las recaídas. Por ello se requiere la identificación de otra vía de administración que mantenga la eficacia, prometa una mejor entrada del medicamento al SNC, controlando la neuroinflamación desde el SNC, y evite la frecuencia e intensidad de los efectos adversos que se han reportado al emplear la vía oral e IV. La administración de MP debería ser sencilla, funcional y menos invasiva que lo que la administración IV representa actualmente.

Por el momento, la vía oral para el tratamiento de recaídas no es una alternativa debido a la falta de presentaciones farmacéuticas con la dosis requerida. Si la administración IN de MP resulta efectiva constituiría un tratamiento que se pueda aplicar en segundos tras la identificación de síntomas de una recaída desde la comodidad de casa, puede tener un mejor apego y puede ayudar a que los pacientes tengan una mejor recuperación de las recaídas, con menos discapacidad acumulada. Para un ensayo piloto, no necesitaría de grandes reformulaciones.

De entre los diferentes modelos para la EM, se decidió emplear el modelo de la EAE con MOG<sub>35-55</sub> en este trabajo por ser un modelo reproducible y robusto (Bittner et al., 2014). Gracias a su evolución monofásica, es sencillo evaluar la eficacia de un tratamiento. Por supuesto que la EAE tiene varias desventajas y no imita por completo a la EMRR, pero es el único modelo que considera ampliamente la inmunopatología y donde se puede estudiar los efectos de un tratamiento sobre el sistema inmune (D. Baker & Amor, 2014;

Lassmann & Bradl, 2017). Debido a lo anterior, no resulta extraño que sea el modelo más empleado en investigación traslacional de EMRR.

Aunque existen antecedentes de la eficacia de la administración de glucocorticoides IN en la EAE, la administración se realizó desde el día inducción del modelo (Duchi et al., 2013). Esto modifica desde un principio la respuesta neuroinflamatoria, resultando en una EAE más severa (Wust et al., 2012). Además, pensando desde un enfoque terapéutico, los pacientes no acuden a los servicios de salud sino hasta después de presentar síntomas y no hay evidencia de que un tratamiento a largo plazo con corticoesteroides retrase la aparición de recaídas (Cicone et al., 2008). Otra gran diferencia en el trabajo de Duchi et al., (2013) es que las dosis de glucocorticoide se dieron diariamente, desde la inducción hasta el sacrificio, mientras que en este trabajo se plantea administrar únicamente 3 dosis tras el inicio de los signos.

No obstante que los esquemas de dosificación y administración varían, los resultados positivos publicados anteriormente con glucocorticoides y otros agentes anti-inflamatorios por vía IN en la EAE ofrecen suficiente evidencia para pensar que la administración IN de MP será por lo menos igual de eficaz que la vía IV para reducir la severidad de la EAE (Duchi et al., 2013; Guo et al., 2019; Zhuang et al., 2011). De comprobarse esto, el hecho de que la MP sea ya un fármaco aprobado para uso en el tratamiento de recaídas de la EMRR, permitiría ofrecer una opción de tratamiento en el mediano plazo en contraste con otras moléculas que se han probado por la vía IN en la EAE.

## 4. Hipótesis y Objetivos

### 4.1. Hipótesis

La administración IN de MP es capaz de controlar la inflamación en el SNC y el agravamiento neurológico asociado al modelo de EAE con una eficacia igual o mayor que la de la administración IV de MP.

### 4.2. Objetivo principal

Estudiar la capacidad de la MP IN para controlar la severidad de los signos en la EAE y promover efectos anti-inflamatorios, así como compararlos con los de la administración IV de MP con el fin de proponer una opción adicional de tratamiento de recaídas en la EMRR.

#### 4.2.1. Objetivos particulares

- a) Realizar un seguimiento de los signos y grados de EAE tras la administración de MP IV e IN y hasta los 28 días post-inducción.
- b) Describir la extensión y localización de infiltrados celulares y probables zonas de desmielinización en médula espinal.
- c) Observar si existen cambios en la activación y morfología glial en la médula espinal tras el tratamiento con MP IN y si se asemejan a los efectos de la MP IV.
- d) Determinar si el tratamiento IN de MP puede reducir los niveles de citocinas pro-inflamatorias en SNC y periferia.
- e) Indagar la concentración de MP que llega al SNC tras la administración IN en comparación con la IV y definir probables dosis menores.
- f) Estudiar efectos de diferentes concentraciones de MP IN sobre la evolución de la EAE.
- g) Explorar posibles efectos secundarios de administración IN a nivel de la cavidad nasal.

## 5. Metodología

### 5.1. Encefalomiелitis autoinmune experimental

El protocolo que se describe a continuación fue registrado y aprobado por la Comisión Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM con el número de protocolo 1285. La EAE se indujo en ratones hembra C57BL6/J de 10 a 12 semanas de edad y con un peso mínimo de 18 g. Los ratones se alojaron en grupos de 3 o 4 y se les proveyó agua y comida ilimitada. Se eligieron hembras puesto que no hay en la literatura evidencias de diferencias entre sexos en esta cepa y podían agruparse sin problema alguno (Okuda et al., 2002). Se preparó una emulsión 1:1 de péptido MOG<sub>35-55</sub> resuspendido en solución salina y adyuvante completo de Freund con 5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. La emulsión se inyectó en 4 puntos de los flancos dorsales de manera subcutánea. Todos los animales se indujeron bajo anestesia con sevoflurano para evitar más inyecciones de las necesarias y garantizar que la emulsión se depositara adecuadamente. En cada punto se inyectaron 50 µl de la emulsión, dando un total de 200 µl por ratón. Adicionalmente se les inyectaron intraperitonealmente 300 ng de toxina de *Bordetella pertussis*. Los ratones recibieron una segunda dosis de toxina 48 h después. Los animales se pesaron al momento de la inducción y diariamente hasta su sacrificio. Los signos de la EAE se evaluaron de acuerdo a la escala de Bittner, Afzali, Wiendl, & Meuth, 2014 (Anexo II). El peso y los grados fueron obtenidos por un evaluador ciego a los tratamientos. Cuando los animales fueron evaluados con un grado 5 o superior, se les colocó comida húmeda en el piso de la caja y se monitorearon 2 veces al día. Los porcentajes de inducción de la EAE de todos los experimentos se ubicó entre 47.8 y 100%.

### 5.2. Cálculo de la dosis equivalente de MP

Para convertir la dosis de MP empleada en humanos, 1 g, a una dosis apropiada para ratones se empleó la fórmula de Reagan-Shaw y colaboradores (Reagan-Shaw et al., 2008) que considera la superficie de absorción de cada una de las especies. Así se obtuvo una dosis de 205 mg/kg que se redondeó para fines prácticos a 200 mg/kg.

### 5.3. Preparación y administración de tratamientos

Se empleó para todos los tratamientos una presentación comercial de MP, *Solumedrol* (Pfizer, México) de 500 mg. Estos se disolvieron en la menor concentración posible del diluyente (agua inyectable con 2% alcohol bencílico), 2.3 ml, para poder preparar las dosis en la concentración y volumen final necesarios. Ya reconstituida la MP, únicamente se conservó por 10 días en refrigeración y previo a cada uso se mezcló en el vórtex.

Para observar una diferencia de por lo menos 2 grados en la escala de EAE con un poder de 80% y una significancia del 95% se calculó, de acuerdo con los resultados obtenidos por Duchi et al. (2013) con prednisolona y un piloto inicial, que la  $n$  requerida por grupo experimental era de 6 ratones. Este tamaño de muestra se calculó con la herramienta en Internet *Power and Sample Size* (Vanderbilt University). Se decidió que la diferencia observada fuera de 2 grados para evitar ruido de evaluaciones subjetivas cuando los signos observados no correspondían a un grado específico en la escala.

Únicamente aquellos ratones que alcanzaron un grado 2 (parálisis total de la cola) se asignaron a uno de los grupos experimentales. Para asegurarse que todos los grupos experimentales tuvieran condiciones iniciales similares, se cuidó que los grupos tuvieran promedios similares en cuanto al peso corporal y el grado de EAE a la aparición de signos. Los promedios se compararon mediante una ANOVA (peso) o Kruskal-Wallis (grados EAE). Se comprobó que no hubiese diferencias significativas antes de decidir en qué grupo se asignaba un ratón. Los grupos experimentales empleados fueron los siguientes:

A) Controles (EAE+SS): recibieron solución salina (SS) con 2% de alcohol bencílico (diluyente de MP) por vía IV (200  $\mu$ l volumen final) o por vía IN (20  $\mu$ l volumen final). La mitad de los ratones se trataba por vía IV y la otra mitad IN.

B) Intravenosos (EAE+MP IV): recibieron solución de MP (200 mg/kg) ajustada al peso del primer día de tratamiento por inyección en venas laterales de la cola en un volumen máximo de 200  $\mu$ l. La administración se realizó posterior a la dilatación de venas con agua a 45 °C. Se consideró una administración exitosa si al momento de realizar la inyección no hubo resistencia y se observó sangre en el lugar de inyección o en la jeringa (Shimizu, 2004).

C) Intranasales (EAE+MP IN): recibieron 10  $\mu$ l en cada fosa de la solución de MP (200 mg/kg) ajustada al peso del primer día de tratamiento. Las dosis intranasales se aplicaron con una micropipeta, colocando la punta y liberando la solución lentamente en la fosa nasal con el ratón boca arriba en la palma de la mano. Para evitar el uso de anestesia, se adoptó un protocolo de habituación al agarre en posición supina, mostrado en la Figura 5 (Hanson et al., 2013). Se aseguró que la dosis se absorbiera por completo antes de incorporar al ratón a la caja. Todos los tratamientos se administraron una vez al día por tres días consecutivos.



**Figura 5.**  
**Administración intranasal en ratones.**

El animal se coloca en posición supina, sosteniéndose con el dedo pulgar e índice. La solución se va depositando lentamente en las fosas nasales, intercalándolas hasta administrar toda la dosis. Se da tiempo de que la fracción de la dosis administrada se absorba. El agarre se mantiene hasta que la solución se absorbe por completo.

#### **5.4. Obtención y procesamiento de muestras**

Se emplearon 2 tiempos de sacrificio para permitir una evaluación más sensible de los efectos de la MP IN. El primero se llevó a cabo un día después del último tratamiento, cuando los ratones aún experimentaban la fase aguda, o pico, de la EAE y se puede caracterizar mejor la respuesta inflamatoria. El segundo punto de sacrificio se realizó a los 28 días. Este punto nos permitió observar la evolución de la EAE y la desmielinización. Los animales se sacrificaron usando 1.5 mg de ketamina y 0.2 mg de xilazina intraperitoneal. Para las pruebas de histología e inmunofluorescencia se perfundió usando paraformaldehído al 4%, mientras que, para la medición de citocinas, se realizó con solución salina estéril.

#### **5.5. Descripción histológica de la infiltración celular y el epitelio nasal**

Posterior a la perfusión, las médulas espinales y las cavidades nasales se extrajeron y se fijaron por 24 h en paraformaldehído al 4%. Las médulas se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 5  $\mu\text{m}$  para posteriormente teñirse con hematoxilina y eosina para evaluar inflamación o con azul luxol rápido y violeta de cresilo para desmielinización. Se realizaron cortes seriados de segmentos de la médula espinal correspondientes a las porciones lumbares y torácicas. En el caso de las cavidades nasales, se siguió una técnica en la que se remueven los huesos y posteriormente se incluyen por congelación en Tissue-Tek (Dunston et al., 2013). Se realizaron cortes de 7  $\mu\text{m}$  pertenecientes al epitelio respiratorio y al epitelio olfatorio. Las imágenes se adquirieron usando un microscopio

Olympus BX51-WI y se reconstruyeron usando el programa Stereo Investigator (MBF Bioscience).

Para los cortes de la médula espinal, se evaluó la inflamación y desmielinización en cortes de 6 ratones por grupo usando una escala propuesta por Brahmachari y Pahan (2007). Según sus resultados y los de otra fuente donde se emplea esta escala (Mondal et al., 2018), se determinó en *Power and Sample Size* (Vanderbilt University) este tamaño de muestra considerando una desviación estándar de 1, un poder de 80% y una alfa de 0.05 para detectar diferencias de por lo menos 2 puntos entre muestras.

La inflamación se cuantificó, de acuerdo con escalas previamente publicadas, como el número de células infiltradas y el número de vasos rodeados. La cuantificación del infiltrado se realizó por evaluadores ciegos que analizaron imágenes obtenidas con un aumento de 40x de diferentes puntos de la sustancia blanca en la médula espinal: funículo posterior (centro), funículos laterales (izquierdo y derecho) y funículo anterior (izquierdo y derecho). Se contaron núcleos en áreas equivalentes a 0.01 mm<sup>2</sup>. Al promedio de estas 5 áreas, se les restó 25, el promedio de núcleos hallados en cortes en animales sin tratamiento. Esto se repitió con 5 cortes subsecuentes por animal. Los valores en la gráfica en la sección de Resultados representan el promedio de estos conteos por animal. En reconstrucciones de la médula capturadas a 20x, un evaluador ciego contabilizó el número de vasos rodeados siempre y cuando cumplieran con la siguiente definición: acumulación de leucocitos en la sustancia blanca en forma de anillo rodeando el lumen que correspondería a un vaso (Agrawal et al., 2013). Según el número de vasos rodeados hallados, se les asignó un valor del 0 al 3: 0, sin vasos rodeados de infiltrado; 1, 1-2 vasos rodeados de infiltrado; 2, 3-5 vasos rodeados de infiltrado; y 3, más de 5 vasos rodeados de infiltrado por corte (Brahmachari & Pahan, 2007). La evaluación se realizó en cinco cortes seriados de seis ratones por grupo experimental.

Para evaluar la diseminación de la desmielinización (tinciones Klüver Barrera con azul Luxol rápido y violeta de cresilo) se usaron también reconstrucciones de imágenes de médulas con un aumento de 20x. Un evaluador ciego a los tratamientos examinó 5 imágenes seriadas por animal usando la siguiente rúbrica: 1, trazas de desmielinización subpial (únicamente en los márgenes); 2, desmielinización subpial y perivascular evidente; 3, desmielinización subpial o perivascular confluyente; 4, desmielinización perivascular o subpial masiva involucrando la mitad de la médula espinal con presencia de infiltrado celular en el parénquima; 5, desmielinización perivascular o subpial extensiva involucrando todo el corte de médula espinal y con presencia de infiltrado celular en el parénquima (Zappia et al., 2005). Se analizaron imágenes de 6 ratones por grupo experimental.

## 5.6. Inmunofluorescencia

Los tejidos para inmunofluorescencia se procesaron por congelación. Antes de ser incluidos en Tissue-Tek, se sometieron a gradientes de sacarosa. El grosor de los cortes fue de 40  $\mu\text{m}$  y correspondieron a la sección lumbar/torácica de la médula espinal. Los cortes se preservaron en PBS 1x hasta ser tratados mediante la técnica de flotación con volúmenes finales de 200  $\mu\text{l}$ . Para la recuperación de antígenos se incubaron los cortes en ácido fórmico al 70% por 3 min a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron con TBS (solución salina tamponada con Tris) y bloqueadas con una solución 2% de albúmina de suero bovino (BSA) en TBS por 30 min a temperatura ambiente. Los cortes se incubaron toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios en BSA al 10% en TBS. Tras realizar los lavados, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 90 min a temperatura ambiente diluidos de la misma forma. Las muestras se montaron sobre portaobjetos con medio Vectashield con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para visualizar núcleos. Las combinaciones y concentraciones de anticuerpos empleados fueron las siguientes:

Marcador	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Iba1 (microglia y macrófagos)	1:200 anti-Iba1 cabra Abcam, Cambridge, MA	1:1000 anti-cabra de burro Alexa Fluor 488 Abcam, Cambridge, MA
GFAP (astrocitos)	1:500 anti-GFAP conejo Dako, Santa Clara, CA	1:1000 anti-conejo de cabra Alexa Fluor 594 Invitrogen, Carlsbad, CA
MBP (proteína básica de mielina)	1:1000 anti-MBP conejo Abcam, Cambridge, MA	1:500 goat anti-conejo de cabra IgG H&L Alexa Fluor 488 Abcam, Cambridge, MA
MP (metilprednisolona)	1:300 anti-MP de borrego Fitzgerald, North Acton, MA	1:500 anti-borrego de conejo IgG - H&L Alexa Fluor 594 Abcam, Cambridge, MA
CD3 (linfocitos)	1:250 anti-ratón CD3 marcado con Alexa Fluor 647 Biolegend, San Diego, CA	

**Tabla 4.**

**Combinaciones de anticuerpos empleados para los ensayos de inmunofluorescencia.**

Las imágenes se capturaron con un microscopio Olympus BX51-WI (Center Valley, PA) y se reconstruyeron usando el programa Stereo Investigator (MBF Bioscience). En el caso de las imágenes de la distribución de MP, las imágenes se capturaron con un microscopio

confocal Nikon A1R-STORM. El análisis de la señal fluorescente se realizó con el programa ImageJ (NIH). Se consideraron los resultados observados en experimentos similares de donde se determinó que se requiere por lo menos una diferencia de 5 unidades (porcentaje área o intensidad media de fluorescencia) y se determinó una desviación estándar de 2 (Evonuk et al., 2015; Hu et al., 2018). Así se calculó el tamaño de la muestra en 4 ratones por grupo, con un poder de 80% y una alfa de 0.05 (Vanderbilt University). En la evaluación de la neuroinflamación (Iba1, GFAP y CD3) se analizaron cortes de por lo menos 4 animales, todos con el mismo grado de EAE al momento del sacrificio.

### **5.7. Medición de citocinas**

Posterior a la perfusión, se recuperó la médula espinal, cerebro y bazo de los ratones y se disgregaron en PBS con PMSF 0.1% con un homogeneizador. El PMSF o fluoruro de fenilmetilsulfonilo es un inhibidor de proteasas de serina, empleado para prevenir la degradación de las citocinas. Los sobrenadantes se recuperaron y se utilizaron para cuantificar tanto proteína, mediante el método de Lowry, como citocinas. Las citocinas se midieron mediante un inmunoensayo magnético múltiple. Se adquirieron las perlas magnéticas personalizadas para medir IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 (Merck Millipore). Los niveles que se detectaron de cada citocina en el lector magnético se ajustaron a las concentraciones de proteína de cada muestra. El tamaño de la muestra se eligió con base en estudios previos publicados (Giles et al., 2018; Way et al., 2015). Puesto que la desviación estándar varía de analito a analito, no se realizó el cálculo de poder de la muestra.

### **5.8. Análisis estadístico**

Los datos (grados EAE, porcentaje de marca fluorescente, intensidad media fluorescente, concentraciones de citocinas) muestran los promedios y el error estándar de la media. Para determinar si existían diferencias entre grupos se realizó una ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Tukey para variables con distribución normal y Kruskal-Wallis para las demás, con una prueba post-hoc Dunnett T3. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p$  menor a 0.05. Las áreas bajo la curva se calcularon tomando en cuenta el mismo número de días para todos los animales experimentales con el fin de aumentar la confianza. Para calcularla se sumó la mitad de los grados de EAE del primer y último día de seguimiento, más los grados obtenidos en el resto de los días (Fleming et al., 2005). Todos los análisis estadísticos se realizaron en Prism 8.0 (GraphPad Software Inc.).

## 6. Resultados

### 6.1. La administración de MP IN reduce la severidad asociada al modelo de EAE

A pesar de que los efectos de la MP se han explorado antes en la EAE, no existe un consenso sobre la dosis a usar en ratones (Chan et al., 2008; Chen et al., 2010; Z. Wei et al., 2015). Se decidió estudiar la dosis empleada para recaídas en pacientes (1 g) y convertirla, ajustando por peso y la superficie de absorción, al equivalente de la dosis para ratón (200 mg/kg). Con esta dosis, administrada tanto por vía IV (control positivo) como por la vía IN, se buscó suprimir el aumento sostenido en grados (pico) que se observa entre 2 y 3 días posteriores a la aparición de signos de la EAE y se asocia a una mayor actividad inflamatoria (Bittner et al., 2014). Como control negativo se designó un grupo al que se le administraría de forma IV o IN solución salina (SS).

Alrededor de 10 días después de inducir la EAE, los ratones presentaron los primeros signos del modelo. Siempre y cuando estos signos correspondieran a un grado 2 o superior, se asignaron a uno de los 3 grupos de tratamiento. La asignación se llevó a cabo cuidando que todos los grupos partieran de un grado de EAE y peso corporal similar. A través de una prueba estadística se pudo comprobar que no había diferencias estadísticamente significativas en estas 2 variables entre los 3 grupos (Tabla 5). Los tratamientos se administraron por 3 días consecutivos a partir del inicio de los signos cada 24 h. Se siguió la evolución de la EAE durante 28 días a partir de su inducción. Diariamente, un colaborador ciego a los tratamientos registró los grados y el peso corporal.

	<b>EAE + SS</b>	<b>EAE + MP IV</b>	<b>EAE + MP IN</b>
<i>Peso corporal (g)</i>	19.12 ± 1.0	18.9 ± 1.1	18.9 ± 0.9
<i>Grado EAE</i>	2.5 ± 0.22	3.0 ± 0.26	2.3 ± 0.33

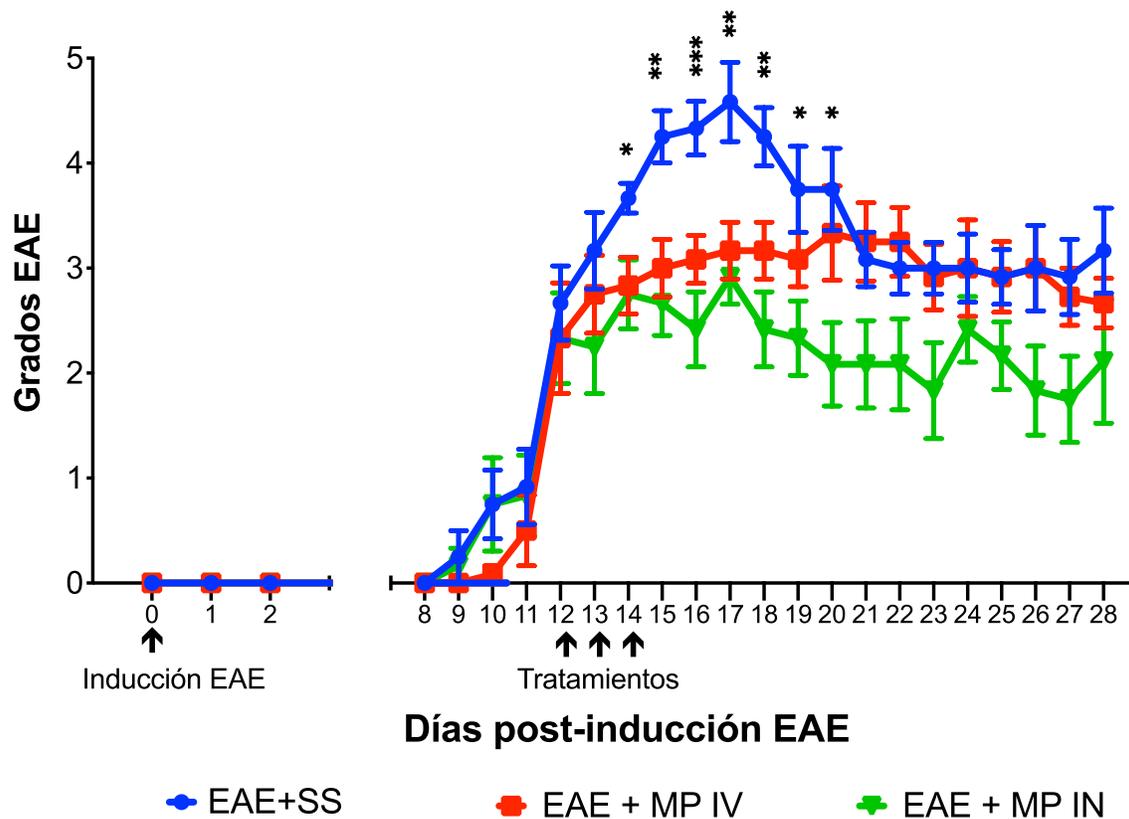
Tabla 5.

#### No existieron diferencias en cuanto a los grados de EAE y peso corporal de los grupos al inicio de los tratamientos.

Los ratones se asignaron a un grupo de tratamiento cuando alcanzaron por lo menos un grado 2 de EAE (parálisis de cola) de acuerdo con la evaluación realizada en ciego. El análisis estadístico se hizo con una prueba ANOVA para el peso corporal y con una Kruskal-Wallis para lo grados de EAE.

En la Figura 6 se puede observar cómo la severidad en los grupos tratados con MP no incrementó de manera importante después de los días de tratamiento. Mientras tanto, el grupo EAE+SS sí experimentó una mayor severidad, registrando un incremento sostenido en la escala de grados y alcanzando sus grados máximos entre los días 14 y 20 post-

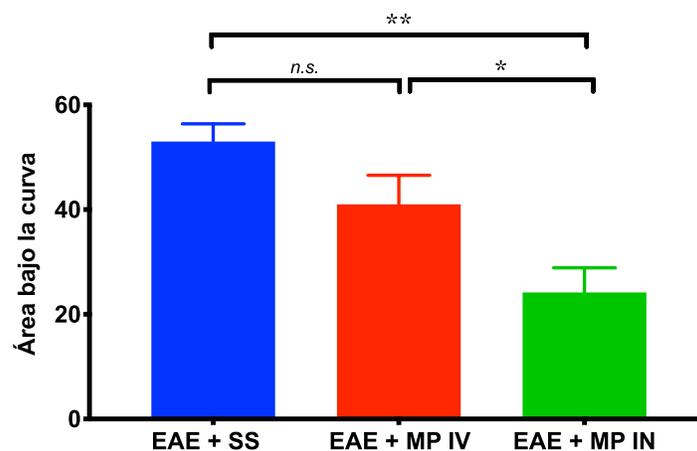
inducción. Esto último corresponde con el pico de inflamación que se reporta en literatura de la EAE. El promedio de grados entre grupos se analizó con una Kruskal-Wallis y arrojó que esta diferencia, considerando por completo el periodo de seguimiento (día 0-28), sí es estadísticamente significativa con una  $p$  de 0.005. Sin embargo, para el día 28 en que los animales experimentan una recuperación parcial de la EAE, no existieron diferencias entre los 3 grupos. Aunque se puede observar una tendencia en el periodo de seguimiento de una reducción continua de grados dentro del grupo EAE+MP IN, esta no fue estadísticamente significativa.



**Figura 6.**  
**Los ratones tratados con MP no experimentaron el pico de actividad característico de la EAE.**

Evolución de los grados de EAE desde la inducción hasta el día de sacrificio. La evaluación de grados se realizó en ciego. Se administraron 3 tratamientos separados por 24 horas. En los grupos EAE+MP IV e IN, la dosis administrada fue de 200 mg/kg. El grupo control recibió solución salina (SS). Las barras de error representan el error estándar de la media. Los grupos se compararon usando una prueba de Kruskal-Wallis: \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , y \*\*\* $p < 0.001$ . Sólo se indican los días con diferencias significativas. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes con  $n = 6$  ratones.

Otra forma de analizar la severidad de la EAE y los efectos de un tratamiento sobre ella es mediante el cálculo del área bajo la curva (ABC). El ABC se calcula como el área obtenida por la curva de los promedios de los grados de EAE (eje Y) y el tiempo de seguimiento (eje X). A través del ABC se puede conocer la severidad acumulada durante todo el experimento por grupo de tratamiento. La Figura 7 muestra el ABC en donde se tomaron en cuenta los grados de EAE de 15 días a partir del inicio de los signos. En ella se puede apreciar cómo los ratones que recibieron MP IN cursaron una EAE menos severa que en el resto de los grupos ( $p = 0.04$  vs. EAE+MP IV y  $p = 0.002$  vs. EAE+SS). A pesar de que el ABC de los ratones tratados con MP IV fue menor que el grupo control, no representó una disminución estadísticamente significativa ( $p = 0.09$ ).



**Figura 7.**

**El tratamiento con MP IN acumuló una menor severidad a lo largo del periodo de seguimiento.**

El área bajo la curva se calculó usando los grados de EAE de 15 días para cada sujeto, desde el inicio de los signos. Las barras de error representan el error estándar de la media. Las comparaciones entre grupos se hicieron con una ANOVA: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Los datos son representativos de 3 experimentos independientes con  $n = 6$  ratones.

La severidad de la EAE también se puede reflejar en la pérdida de peso de los ratones (Stromnes & Goverman, 2006). Tras la inducción de la EAE, los ratones sufren una pérdida de peso transitoria por los efectos del adyuvante y la PTX. Sin embargo, una vez que presentan signos de la EAE se puede observar una baja importante en el peso corporal que suele coincidir con el pico de la EAE. Esta baja de peso está asociada a la parálisis que pueden experimentar los ratones con EAE donde suele disminuir el consumo de agua y comida. Sin embargo, la baja de peso también se puede asociar a la producción de citocinas pro-inflamatorias (Hooke Laboratories, 2019). En la Figura 8 están representados

los promedios por grupo de la pérdida de peso, expresado como el porcentaje respecto al peso inicial (día de inducción), registrados a lo largo de los 28 días de seguimiento. La pérdida de peso del grupo EAE+SS es la más notoria, con hasta un 25% en el día 19. Para el día 28, estos ratones no habían recuperado su peso inicial. En contraste, los grupos que recibieron MP experimentaron una baja de peso de alrededor de 15% en el día 12, que coincide con el inicio de signos e inicio de tratamientos, y lo fueron recuperando gradualmente hasta regresar al peso inicial al final del periodo de seguimiento. Se tomaron los pesos del periodo de seguimiento para los 3 grupos y se compararon por medio de una ANOVA. De acuerdo con los resultados de esta prueba, no hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo que recibió MP IV e IN ( $p = 0.85$ ). Sin embargo, los menores pesos que se registraron en el grupo EAE+SS sí resultaron significativos con una  $p$  de 0.02 respecto al grupo que recibió MP IV y 0.004 contra el grupo tratado con MP IN. Cuando se compararon los valores día por día entre grupos, no se encontraron diferencias significativas.

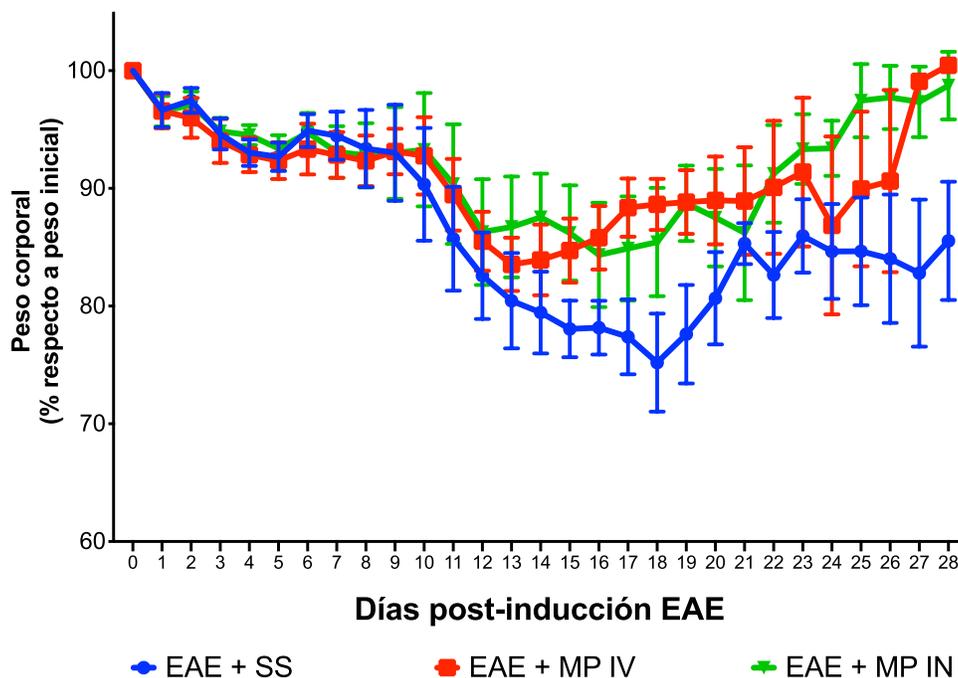


Figura 8.

**Los ratones tratados con MP IV e IN experimentaron una menor baja de peso.** Cambio porcentual respecto al peso corporal registrado al inducir la EAE a lo largo del periodo de seguimiento. Las barras de error representan el error estándar de la media. Los grupos se compararon usando una ANOVA:  $*p < 0.05$ . Sólo se indican los días con diferencias significativas. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes con  $n = 6$  ratones.

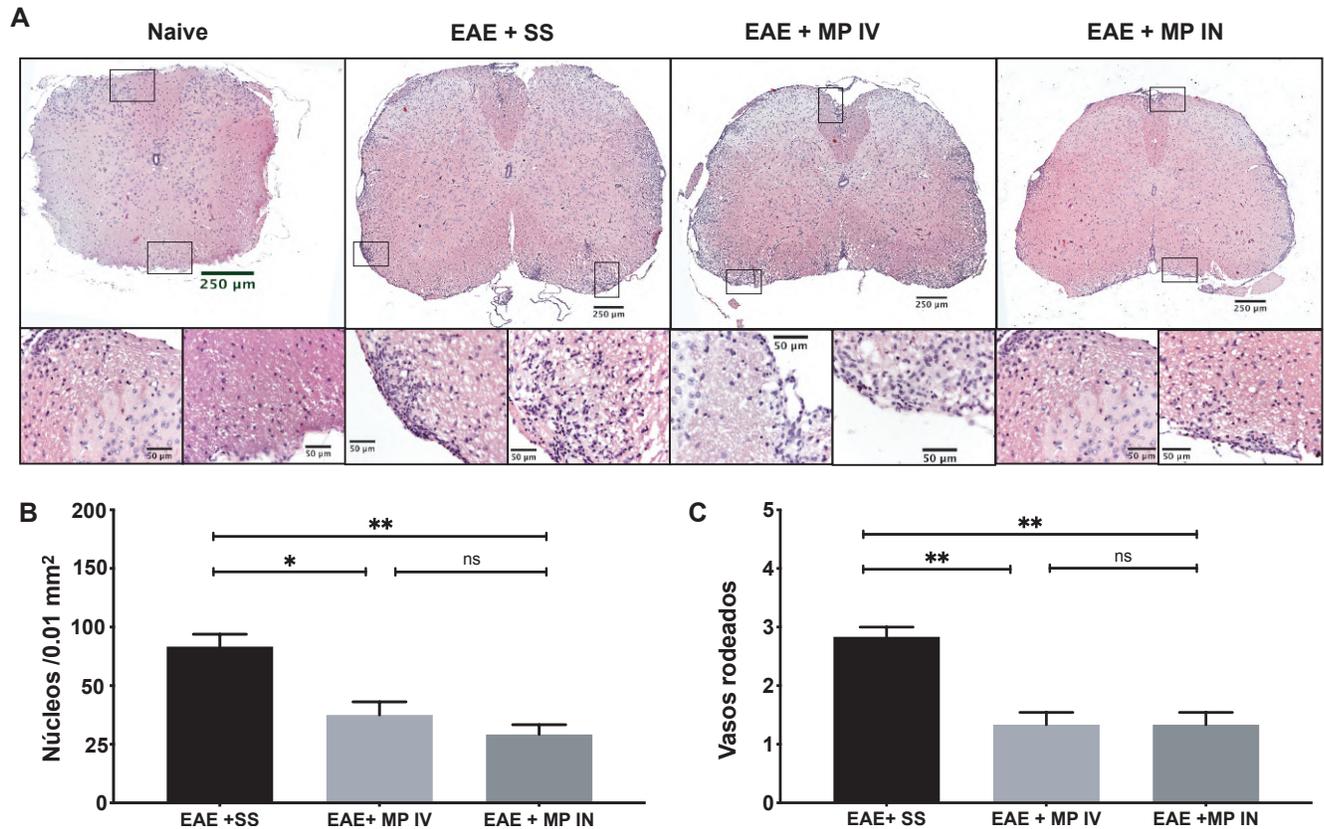
Para las 3 pruebas donde se evaluó la severidad de la EAE, la MP IN demostró poder reducirla de forma similar al tratamiento IV.

## **6.2. El tratamiento de MP IN reduce la infiltración celular hacia la médula espinal**

Una vez sabiendo que la MP IN sí podía prevenir el pico de actividad de la EAE, era importante correlacionar esto con hallazgos histológicos como un primer indicio de que el tratamiento actúa sobre la neuroinflamación asociada a la EAE. El pico de la EAE coincide con la infiltración de células del sistema inmune (linfocitos, monocitos, macrófagos y neutrófilos) hacia el SNC y a mayor severidad, mayor la cantidad de focos de infiltración hacia el SNC (Barthelmes et al., 2016; Bittner et al., 2014). El hecho de que los grados de EAE no aumenten tras recibir el tratamiento con MP, se puede interpretar como la capacidad que tiene el fármaco para prevenir la activación de células inmunes en la periferia y/o evitar su migración hacia el SNC (Fischer et al., 2013). Para estudiar el infiltrado celular se analizaron cortes de médula espinal obtenidos 24 h después de administrar el último tratamiento, coincidiendo con el pico de la EAE. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina, lo cual permite distinguir los núcleos del infiltrado y observar el estado general de los tejidos. En la Figura 9A se encuentran imágenes representativas de estos cortes. Dentro de los cortes del grupo de EAE+SS se encontró un mayor daño al tejido, especialmente aquel correspondiente a la sustancia blanca. En esta zona, y especialmente en la periferia de los tejidos es donde se encontraron con mayor frecuencia los focos de infiltrado. No obstante que en los grupos que recibieron MP también se encontraron estos focos, su densidad fue menor. Esto se corroboró mediante el conteo de núcleos en un área de  $0.01 \text{ mm}^2$  (Figura 9B). El conteo fue realizado por un evaluador ciego al grupo de tratamiento. Los resultados confirmaron que el grupo con mayor número de núcleos fue el de EAE+SS. El número fue únicamente estadísticamente superior respecto al grupo EAE+MP IN.

Otra área donde se encontraron focos de inflamación fue rodeando vasos que irrigan la médula espinal. Es frecuente encontrar leucocitos aquí ya que es donde se acumulan antes de infiltrarse hacia el parénquima del SNC (Agrawal et al., 2013). De acuerdo con una definición histológica, un evaluador buscó y contó los vasos rodeados en imágenes sin conocer el grupo de tratamiento al que pertenecían. En la Figura 9C se presentan los resultados de esta evaluación. Mientras que los grupos tratados con MP tuvieron entre 1 y 2 vasos rodeados en promedio, el grupo que recibió únicamente solución salina tuvo, en promedio, 5 o más vasos rodeados. Esto corresponde con la mayor densidad de los focos en el grupo EAE+SS. La mayor cantidad de vasos rodeados sí resultó significativa con valor de  $p$  al comparar con los grupos que recibieron MP equivalente a 0.009. No hubo diferencias entre los grupos que recibieron MP. Estos resultados apuntan hacia el

hecho de que el tratamiento con MP IN podría estar interfiriendo con la activación y migración de células inmunes hacia el SNC; por ello la densidad de los infiltrados y el número de vasos rodeados son menores en contraste con el grupo EAE+SS.



**Figura 9.**

**Los tratamientos con MP IV e IN resultaron en una menor infiltración de células inmunes hacia el SNC.**

A) Imágenes representativas empleadas para estudiar la infiltración celular, observada como el aumento de núcleos (morado), en cortes de médula espinal. Los recuadros indican las regiones donde se capturaron las imágenes con aumento de la fila inferior. N= 6 ratones por grupo.

B) Cuantificación del número de núcleos observados por área. El conteo fue realizado por una persona sin conocimiento del grupo de tratamiento al que pertenecían las imágenes.

C) Número de vasos rodeados detectados, definidos como acumulación de leucocitos en forma de anillo, donde se puede observar el lumen al interior. La evaluación fue realizada por una persona sin conocimiento del grupo de tratamiento al que pertenecían las imágenes.

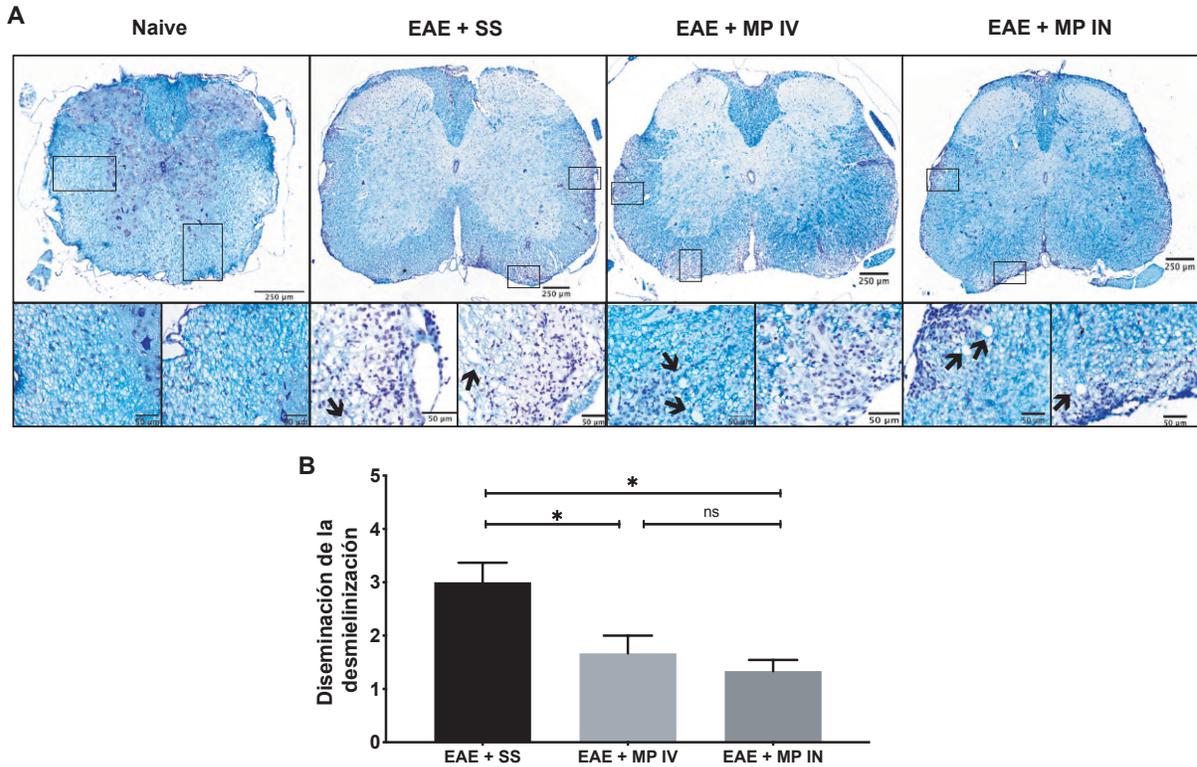
B y C) Las barras muestran el promedio  $\pm$  error estándar de la media de la evaluación de 5 cortes subsiguientes en 6 ratones por tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA: \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

### 6.3. La MP IN atenúa la desmielinización por EAE

Además de contrarrestar la neuroinflamación, es deseable que un fármaco o estrategia que busque reducir el daño asociado a la EAE prevenga la desmielinización. Mientras que los infiltrados celulares se resuelven con el paso del tiempo, los daños a la mielina no corren con la misma suerte. En este trabajo se buscó describir el estado de la mielina en la sustancia blanca mediante una tinción de Klüver-Barrera con azul Luxol rápido y violeta de cresilo. El azul Luxol rápido se une a lipoproteínas de la mielina y las tiñe de azul, mientras que el violeta de cresilo tiñe núcleos. Imágenes representativas de cortes de médulas espinales con esta tinción se muestran en la Figura 10A. En esta se advierte que la coloración azul de la sustancia blanca es mucho más intensa en los ratones naive que en el resto de los grupos. Observadas con un mayor aumento, las fibras de mielina se ven mucho más delgadas y con mayor separación en el grupo EAE+SS.

Por el contrario, en los grupos que recibieron MP, las fibras tienen una apariencia más homogénea en cuanto al grosor y coloración. La presencia de núcleos, como resultado de la infiltración celular, especialmente en el grupo EAE+SS pudiera estar relacionado con la pérdida de mielina en estas áreas. La presencia de vacuolas, o áreas evidentes sin coloración dentro de la sustancia blanca, también puede indicar desmielinización (Hooke Laboratories, 2019). Debido al daño al tejido, probablemente como consecuencia de la inflamación, no resultó tan sencillo identificar vacuolas en cortes del grupo EAE+SS; fueron más fácil de apreciar en los otros 2 grupos (indicadas con flechas).

Otra aproximación que se siguió para cuantificar la desmielinización fue utilizar una escala basada en la ubicación y extensión de las áreas con una menor intensidad o falta de coloración con la tinción de Klüver-Barrera. Tras la evaluación en ciego de las imágenes y de acuerdo con los parámetros de esta escala, en el grupo EAE+MP IN la desmielinización estuvo casi siempre limitada a los márgenes (desmielinización subpial equivalente a una calificación de 1), mientras que en el grupo EAE+SS todas las imágenes estudiadas presentaban por lo menos desmielinización en los márgenes y alrededor de vasos (correspondiente a una calificación de 2 o más). Las diferencias en las puntuaciones entre estos 2 grupos resultaron estadísticamente significativas ( $p = 0.02$ ). En suma, estas observaciones pudieran indicar que el tratamiento con MP IN e IV limita los daños histológicos como consecuencia de la desmielinización. La MP parece haber evitado una desmielinización generalizada y los tejidos pertenecientes a este grupo conservan mejor su integridad.



**Figura 10.**

**La mielina mostró alteraciones moderadas cuando los ratones recibieron MP IV e IN.**

A) Imágenes representativas mostrando cambios en la apariencia de la mielina (teñida en azul) e infiltrado (núcleos en morado). Los recuadros indican las regiones donde se capturaron las imágenes con aumento de la fila inferior. Las flechas en esta fila señalan vacuolas que se asocian con áreas de desmielinización. N= 6 ratones por grupo.

B) Evaluación de la diseminación de las áreas con alteraciones en la mielina según escala de Brahmachari y Pachan (2008). La evaluación fue realizada por una persona sin conocimiento del grupo de tratamiento al que pertenecían las imágenes. Las barras muestran el promedio  $\pm$  error estándar de la media de la evaluación de 5 cortes subsecuentes en 6 ratones por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante Kruskal-Wallis:  $*p < 0.05$ .

#### **6.4. La migración de linfocitos y la activación de macrófagos/microglia y astrocitos se reduce con el tratamiento de MP IN**

Dentro de los infiltrados celulares, los subtipos celulares de mayor importancia en la EAE son los linfocitos y los macrófagos. Estos subtipos liberan mediadores de la inflamación y generan daño tisular. Además, pueden reclutar a otras células del sistema inmune. Por otro lado, en el SNC, la microglia y los astrocitos participan como células presentadoras de antígeno, pero también secretando mediadores que promueven la inflamación. Por medio de ensayos de inmunofluorescencia se estudiaron marcadores característicos de estos fenotipos celulares para evaluar cómo se modifica su expresión tras la administración IN de MP.

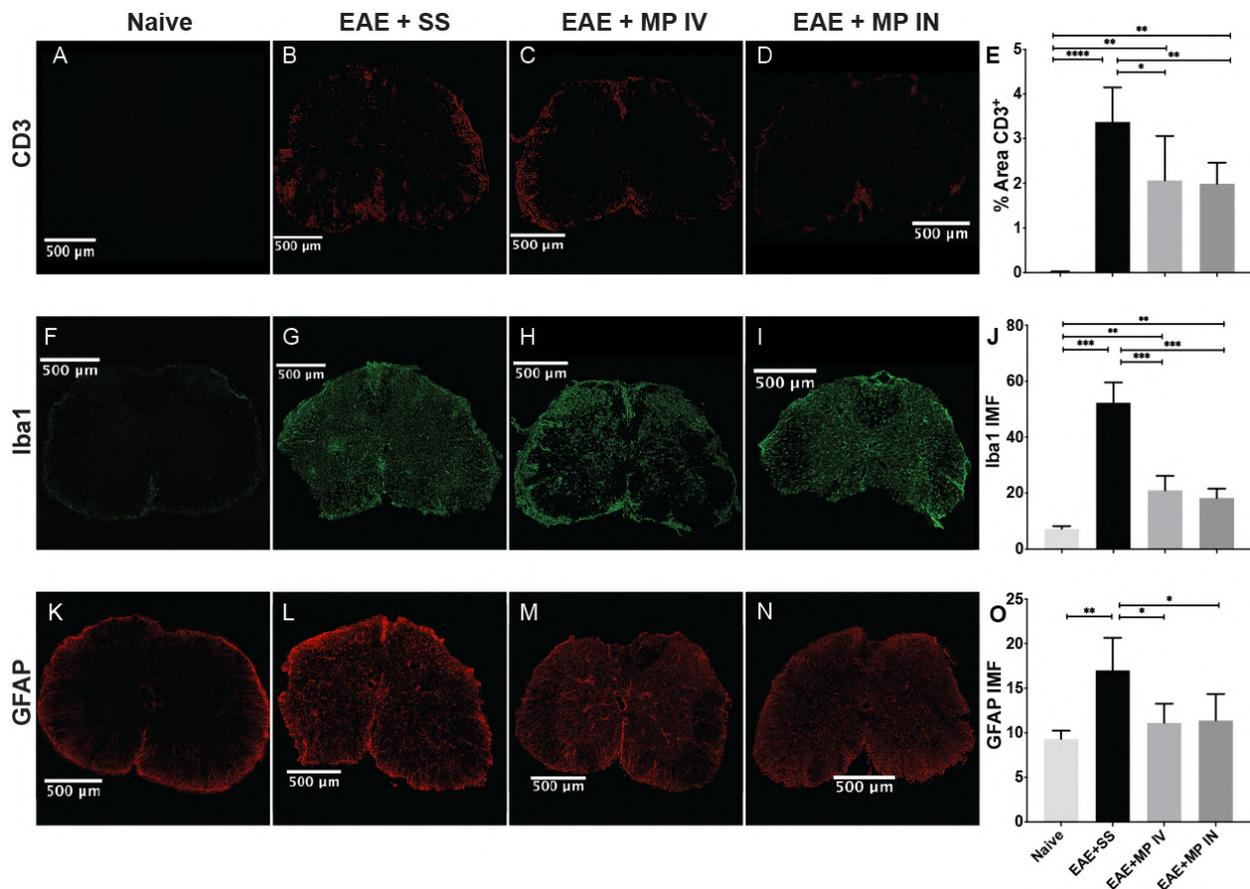


Figura 11.

Los ratones tratados con MP IV e IN tuvieron una menor infiltración de linfocitos (fila superior) y presentaron una menor intensidad de fluorescencia media (IMF) para Iba1 (fila intermedia) y GFAP (fila inferior).

Imágenes representativas de análisis de inmunofluorescencia en cortes de la médula espinal teñidas con anticuerpos para los siguientes marcadores: CD3 (A-D), Iba1 (F-I) y GFAP (K-N). Se capturaron 3 imágenes subsecuentes de 4 animales por grupo con una configuración constante para cada marcador con el fin de poder compararlas. Las cuantificaciones se hicieron en ciego. Las gráficas de barras de la derecha muestran el área con marca positiva de CD3 (E) o la IMF para Iba1 (J) y GFAP (O). Las barras de error representan el error estándar de la media. Las comparaciones entre grupos se hicieron con una ANOVA: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Para linfocitos se usó el marcador CD3, un marcador que no está presente exclusivamente en linfocitos T CD4<sup>+</sup> sino también en los CD8<sup>+</sup>. Estos últimos, aunque no predominan, también participan en la neuroinflamación asociada a la EAE. En condiciones normales, la marca de CD3 en el SNC debería ser prácticamente nula (como en el panel A de la Figura 11), por lo que en lugar de cuantificar la intensidad media de fluorescencia (IMF), se cuantificó el porcentaje de área positiva de este marcador. Similar a lo observado en la histología, en los controles negativos (EAE+SS), la mayor concentración de marca se encontró en la sustancia blanca, aunque también se puede observar en la sustancia gris

(Figura 11 panel B). En los grupos que recibieron MP (Figura 11, paneles C y D), la marca también se encontró principalmente en la sustancia blanca, de forma particular alrededor de la arteria espinal anterior. El área positiva para CD3 fue menor en los grupos que recibieron MP IN e IV que en los grupos que recibieron solución salina (Figura 11 panel E). El menor porcentaje de área CD3<sup>+</sup> en el grupo de MP IV E IN fue estadísticamente significativo.

Como parte de la respuesta neuroinflamatoria en la EAE, los monocitos que migran desde la periferia y la microglia adquieren un fenotipo indistinguible de macrófagos activados y por esta razón se estudiaron en conjunto (Lelios & Greter, 2014). Ambos tipos celulares expresan constitutivamente la proteína citoplasmática Iba1 (molécula adaptadora de unión a calcio ionizado tipo 1). Esta expresión constitutiva se puede observar en el panel F de la Figura 11. Sin embargo, su expresión aumenta en condiciones de neuroinflamación (Boche et al., 2013). En el grupo EAE+SS, además del aumento de la expresión de Iba1, la marca se encontró profusamente tanto en la sustancia gris como en la blanca, con algunas regiones donde la intensidad es mayor (Figura 11, panel G). Pese a que en los grupos EAE+MP IV e IN también se encontró la marca correspondiente a Iba1 en sustancia gris y blanca, una diferencia importante es que en la sustancia blanca se halló concentrada hacia los bordes del corte (Figura 11, paneles H e I). En esta zona además se hallaron focos con mayor intensidad de la marca. Al comparar la intensidad media fluorescente (IMF) de Iba1 en cada uno de los grupos se pudo corroborar que en los ratones con EAE fue mayor (Figura 11, panel J;  $p = 0.001$  respecto a EAE+MP IV,  $0.005$  respecto a EAE+MP IN y  $<0.001$  para EAE+SS). Los grupos que recibieron MP registraron una menor IMF con una  $p$  menor a  $0.001$  cuando se compararon con el grupo EAE+SS. Tomando en cuenta lo observado en las imágenes, así como los resultados del análisis de IMF, es posible pensar que la administración de MP, independientemente de la vía, reduce la expresión de Iba1. Esto podría ser consecuencia de una reducción en el reclutamiento de monocitos y/o en la inhibición de activación de la microglia.

El tercer marcador que se estudió fue la proteína ácida fibrilar glial, o GFAP por sus iniciales en inglés. Este marcador es una proteína de citoesqueleto producida exclusivamente por astrocitos. En la EAE, la activación de astrocitos, como parte de la neuroinflamación, se puede apreciar como un aumento en la expresión de GFAP (Brambilla, 2019). A mayor activación, mayor suele ser la severidad de la EAE. En condiciones fisiológicas, la sustancia blanca expresa constitutivamente GFAP (Khakh & Sofroniew, 2015). Es eso lo que se encontró en cortes de animales naive (Figura 11, panel K). La inducción de la EAE aumentó la expresión de GFAP: la intensidad de la señal en la sustancia blanca fue mayor, pero además se encontró también en la sustancia gris (Figura 11, panel L). En términos de IMF, este aumento en la intensidad de la señal del grupo

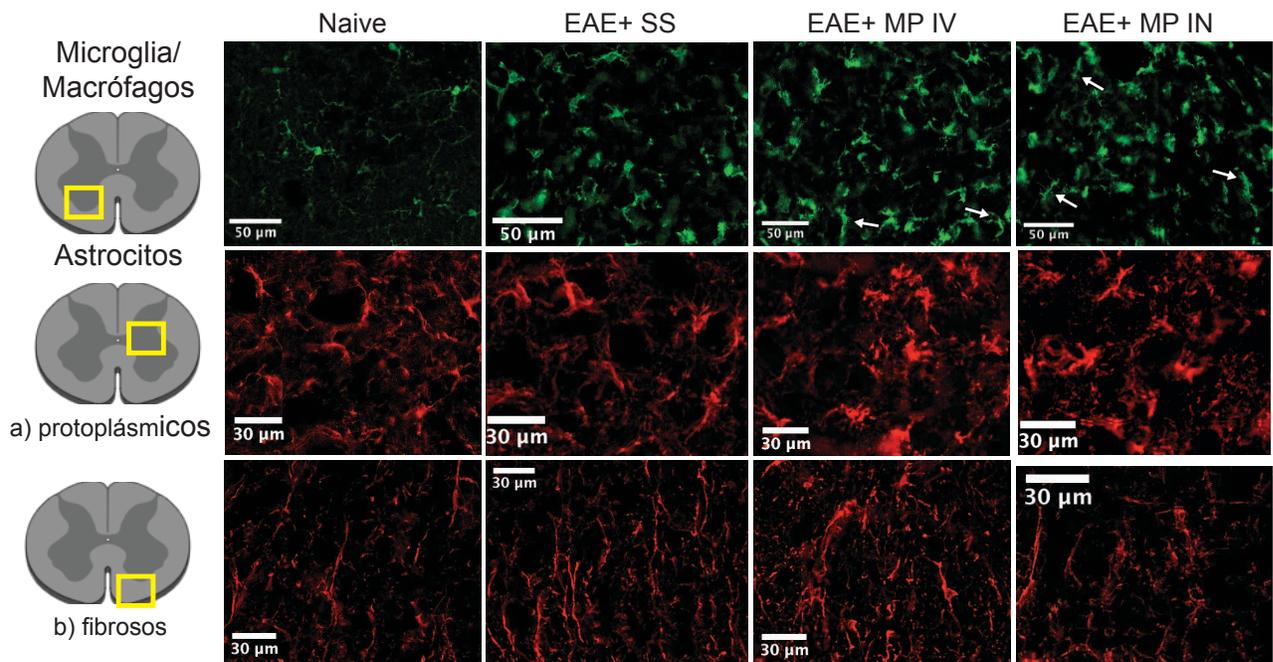
naive al grupo EAE+SS fue estadísticamente significativo ( $p = 0.001$ ). Cuando se toman en cuenta los grupos tratados con MP, quizá la única diferencia importante en estos animales con respecto al grupo que recibió solución salina es que la señal de GFAP en la periferia de la médula no es tan intensa como en este último grupo, aunque la marca está presente en las regiones que corresponden tanto a la sustancia blanca como a la gris (Figura 11, paneles M y N). Por medio del análisis de la IMF, sin embargo, sí se observa en el panel O de la Figura 11 una reducción de la señal de GFAP en los grupos EAE+MP IV e IN, ambas significativas ( $p = 0.02$ ). De acuerdo con lo anterior, se puede proponer que la administración de MP IN en la EAE promueve una reducción en la expresión de GFAP que podría estar asociada a una menor activación de astrocitos. Sin embargo, esta reducción no es tan clara como en el caso de Iba1.

### **6.5. Modificación de la morfología de microglia/macrófagos y astrocitos tras la exposición a MP IN**

Además de evaluar la expresión de marcadores que se han asociado previamente con neuroinflamación, estudiar la morfología de microglia y astrocitos constituye una evidencia adicional de los efectos de un tratamiento en el SNC. Empleando imágenes obtenidas de este mismo experimento, fue posible detectar los cambios en la morfología de microglia/macrófagos y astrocitos en la médula espinal. En animales a los que no se les indujo la EAE ni recibieron tratamiento, se puede ver en la fila superior de la Figura 12 a la microglia como cuerpos celulares pequeños rodeados de delgadas ramificaciones. En contraste, en la imagen a la derecha, perteneciente al grupo EAE+SS, la microglia posee un mayor tamaño y una forma ameboide, propia de la neuroinflamación, con pocas ramificaciones, aunque más gruesas. El tratamiento con MP (Figura 12, tercer y cuarta columna de la fila superior) no parece revertir la morfología al estado quiescente: aún se observan células con forma ameboide aunque son de menor tamaño. En estos grupos se observa una mayor ramificación de la microglia que en el grupo sin tratamiento, pero son de menor longitud que en el grupo naive. Otra particularidad registrada en estos grupos es la presencia de microglia bipolar, implicada en reparación del SNC, señaladas con flechas blancas.

Dentro de los astrocitos, se distinguen dos tipos en la médula espinal: los protoplásmicos en la sustancia gris (Figura 12, fila intermedia), y los fibrosos en la sustancia blanca (Figura 12, fila inferior). Los astrocitos protoplásmicos del grupo naive coinciden con las características que se suelen describir en la literatura: con pocos procesos principales de donde emergen ramificaciones delgadas que le da una apariencia "frondosa" (Figura 12, imagen extrema izquierda, fila intermedia). Se pueden identificar dominios definidos. Sin embargo, en todos los grupos donde se indujo EAE se observa proliferación, hipertrofia del cuerpo celular y disminución de la densidad de procesos/ramificaciones, consistente

con astrogliosis. Otra característica asociada a inflamación es la pérdida de los dominios definidos, visible en los grupos con EAE+SS y EAE+MP IV. Si bien varias de estas características están presentes en el grupo EAE+MP IN, parece que el daño no fue tan extensivo (Figura 12, fila intermedia).



**Figura 12.**

**La glía de los grupos tratados con MP presenta una morfología intermedia entre aquella de los grupos naive y EAE+SS.**

Imágenes representativas de microglia/macrófagos (fila superior) y astrocitos (fila intermedia e inferior) capturadas de las zonas indicadas en el esquema a la izquierda. Las células están marcadas con anticuerpos para Iba1 (fila superior) y GFAP (fila intermedia e inferior). Las flechas en la fila superior indican la microglia bipolar. Para la descripción morfológica se capturaron 3 imágenes subsecuentes de 4 animales por grupo.

Los astrocitos fibrosos (Figura 12, fila inferior) son más alargados con procesos que parecen fibras. No poseen tantas ramificaciones como los protoplasmáticos ni se organizan en dominios definidos. En los controles positivos (EAE+SS), se detectó una hipertrofia de los astrocitos fibrosos y una reducción en el número de procesos, además de proliferación. Para los grupos que recibieron MP, no se registró un engrosamiento de estos astrocitos, ni parece evidente la pérdida de procesos. Sin embargo, en estos dos grupos es notoria la pérdida de la orientación transversal que presentan los astrocitos fibrosos y el hecho de que varios de ellos se ven más compactos.

En conjunto estas observaciones podrían sugerir que tras el tratamiento con MP, los astrocitos y la microglia adquieren un tercer fenotipo intermedio entre el estado quiescente y el generado por la neuroinflamación asociada a la EAE.

## **6.6. Disminución de citocinas pro-inflamatorias en la médula espinal de ratones tratados con MP IN**

Ya sea en la periferia, o en el SNC, las citocinas son otro componente importante dentro de la inmunopatología de la EAE, especialmente porque definen la función y la polarización de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Göbel et al., 2018). Junto con los linfocitos, la microglia/macrófagos y astrocitos pueden secretar citocinas pro-inflamatorias que promueven la apoptosis de oligodendrocitos y una subsecuente desmielinización (Barthelmes et al., 2016). Sabiendo esto, se midieron citocinas pro-inflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17) en la médula espinal 24 h después de la última administración de tratamientos. Se decidió extender la evaluación al bazo considerando que se ha propuesto que la MP actúa principalmente en la periferia y que el bazo es el sitio de proliferación de linfocitos antes de migrar hacia el SNC (Leussink et al., 2001; Wüst et al., 2008). Los resultados se pueden encontrar en la Figura 13. Se sabe que al inicio de los signos de la EAE, cuando se da la infiltración celular, está dominada por linfocitos Th1 que secretan IFN- $\gamma$  y que la MP puede disminuir su expresión (Miljković et al., 2009; Sosa et al., 2015). En la médula espinal se pudo corroborar esto tras la administración IV e IN ( $p < 0.001$ ). Mientras tanto, en el bazo, no se observaron cambios importantes en los niveles de esta citocina. La liberación de IFN- $\gamma$ , promueve la liberación de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por parte de macrófagos y microglia (Ottum et al., 2015). TNF- $\alpha$  también puede ser secretada por linfocitos Th1 y Th17 (Wagner et al., 2020). En bazo y médula espinal se registró un aumento de TNF- $\alpha$  en los ratones con EAE, así como su disminución al recibir MP. Sin embargo, la menor concentración de esta citocina en el bazo no fue estadísticamente significativa para el grupo que recibió MP IV. Al evaluar IL-1 $\beta$ , en la médula espinal se halló un efecto similar cuando se administró MP. Por el contrario, en el bazo no se observaron cambios, incluso frente a los ratones naive.

Como se mencionó en la introducción, los linfocitos Th17 también juegan un papel importante en la EAE (Sie et al., 2014). IL-6 se requiere para la diferenciación de estos linfocitos; también la microglia y los astrocitos pueden liberar esta citocina (Barthelmes et al., 2016). En la médula espinal, la inducción de la EAE aumentó la expresión de IL-6 respecto al grupo naive. La MP no modificó importantemente sus niveles. Estudiando directamente a la IL-17, secretada exclusivamente por linfocitos, en la médula espinal se detectó un aumento significativo tras la inducción de la EAE ( $p < 0.01$ ). Los tratamientos

con MP lograron revertir este aumento. En el bazo no existieron diferencias entre los 4 grupos experimentales.

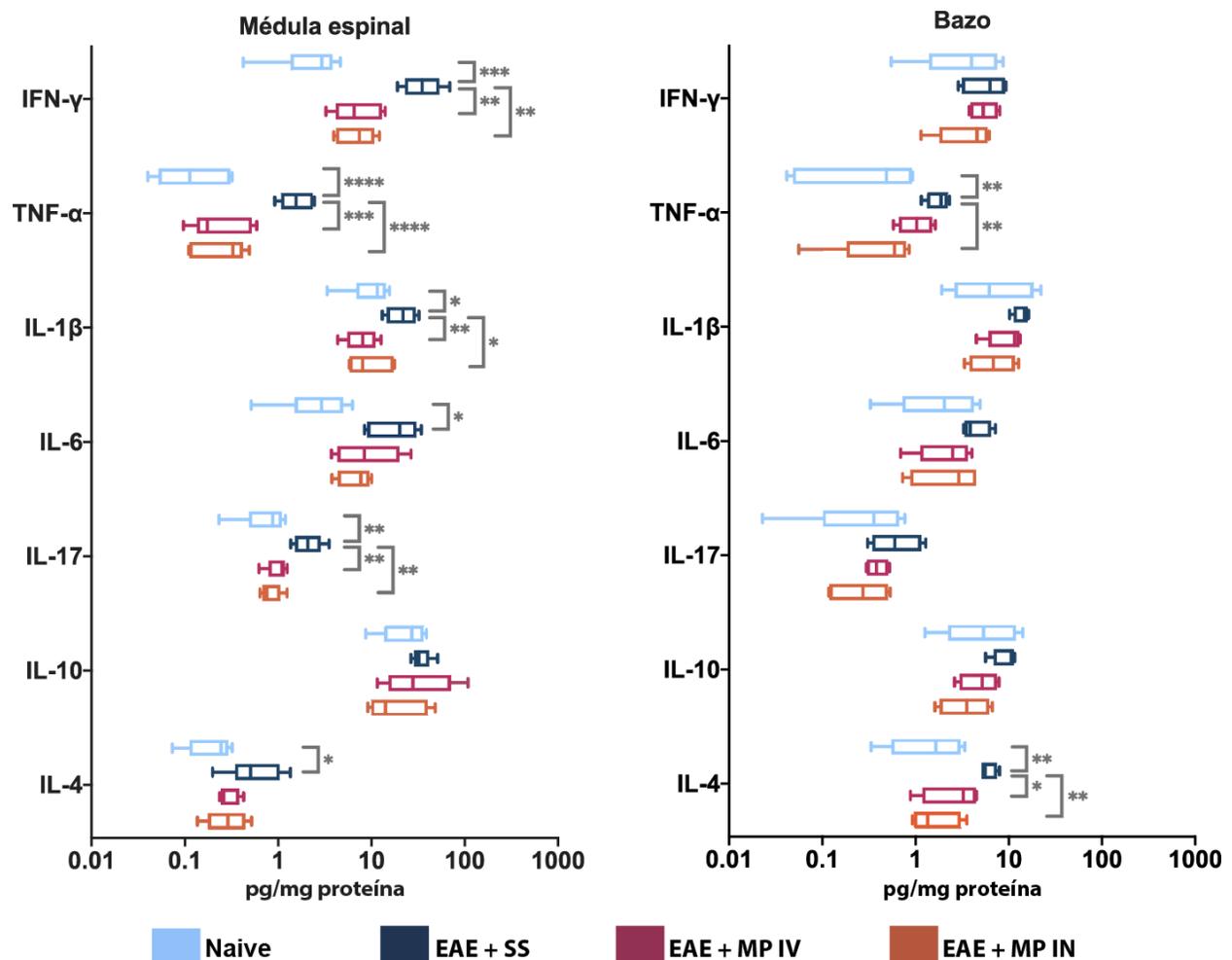


Figura 13.

La MP IV e IN actúa principalmente en la médula espinal reduciendo la secreción de citocinas pro-inflamatorias.

Niveles de citocinas en médula espinal y bazo medidos por un inmunoensayo múltiple magnético. El análisis estadístico se hizo mediante una ANOVA:  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Se incluyeron 5 ratones por grupo.

Para obtener indicios de una posible regulación de la neuroinflamación por medio de linfocitos Th2, se midieron también IL-10 e IL-4. Las concentraciones de IL-10 en ambos tejidos no se vieron afectadas ni por la inducción de la EAE, ni por el tratamiento con MP. En el bazo se registró un aumento de IL-4 en los ratones del grupo EAE+SS con respecto al grupo naive ( $p < 0.01$ ). Lo mismo se puede apreciar en la médula espinal. Al recibir MP, únicamente los niveles de IL-4 en el bazo se asemejaron al grupo naive.

Al tomar en cuenta estos resultados se puede concluir que la MP IN actúa sobre la secreción de citocinas de manera similar que la MP IV en este modelo de EAE.

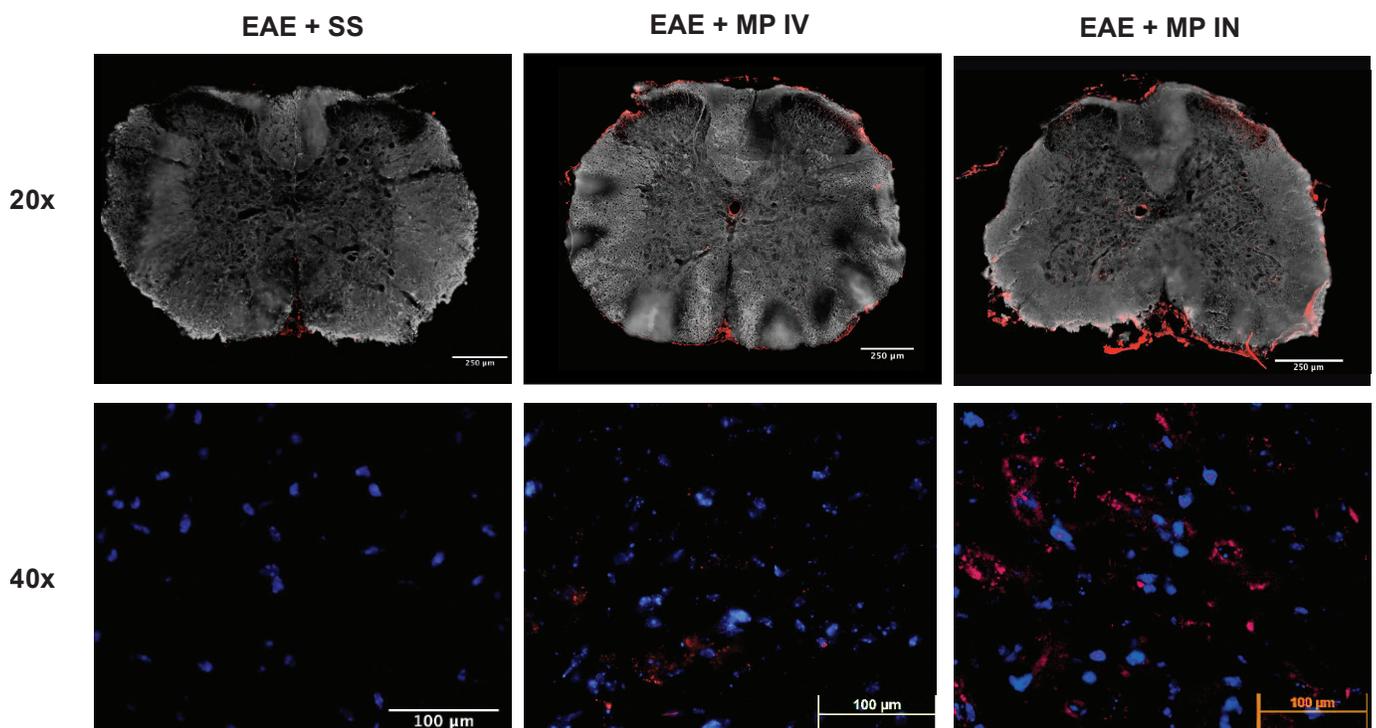
### **6.7. Presencia extendida de MP en la médula espinal tras la administración IN**

Otro aspecto que este trabajo exploró fue la distribución de la MP en el SNC tras su administración IN e IV. De acuerdo con trabajos publicados anteriormente comparando la vía IN contra otras vías, una de sus ventajas es que se puede encontrar en un menor tiempo el fármaco en el SNC (D. S. Quintana et al., 2016). Una primera prueba consistió en detectar la presencia de la MP en la médula a través de una prueba de inmunofluorescencia. La MP al ser una molécula pequeña incapaz de generar una respuesta inmune, se une a una proteína acarreadora, tiroglobulina bovina y se usa como inmunógeno para crear los anticuerpos usados en esta prueba. Únicamente con el fin de delimitar la sustancia gris y blanca dentro de los cortes de la médula, se empleó un anticuerpo contra la proteína básica de mielina. En la Figura 14 se muestran imágenes representativas de la señal de MP en cortes de médula. En las imágenes pertenecientes al grupo EAE+SS se puede observar señal fuera del tejido que pudiera corresponder a un pegado inespecífico o ruido. Cuando se analizaron los cortes con mayor aumento, no se encontró marca. En los grupos que recibieron MP se observó señal especialmente en la periferia de la médula espinal, posiblemente en sitios adyacentes a vasos sanguíneos. Dentro del parénquima también se alcanzan a ver varios sitios con marca. En las reconstrucciones totales de las imágenes de la médula, no se apreciaron diferencias en la distribución de la marca entre los 2 grupos que recibieron MP. En cambio, con mayores aumentos fue posible observar en el grupo que recibió MP mediante la nariz la marca del fármaco rodeando varios núcleos. Esta marca de MP pudiera representar las moléculas que están acopladas a receptores de glucocorticoides en la superficie celular. En el grupo de administración IV, se detectó una tenue señal de MP, pero sin una ubicación específica. Estos resultados sugieren que cuando se administra MP mediante la vía IN es más probable encontrarla en el SNC que cuando se administra por la vía IV.

Para corroborar mediante un método cuantitativo este hallazgo, se realizó una prueba piloto de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Si efectivamente la concentración que llega al SNC es mayor por vía IN, se podría administrar una dosis menor alcanzando la misma concentración en SNC que aquella que se logra mediante la administración IV. Además de incluir tejidos de ratones de los grupos que recibieron la dosis empleada de 200 mg/kg IV o IN, se incluyeron 2 grupos con dosis menores por vía IN. Se consideró un grupo que recibió 100 mg/kg y otro que recibió 50 mg/kg. Las concentraciones registradas, expresadas en  $\mu\text{g/ml}$  y medidas 24 h después de la última administración de

MP, se muestran en la Figura 15, panel A. En el panel B de la misma Figura se muestra que la metodología empleada permite detectar específicamente la MP.

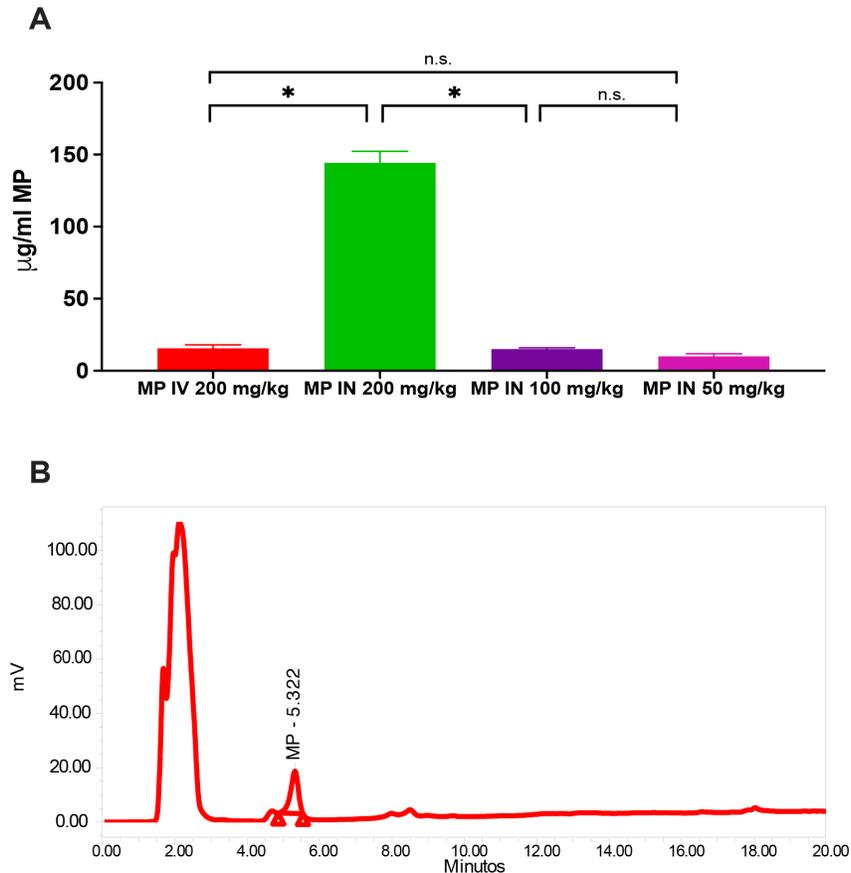
Hay diferencias significativas entre la concentración de MP detectada en SNC luego de administrar 200 mg/kg IN contra administrarlo por vía IV ( $p = 0.01$ ). La concentración detectada en el grupo EAE+MP IN es 9 veces mayor que la detectada en el grupo EAE+MP IV. La concentración observada en el SNC del grupo IV es similar a la alcanzada con las dosis IN menores. No hubo diferencias significativas entre estos 3 grupos. Lo anterior indica que 24 horas tras administrar la misma dosis de MP, la concentración que llega al SNC es superior por vía IN que IV.



**Figura 14.**

**La marca correspondiente a MP es más evidente en el grupo que la recibió por vía IN.**

Imágenes representativas de distribución de metilprednisolona (MP) en cortes de médula espinal. La MP está teñida en rojo (anticuerpo conjugado con el fármaco), en la fila superior el gris representa la proteína básica de mielina y en las filas inferiores, los núcleos están teñidos en azul (DAPI). Se capturaron 3 imágenes subsecuentes de 4 animales por grupo.



**Figura 15.**

**La concentración de MP detectada mediante HPLC es 9 veces mayor cuando se administra por vía IN.**

A) Concentraciones de MP en cerebro y médula espinal correspondientes a 3 ratones por grupo. El valor se ajustó con respecto al porcentaje de recobro de la metodología y con respecto a la dosis ajustada al peso que se administró.

B) Cromatograma de detección de MP por HPLC, 0.2 mg/ml.

## 6.8. Dosis menores de MP IN son igual de efectivas en EAE

Habiendo encontrado que las dosis menores de MP IN alcanzaban concentraciones similares en el SNC que la dosis original IV, surgió la inquietud de ver si igualmente podrían reducir la severidad asociada a la EAE. Usando dosis menores ofrece además la posibilidad de reducir los posibles efectos colaterales asociados al tratamiento. Se diseñó un experimento donde se evaluaron diferentes dosis de MP por vía IN: la original de 200 mg/kg, las dosis inferiores empleadas en la prueba de HPLC (100 mg/kg y 50 mg/kg), y una dosis aún inferior de 25 mg/kg. En un experimento previo, se encontró que el fármaco, especialmente en pequeñas dosis, podía absorberse mejor en la cavidad nasal de los ratones si se aplicaba únicamente el volumen correspondiente (v.c.) a la dosis de

MP, en lugar de diluirla para alcanzar un volumen constante de administración. Para estas dosis menores, los volúmenes por dosis de la solución de MP empleados estaban entre 2 y 8  $\mu$ l.

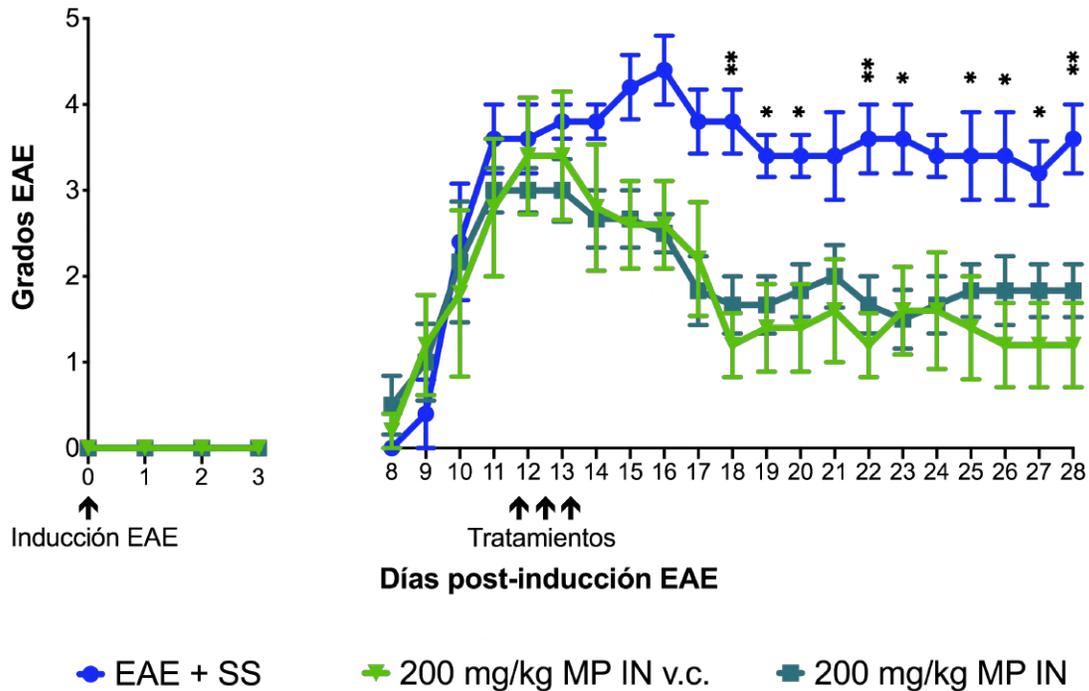


Figura 16.

**No hay diferencias cuando se administra la dosis de MP sin diluir para obtener un volumen final constante.**

Comparación de la evolución de la EAE al administrar 200 mg/kg MP IN con un volumen ajustado de 20  $\mu$ l (volumen constante= v.c), o administrar únicamente el volumen correspondiente a la dosis de 200 mg/kg de MP. Un evaluador sin conocimiento de los grupos de tratamiento registró diariamente los grados. Las barras de error representan el error estándar de la media. Los grupos se compararon usando una prueba de Kruskal-Wallis:  $*p < 0.05$  y  $**p < 0.01$ , Sólo se indican los días con diferencias significativas. N= 6 ratones.

Por ello, antes de evaluar el efecto de las dosis menores en el modelo de EAE, se usó la dosis original de 200 mg/kg y se comprobó que no hubiera diferencias en cuanto al efecto terapéutico cuando se administraba un v.c. de 10  $\mu$ l por fosa nasal (20  $\mu$ l en total) contra el volumen únicamente correspondiente a la dosis de MP. En la Figura 16 se puede observar que no existieron diferencias entre ambos grupos que recibieron MP a lo largo de los 28 días que se realizó el seguimiento y que los 2 fueron igualmente eficaces para reducir la severidad asociada a la EAE.

Posterior a corroborar que se podía emplear la MP sin diluir, se procedió a evaluar el efecto de las dosis menores sobre la EAE. En la Figura 17 se puede observar la respuesta

a estas dosis. Todos los grupos partieron de un promedio de grados similar ( $p = 0.59$ ). Para todas las dosis de MP se puede apreciar una disminución progresiva de los grados de EAE. No obstante, las más eficaces resultaron ser las de 25 mg/kg ( $p = 0.03$ ) y la de 100 mg/kg ( $p = 0.009$ ) cuando se consideró todo el periodo de seguimiento. La menos eficaz en este análisis fue la de 50 mg/kg ( $p = 0.25$ ). Para las múltiples dosis también se calculó el área bajo la curva (ABC). En la Figura 18 se muestra que todas las dosis, excepto la de 50 mg/kg, lograron reducir significativamente el ABC comparado con el grupo que solo recibió solución salina. Tanto la reducción en los grados como en el ABC indica que las dosis de 100 mg/kg y 25 mg/kg de MP son eficaces para contrarrestar la severidad asociada a la EAE.

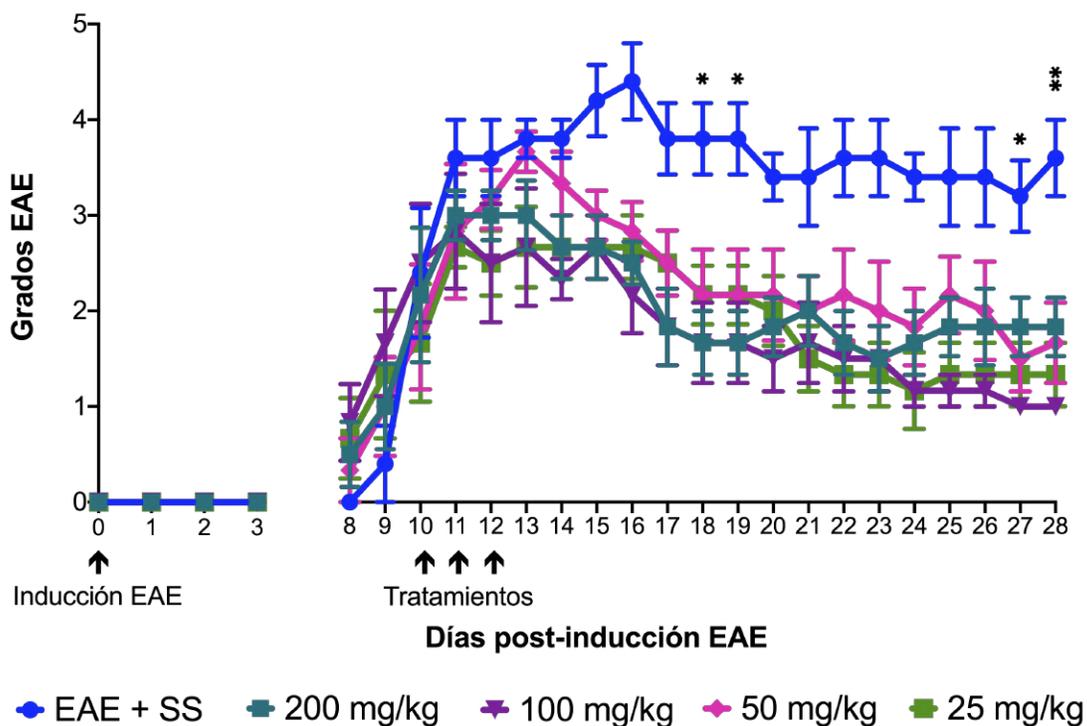


Figura 17.

**Las dosis inferiores de MP tienen una capacidad similar de reducir los signos de la EAE.**

Comparación del efecto de diferentes dosis de MP sobre la severidad de la EAE. El registro de grados se realizó por un evaluador ciego a los tratamientos. Las barras de error representan el error estándar de la media. Los grupos se compararon usando una prueba de Kruskal-Wallis: \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ , Sólo se indican los días con diferencias significativas, para todos los grupos respecto al control (EAE+SS). N= 6 ratones.

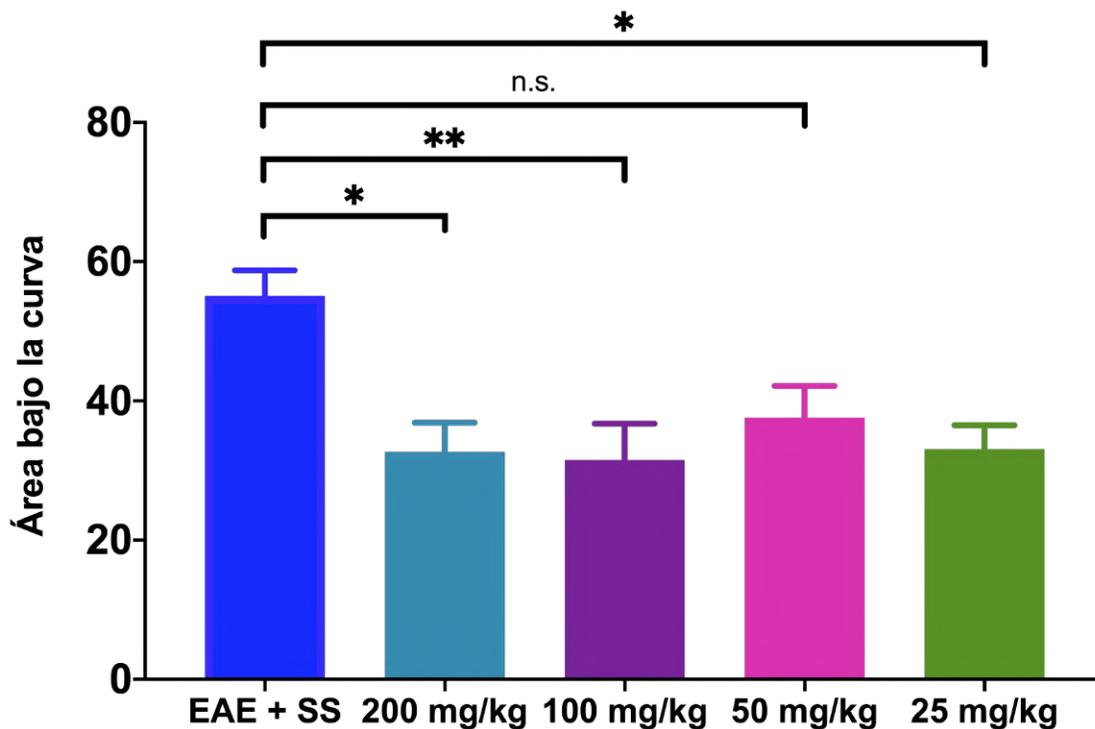


Figura 18.

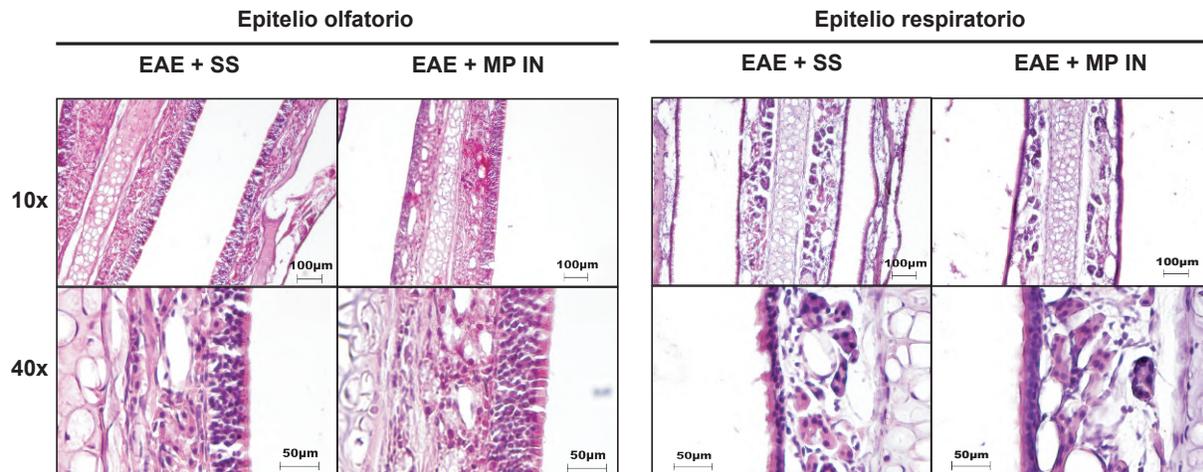
Las dosis inferiores de MP IN redujeron la severidad acumulada en el periodo de seguimiento.

El área bajo la curva (ABC) se calculó usando los grados de EAE de 15 días para cada ratón a partir del inicio de los signos. Las barras representan el promedio de la ABC por grupo. Las barras de error representan el error estándar de la media. Las comparaciones entre grupos se hicieron con una ANOVA: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . N=6

### 6.9. La administración IN de MP no conlleva daño severo a la cavidad nasal

Además de establecer la eficacia de la MP IN para reducir los grados y la neuroinflamación asociada a la EAE, una consideración esencial para que eventualmente esta ruta de administración se pueda usar en pacientes es que no presente efectos adversos. Frecuentemente los pacientes que usan corticoesteroides se quejan de reseca nasal y mucosas inflamadas (Lambert, 2013). Por ello, se recuperaron las cavidades nasales de ratones tratados con 200 mg/kg MP IN, 24 h tras el último tratamiento y fueron teñidas con hematoxilina y eosina para estudiar cambios histológicos. Se obtuvieron cortes del epitelio olfatorio y del epitelio respiratorio, que correspondería a las 2 regiones donde se absorbe el fármaco. Se presentan imágenes representativas en la Figura 19. En ninguna de estas dos se observó una degeneración del tejido o necrosis. En el epitelio olfatorio se observó un rasgo particular tras administrar MP IN con respecto a los ratones tratados únicamente con solución salina y 2% alcohol bencílico: la capa de moco sobre las células

olfatorias y de soporte sufrió un engrosamiento. Esto puede ser consecuencia de una regeneración del tejido o de hiperplasia. Dentro del epitelio respiratorio, este se ve también engrosado y de superficie más uniforme que en el grupo EAE+SS. Las glándulas parecen ligeramente dilatadas. Es preciso indagar más si el engrosamiento y la dilatación de glándulas observados en ambos epitelios es resultado de una regeneración o de un proceso inflamatorio. De la misma manera, sería importante verificar que se trata simplemente de un efecto pasajero.



**Figura 19.**

**La administración IN de MP no genera daño tisular en la cavidad nasal.**

Imágenes representativas de la cavidad nasal de ratones tratados con el vehículo (solución salina y alcohol bencílico 2 % o 200 mg/kg MP IN. N=5 ratones por grupo. Aunque no hay signos de daño al tejido ni necrosis, las imágenes muestran signos de engrosamiento del epitelio y dilatación de glándulas.

## 7. Discusión

Las recaídas en la EMRR son eventos clave en la acumulación de discapacidad; son episodios donde una respuesta inflamatoria genera desmielinización. La extensión de la respuesta inflamatoria y las áreas desmielinizadas determinan si posteriormente puede haber una remielinización total o parcial de las lesiones en el SNC. Desde hace más de 50 años, la principal estrategia para contener la inflamación en las recaídas es la administración de altas dosis de glucocorticoides, especialmente la MP, por vía IV. Este tratamiento puede reducir las secuelas, pero es invasivo, requiere de personal calificado y está asociado a un gran número de efectos adversos. Al existir receptores de glucocorticoides en prácticamente todos los órganos del cuerpo humano, una alta dosis de MP IV no sólo actúa sobre el tejido meta, sino sobre todos los tejidos. Entre mayor es la dosis de glucocorticoides, se corre un mayor riesgo de suprimir por completo la respuesta inmune, inhibiendo una reparación de las lesiones desmielinizantes y aumentando la susceptibilidad de los pacientes a infecciones (Sadaie et al., 2014). La ruta oral se ha propuesto como una opción más sencilla de administración, pero que también conlleva a una alta exposición sistémica. La vía IN, al ser una ruta directa hacia el SNC podría ser la indicada para tratar las recaídas sin que existan altas concentraciones de glucocorticoides en la periferia.

El diseño experimental utilizado en esta tesis buscó emular las circunstancias de diagnóstico y tratamiento de recaídas en pacientes con EMRR si eventualmente se sustituyera la administración IV de MP por la vía IN. Las recaídas no son previsibles ni se han encontrado beneficios para administrar glucocorticoides en el largo plazo (Ciccione et al., 2008), que pudieran justificar una administración IN previa a la aparición de los signos de la EAE como la empleada por Duchi (2013). Por ello, se decidió administrar la MP tras la aparición de los signos.

En tal sentido, para este proyecto se partió de la dosis recomendada en México para el tratamiento de recaídas (1 gramo). Además se sabe que las dosis menores a 500 mg de MP IV son ineficaces para tratar una recaída (Berkovich, 2016). La dosis de 1 gramo se convirtió a una dosis equivalente para ratón empleando una fórmula que toma en cuenta la superficie de absorción de cada especie. Esto contrasta con la aproximación que se suele emplear, ajustando únicamente la dosis humana de acuerdo con el peso del ratón. Así, los experimentos se realizaron con una dosis superior a la reportada en la mayoría de los estudios previos, pero aún muy por debajo de la dosis letal 50 de 1409 mg/kg (Pfizer, 2017). Una ventaja adicional de emplear la fórmula que toma en cuenta la superficie de

absorción es que la dosis de MP con mayor eficiencia derivada de este trabajo y futuros experimentos, se puede convertir fácilmente de vuelta a su equivalente para uso en humanos.

En este trabajo se demuestra por primera vez que la administración IN de MP al inicio de los signos es capaz de reducir la severidad asociada a la EAE. El tratamiento con MP IN redujo la infiltración de células inmunes hacia la médula espinal, los niveles de citocinas pro-inflamatorias y restringió a la periferia la desmielinización observada durante el pico de la EAE que es cuando hay una mayor respuesta neuroinflamatoria (Constantinescu et al., 2011). Asimismo, este tratamiento evitó el aumento en la expresión de marcadores de activación glial asociada a neuroinflamación. Dentro de casi todas pruebas realizadas la eficacia observada fue muy similar a la del grupo que recibió MP IV, el actual tratamiento de elección para las recaídas en la EMRR (Filippi et al., 2018). El efecto de la MP IN sobre la EAE se sostuvo al administrar dosis menores.

La administración de MP IN pudo suprimir la aparición del pico característico de la EAE en donde suele haber incrementos sostenidos en grados de EAE, correspondiendo a déficits motores y, días después, una recuperación parcial. Mientras que al día 21 post-inducción los ratones que únicamente recibieron solución salina alcanzaron el mismo promedio de grados de EAE que el grupo que recibió MP IV, el grupo con MP IN se mantuvo siempre con un grado menor. En la mayoría de los protocolos y recomendaciones para trabajar con el modelo de EAE se sugiere terminar el seguimiento a los 28 días post-inducción por 2 razones: 1) Posterior a ese día no se suelen encontrar variaciones significativas en los grados 2) Hasta en una cuarta parte de los ratones se puede presentar un segundo pico de inflamación, de menor intensidad y duración (Hooke Laboratories, 2019). Sin embargo, dada la evolución que tuvieron los ratones en el grupo EAE+MP IN, hubiera sido interesante prolongar el periodo de seguimiento para ver si el menor promedio de grados de la EAE se mantenía. Esto habría sido valioso especialmente considerando que una de las críticas que se le ha hecho al tratamiento con MP para recaídas es que en el largo plazo (1 mes- 1 año) no tiene ningún efecto (Martínez-Cáceres et al., 2002).

La evaluación de los grados se realizó empleando una escala de 10 puntos (Bittner et al., 2014). Se eligió esta escala por diferenciar mejor, con descripciones más completas, los signos correspondientes a cada grado. Esto se debería traducir a una mayor sensibilidad para discriminar entre animales que experimentaron un agravamiento o una mejoría (Palle et al., 2016). En el caso del agravamiento, las pérdidas motoras si correspondieron a un grado de la escala y se fueron incrementando. Sin embargo, esta escala no resultó ser tan útil para evaluar la recuperación, pues los cambios suelen ser más sutiles, y las funciones

motoras podían no corresponder a un grado particular. Por ello se tuvo que recurrir a pruebas adicionales durante la observación diaria, reflejos de la cola y fuerza de las extremidades, por ejemplo, para complementar la evaluación. A estas pruebas, por estar fuera del diseño experimental, no se les asignó un valor. Algunos autores complementan su escala de EAE con la evaluación de funciones motoras mediante pruebas como el *rotarod*, reflejo de enderezamiento, coordinación motora al caminar en una rejilla, entre otras, que permiten tener medidas más objetivas de la severidad del modelo (Burrows et al., 2019; de Bruin et al., 2016). Sin embargo, estas pruebas, que demandan más tiempo fuera de la caja para los animales, pueden constituir una fuente de estrés adicional para los animales y se ha encontrado que no ayudan a encontrar diferencias significativas entre dos o más tratamientos (Tietz et al., 2016).

El peso corporal de los ratones se incluyó como un parámetro alternativo para estudiar la severidad. Los cambios en el peso se consideraron desde el momento de la inducción, por lo que se podría interpretar que al momento del pico, sobrepasaron los porcentajes reportados en la literatura (15-20%) (Hasselmann et al., 2017; Hooke Laboratories, 2019). No obstante, en estudios publicados las pérdidas de peso corporal se consideran a partir de la aparición de los signos de la EAE, cuando los ratones ya habían perdido alrededor de un 8% de su peso original. Aunque esta pérdida de peso se atribuye frecuentemente a la pérdida de movilidad que conlleva a la incapacidad para comer y beber agua, otra explicación es que haya una pérdida de apetito, resultado de la liberación de citocinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Sarraf et al., 1997). Aunque fueron experimentos independientes, estas tres citocinas tuvieron niveles mayores en el grupo EAE+SS alrededor del pico del modelo. Se necesitarían experimentos adicionales para concluir esto, pero es factible que la mayor pérdida de peso, observada en el grupo EAE+SS, esté asociada a los niveles aumentados de estas citocinas.

El aumento en grados del pico de la EAE es causado esencialmente por la infiltración de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y macrófagos pro-inflamatorios (Constantinescu et al., 2011). Estos infiltrados, al reactivarse, liberan mediadores de inflamación y reclutan células con capacidad de dañar la mielina. Una primera aproximación para estudiar la infiltración y la desmielinización fue realizar un análisis histológico. Combinado con el uso de escalas, este análisis se adquirió un carácter semi-cuantitativo que proveyó un panorama de la severidad y extensión del daño, además de constituir una primera observación de que el tratamiento con MP fue capaz de contener el daño. La densidad de núcleos celulares por área, el número de vasos rodeados y la diseminación del efecto desmielinizante, fueron menores cuando los ratones recibieron MP IV o IN.

En retrospectiva, adicionalmente a los datos sobre la extensión del infiltrado y la desmielinización, los cortes obtenidos se habrían podido aprovechar para estudiar otros fenómenos implicados en la respuesta inflamatoria dentro de la EAE y cómo se suele modificar con el uso de glucocorticoides. Por ejemplo, algunos autores proponen que la administración de altas dosis de glucocorticoides puede ocasionar apoptosis de oligodendrocitos y neuronas (Herold & Reichardt, 2013; Krieger et al., 2014).

La histología ofreció un primer acercamiento sobre cómo los tratamientos con MP modificaron la extensión y distribución de los infiltrados celulares en la médula espinal, pero esta técnica no permite conocer la composición de los infiltrados. Por ello se planteó realizar ensayos de inmunofluorescencia, empleando el marcador CD3<sup>+</sup>. A pesar de que este marcador está presente en diferentes subtipos de linfocitos T, todos resultan de interés: los CD4<sup>+</sup> por los mediadores que liberan, amplificando la respuesta inmune; los CD8<sup>+</sup> por la destrucción directa que producen en la mielina, y los linfocitos T reguladores, que por un lado se reporta que funcionan como uno de los blancos de los glucocorticoides, y por otro lado se ha observado que su número aumenta tras exponerse a esta familia de fármacos (D. Kim et al., 2020; Zen et al., 2011). Anteriormente se había reportado que la administración de glucocorticoides disminuía la presencia de células CD3<sup>+</sup> en la médula (Wust et al., 2012). En este trabajo se encontró el mismo efecto.

Igualmente, una evaluación más integral de la respuesta inmune en el SNC requería también conocer qué estaba ocurriendo con la microglia/macrófagos y los astrocitos. Para la glía, se eligieron marcadores que se conoce aumentan su expresión dentro de la neuroinflamación, pero también para los que se ha reportado que los glucocorticoides revierten el aumento a sus niveles constitutivos (Brambilla, 2019; Liu et al., 2008). La activación de la microglia alrededor del día 14 p.i. en la EAE se relaciona con un aumento en la expresión de Iba1, que va acompañada del engrosamiento de sus procesos y aumento de tamaño (D. A. Brown & Sawchenko, 2007). También se sabía antes de realizar este proyecto que la administración de glucocorticoides, como dexametasona, podía reducir la expresión de Iba1 en el modelo de EAE (Tsutsui et al., 2008). Aunque esto se corroboró en los resultados, no se consideró que los monocitos también expresan Iba1, y contribuyen significativamente a la neuroinflamación en la EAE (Yamasaki, 2014).

El aumento en la expresión de GFAP, una proteína de filamentos intermedios, caracteriza a los astrocitos reactivos dentro de la neuroinflamación. El tratamiento con MP ha demostrado revertir este efecto en cultivo, pero no en la EAE (Liu et al., 2008). Los resultados obtenidos previamente en otros modelos de neuroinflamación en este grupo de investigación revelaron la disminución de GFAP tras la administración IN de glucocorticoides, por lo que se decidió explorar si este efecto se mantenía en diferentes

patologías neuroinflamatorias (Meneses et al., 2017). Los resultados de este proyecto respaldan los hallazgos previamente reportados al respecto. El tratamiento con MP, independientemente de la vía de administración, redujo los niveles de expresión, reportados como IMF, de GFAP. Sin embargo, hay que tomar con cautela la interpretación de los niveles de GFAP, ya que suele ubicarse únicamente en las ramificaciones principales y no se expresa homogéneamente en la materia gris y blanca (Sun & Jakobs, 2012).

Las tinciones con estos marcadores inmunofluorescentes de la glía permitieron realizar una descripción morfológica tanto de microglia/macrófagos y astrocitos. Puesto que este análisis se incorporó en la fase final del proyecto, no se capturaron imágenes específicamente para este propósito, con una resolución considerablemente mayor a la empleada para el análisis de marcadores. Sin embargo, dentro de las imágenes pertenecientes a la microglia/macrófagos se apreciaron cambios consistentes con una diferenciación hacia el fenotipo M2c en los grupos que recibieron MP, tal y como se había reportado anteriormente (J. J. J. Wang et al., 2019). El fenotipo M2c está asociado a reparación tisular y suele tener cuerpos celulares pequeños y una estructura ramificada, que coincide con la morfología observada en los grupos que recibieron MP. En el extremo opuesto de la morfología microglial, está el fenotipo M1, con acción pro-inflamatoria, que suele tener forma ameboide. La microglia del grupo EAE+SS no mostró una morfología que se apegara estrictamente a este fenotipo, pues todavía contaba con algunos de sus procesos; pero por descripciones previas muy probablemente estaba en transición hacia la forma ameboide (D. A. Brown & Sawchenko, 2007). Este fenotipo parece darle más movilidad a las células (Caravagna et al., 2018). En los grupos que recibieron MP se identificó también microglia bipolar. Este tipo de microglia, altamente fagocítica, suele aparecer durante la fase inicial de activación de la microglia (que coincidiría con el aumento de Iba1) y puede ser clave en la organización espacial necesaria para que la microglia desempeñe tareas de reparación y neuroprotección, especialmente alrededor de las lesiones o focos de inflamación (Au & Ma, 2017).

Tanto para las inmunohistoquímicas como para las inmunofluorescencias, aún y cuando se hizo un esfuerzo por sistematizar este análisis, obteniendo un número determinado de cortes de las mismas regiones de la médula espinal, seleccionando las mismas regiones de interés entre sujetos experimentales e incluyendo el mismo número de cortes, lo cierto es que se sigue tratando de pruebas que ofrecen resultados principalmente descriptivos, donde la heterogeneidad del modelo de EAE incluso puede jugar en contra. Aunque se realizó un análisis de poder previamente, esta heterogeneidad pudo haber sido mayor a la contemplada tan sólo por el hecho de que el sitio de las lesiones suele variar entre los animales y que no todos los ratones experimentan la misma severidad. Incluir análisis

donde se hubiera estudiado por completo la médula espinal con métodos, preferentemente cuantitativos le hubiera dado más rigor a este proyecto.

Una forma alternativa de evaluar la desmielinización es a través de resonancia magnética nuclear. Esta técnica de imagenología permite evaluar objetivamente in vivo la ubicación y el tamaño de las lesiones. Esta técnica se intentó incorporar al proyecto en colaboración con la Universidad Autónoma de México-Iztapalapa. La idea se tuvo que abandonar al hallar que el manejo y transporte de animales hacia el equipo representaba una fuente importante de estrés, incluso resultando en la muerte de animales. Ante la imposibilidad de trasladar todo el experimento a esta institución, se decidió únicamente seguir con los análisis histológicos.

Más allá de la morfología, una forma de corroborar hacia qué perfiles o estados alternos de activación se estaría diferenciando la microglia/macrófagos, así como la proporción de subtipos de linfocitos presentes en el infiltrado, e indagar si la vía de administración tiene algún impacto sobre esto sería realizando citometría de flujo. Para la microglia/macrófagos existen marcadores característicos de los fenotipos mencionados arriba, en M1 MHCII y CD68; en M2c SR-A, B, y CD163 como ejemplos (Franco & Fernández-Suárez, 2015). Mediante el empleo de esta técnica también se habrían podido distinguir los macrófagos derivados de monocitos, implicados en la destrucción de la mielina, de aquellos derivados de la microglia, que se han asociado con procesos de limpieza en la fase de reparación (Bhise & Dhib-Jalbut, 2016). De hecho, la intención inicial en el proyecto era analizar la composición de los infiltrados y la expansión y diferenciación de la microglia/macrófagos con esta metodología. Se probaron diferentes métodos para aislar leucocitos de la médula espinal, pero el número de células recuperado siempre fue insuficiente para los análisis. Una alternativa era juntar médulas de varios ratones, pero eso hubiera implicado incluir más ratones en los experimentos. Los desarrollos de los últimos años en las tecnologías para el estudio de células individuales por medio de espectroscopía o secuenciación de ARN también podrían ser una opción para identificar los perfiles hacia los que la MP promueve la diferenciación (Masuda et al., 2020).

Otra limitación de estas pruebas es que, de las células inmunes implicadas en los infiltrados, únicamente se evaluaron linfocitos, pero quizá la MP también fue capaz de actuar sobre monocitos y neutrófilos, ambos importantes en la EAE. Los monocitos, con sus funciones fagocíticas y su capacidad de liberar citocinas pro-inflamatorias, son críticos en el inicio de la desmielinización. Los neutrófilos, por su parte, son los más abundantes en los infiltrados y se cree que facilitan la invasión del parénquima (Caravagna et al., 2018). Dentro del grupo de investigación donde se realizó este trabajo, se había encontrado previamente que el tratamiento intranasal con glucocorticoides puede reducir también la presencia de neutrófilos en el SNC (Meneses et al., 2017). En la literatura también se ha

reportado que los glucocorticoides pueden actuar sobre los monocitos, inhibiendo la liberación de mediadores pro-inflamatorios (Fischer et al., 2019; Liberman et al., 2018)

Además de los efectos sobre la respuesta celular y la activación de la glía, otra pregunta que se intentó responder es si el tratamiento con MP IN al igual que la vía IV, podía reducir el nivel de citocinas pro-inflamatorias y si existían diferencias en los efectos del tratamiento con MP entre el SNC y la periferia (bazo). Los tratamientos con MP, por ambas vías, fueron capaces de reducir la secreción de citocinas pro-inflamatorias en la médula espinal. Los efectos no fueron tan claros en el bazo. En estudios previos, por ejemplo el de Wüst et al., (2008) se postula que la MP ejerce sus efectos a nivel periférico, principalmente previniendo la migración y la infiltración de linfocitos Th1 y Th17 activados hacia el SNC. Sin embargo, tras comparar los niveles de citocinas en la médula espinal y en el bazo parece ser que el mayor efecto anti-inflamatorio es más bien en el primero de estos tejidos. Más allá de que haya una reducción en la migración de linfocitos, hay otras explicaciones para el efecto observado. Por ejemplo, la MP podría actuar inhibiendo también la proliferación de linfocitos en los ganglios linfáticos, disminuyendo a su vez la liberación de citocinas pro-inflamatorias. Especialmente interesante hubiera sido medir citocinas en los ganglios cervicales profundos, pues un sitio importante de drenaje desde el SNC y de proliferación de linfocitos. Esta medición adicional podría esclarecer el sitio primario de acción de la MP. Según el modelo intrínseco una explicación adicional podría ser que la inflamación que ocurre en el SNC no sea detectada adecuadamente en la periferia y por ello, los niveles de citocinas no se modifiquen con el tratamiento en este compartimento. Una tercera posibilidad es que estos hallazgos sean específicos del tiempo en que se llevó a cabo la medición de las citocinas (día 14 p.i.). En la sangre suele haber un incremento de células del sistema inmune entre el día 6 y 10, acompañado de liberación de citocinas pro-inflamatorias (Barthelmes et al., 2016; Caravagna et al., 2018), antes de que se infiltren al SNC y se manifiesten los primeros signos de la EAE. Destaca que en la periferia el tratamiento con MP haya reducido los niveles de IL-4, cuando se anticipaba que aumentarían. Esto puede ser también consecuencia del tiempo en el que se hizo la medición, antes de una eventual remisión. Sin embargo, existen reportes que indican que en realidad los glucocorticoides pueden inhibir la actividad de GATA3, impidiendo la liberación de IL-4 (Liberman et al., 2018).

El panel empleado se solicitó pensando en evaluar citocinas implicadas en diferentes enfermedades neuroinflamatorias, y no específicamente para la EAE ni la respuesta a glucocorticoides. Por ello, estos resultados pueden ofrecer una idea general de los efectos de los glucocorticoides, pero esos cambios de niveles no están necesariamente relacionados con una respuesta anti-inflamatoria ni con la eficacia del tratamiento. A la par de este proyecto se identificaron algunos marcadores de recaídas y respuesta a

tratamiento con glucocorticoides: IL-12, IL-23, osteopontina, metaloproteasa o metaloproteinasa de matriz 9, quimiocina CXCL-13, factor neurotrófico derivado del cerebro y factor activador de linfocitos B, además de IL-17 y TNF- $\alpha$  que sí se incluyeron. Haber usado estos marcadores podría haber arrojado más información, y más allá de un resultado descriptivo, se hubiera podido correlacionar con la evolución de la EAE.

Las concentraciones de MP registradas mediante HPLC, así como la señal detectada de MP en los ensayos de inmunofluorescencia apuntan a que la MP IN no sólo está llegando al SNC, sino que alcanza mayores concentraciones que cuando se administra por vía IN. Aunque esto es un resultado alentador, falta por establecer si el ingreso de la MP por circulación no sigue siendo la principal vía por la cual ejerce sus efectos y si esto representa aún una considerable exposición sistémica. La cavidad nasal está altamente irrigada y sin una formulación que nos garantice que el fármaco se esté depositando en la parte superior de la cavidad nasal, es probable que la MP también haya llegado a la circulación sistémica (Fortuna et al., 2014). Esto se habría podido evaluar a través de la recuperación de tejidos periféricos (corazón, riñones, pulmones) a diferentes tiempos tras la administración IN e IV y medir la concentración de MP en ellos ya sea por HPLC, con una marca de tritio, o con una ELISA empleando el anticuerpo MP. Dentro de la literatura, se han reportado niveles elevados de moléculas administradas por la vía IN en los pulmones, pero no en el resto de los órganos (Hanson et al., 2009; Pérez Osorio, 2019).

Derivado también de los resultados de HPLC, pero también de la administración de las diferentes dosis por la nariz en la EAE, llama la atención el hecho de que no se haya encontrado una relación lineal dosis-respuesta de la MP IN, especialmente con las dosis menores, en la prueba de HPLC. Existen trabajos anteriores demostrando una clara relación dosis-respuesta cuando se administra MP en el modelo de EAE, pero todos emplean la vía oral o intraperitoneal (Chan et al., 2008; Wüst et al., 2008). Una primera explicación, podría ser debido a un error en la administración de las dosis. Al ser dosis tan pequeñas, pudo no haberse tomado la cantidad correcta con la micropipeta o no haberse depositado por completo dentro de la cavidad nasal. Sin embargo, si esto hubiera sido el problema, es más factible que las dosis pequeñas hubieran presentado una menor eficacia y no la dosis intermedia de 50 mg/kg. En un piloto previo, esta dosis intermedia también fue la menos eficaz para reducir la severidad de la EAE. Más bien, parece ser que la vía IN no suele seguir este tipo de relación lineal. En la literatura se ha documentado esta situación anteriormente cuando se emplea la vía IN para administrar oxitocina y eritropoyetina (Daniel S. Quintana et al., 2020; Teste et al., 2012). No se sabe exactamente a qué se debe la falta de una relación lineal dosis-respuesta, pero se cree que tiene que ver con la forma en cómo los fármacos se van uniendo en los receptores. Bajo este escenario, la MP por vía IV necesita alcanzar una concentración determinada en la

periferia para poder atravesar la BHE y se estaría uniendo a receptores en zonas aledañas a los vasos sanguíneos y en zonas del SNC donde son más abundantes. Mientras tanto, en la administración IN, la MP se estaría uniendo a receptores en múltiples áreas del SNC rápidamente, saturando quizá los receptores de glucocorticoides e incluso quizá uniéndose a los receptores mineralocorticoides en las dosis más elevadas. Esta última parte no sería tan deseable. Esta diferente forma de unión y saturación de receptores podría también activar de manera diferencial los mecanismos genómicos y no genómicos de los glucocorticoides. Se sabe que, a altas concentraciones de glucocorticoides, se favorecen los efectos rápidos (no genómicos) (Scheschowitsch et al., 2017).

La evaluación preliminar de efectos adversos en la cavidad nasal que se realizó en este proyecto arrojó que la administración intranasal de MP produjo más moco y el crecimiento de glándulas. No se observó una reducción en el tamaño de las células ni destrucción de los epitelios que se asocia con la presencia de atrofia (Miller & Cesta, 2015). Tampoco se hallaron células de la respuesta inmune que indicarían un proceso inflamatorio. Por ello, los resultados sugieren que tras la administración IN de MP se genera un proceso de remodelación de la cavidad nasal. En la mucosa existen receptores de glucocorticoides que al unirse con sus ligandos, promueven la diferenciación de células basales (X. Wang et al., 2017). Esta regeneración, esta relacionada principalmente con las funciones de los cilios (Samoliński et al., 2014). Los cilios nasales participan en el aclaramiento mucociliar y el transporte mecánico. Con la MP IN, se observó una reorientación de los cilios que podría estar relacionado con un incremento en el transporte dentro de la nariz (Gizurason, 2015). Sin embargo, sería relevante conocer si la producción aumentada de moco no inhibe la absorción de la MP. De la misma forma, la administración de glucocorticoides en la cavidad nasal podría mejorar la transducción de señales en el nervio olfatorio (Y. Wei et al., 2009).

Para complementar esta evaluación de efectos adversos, hay más pruebas que se pudieron haber incluido dentro de este proyecto. Una primera aproximación es observar si los ratones experimentan descargas nasales posteriores a la administración. Si existen, se pueden ver secas en las narinas o como costras en las patas delanteras, tras acicalarse (Burkholder et al., 2012). Aunque en algunos ratones sí se observaron estas descargas, no se registró el día en el que se observó ni cuántos días perduró. La capacidad olfatoria se puede analizar con una prueba de comportamiento, como la habilidad para desenterrar comida o mediante una prueba de habituación (Yang & Crawley, 2009). La primera quizá no sea tan recomendable puesto que, en el pico de la EAE, algunos ratones pierden la movilidad de sus extremidades y no le sería tan fácil desenterrar la comida.

A pesar de la eficacia demostrada en la EAE, es importante recalcar que la administración IN, de eventualmente poder usarse en pacientes con EMRR, pudiera no ser igual de efectiva, ni debería ser indicada en todos ellos. Los ratones son muy útiles como modelo, pero su cavidad nasal es muy diferente a la de los seres humanos. Varía la arquitectura del conducto nasal, el sentido de flujo del aclaramiento mucociliar y la forma en que respiramos (Lochhead & Thorne, 2012). Encima, la cavidad nasal de los ratones tiene una superficie de absorción relativa hasta 15 veces mayor y su epitelio olfatorio es 6 veces más grande cuando se ajusta al peso corporal de la especie (Ullah et al., 2019). Esto significa que lo que se observa en ratones podría ser una sobrestimación de lo que sucedería en pacientes.

Una desventaja frecuentemente mencionada en revisiones sobre la vía IN es la existencia de variaciones en cuanto a la dosis efectivamente administrada entre individuos. Dentro del contexto de este trabajo los factores que primordialmente pudieron haber afectado el volumen que se administró fueron: la presión con la que se liberan las dosis, si la dosis se fue administrando poco a poco o se liberó toda al mismo tiempo, y cuánto tiempo se mantuvo a los ratones en posición supina. Dentro de los primeros experimentos se identificó que liberar los 10  $\mu$ l rápidamente y con mucha presión podía asfixiar a los ratones, tal y como se indica en la literatura (Shimizu, 2004). Además, cuando se hacía esto, una parte de la dosis era expulsada de la cavidad nasal. Por ello la técnica se modificó para ir administrando la dosis poco a poco, dando espacios para que el ratón absorbiera la dosis. La pérdida de volumen se minimizó, pero aún así el hecho de que los ratones estornudaran ocasionalmente y el tamaño de sus narinas contribuyó a estas variaciones. En pacientes, esto no sería muy diferente. El actual dispositivo que se tiene identificado para administración IN también requiere manipulación manual. La presión y rapidez con que se administre la MP con este dispositivo pueden determinar el sitio de deposición y la absorción.

A lo largo de este trabajo se ha mencionado que el transporte desde la cavidad nasal hacia el SNC se realiza a través de los nervios olfatorio y trigémino. Pero ¿qué pasaría si alguno de estos nervios presenta una disfunción o daño como parte de los efectos de la EMRR? Este es un tema poco explorado aún y cuando hasta un 60% de pacientes con EMRR pueden presentar neuralgia del nervio trigémino y un 30% una pérdida del olfato (Atalar et al., 2018; Fallata et al., 2017). Estos daños obstaculizarían el transporte intracelular del fármaco. La observación de reducciones en los grados de la EAE al día posterior a la primera administración IN y el hallazgo de una señal diseminada de la MP en la médula espinal tras 24 horas de la administración, aunado a que incluso a los 15 minutos se puede detectar la señal de glucocorticoides en el SNC (Pérez Osorio, 2019), llevan a pensar que es poco probable que el transporte se esté realizando de manera

intracelular. El transporte intracelular, dentro de los axones, implicaría por lo menos 24 horas y su diseminación por el SNC sería mucho más limitada, quizás incluso no llegando a la médula espinal (Erdő et al., 2018; Lochhead & Davis, 2019). Incluso si este fuera el caso, esta vía de administración se ha propuesto como una forma de reducir los daños asociados a la pérdida del olfato y neuralgia del trigémino (Candido, 2017; X. Wang et al., 2017) Si hubiera una desmielinización de estos nervios, detectada o no, la administración IN de MP podría contrarrestarla. Una forma de corroborar esto en pacientes podría ser estudiando los potenciales evocados del nervio trigémino y olfatorio antes y después de la administración.

Asimismo, tomando en cuenta afecciones como la rinitis alérgica y pólipos nasales con prevalencias en México de 15 y 4% respectivamente, se puede obtener un estimado rápido, calculando el promedio, que alrededor de un 9.5% de los pacientes contarán con algún tipo de obstrucción nasal que represente una contraindicación para el uso de la vía IN (Ívancevich et al., 2019; Mancilla-Hernández et al., 2015).

La administración IN de MP tampoco podría ser una estrategia para considerar en pacientes con EMRR en donde previamente se haya identificado resistencia a esteroides. Esta resistencia está principalmente dada por mutaciones o desregulación en la expresión de los receptores de glucocorticoides, aunque en contextos clínicos se considera también como la falta de respuesta al tratamiento. Se estima que hasta un 30% de los pacientes pudieran entrar en esta categoría al experimentar una recaída (Berkovich, 2016).

Algunas variables se mantuvieron constantes a lo largo de todo este trabajo: el sexo de los ratones, el régimen de administración de la MP, y el glucocorticoide administrado. No obstante, haber modificado también estas variables hubieran podido proporcionar datos adicionales sobre la eficacia de la MP IN para controlar la neuroinflamación asociada a la EAE. En todos los experimentos usamos únicamente hembras. Aunque no hay diferencias en susceptibilidad ni en la evolución de la EAE en ratones C57BL6/J, en la literatura existen algunos reportes de una respuesta a glucocorticoides diferenciada en roedores según el sexo. En las hembras, por ejemplo, el estrés provocado por aislamiento y derrota social puede aumentar la tasa de translocación de los receptores GR (Bourke et al., 2013), pero el efecto de los glucocorticoides parece ser más efectivo en machos (Duma et al., 2010). Estas diferencias pueden estar dadas por patrones de expresión genética asociados al sexo. En pacientes de EM, no hay estudios que hayan evaluado el rol del sexo en la respuesta al tratamiento de recaídas. No obstante, sería importante hacer experimentos con ratones macho para explorar y comparar los efectos de la MP IN, así como para contemplar estas posibles diferencias en la respuesta en un ensayo clínico en pacientes.

Durante todo el proyecto, se conservó el esquema actual de administración de MP IV, contemplando una dosis diaria en 3 días consecutivos. Este esquema es más eficaz para tratar las recaídas de EMRR que una única dosis (Sellebjerg et al., 2010). Considerando, sin embargo, que los resultados apuntan a que una mayor concentración llega al SNC, se podría considerar para futuros experimentos administrar una dosis única y evaluar la evolución de la EAE. También, apostando a una mejor absorción de la dosis, se podría dividir en 2 o 3 administraciones de menor volumen a lo largo del día. Del mismo modo, las administraciones se realizaron normalmente alrededor del medio día, mientras que existe evidencia en pacientes con EMRR que variar la hora de administración para coincidir con la hora en la que la producción de corticoesteroides endógenos es menor, puede aumentar la eficacia. Por ejemplo, los pacientes que recibieron la MP IV entre las 10 p.m. y 2 a.m., tuvieron una mejor recuperación de la recaída y experimentaron menos efectos adversos que los que la recibieron en la mañana (Glass-Marmor et al., 2007).

La tercera variable que permaneció constante a lo largo de los experimentos fue el uso de la MP. La idea detrás de usar MP era que, al estar aprobado su uso en pacientes para las recaídas, si la vía IN era eficaz, como fue el caso, sería más fácil de probar esto en pacientes posteriormente. Podría ser interesante explorar si otros glucocorticoides funcionan de la misma forma cuando se administran por vía IN en la EAE. Uno de especial interés es la dexametasona, pues además de que se ha estudiado en otros proyectos de neuroinflamación del laboratorio, también por la vía IN, tiene una mayor potencia y es más soluble, lo que permitiría usar volúmenes pequeños (Espinosa et al., 2020; Meneses et al., 2017). Aunque no es exclusivo de la dexametasona, se ha visto que este glucocorticoide tiene un mayor impacto sobre los linfocitos T en la periferia, induciendo su apoptosis e inhibiendo su migración hacia el SNC (Wüst et al., 2008). Otros glucocorticoides que podrían probarse son la betametasona, también por tener una mejor potencia que la MP, y la triamcinolona, de igual potencia, pero que ya se ha usado por vía nasal.

El foco del trabajo fue estudiar la eficacia de la MP IN, pero queda pendiente, y no es menos importante, el elucidar si la MP que se administra en la cavidad nasal, realmente está llegando al SNC a través del nervio trigémino u olfatorio, y si el transporte es preferentemente por uno de ellos. Esto se puede conocer midiendo las concentraciones en el SNC, sangre y órganos por HPLC a diferentes tiempos. Este método podría ayudar a determinar la farmacocinética de la MP IN. Otras formas de estudiar el transporte son mediante el uso de moléculas marcadas con radioactividad para seguir su camino acoplado a técnicas tradicionales de imagenología (RM, PET, tomografía). La imagenología con bioluminiscencia o fluorescencia son técnicas menos invasivas, caras y laboriosas que permiten también seguir *in vivo* y en tiempo real una molécula y saber qué

concentración de MP está llegando a los sitios de interés. A partir de estos experimentos, incluso se podría determinar una dosis mínima efectiva.

Este proyecto nació con el objetivo inicial de poder probar la MP IN en pacientes con recaídas de EMRR. De hecho, en junio de 2017, el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía autorizó un estudio piloto para evaluar su eficacia en pacientes (anexos V y VI). El financiamiento se obtuvo recientemente, en la convocatoria Ciencia de Frontera 2019 de CONACyT. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la MP IN podría ser una alternativa para el tratamiento de recaídas. Pero, antes de su uso en pacientes, es preciso tomar en cuenta los siguientes puntos. En primera, es necesario reducir sustancialmente el volumen de la dosis a administrar. Bajo las condiciones usadas en este proyecto, se diluyen 500 mg de MP en 2.3 ml de solución salina. Esto significaría que, para administrar un gramo, se necesitarían 4.6 ml cuando el volumen máximo recomendado por día para la ruta intranasal en humanos es de 1 ml. A reserva de eventualmente contar con el dato de la dosis mínima efectiva, convendría explorar en pacientes la dosis menor empleada en este trabajo, 25 mg/kg (equivalente a 2.03 mg/kg en humanos), pues con ella se requerirían casi 10 veces menos MP en un volumen de un mililitro.

Otra gran consideración tiene que ver con la presentación de la MP. En el mercado existen múltiples glucocorticoides para administración nasal, sin embargo, estos productos prescritos para el tratamiento de rinitis, sinusitis, alergias, asma o pólipos nasales buscan administrar dosis en el orden de microgramos que permanezcan dentro de la cavidad nasal o en los senos paranasales. A falta de una formulación adecuada, probablemente los primeros ensayos se tendrían que realizar con la solución originalmente diseñada para administración IV y confiar en que el dispositivo elegido para su administración deposite el fármaco en las mucosas, donde están las terminales del nervio trigémino, pero también en la parte posterior de la cavidad nasal, donde se concentran las terminaciones del nervio olfatorio (Djupestrand, 2013). Más adelante sería deseable una formulación que permita mantener la estabilidad y aumentar la solubilidad de las sales de metilprednisolona.

Los hallazgos de este trabajo apuntan a que la MP IN pudiera ser una opción factible en el corto plazo para el tratamiento de las recaídas de EMRR. Dado que es un fármaco ya incluido en las guías clínicas para el tratamiento de la EMRR en múltiples países y se encuentra bien caracterizado, su proceso de desarrollo sería menor que el de un fármaco completamente nuevo. Al contrario de la vía IV, la MP IN representaría, además de ahorros al sistema de salud y al paciente, una forma fácil de administración que alcance el SNC en un menor tiempo y con la promesa de padecer menos efectos adversos.

## 8. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se sustenta la eficacia de la MP IN para reducir la severidad asociada al modelo de EAE ya que:

1. Este tratamiento impidió la evolución hacia signos más graves y resultó en una menor severidad acumulada.
2. La MP IN confinó el daño como consecuencia del modelo de EAE a la periferia de la médula, inhibiendo la infiltración de células inmunes.
3. La expresión de marcadores de activación de la glía disminuyó y la morfología de astrocitos y microglia correspondió con procesos anti-inflamatorios tras la administración de MP IN.
4. La administración de MP IN redujo los niveles de citocinas pro-inflamatorias en la médula espinal.

Para los puntos anteriores, no se encontraron diferencias importantes en cuanto a efectos observados entre los grupos que recibieron MP por la vía IV o IN. Sin embargo, al comparar ambas vías directamente y diferentes dosis se encontró que:

- La MP IN alcanza mayores concentraciones en el SNC que la MP IV, 24 horas tras su administración.
- Dosis menores de MP (25 y 100 mg/kg) administradas por la vía IN tuvieron una eficacia similar a la de la dosis original de 200 mg/kg para suprimir el pico de inflamación de la EAE.

## 9. Referencias

- 't Hart, B. A., Gran, B., & Weissert, R. (2011). EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends in Molecular Medicine*, *17*(3), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.11.006>
- Abu-Mugheisib, M., Benecke, R., & K. Zettl, U. (2012). Management of Spasticity in Progressive Multiple Sclerosis: Efficacy of Repeated Intrathecal Triamcinolone Acetonide Administration. *Current Pharmaceutical Design*, *18*(29), 4564–4569. <https://doi.org/10.2174/138161212802502251>
- Adamec, I., Pavlović, I., Pavičić, T., Ruška, B., & Habek, M. (2018). Toxic liver injury after high-dose methylprednisolone in people with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, *25*, 43–45. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2018.07.021>
- Adams, R. A., Bauer, J., Flick, M. J., Sikorski, S. L., Nuriel, T., Lassmann, H., Degen, J. L., & Akassoglou, K. (2007). The fibrin-derived gamma377-395 peptide inhibits microglia activation and suppresses relapsing paralysis in central nervous system autoimmune disease. *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(3), 571–582. <https://doi.org/10.1084/jem.20061931>
- Agrawal, S. M., Williamson, J., Sharma, R., Kebir, H., Patel, K., Prat, A., & Yong, V. W. (2013). Extracellular matrix metalloproteinase inducer shows active perivascular cuffs in multiple sclerosis. *Brain*, *136*(6), 1760–1777. <https://doi.org/10.1093/brain/awt093>
- Ahmed, S. I., Aziz, K., Gul, A., Samar, S. S., & Bareeqa, S. B. (2019). Risk of Multiple Sclerosis in Epstein-Barr Virus Infection. *Cureus*, *11*(9), e5699. <https://doi.org/10.7759/cureus.5699>
- Al-Badri, G., & Castorina, A. (2018). Insights into the role of neuroinflammation in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology*, *3*(1). <https://doi.org/10.3390/jfmk3010013>
- Alfredsson, L., & Olsson, T. (2019). Lifestyle and Environmental Factors in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *9*(4), a028944. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028944>
- Antal, E. J., Wright, C. E., Gillespie, W. R., & Albert, K. S. (1983). Influence of route of administration on the pharmacokinetics of methylprednisolone. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, *11*(6), 561–576. <https://doi.org/10.1007/BF01059057>
- Arndt, A., Hoffacker, P., Zellmer, K., Goecer, O., Recks, M. S., & Kuerten, S. (2014). Conventional Housing Conditions Attenuate the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS ONE*, *9*(6), e99794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099794>
- Atalar, A. Ç., Erdal, Y., Tekin, B., Yıldız, M., Akdoğan, Ö., & Emre, U. (2018). Olfactory dysfunction in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, *21*, 92–96. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2018.02.032>
- Au, N. P. B., & Ma, C. H. E. (2017). Recent Advances in the Study of Bipolar/Rod-Shaped Microglia and their Roles in Neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *9*, 128. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00128>
- Bach, J.-F. (2018). The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals. *Nature Reviews Immunology*, *18*(2), 105–120. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.111>
- Bai, X. F., Shi, F. D., Xiao, B. G., Li, H. L., van der Meide, P. H., & Link, H. (1997). Nasal administration of myelin basic protein prevents relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats by activating regulatory cells expressing IL-4 and TGF-beta mRNA. *Journal of Neuroimmunology*, *80*(1–2), 65–75. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(97\)00133-1](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(97)00133-1)
- Baker, D., & Amor, S. (2014). Experimental autoimmune encephalomyelitis is a good model of multiple sclerosis if used wisely. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, *3*(5), 555–564. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2014.05.002>
- Baker, H., & Spencer, R. F. (1986). Transneuronal transport of peroxidase-conjugated wheat germ agglutinin (WGA-HRP) from the olfactory epithelium to the brain of the adult rat. *Experimental Brain Research*, *63*(3), 461–473. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3758265>
- Baranzini, S. E., & Oksenberg, J. R. (2017). The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years. *Trends in Genetics : TIG*, *33*(12), 960–970. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.09.004>
- Barthelmes, J., Tafferer, N., Kurz, J., de Bruin, N., Parnham, M. J., Geisslinger, G., & Schiffmann, S. (2016). Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice and Evaluation of the

- Disease-dependent Distribution of Immune Cells in Various Tissues. *Journal of Visualized Experiments*, 111. <https://doi.org/10.3791/53933>
- Beigi Boroujeni, F., Pasbakhsh, P., Mortezaee, K., Pirhajati, V., Alizadeh, R., Aryanpour, R., Madadi, S., & Ragerdi Kashani, I. (2020). Intranasal delivery of SDF-1 $\alpha$ -preconditioned bone marrow mesenchymal cells improves remyelination in the cuprizone-induced mouse model of multiple sclerosis. *Cell Biology International*, 44(2), 499–511. <https://doi.org/10.1002/cbin.11250>
- Berkovich, R. R. (2016). Acute Multiple Sclerosis Relapse. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*, 22(3), 799–814. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000330>
- Bernat, J. L. (1981). Intraspinal steroid therapy. *Neurology*, 31(2), 168–168. <https://doi.org/10.1212/WNL.31.2.168>
- Bevan, C., & Gelfand, J. M. (2015). Therapeutic Management of Severe Relapses in Multiple Sclerosis. *Current Treatment Options in Neurology*, 17(4), 17. <https://doi.org/10.1007/s11940-015-0345-6>
- Bhal, S. K. (2007). *LogP—Making Sense of the Value*. ACD Labs- Application Note. [https://www.acdlabs.com/download/app/physchem/making\\_sense.pdf](https://www.acdlabs.com/download/app/physchem/making_sense.pdf)
- Bhise, V., & Dhib-Jalbut, S. (2016). Further understanding of the immunopathology of multiple sclerosis: impact on future treatments. *Expert Review of Clinical Immunology*, 12(10), 1069–1089. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2016.1191351>
- Billiau, A., & Matthys, P. (2001). Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(6), 849–860. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739546>
- Bitter, C., Suter-Zimmermann, K., & Surber, C. (2011). Nasal drug delivery in humans. *Current Problems in Dermatology*, 40, 20–35. <https://doi.org/10.1159/000321044>
- Bittner, S., Afzali, A. M., Wiendl, H., & Meuth, S. G. (2014). Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 86, e51275. <https://doi.org/10.3791/51275>
- Blackmore, S., Hernandez, J., Juda, M., Ryder, E., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Steelman, A. J. (2017). Influenza infection triggers disease in a genetic model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(30), E6107–E6116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620415114>
- Boche, D., Perry, V. H., & Nicoll, J. A. R. (2013). Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39(1), 3–18. <https://doi.org/10.1111/nan.12011>
- Bogie, J. F. J., Jorissen, W., Mailleux, J., Nijland, P. G., Zelcer, N., Vanmierlo, T., Van Horsen, J., Stinissen, P., Hellings, N., & Hendriks, J. J. A. (2013). Myelin alters the inflammatory phenotype of macrophages by activating PPARs. *Acta Neuropathologica Communications*, 1, 43. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-1-43>
- Bourke, C. H., Raees, M. Q., Malviya, S., Bradburn, C. A., Binder, E. B., & Neigh, G. N. (2013). Glucocorticoid sensitizers Bag1 and Ppid are regulated by adolescent stress in a sex-dependent manner. *Psychoneuroendocrinology*, 38(1), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.05.001>
- Brahmachari, S., & Pahan, K. (2007). Sodium benzoate, a food additive and a metabolite of cinnamon, modifies T cells at multiple steps and inhibits adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(1), 275–283. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.275>
- Brambilla, R. (2019). The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathologica*, 137(5), 757–783. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01980-7>
- Brown, D. A., & Sawchenko, P. E. (2007). Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Comparative Neurology*, 502(2), 236–260. <https://doi.org/10.1002/cne.21307>
- Brown, M. T., & Bussell, J. K. (2011). Medication adherence: WHO cares? *Mayo Clinic Proceedings*, 86(4), 304–314. <https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0575>
- Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. (2011). *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12e. <https://doi.org/10.1036/0071422803>

- Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., Linton, C. G., & Smith, J. M. (2012). Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Current Protocols in Mouse Biology*, 2, 145–165. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo110217>
- Burrows, D. J., McGown, A., Jain, S. A., De Felice, M., Ramesh, T. M., Sharrack, B., & Majid, A. (2019). Animal models of multiple sclerosis: From rodents to zebrafish. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 25(3), 306–324. <https://doi.org/10.1177/1352458518805246>
- Burton, J. M., O'Connor, P. W., Hohol, M., & Beyene, J. (2012). Oral versus intravenous steroids for treatment of relapses in multiple sclerosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006921.pub3>
- Cação, G., Santos, E., & Martins Silva, A. (2018). Concurrent autoimmune hepatitis in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 24(3), 350–353. <https://doi.org/10.1177/1352458517692885>
- Campbell, C., Morimoto, B. H., Nenciu, D., & Fox, A. W. (2012). Drug development of intranasally delivered peptides. *Therapeutic Delivery*, 3(4), 557–568. <https://doi.org/10.4155/tde.12.12>
- Candido, K. D. (2017). *A Nasal Applicator for the Treatment of Trigeminal Neuralgia*. ClinicalTrials.Gov.
- Caplan, A., Fett, N., Rosenbach, M., Werth, V. P., & Micheletti, R. G. (2017). Prevention and management of glucocorticoid-induced side effects: A comprehensive review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 76(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.01.062>
- Caravagna, C., Jaouën, A., Desplat-Jégo, S., Fenrich, K. K., Bergot, E., Luche, H., Grenot, P., Rougon, G., Malissen, M., & Debarbieux, F. (2018). Diversity of innate immune cell subsets across spatial and temporal scales in an EAE mouse model. *Scientific Reports*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22872-y>
- Carulli, C., Nistri, L., Bracco, L., Giannini, M., & Amato, M. P. (2015). A steroid-induced bilateral avascular necrosis of the femoral head in an underage patient affected by multiple sclerosis. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism: The Official Journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*, 12(3), 257–259. <https://doi.org/10.11138/ccmbm/2015.12.3.257>
- CENETEC. (2010). *Tratamiento modificador de enfermedad en pacientes con diagnóstico de Esclerosis Múltiple*.
- Ceribelli, A., De Santis, M., & Selmi, C. (2019). Sex and autoimmune disease: Four mechanisms pointing at women. *Mediterranean Journal of Rheumatology*, 30(3), 162. <https://doi.org/10.31138/mjr.30.3.162>
- Chan, J., Ban, E. J., Chun, K. H., Wang, S., McQualter, J., Bernard, C., Toh, B.-H., & Alderuccio, F. (2008). Methylprednisolone induces reversible clinical and pathological remission and loss of lymphocyte reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmunity*, 41(5), 405–413. <https://doi.org/10.1080/08916930802011258>
- Chapman, C. D., Frey, W. H., Craft, S., Danielyan, L., Hallschmid, M., Schieth, H. B., & Benedict, C. (2013). Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharmaceutical Research*, 30(10), 2475–2484. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0915-1>
- Chen, X., Pi, R., Liu, M., Ma, X., Jiang, Y., Liu, Y., Mao, X., & Hu, X. (2010). Combination of methylprednisolone and minocycline synergistically improves experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice. *Journal of Neuroimmunology*, 226(1–2), 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.05.039>
- Chung, E. P., Cotter, J. D., Prakapenka, A. V., Cook, R. L., DiPerna, D. M., & Sirianni, R. W. (2020). Targeting Small Molecule Delivery to the Brain and Spinal Cord via Intranasal Administration of Rabies Virus Glycoprotein (RVG29)-Modified PLGA Nanoparticles. *Pharmaceutics*, 12(2), 93. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020093>
- Ciccione, A., Beretta, S., Brusaferrri, F., Galea, I., Protti, A., & Spreafico, C. (2008). Corticosteroids for the long-term treatment in multiple sclerosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006264.pub2>
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1079–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x>
- Cotsapas, C., Mitrovic, M., & Hafler, D. (2018). Chapter 46 - Multiple sclerosis. In D. H. Geschwind, H. L. Paulson, & C. B. T.-H. of C. N. Klein (Eds.), *Neurogenetics, Part II* (Vol. 148, pp. 723–730). Elsevier.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00046-6>

Cottin, J., Pierre, S., Pizzoglio, V., Simon, C., Durrieu, G., Bleyzac, N., Gouraud, A., & Dumortier, J. (2020). Methylprednisolone-related liver injury: A descriptive study using the French pharmacovigilance database. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*.

<https://doi.org/10.1016/j.clinre.2019.12.008>

Cree, B. A. C. (2014). Chapter 9 - Multiple sclerosis genetics. In D. S. B. T.-H. of C. N. Goodin (Ed.), *Multiple Sclerosis and Related Disorders* (Vol. 122, pp. 193–209). Elsevier.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00009-1>

Crowe, T. P., Greenlee, M. H. W., Kanthasamy, A. G., & Hsu, W. H. (2018). Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences*, *195*(December 2017), 44–52.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.025>

Cruz-Topete, D., & Cidlowski, J. A. (2018). Glucocorticoids: Molecular Mechanisms of Action. In *Immunopharmacology and Inflammation* (pp. 249–266). Springer International Publishing.

[https://doi.org/10.1007/978-3-319-77658-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-77658-3_11)

Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., Androutsou, M.-E., de Courten, M., Matsoukas, J., & Apostolopoulos, V. (2017). Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. *Brain Sciences*, *7*(7).

<https://doi.org/10.3390/brainsci7070078>

de Bruin, N. M. W. J., Schmitz, K., Schiffmann, S., Tafferner, N., Schmidt, M., Jordan, H., Häußler, A., Tegeder, I., Geisslinger, G., & Parnham, M. J. (2016). Multiple rodent models and behavioral measures reveal unexpected responses to FTY720 and DMF in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Behavioural Brain Research*, *300*, 160–174.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.12.006>

Deckx, N., Lee, W. P., Berneman, Z. N., & Cools, N. (2013). Neuroendocrine immunoregulation in multiple sclerosis. *Clinical and Developmental Immunology*, *2013*(23). <https://doi.org/10.1155/2013/705232>

Defer, G. L., Barré, J., Ledudal, P., Tillement, J. P., & Degos, J. D. (1995). Methylprednisolone infusion during acute exacerbation of MS: plasma and CSF concentrations. *European Neurology*, *35*(3), 143–148. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628493>

Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature*

*Reviews Immunology*, *15*(9), 545–558.

<https://doi.org/10.1038/nri3871>

Denic, A., Johnson, A. J., Bieber, A. J., Warrington, A. E., Rodriguez, M., & Pirko, I. (2011). The relevance of animal models in multiple sclerosis research.

*Pathophysiology*, *18*(1), 21–29.

<https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2010.04.004>

Deruaz, C. A., Spertini, F., Souza Lima, F., Du Pasquier, R. A., & Schluemp, M. (2007). Anaphylactic reaction to methylprednisolone in multiple sclerosis: a practical approach to alternative corticosteroids. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, *13*(4), 559–560. <https://doi.org/10.1177/1352458506070655>

Desmet, S. J., & De Bosscher, K. (2017). Glucocorticoid receptors: Finding the middle ground. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(4), 1136–1145.

<https://doi.org/10.1172/JCI88886>

Dhuria, S. V., Hanson, L. R., & Frey, W. H. (2010). Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *99*(4), 1654–1673.

<https://doi.org/10.1002/jps.21924>

Didonna, A., & Oksenberg, J. R. (2017). The Genetics of Multiple Sclerosis. In *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis* (pp. 3–16). Codon Publications.

<https://doi.org/10.15586/codon.multiplesclerosis.2017.ch1>

Diener, H.-C., & Evers, S. (2007). Effectiveness and satisfaction with zolmitriptan 5 mg nasal spray for treatment of migraine in real-life practice: results of a postmarketing surveillance study. *Clinical Drug Investigation*, *27*(1), 59–66.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17177580>

Djupesland, Per G. (2018). Looking to the future of nasal drug delivery – an interview with Per Gisle Djupesland. *Therapeutic Delivery*, *9*(3), 163–168.

<https://doi.org/10.4155/tde-2018-0005>

Djupesland, Per G., Messina, J. C., & Mahmoud, R. A. (2014). The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: an anatomic, physiologic, and delivery technology overview. *Therapeutic Delivery*, *5*(6), 709–733. <https://doi.org/10.4155/tde.14.41>

Djupesland, Per Gisle. (2013). Nasal drug delivery devices: characteristics and performance in a clinical perspective—a review. *Drug Delivery and Translational Research*, *3*(1), 42–62. <https://doi.org/10.1007/s13346-012-0108-9>

- Dobson, R., & Giovannoni, G. (2019). Multiple sclerosis – a review. *European Journal of Neurology*, *28*(1), 27–40. <https://doi.org/10.1111/ene.13819>
- Drugbank. (2020). *Methylprednisolone sodium succinate*. <https://www.drugbank.ca/salts/DBSALT001158>
- Duchi, S., Ovadia, H., & Touitou, E. (2013). Nasal administration of drugs as a new non-invasive strategy for efficient treatment of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, *258*(1–2), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.02.013>
- Duma, D., Collins, J. B., Chou, J. W., & Cidlowski, J. A. (2010). Sexually dimorphic actions of glucocorticoids provide a link to inflammatory diseases with gender differences in prevalence. *Science Signaling*, *3*(143), ra74. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001077>
- Dunston, D., Ashby, S., Krosnowski, K., Ogura, T., & Lin, W. (2013). An effective manual deboning method to prepare intact mouse nasal tissue with preserved anatomical organization. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *78*. <https://doi.org/10.3791/50538>
- Durrant, D. M., Ghosh, S., & Klein, R. S. (2016). The Olfactory Bulb: An Immunosensory Effector Organ during Neurotropic Viral Infections. *ACS Chemical Neuroscience*, *7*(4), 464–469. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00043>
- Dychter, S. S., Gold, D. A., Carson, D., & Haller, M. (2012). Intravenous Therapy. *Journal of Infusion Nursing*, *35*(2), 84–91. <https://doi.org/10.1097/NAN.0b013e31824237ce>
- Ebringer, A., Rashid, T., & Wilson, C. (2012). The role of Acinetobacter in the pathogenesis of multiple sclerosis examined by using Popper sequences. *Medical Hypotheses*, *78*(6), 763–769. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2012.02.026>
- Egwuagu, C. E., & Larkin, III, J. (2013). Therapeutic targeting of STAT pathways in CNS autoimmune diseases. *JAK-STAT*, *2*(1), e24134. <https://doi.org/10.4161/jkst.24134>
- Erdő, F., Bors, L. A., Farkas, D., Bajza, Á., & Gizurarson, S. (2018). Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Research Bulletin*, *143*, 155–170. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.10.009>
- Espinosa, A., Meneses, G., Chavarría, A., Mancilla, R., Pedraza-Chaverri, J., Fleury, A., Bárcena, B., Pérez-Osorio, I. N., Besedovsky, H., Arauz, A., Fragoso, G., & Sciotto, E. (2020). Intranasal Dexamethasone Reduces Mortality and Brain Damage in a Mouse Experimental Ischemic Stroke Model. *Neurotherapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00884-9>
- Evonuk, K. S., Baker, B. J., Doyle, R. E., Moseley, C. E., Sestero, C. M., Johnston, B. P., De Sarno, P., Tang, A., Gembitsky, I., Hewett, S. J., Weaver, C. T., Raman, C., & DeSilva, T. M. (2015). Inhibition of System Xc – Transporter Attenuates Autoimmune Inflammatory Demyelination. *The Journal of Immunology*, *195*(2), 450–463. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401108>
- Faissner, S., & Gold, R. (2018). Efficacy and Safety of the Newer Multiple Sclerosis Drugs Approved Since 2010. *CNS Drugs*, *32*(3), 269–287. <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0488-6>
- Fallata, A., Salter, A., Tyry, T., Cutter, G. R., & Marrie, R. A. (2017). Trigeminal Neuralgia Commonly Precedes the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *International Journal of MS Care*, *19*(5), 240–246. <https://doi.org/10.7224/1537-2073.2016-065>
- Fan, L.-W., Carter, K., Bhatt, A., & Pang, Y. (2019). Rapid transport of insulin to the brain following intranasal administration in rats. *Neural Regeneration Research*, *14*(6), 1046. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.250624>
- FDA. (2011). *SOLU-MEDROL® (methylprednisolone sodium succinate for injection, USP)*. FDA. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/011856s103s104lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/011856s103s104lbl.pdf)
- Ferreira, E., & Letwin, S. R. (1998). Desmopressin for Nocturia and Enuresis Associated with Multiple Sclerosis. *Annals of Pharmacotherapy*, *32*(1), 114–116. <https://doi.org/10.1345/aph.17158>
- Filippi, M., Bar-Or, A., Piehl, F., Preziosa, P., Solari, A., Vukusic, S., & Rocca, M. A. (2018). Multiple sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, *4*(1), 1–27. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0041-4>
- Filippini, G., Brusaferrri, F., Wa, S., Citterio, A., Ciucci, G., Midgard, R., Candelise, L., Filippini, G., Brusaferrri, F., Sibley, W. A., Citterio, A., Ciucci, G., Midgard, R., & Candelise, L. (2009). *Corticosteroids or ACTH for acute exacerbations in multiple sclerosis (Review)* (Issue 1). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001331>. Copyright
- Fischer, H. J., Finck, T. L. K., Pellkofer, H. L., Reichardt, H. M., & Lühder, F. (2019). Glucocorticoid Therapy of Multiple Sclerosis Patients Induces Anti-inflammatory Polarization and Increased Chemotaxis of Monocytes. *Frontiers in Immunology*, *10*, 1200. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01200>

- Fischer, H. J., Schweingruber, N., Lühder, F., & Reichardt, H. M. (2013). The potential role of T cell migration and chemotaxis as targets of glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *380*(1–2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.001>
- Fleming, K. K., Bovaird, J. A., Mosier, M. C., Emerson, M. R., LeVine, S. M., & Marquis, J. G. (2005). Statistical analysis of data from studies on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, *170*(1–2), 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.08.020>
- Fogarty, E., Schmitz, S., Tubridy, N., Walsh, C., & Barry, M. (2016). Comparative efficacy of disease-modifying therapies for patients with relapsing remitting multiple sclerosis: Systematic review and network meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, *9*, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2016.06.001>
- Fortuna, A., Alves, G., Serralheiro, A., Sousa, J., & Falcão, A. (2014). Intranasal delivery of systemic-acting drugs: small-molecules and biomacromolecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, *88*(1), 8–27. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.03.004>
- Franco, R., & Fernández-Suárez, D. (2015). Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, *131*, 65–86. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.05.003>
- Frank, D. O., Kimbell, J. S., Cannon, D., Pawar, S. S., & Rhee, J. S. (2012). Deviated nasal septum hinders intranasal sprays: a computer simulation study. *Rhinology*, *50*(3), 311–318. <https://doi.org/10.4193/Rhino12.053>
- Fransson, M., Piras, E., Burman, J., Nilsson, B., Essand, M., Lu, B., Harris, R. A., Magnusson, P. U., Brittebo, E., & Loskog, A. S. I. (2012). CAR/FoxP3-engineered T regulatory cells target the CNS and suppress EAE upon intranasal delivery. *Journal of Neuroinflammation*, *9*(1), 112. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-112>
- Fransson, M., Piras, E., Wang, H., Burman, J., Duprez, I., Harris, R. A., LeBlanc, K., Magnusson, P. U., Brittebo, E., & Loskog, A. S. I. (2014). Intranasal delivery of central nervous system-retargeted human mesenchymal stromal cells prolongs treatment efficacy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology*, *142*(3), 431–441. <https://doi.org/10.1111/imm.12275>
- Fredrikson, S. (1996). Nasal spray desmopressin treatment of bladder dysfunction in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*, *94*(1), 31–34. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1996.tb00035.x>
- Frey II, W. H. (1989). *Method for administering neurologic agents to the brain* (No. US5624898A). US Grant.
- Gadhave, D. G., & Kokare, C. R. (2019). Nanostructured lipid carriers engineered for intranasal delivery of teriflunomide in multiple sclerosis: optimization and in vivo studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *45*(5), 839–851. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1576724>
- Gänger, S., & Schindowski, K. (2018). Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030116>
- Gianfrancesco, M. A., & Barcellos, L. F. (2016). Obesity and Multiple Sclerosis Susceptibility: A Review. *Journal of Neurology & Neuromedicine*, *1*(7), 1–5. <https://doi.org/10.29245/2572.942x/2016/7.1064>
- Gilbert, J. A., Blaser, M. J., Gregory Caporaso, J., Jansson, J. K., Lynch, S. V., & Knight, R. (2018). *Current understanding of the human microbiome*. <https://doi.org/10.1038/nm.4517>
- Giles, D. A., Duncker, P. C., Wilkinson, N. M., Washnock-Schmid, J. M., & Segal, B. M. (2018). CNS-resident classical DCs play a critical role in CNS autoimmune disease. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(12), 5322–5334. <https://doi.org/10.1172/JCI123708>
- Giralt, M., Molinero, A., & Hidalgo, J. (2018). *Active Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) with MOG35–55 in the Mouse* (pp. 227–232). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7862-5\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7862-5_17)
- Gizurarson, S. (2015). The effect of cilia and the mucociliary clearance on successful drug delivery. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *38*(4), 497–506. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00398>
- Glass-Marmor, L., Paperna, T., Ben-Yosef, Y., & Miller, A. (2007). Chronotherapy using corticosteroids for

- multiple sclerosis relapses. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 78(8), 886–888. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2006.104000>
- Glatigny, S., & Bettelli, E. (2018). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(11), a028977. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028977>
- Göbel, K., Ruck, T., & Meuth, S. G. (2018). Cytokine signaling in multiple sclerosis: Lost in translation. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 24(4), 432–439. <https://doi.org/10.1177/1352458518763094>
- Golden, L. C., Itoh, Y., Itoh, N., Iyengar, S., Coit, P., Salama, Y., Arnold, A. P., Sawalha, A. H., & Voskuhl, R. R. (2019). Parent-of-origin differences in DNA methylation of X chromosome genes in T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(52), 26779–26787. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910072116>
- González, L. F., Acuña, E., Arellano, G., Morales, P., Sotomayor, P., Oyarzun-Ampuero, F., & Naves, R. (2020). Intranasal delivery of interferon- $\beta$ -loaded nanoparticles induces control of neuroinflammation in a preclinical model of multiple sclerosis: A promising simple, effective, non-invasive, and low-cost therapy. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.11.019>
- Goodin, D. S. (2014a). Chapter 11 - The epidemiology of multiple sclerosis: insights to disease pathogenesis. In D. S. B. T.-H. of C. N. Goodin (Ed.), *Multiple Sclerosis and Related Disorders* (Vol. 122, pp. 231–266). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00010-8>
- Goodin, D. S. (2014b). Glucocorticoid treatment of multiple sclerosis. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 122). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00020-0>
- Goodin, D. S., Reder, A. T., Bermel, R. A., Cutter, G. R., Fox, R. J., John, G. R., Lublin, F. D., Lucchinetti, C. F., Miller, A. E., Pelletier, D., Racke, M. K., Trapp, B. D., Vartanian, T., & Waubant, E. (2016). Relapses in multiple sclerosis: Relationship to disability. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 6, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2015.09.002>
- Grassin-Delyle, S., Buenestado, A., Naline, E., Faisy, C., Blouquit-Laye, S., Couderc, L.-J., Le Guen, M., Fischler, M., & Devillier, P. (2012). Intranasal drug delivery: An efficient and non-invasive route for systemic administration. *Pharmacology & Therapeutics*, 134(3), 366–379. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.003>
- Groenewoud, G., Hundt, H. K., Luus, H. G., Müller, F. O., & Schall, R. (1994). Absolute bioavailability of a new high dose methylprednisolone tablet formulation. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 32(12), 652–654. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7881703>
- Guerrero-García, J. de J., Carrera-Quintanar, L., López-Roa, R. I., Márquez-Aguirre, A. L., Rojas-Mayorquín, A. E., & Ortuño-Sahagún, D. (2016). Multiple Sclerosis and Obesity: Possible Roles of Adipokines. *Mediators of Inflammation*, 2016, 1–24. <https://doi.org/10.1155/2016/4036232>
- Guo, S.-D., Liu, C.-Y., Yu, J.-W., Chai, Z., Wang, Q., Mi, X.-T., Song, G.-B., Li, Y.-H., Yang, P.-W., Feng, L., Xiao, B.-G., & Ma, C.-G. (2019). Nasal delivery of Fasudil-modified immune cells exhibits therapeutic potential in experimental autoimmune encephalomyelitis. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(6), 783–795. <https://doi.org/10.1111/cns.13111>
- Gupta, R., & Fonacier, L. S. (2016). Adverse Effects of Nonsystemic Steroids (Inhaled, Intranasal, and Cutaneous): a Review of the Literature and Suggested Monitoring Tool. *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(6), 44. <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0620-y>
- Hanson, L. R., Fine, J. M., Svitak, A. L., & Falteseck, K. a. (2013). Intranasal administration of CNS therapeutics to awake mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 74, 1–7. <https://doi.org/10.3791/4440>
- Hanson, L. R., Roeytenberg, A., Martinez, P. M., Coppes, V. G., Sweet, D. C., Rao, R. J., Marti, D. L., Hoekman, J. D., Matthews, R. B., Frey, W. H., & Panter, S. S. (2009). Intranasal Deferoxamine Provides Increased Brain Exposure and Significant Protection in Rat Ischemic Stroke. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 330(3), 679–686. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.149807>
- Hassani, A., Corboy, J. R., Al-Salam, S., & Khan, G. (2018). Epstein-Barr virus is present in the brain of most cases of multiple sclerosis and may engage more than just B cells. *PLOS ONE*, 13(2), e0192109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192109>
- Hasselmann, J. P. C., Karim, H., Khalaj, A. J., Ghosh, S., & Tiwari-Woodruff, S. K. (2017). Consistent induction of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice for the longitudinal study of pathology and repair. *Journal of*

*Neuroscience Methods*, 284, 71–84.

<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.04.003>

Helm, R. E., Klausner, J. D., Klemperer, J. D., Flint, L. M., & Huang, E. (2015). Accepted but unacceptable: peripheral IV catheter failure. *Journal of Infusion Nursing: The Official Publication of the Infusion Nurses Society*, 38(3), 189–203.

<https://doi.org/10.1097/NAN.0000000000000100>

Hernández-Díaz, S., & Rodríguez, L. A. (2001). Steroids and risk of upper gastrointestinal complications. *American Journal of Epidemiology*, 153(11), 1089–1093. <https://doi.org/10.1093/aje/153.11.1089>

Herold, M. J., & Reichardt, H. M. (2013). Glucocorticoid-induced apoptosis in animal models of multiple sclerosis. *Critical Reviews in Immunology*, 33(3), 183–202.

<https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2013007415>

Heun, R., Sliwka, U., Röttinger, H., & Schimrigk, K. (1992). Intrathecal versus systemic corticosteroids in the treatment of multiple sclerosis: results of a pilot study. *Journal of Neurology*, 239(1), 31–35.

<https://doi.org/10.1007/BF00839208>

Hollenbach, J. A., & Oksenberg, J. R. (2015). The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 64, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.06.010>

Hooke Laboratories. (2019). *EAE Induction by Active Immunization in C57BL/6 Mice*.

[https://hookelabs.com/protocols/pdf/EAE Induction by Active Immunization in C57BL6 Mice.pdf](https://hookelabs.com/protocols/pdf/EAE%20Induction%20by%20Active%20Immunization%20in%20C57BL6%20Mice.pdf)

Hu, Z., Cui, Y., Qiao, X., He, X., Li, F., Luo, C., Wang, S., Li, C., & Dai, R. (2018). Silencing miR-150 Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Frontiers in Neuroscience*, 12.

<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00465>

Illum, L. (2015). Intranasal Delivery to the Central Nervous System. In L. Di & E. H. Kerns (Eds.), *Blood-Brain Barrier in Drug Discovery* (pp. 535–565). John Wiley & Sons, Inc.

<https://doi.org/10.1002/9781118788523.ch25>

Ivancevich, J. C., Cardona, V., Larenas-Linnemann, D., Mullol, J., Neffen, H., Zernotti, M., Asayag, E., Blua, A. E., Gómez, R. M., Jares, E., Máspero, J., Anto, J. M., Dedeu, T., Rodríguez-González, M., Huerta-Villalobos, Y. R., Fuentes-Pérez, J. M., Rodríguez-Zagal, E., Valero, A., Bartra, J., ... Bousquet, J. (2019). Resumen ejecutivo de ARIA 2019: Vías integradas de atención para la rinitis alérgica en Argentina, España y México. *Revista Alergia México*, 66(4), 409.

<https://doi.org/10.29262/ram.v66i4.643>

Johnson, N. J., Hanson, L. R., & Frey, W. H. (2010). Trigeminal pathways deliver a low molecular weight drug from the nose to the brain and orofacial structures. *Molecular Pharmaceutics*, 7(3), 884–893. <https://doi.org/10.1021/mp100029t>

Jongen, P. J., Stavrakaki, I., Voet, B., Hoogervorst, E., van Munster, E., Linssen, W. H., Sinnige, L. G., Verhagen, W. I., Visser, L. H., van der Kruijk, R., Verheul, F., Boringa, J., Heerings, M., Gladdines, W., Lönnqvist, F., & Gaillard, P. (2016). Patient-reported adverse effects of high-dose intravenous methylprednisolone treatment: a prospective web-based multi-center study in multiple sclerosis patients with a relapse. *Journal of Neurology*, 263(8), 1641–1651. <https://doi.org/10.1007/s00415-016-8183-3>

Jużwik, C. A., S Drake, S., Zhang, Y., Paradis-Isler, N., Sylvester, A., Amar-Zifkin, A., Douglas, C., Morquette, B., Moore, C. S., & Fournier, A. E. (2019). microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review. *Progress in Neurobiology*, 182, 101664.

<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101664>

Kalincik, T. (2015). Multiple Sclerosis Relapses: Epidemiology, Outcomes and Management. A Systematic Review. *Neuroepidemiology*, 44(4), 199–214. <https://doi.org/10.1159/000382130>

Kantor, D., Mehta, R., Pelletier, C., Tian, M., Noxon, V., Johnson, B. H., & Bonafede, M. (2020). Treatment Patterns and Relapses Among Newly Treated Multiple Sclerosis Patients From a Retrospective Claims Analysis. *Clinical Therapeutics*, 42(11), 2136–2147.e3. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.09.014>

Katz Sand, I. (2018). The Role of Diet in Multiple Sclerosis: Mechanistic Connections and Current Evidence. *Current Nutrition Reports*, 7(3), 150–160. <https://doi.org/10.1007/s13668-018-0236-z>

Khakh, B. S., & Sofroniew, M. V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neuroscience*, 18(7), 942–952. <https://doi.org/10.1038/nn.4043>

Khurana, V., & Medin, J. (2017). Time to, and rate of secondary progression in patients with multiple sclerosis: results of a systematic search. *ECTRIMS Online Library*, EP1326. <https://onlinelibrary.ectrims-congress.eu/ectrims/2017/ACTRIMS-ECTRIMS2017/199347/jennie.medin.time.to.and.rate.of.secondary.progression.in.patients.with.html>

Kim, D., Nguyen, Q. T., Lee, J., Lee, S. H., Janocha, A.,

- Kim, S., Le, H. T., Dvorina, N., Weiss, K., Cameron, M. J., Asosingh, K., Erzurum, S. C., Baldwin, W. M., Lee, J.-S., & Min, B. (2020). Anti-inflammatory Roles of Glucocorticoids Are Mediated by Foxp3+ Regulatory T Cells via a miR-342-Dependent Mechanism. *Immunity*, *53*(3), 581-596.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.002>
- Kim, I.-D., Shin, J.-H., Kim, S.-W., Choi, S., Ahn, J., Han, P.-L., Park, J.-S., & Lee, J.-K. (2012). Intranasal delivery of HMGB1 siRNA confers target gene knockdown and robust neuroprotection in the postischemic brain. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *20*(4), 829-839. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.291>
- Krieger, S., Sorrells, S. F., Nickerson, M., & Pace, T. W. W. (2014). Mechanistic insights into corticosteroids in multiple sclerosis: War horse or chameleon? *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *119*, 6-16. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.12.021>
- Kumar, N. N., Lochhead, J. J., Pizzo, M. E., Nehra, G., Boroumand, S., Greene, G., & Thorne, R. G. (2018). Delivery of immunoglobulin G antibodies to the rat nervous system following intranasal administration: Distribution, dose-response, and mechanisms of delivery. *Journal of Controlled Release*, *286*, 467-484. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.08.006>
- Kurschus, F. (2015). T cell mediated pathogenesis in EAE: Molecular mechanisms. *Biomedical Journal*, *38*(3), 183. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.155590>
- Kutzelnigg, A., & Lassmann, H. (2014). Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 122). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00002-9>
- Lambert, L. (2013). Intranasal corticosteroids. *South African Pharmaceutical Journal*, *80*(6), 22-24.
- Lassmann, H., & Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, *133*(2), 223-244. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1631-4>
- Le Page, E., Veillard, D., Laplaud, D. A., Hamonic, S., Wardi, R., Lebrun, C., Zagnoli, F., Wiertelowski, S., Deburghgraeve, V., Coustans, M., & Edan, G. (2015). Oral versus intravenous high-dose methylprednisolone for treatment of relapses in patients with multiple sclerosis (COPOUSEP): A randomised, controlled, double-blind, non-inferiority trial. *The Lancet*, *386*(9997), 974-981. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61137-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61137-0)
- Lee, J., Taneja, V., & Vassallo, R. (2012). Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Dental Research*, *91*(2), 142-149. <https://doi.org/10.1177/0022034511421200>
- Lehrer, S., & Rheinstein, P. H. (2018). Alzheimer's Disease and Intranasal Fluticasone Propionate in the FDA MedWatch Adverse Events Database. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, *2*(1), 111-115. <https://doi.org/10.3233/ADR-170033>
- Leibovitch, E. C., Caruso, B., Ha, S. K., Schindler, M. K., Lee, N. J., Luciano, N. J., Billioux, B. J., Guy, J. R., Yen, C., Sati, P., Silva, A. C., Reich, D. S., & Jacobson, S. (2018). Herpesvirus trigger accelerates neuroinflammation in a nonhuman primate model of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(44), 11292-11297. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811974115>
- Lelios, I., & Greter, M. (2014). Isolation of Leukocytes from Mouse Central Nervous System. In A. Waisman & B. Becher (Eds.), *T-Helper Cells: Methods and Protocols* (Vol. 1193, pp. 15-19). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1212-4>
- Leussink, V. I., Jung, S., Merschedorf, U., Toyka, K. V., & Gold, R. (2001). High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Archives of Neurology*, *58*(1), 91-97. <https://doi.org/10.1001/archneur.58.1.91>
- Li, Y.-H., Yu, J.-Z., Liu, C.-Y., Zhang, H., Zhang, H.-F., Yang, W.-F., Li, J.-L., Feng, Q.-J., Feng, L., Zhang, G.-X., Xiao, B.-G., & Ma, C.-G. (2014). Intranasal delivery of FSD-C10, a novel Rho kinase inhibitor, exhibits therapeutic potential in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology*, *143*(2), 219-229. <https://doi.org/10.1111/imm.12303>
- Liberman, A. C., Budziński, M. L., Sokn, C., Gobbini, R. P., Steininger, A., & Arzt, E. (2018). Regulatory and Mechanistic Actions of Glucocorticoids on T and Inflammatory Cells. *Frontiers in Endocrinology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00235>
- Liu, W.-L., Lee, Y.-H., Tsai, S.-Y., Hsu, C. Y., Sun, Y.-Y., Yang, L.-Y., Tsai, S.-H., & Yang, W.-C. V. (2008). Methylprednisolone inhibits the expression of glial fibrillary acidic protein and chondroitin sulfate proteoglycans in reactivated astrocytes. *Glia*, *56*(13), 1390-1400. <https://doi.org/10.1002/glia.20706>
- Lochhead, J. J., & Davis, T. P. (2019). Perivascular and Perineural Pathways Involved in Brain Delivery and Distribution of Drugs after Intranasal Administration. *Pharmaceutics*, *11*(11).

- <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110598>
- Lochhead, J. J., & Thorne, R. G. (2012). Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(7), 614–628. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.002>
- Louveau, A., Da Mesquita, S., & Kipnis, J. (2016). Lymphatics in Neurological Disorders: A Neuro-Lympho-Vascular Component of Multiple Sclerosis and Alzheimer's Disease? *Neuron*, *91*(5), 957–973. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.027>
- Lu, H. C., Kim, S., Steelman, A. J., Tracy, K., Zhou, B., Michaud, D., Hillhouse, A. E., Konganti, K., & Li, J. (2020). STAT3 signaling in myeloid cells promotes pathogenic myelin-specific T cell differentiation and autoimmune demyelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(10), 5430–5441. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913997117>
- Lu, M., Taylor, B. V., & Körner, H. (2018). Genomic Effects of the Vitamin D Receptor: Potentially the Link between Vitamin D, Immune Cells, and Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00477>
- Mancilla-Hernández, E., Medina-Ávalos, M. A., Barnica-Alvarado, R. H., Soto-Candia, D., Guerrero-Venegas, R., & Zecua-Nájera, Y. (2015). Prevalencia de rinitis alérgica en poblaciones de varios estados de México. *Revista Alergia México*, *62*(3), 196–201.
- Martinelli, V., Rocca, M. A., Annovazzi, P., Pulizzi, A., Rodegher, M., Boneschi, F. M., Scotti, R., Falini, A., Sormani, M. P., Comi, G., & Filippi, M. (2009). A short-term randomized MRI study of high-dose oral vs intravenous methylprednisolone in MS. *Neurology*, *73*(22), 1842–1848. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c3fd5b>
- Martínez-Cáceres, E. M., Barrau, M. A., Brieva, L., Espejo, C., Barberà, N., & Montalban, X. (2002). Treatment with methylprednisolone in relapses of multiple sclerosis patients: Immunological evidence of immediate and short-term but not long-lasting effects. *Clinical and Experimental Immunology*, *127*(1), 165–171. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01725.x>
- Marx, D., Williams, G., & Birkhoff, M. (2015). Intranasal Drug Administration — An Attractive Delivery Route for Some Drugs. In *Drug Discovery and Development - From Molecules to Medicine*. InTech. <https://doi.org/10.5772/59468>
- Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., & Prinz, M. (2020). Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Reports*, *30*(5), 1271–1281. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.010>
- Mayo, L., Cunha, A. P. Da, Madi, A., Beynon, V., Yang, Z., Alvarez, J. I., Prat, A., Sobel, R. A., Kobzik, L., Lassmann, H., Quintana, F. J., & Weiner, H. L. (2016). IL-10-dependent Tr1 cells attenuate astrocyte activation and ameliorate chronic central nervous system inflammation. *Brain: A Journal of Neurology*, *139*(Pt 7), 1939–1957. <https://doi.org/10.1093/brain/aww113>
- Meneses, G., Gevorkian, G., Florentino, A., Bautista, M. A., Espinosa, A., Acero, G., Díaz, G., Fleury, A., Pérez Osorio, I. N., del Rey, A., Fragoso, G., Sciutto, E., & Besedovsky, H. (2017). Intranasal delivery of dexamethasone efficiently controls LPS-induced murine neuroinflammation. *Clinical & Experimental Immunology*, *190*(3), 304–314. <https://doi.org/10.1111/cei.13018>
- Merkus, P. (2006). *Current Aspects of Nasal Drug Delivery*. University of Amsterdam.
- Miljković, Z., Momčilović, M., Miljković, D., & Mostarica-Stojković, M. (2009). Methylprednisolone inhibits IFN-gamma and IL-17 expression and production by cells infiltrating central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroinflammation*, *6*, 37. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-6-37>
- Miller, R. A., & Cesta, M. F. (2015). *Nose, Nerve – Atrophy*. NTP Nonneoplastic Lesion Atlas. [https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/respiratory/nose/nvatrophy/nose-nerve-atrophy-pdf\\_508.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/respiratory/nose/nvatrophy/nose-nerve-atrophy-pdf_508.pdf)
- Milligan, N. M., Newcombe, R., & Compston, D. A. (1987). A double-blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: 1. Clinical effects. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *50*(5), 511–516. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3295122>
- Mittal, D., Ali, A., Md, S., Baboota, S., Sahni, J. K., & Ali, J. (2014). Insights into direct nose to brain delivery: current status and future perspective. *Drug Delivery*, *21*(2), 75–86. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.838713>
- Mohammed, E. M. (2020). Environmental Influencers, MicroRNA, and Multiple Sclerosis. *Journal of Central Nervous System Disease*, *12*, 1179573519894955. <https://doi.org/10.1177/1179573519894955>
- Mohr, A., Malhotra, R., Mayer, G., Gorochov, G., & Miyara, M. (2018). Human FOXP3+ T regulatory cell heterogeneity. *Clinical & Translational Immunology*,

71), e1005. <https://doi.org/10.1002/cti2.1005>

Mondal, S., Jana, M., Dasarathi, S., Roy, A., & Pahan, K. (2018). Aspirin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis through interleukin-11-mediated protection of regulatory T cells. *Science Signaling*, 11(558). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aar8278>

Moretti, R., Torre, P., Antonello, R. M., Zorzon, M., & Cazzato, G. (2000). Recurrent atrial fibrillation associated with pulse administration of high doses of methylprednisolone: a possible prophylactic treatment. *European Journal of Neurology*, 7(1), 130. <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2000.00026.x>

Morgan, T. M., & Soh, B. (2017). Absolute bioavailability and safety of a novel rivastigmine nasal spray in healthy elderly individuals. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83(3), 510–516. <https://doi.org/10.1111/bcp.13133>

Morrow, S. a, Stoian, C. a, Dmitrovic, J., Chan, S. C., & Metz, L. M. (2004). The bioavailability of IV methylprednisolone and oral prednisone in multiple sclerosis. *Neurology*, 63(6), 1079–1080. <https://doi.org/10.1212/WNL.64.6.1100-a>

Müller, T. (2009). Role of intraspinal steroid application in patients with multiple sclerosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 9(9), 1279–1287. <https://doi.org/10.1586/ern.09.60>

Munger, K. L., Levin, L. I., Hollis, B. W., Howard, N. S., & Ascherio, A. (2006). Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Multiple Sclerosis. *JAMA*, 296(23), 2832. <https://doi.org/10.1001/jama.296.23.2832>

Naegele, M., & Martin, R. (2014). The good and the bad of neuroinflammation in multiple sclerosis. In D. S. Goodin (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 122, Issue 0, pp. 59–87). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00003-0>

NCBI. (2020). *Pubmed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

Negrotto, L., & Correale, J. (2018). Evolution of multiple sclerosis prevalence and phenotype in Latin America. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 22, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2018.03.014>

Nelson, D. A., & Landau, W. (2001). Intraspinal steroids: history, efficacy, accidentality, and controversy with review of United States Food and Drug Administration reports. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 70(4), 433–443. <https://doi.org/10.1136/jnnp.70.4.433>

Nelson, D. A., Vates, T. S., & Thomas, R. B. (1973).

COMPLICATIONS FROM INTRATHECAL STEROID THERAPY IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS. *Acta Neurologica Scandinavica*, 49(2), 176–188. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1973.tb01289.x>

Newsome, S., & Mowry, E. (2016). *Intranasal Insulin for Improving Cognitive Function in Multiple Sclerosis*. ClinicalTrials.Gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02988401>

Nociti, V., Biolato, M., De Fino, C., Bianco, A., Losavio, F. A., Lucchini, M., Marrone, G., Grieco, A., & Mirabella, M. (2018). Liver injury after pulsed methylprednisolone therapy in multiple sclerosis patients. *Brain and Behavior*, 8(6), e00968. <https://doi.org/10.1002/brb3.968>

Okuda, Y., Okuda, M., & Bernard, C. C. A. (2002). Gender does not influence the susceptibility of C57BL/6 mice to develop chronic experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Immunology Letters*, 87(1), 25–29. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(01\)00339-x](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(01)00339-x)

Olsson, T., Barcellos, L. F., & Alfredsson, L. (2017). Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 13(1), 25–36. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.187>

Ottum, P. A., Arellano, G., Reyes, L. I., Iruretagoyena, M., & Naves, R. (2015). Opposing roles of interferon-gamma on cells of the central nervous system in autoimmune neuroinflammation. *Frontiers in Immunology*, 6(OCT), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00539>

Palavra, F., Almeida, L., Ambrósio, A. F., & Reis, F. (2016). Obesity and brain inflammation: a focus on multiple sclerosis. *Obesity Reviews*, 17(3), 211–224. <https://doi.org/10.1111/obr.12363>

Palle, P., Ferreira, F. M., Methner, A., & Buch, T. (2016). The more the merrier? Scoring, statistics and animal welfare in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Laboratory Animals*, 50(6), 427–432. <https://doi.org/10.1177/0023677216675008>

Pandit, L. (2019). No Evidence of Disease Activity (NEDA) in Multiple Sclerosis - Shifting the Goal Posts. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 22(3), 261–263. [https://doi.org/10.4103/aian.AIAN\\_159\\_19](https://doi.org/10.4103/aian.AIAN_159_19)

Pardridge, W. M. (2016). CSF, blood-brain barrier, and brain drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(7), 963–975. <https://doi.org/10.1517/17425247.2016.1171315>

- Pathak, V. (2018). Nasal Delivery – A Promising Route of Drug Delivery to the Brain: Scientific Considerations. *Drug Development and Delivery*. <https://drug-dev.com/nasal-delivery-a-promising-route-of-drug-delivery-to-the-brain-scientific-considerations-2/>
- Pavičić, T., Ruška, B., Adamec, I., & Habek, M. (2019). Recurrent atrial fibrillation after pulse corticosteroid treatment for a relapse of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, *32*, 30–32. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.04.022>
- Pérez Osorio, I. N. (2019). *Distribución de glucocorticoides en el sistema nervioso central administrados por vía intranasal* [Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2019/agosto/0794829/Index.html>
- Pfizer. (2017). *Medrol- Safety Data Sheet*. [https://www.pfizer.com/sites/default/files/products/material\\_safety\\_data/MEDROL\\_\(methylprednisolone\)\\_tablets\\_23-mar-2017.pdf](https://www.pfizer.com/sites/default/files/products/material_safety_data/MEDROL_(methylprednisolone)_tablets_23-mar-2017.pdf)
- Piket, E., Zheleznyakova, G. Y., Kular, L., & Jagodic, M. (2019). Small non-coding RNAs as important players, biomarkers and therapeutic targets in multiple sclerosis: A comprehensive overview. *Journal of Autoimmunity*, *101*, 17–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.04.002>
- Pires, A., Fortuna, A., Alves, G., & Falcão, A. (2009). Intranasal drug delivery: how, why and what for? *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, *12*(3), 288–311. <https://doi.org/10.18433/j3nc79>
- PLM Latinoamérica. (2020). *Prednisona (Sustancia)*. Medicamentos PLM. [www.medicamentosplm.com](http://www.medicamentosplm.com)
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F. D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A. J., Waubant, E., Weinshenker, B., & Wolinsky, J. S. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology*, *69*(2), 292–302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>
- Ponomarev, E. D., Maresz, K., Tan, Y., & Dittel, B. N. (2007). CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(40), 10714–10721. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1922-07.2007>
- Quadir, M., Zia, H., & Needham, T. E. (1999). Toxicological Implications of Nasal Formulations. *Drug Delivery*, *6*(4), 227–242. <https://doi.org/10.1080/107175499266823>
- Quinn, K., Galbraith, S. E., Sheahan, B. J., & Atkins, G. J. (2008). Effect of intranasal administration of Semliki Forest virus recombinant particles expressing interferon- $\beta$  on the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Molecular Medicine Reports*, *1*(3), 335–342. <https://doi.org/10.3892/mmr.1.3.335>
- Quintana, D. S., Guastella, A. J., Westlye, L. T., & Andreassen, O. a. (2016). The promise and pitfalls of intranasally administering psychopharmacological agents for the treatment of psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, *21*(1), 29–38. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.166>
- Quintana, D S, Westlye, L. T., Rustan, Ø. G., Tesli, N., Poppy, C. L., Smevik, H., Tesli, M., Røine, M., Mahmoud, R. A., Smerud, K. T., Djupesland, P. G., & Andreassen, O. A. (2015). Low-dose oxytocin delivered intranasally with Breath Powered device affects social-cognitive behavior: a randomized four-way crossover trial with nasal cavity dimension assessment. *Translational Psychiatry*, *5*(7), e602–e602. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.93>
- Quintana, Daniel S., Lischke, A., Grace, S., Scheele, D., Ma, Y., & Becker, B. (2020). Advances in the field of intranasal oxytocin research: lessons learned and future directions for clinical research. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00864-7>
- Rakover, I. S., Zabavnik, N., Kopel, R., Paz-Rozner, M., & Solomon, B. (2010). Antigen-specific therapy of EAE via intranasal delivery of filamentous phage displaying a myelin immunodominant epitope. *Journal of Neuroimmunology*, *225*(1–2), 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.04.014>
- Ramo-Tello, C., Grau-López, L., Tintoré, M., Rovira, a, Ramió i Torrenta, L., Brieva, L., Cano, a, Carmona, O., Saiz, a, Torres, F., Giner, P., Nos, C., Massuet, a, Montalbán, X., Martínez-Cáceres, E., & Costa, J. (2014). A randomized clinical trial of oral versus intravenous methylprednisolone for relapse of MS. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, *20*(6), 717–725. <https://doi.org/10.1177/1352458513508835>

- Rao, A. S., Gelaye, B., Kurth, T., Dash, P. D., Nitchie, H., & Peterlin, B. L. (2016). A Randomized Trial of Ketorolac vs Sumatriptan vs Placebo Nasal Spray (KSPN) for Acute Migraine. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, *56*(2), 331–340. <https://doi.org/10.1111/head.12767>
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *22*(3), 659–661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>
- Repovic, P., & Lublin, F. D. (2011). Treatment of Multiple Sclerosis Exacerbations. *Neurologic Clinics*, *29*(2), 389–400. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2010.12.012>
- Reynolds, R., Roncaroli, F., Nicholas, R., Radotra, B., Gveric, D., & Howell, O. (2011). The neuropathological basis of clinical progression in multiple sclerosis. *Acta Neuropathologica*, *122*(2), 155–170. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0840-0>
- Rivera, V. M., & Macias, M. A. (2017). Access and barriers to MS care in Latin America. *Multiple Sclerosis Journal – Experimental, Translational and Clinical*, *3*(1), 205521731770066. <https://doi.org/10.1177/2055217317700668>
- Rocchelli, B., Poloni, M., Mazzarello, P., Piccolo, G., Delodovici, M., & Pinelli, P. (1982). Intrathecal Methylprednisolone acetate in multiple sclerosis treatment: Effect on the blood-CSF barrier and on the intrathecal IgG production. *The Italian Journal of Neurological Sciences*, *3*(2), 119–126. <https://doi.org/10.1007/BF02043943>
- Ross, T. M., Martinez, P. M., Renner, J. C., Thorne, R. G., Hanson, L. R., & Frey, W. H. (2004). Intranasal administration of interferon beta bypasses the blood-brain barrier to target the central nervous system and cervical lymph nodes: A non-invasive treatment strategy for multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, *151*(1–2), 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.02.011>
- Sadaie, M. R., Samiy, N., Rosenbaum, R. E., & Thomas, G. A. (2014). Steroids Impact on Myelin Repair, Neurogenesis and Visual Pathway in Multiple Sclerosis: Preclinical Perspectives. *J Exp Clin Neu Sci*, *7*(1), 13–20. <https://doi.org/10.13183/jecns.v1i1.9>
- Sahraian, M. A., Yadegari, S., Azarpajouh, R., & Forughipour, M. (2012). Avascular necrosis of the femoral head in multiple sclerosis: report of five patients. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, *33*(6), 1443–1446. <https://doi.org/10.1007/s10072-011-0914-8>
- Salvador, E., Shityakov, S., & Förster, C. (2014). Glucocorticoids and endothelial cell barrier function. *Cell and Tissue Research*, *355*(3), 597–605. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1762-z>
- Sambucci, M., Gargano, F., Guerrera, G., Battistini, L., & Borsellino, G. (2019). One, No One, and One Hundred Thousand: T Regulatory Cells' Multiple Identities in Neuroimmunity. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2947. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02947>
- Samoliński, B., Nowicka, A., Wojas, O., Lipiec, A., Krzych-Fałta, E., & Tomaszewska, A. (2014). Intranasal glucocorticosteroids - Not only in allergic rhinitis in the 40th anniversary of intranasal glucocorticosteroids' introduction. *Otolaryngologia Polska*, *68*(2), 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.otpol.2013.12.003>
- Sarkar, M. A. (1992). Drug Metabolism in the Nasal Mucosa. *Pharmaceutical Research*, *9*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1023/A:1018911206646>
- Sarraf, P., Frederich, R. C., Turner, E. M., Ma, G., Jaskowiak, N. T., Rivet, D. J., Flier, J. S., Lowell, B. B., Fraker, D. L., & Alexander, H. R. (1997). Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *The Journal of Experimental Medicine*, *185*(1), 171–175. <https://doi.org/10.1084/jem.185.1.171>
- Sastre, J., & Mosges, R. (2012). Local and systemic safety of intranasal corticosteroids. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, *22*(1), 1–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22448448>
- Scheschowitsch, K., Leite, J. A., & Assreuy, J. (2017). New Insights in Glucocorticoid Receptor Signaling-More Than Just a Ligand-Binding Receptor. *Frontiers in Endocrinology*, *8*, 16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00016>
- Schweingruber, N., Reichardt, S. D., Lühder, F., & Reichardt, H. M. (2012). Mechanisms of Glucocorticoids in the Control of Neuroinflammation. *Journal of Neuroendocrinology*, *24*(1), 174–182. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02161.x>
- Segunda Comisión de Trabajo de la Comisión Permanente del Honorable Congreso de la Unión. (2015). *DICTAMEN CON PUNTO DE ACUERDO EN MATERIA DE ATENCIÓN DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE*. [https://www.senado.gob.mx/comisiones/segunda\\_co](https://www.senado.gob.mx/comisiones/segunda_co)

mision/docs/dictamen7\_160615.pdf

- Sellebjerg, F., Barnes, D., Filippini, G., Midgard, R., Montalban, X., Rieckmann, P., Selmaj, K., Visser, L. H., & Soelberg Sørensen, P. (2010). Acute Relapses of Multiple Sclerosis. In N. E. Nilhus, M. P. Barnes, & M. Brainin (Eds.), *European Handbook of Neurological Management* (2nd ed., Vol. 1, pp. 411–419). Wiley-Blackwell.  
<https://doi.org/10.1002/9781444328394.ch27>
- Selvaraj, K., Gowthamarajan, K., & Karri, V. V. S. R. (2017). Nose to brain transport pathways an overview: potential of nanostructured lipid carriers in nose to brain targeting. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 1–8.  
<https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1420073>
- Serralheiro, A., Alves, G., Fortuna, A., & Falcão, A. (2014). Intranasal administration of carbamazepine to mice: A direct delivery pathway for brain targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.04.019>
- Shaygannejad, V., Ashtari, F., Alinaghian, M., Norouzi, R., Salari, M., & Fatehi, F. (2013). Short-Term Safety of Pulse Steroid Therapy in Multiple Sclerosis Relapses. *Clinical Neuropharmacology*, 36(1), 1–3.  
<https://doi.org/10.1097/WNF.0b013e3182764f91>
- Shimizu, S. (2004). Routes of Administration. In H. J. Hedrich & G. Bullock (Eds.), *The Laboratory Mouse* (pp. 527–542). Academic Press.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012336425-8/50085-6>
- Sie, C., Korn, T., & Mitsdoerffer, M. (2014). Th17 cells in central nervous system autoimmunity. *Experimental Neurology*, 262 Pt A, 18–27.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.03.009>
- Simmons, S. B., Pierson, E. R., Lee, S. Y., & Goverman, J. M. (2013). Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. *Trends in Immunology*, 34(8), 410–422. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.04.006>
- Sintzel, M. B., Rametta, M., & Reder, A. T. (2018). Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurology and Therapy*, 7(1), 59–85.  
<https://doi.org/10.1007/s40120-017-0086-4>
- Sosa, R. a., Murphey, C., Robinson, R. R., & Forsthuber, T. G. (2015). IFN- $\gamma$  ameliorates autoimmune encephalomyelitis by limiting myelin lipid peroxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 201505955.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1505955112>

- Stein, S. W., & Thiel, C. G. (2017). The History of Therapeutic Aerosols: A Chronological Review. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 30(1), 20–41. <https://doi.org/10.1089/jamp.2016.1297>
- Steinman, L. (2014). Immunology of Relapse and Remission in Multiple Sclerosis. *Annual Review of Immunology*, 32(1), 257–281.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120227>
- Stromnes, I. M., & Goverman, J. M. (2006). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols*, 1(4), 1810–1819.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.285>
- Suman, J. D. (2013). Current understanding of nasal morphology and physiology as a drug delivery target. *Drug Delivery and Translational Research*, 3(1), 4–15.  
<https://doi.org/10.1007/s13346-012-0121-z>
- Sun, D., & Jakobs, T. C. (2012). Structural remodeling of astrocytes in the injured CNS. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 18(6), 567–588.  
<https://doi.org/10.1177/1073858411423441>
- Takahashi, K., Asano, T., Higashiyama, Y., Koyano, S., Doi, H., Takeuchi, H., & Tanaka, F. (2018). Two cases of anaphylactic shock by methylprednisolone in neuromyelitis optica. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 24(11), 1514–1516.  
<https://doi.org/10.1177/1352458518763099>
- Tarlinton, R., Khaibullin, T., Granatov, E., Martynova, E., Rizvanov, A., & Khaiboullina, S. (2019). The Interaction between Viral and Environmental Risk Factors in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 303.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20020303>
- Teste, I. S., Tamos, Y. M., Cruz, Y. R., Cernada, A. M., Rodríguez, J. C., Martínez, N. S., Antich, R. M. C., González-Quevedo, A., & Rodríguez, J. C. G. (2012). Dose Effect Evaluation and Therapeutic Window of the Neuro-EPO Nasal Application for the Treatment of the Focal Ischemia Model in the Mongolian Gerbil. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–12.  
<https://doi.org/10.1100/2012/607498>
- Thorne, R. G., Hanson, L. R., Ross, T. M., Tung, D., & Frey, W. H. (2008). Delivery of interferon-beta to the monkey nervous system following intranasal administration. *Neuroscience*, 152(3), 785–797.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.013>
- Thrower, B. W. (2009). Relapse Management in Multiple Sclerosis. *Neurologist*, 15(1), 1–5.

- <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e31817acf1a>
- Tietz, S. M., Zwahlen, M., Haghayegh Jahromi, N., Baden, P., Lazarevic, I., Enzmann, G., & Engelhardt, B. (2016). Refined clinical scoring in comparative EAE studies does not enhance the chance to observe statistically significant differences. *European Journal of Immunology*, *46*(10), 2481–2483. <https://doi.org/10.1002/eji.201546272>
- Tischner, D., & Reichardt, H. M. (2007). Glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *275*(1–2), 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.03.007>
- Torkildsen, Ø., Myhr, K.-M., & Bø, L. (2016). Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications. *European Journal of Neurology*, *23 Suppl 1*, 18–27. <https://doi.org/10.1111/ene.12883>
- Touitou, E., & Karussis, D. (2008). *Nasal Administration of Dexamethasone for Multiple Sclerosis (MS) Treatment*. ClinicalTrials.Gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00674141>
- Tsutsui, S., Vergote, D., Shariat, N., Warren, K., Ferguson, S. S. G., & Power, C. (2008). Glucocorticoids regulate innate immunity in a model of multiple sclerosis: reciprocal interactions between the A1 adenosine receptor and  $\beta$ -arrestin-1 in monocytoid cells. *The FASEB Journal*, *22*(3), 786–796. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9002com>
- Tungland, B. (2018). Gut Microbiota in Brain Development and Disorders of the CNS: Therapeutic Strategies Involving Dietary Modification, Pro- and Prebiotic Intervention, and Fecal Microbiota Transplantation (FMT) Therapy. In *Human Microbiota in Health and Disease* (pp. 517–594). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814649-1.00012-0>
- Ullah, I., Chung, K., Beloor, J., Lee, S.-K., & Kumar, P. (2019). A Positioning Device for the Placement of Mice During Intranasal siRNA Delivery to the Central Nervous System. *Journal of Visualized Experiments*, *150*. <https://doi.org/10.3791/59201>
- Van Dyken, P., & Lacoste, B. (2018). Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood–Brain Barrier. *Frontiers in Neuroscience*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00930>
- van Noort, J. M., & Amor, S. (2013). Pathophysiology of multiple sclerosis: a controversial new perspective. In *Personalized Management of Multiple Sclerosis* (pp. 22–34). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/ebo.12.277>
- van Woensel, M., Wauthoz, N., Rosière, R., Amighi, K., Mathieu, V., Lefranc, F., van Gool, S. W., & de Vleeschouwer, S. (2013). Formulations for Intranasal Delivery of Pharmacological Agents to Combat Brain Disease: A New Opportunity to Tackle GBM? *Cancers*, *5*(3), 1020–1048. <https://doi.org/10.3390/cancers5031020>
- Vanderbilt University. (n.d.). *Power and Sample Size*. Retrieved June 6, 2017, from <https://vbiostatps.app.vumc.org/ps/t-test/ind/1>
- Vasheghani-Farahani, A., Sahraian, M. A., Darabi, L., Aghsaie, A., & Minagar, A. (2011). Incidence of various cardiac arrhythmias and conduction disturbances due to high dose intravenous methylprednisolone in patients with multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, *309*(1–2), 75–78. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.07.018>
- Verkerk, M. M., Bhatia, D., Rimmer, J., Earls, P., Sacks, R., & Harvey, R. J. (2015). Intranasal steroids and the myth of mucosal atrophy: a systematic review of original histological assessments. *American Journal of Rhinology & Allergy*, *29*(1), 3–18. <https://doi.org/10.2500/ajra.2015.29.4111>
- Veronesi, M. C., Alhamami, M., Miedema, S. B., Yun, Y., Ruiz-Cardozo, M., & Vannier, M. W. (2020). Imaging of intranasal drug delivery to the brain. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *10*(1), 1–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32211216>
- Vollmer, T. (2007). The natural history of relapses in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, *256 Suppl*, S5-13. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.01.065>
- Wagner, C. A., Roqué, P. J., & Goverman, J. M. (2020). Pathogenic T cell cytokines in multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*, *217*(1). <https://doi.org/10.1084/jem.20190460>
- Wang, J. J. J., Wang, J. J. J., Wang, J. J. J., Yang, B., Weng, Q., & He, Q. (2019). Targeting Microglia and Macrophages: A Potential Treatment Strategy for Multiple Sclerosis. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 286. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00286>
- Wang, X., Zhu, Y., Ni, D., Lv, W., Gao, Z., & Qi, F. (2017). Intranasal application of glucocorticoid alleviates olfactory dysfunction in mice with allergic rhinitis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *14*(5), 3971–3978. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5042>
- Wang, Z., Xie, J., Wu, C., & Xiao, G. (2019). Correlation Between Smoking and Passive Smoking with Multiple Sclerosis and the Underlying Molecular Mechanisms.

*Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 25, 893–902. <https://doi.org/10.12659/MSM.912863>

Wasko, N. J., Nichols, F., & Clark, R. B. (2020). Multiple sclerosis, the microbiome, TLR2, and the hygiene hypothesis. *Autoimmunity Reviews*, 19(1), 102430. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102430>

Way, S. W., Podojil, J. R., Clayton, B. L., Zaremba, A., Collins, T. L., Kunjamma, R. B., Robinson, A. P., Brugarolas, P., Miller, R. H., Miller, S. D., & Popko, B. (2015). Pharmaceutical integrated stress response enhancement protects oligodendrocytes and provides a potential multiple sclerosis therapeutic. *Nature Communications*, 6(1), 6532. <https://doi.org/10.1038/ncomms7532>

Weber, M. S., Benkhoucha, M., Lehmann-Horn, K., Hertenberg, D., Sellner, J., Santiago-Raber, M.-L., Chofflon, M., Hemmer, B., Zamvil, S. S., & Lalive, P. H. (2010). Repetitive Pertussis Toxin Promotes Development of Regulatory T Cells and Prevents Central Nervous System Autoimmune Disease. *PLoS ONE*, 5(12), e16009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016009>

Wei, Y., Zhang, C., Miao, X., Xing, F., Liu, X., Zhao, H., Zhan, X., & Han, D. (2009). Effects of glucocorticoid on cyclic nucleotide-gated channels of olfactory receptor neurons. *Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery = Le Journal d'oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie Cervico-Faciale*, 38(1), 90–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19344617>

Wei, Z., Deng, X., Hong, M., Su, Q., Liu, A., Huang, Y., Yu, Q., & Peng, Z. (2015). Icariin has synergistic effects with methylprednisolone to ameliorate EAE via modulating HPA function, promoting anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(11), 20188–20197. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26884931>

Wekerle, H. (2017). B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity*, 50(1), 57–60. <https://doi.org/10.1080/08916934.2017.1281914>

Wendel-Haga, M., & Celius, E. G. (2017). Is the hygiene hypothesis relevant for the risk of multiple sclerosis? *Acta Neurologica Scandinavica*, 136, 26–30. <https://doi.org/10.1111/ane.12844>

Whirlledge, S., & DeFranco, D. B. (2017). Glucocorticoid Signaling in Health and Disease: Insights from Tissue-Specific GR Knockout Mice. *Endocrinology*.

<https://doi.org/10.1210/en.2017-00728>

Wilson, J. A., & Islam, O. (2019). *Brain Imaging in Multiple Sclerosis*. Medscape.

Witt, K. A., & Sandoval, K. E. (2014). Steroids and the Blood–Brain Barrier. In Thomas P. Davis (Ed.), *Advances in Pharmacology* (Vol. 71, pp. 361–390). <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.06.018>

Wust, S., van den Brandt, J., Reichardt, H. M., & Luhder, F. (2012). Preventive treatment with methylprednisolone paradoxically exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int J Endocrinol*, 2012, 417017. <https://doi.org/10.1155/2012/417017>

Wüst, S., van den Brandt, J., Tischner, D., Kleiman, A., Tuckermann, J. P., Gold, R., Lühder, F., & Reichardt, H. M. (2008). Peripheral T cells are the therapeutic targets of glucocorticoids in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(7), 8434–8443.

Yadav, S. K., Mindur, J. E., Ito, K., & Dhib-Jalbut, S. (2015). Advances in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Current Opinion in Neurology*, 28(3), 206–219. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000205>

Yalkowsky, S., & He, Y. (2003). *Handbook of Aqueous Solubility Data*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203490396>

Yamasaki, R. (2014). Distinct roles of microglia and monocytes in central nervous system inflammation and degeneration. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, 5, 41–48. <https://doi.org/10.1111/cen3.12162>

Yan, Y., Yu, J., Gao, Y., Kumar, G., Guo, M., Zhao, Y., Fang, Q., Zhang, H., Yu, J., Jiang, Y., Zhang, H.-T., & Ma, C.-G. (2019). Therapeutic potentials of the Rho kinase inhibitor Fasudil in experimental autoimmune encephalomyelitis and the related mechanisms. *Metabolic Brain Disease*, 34(2), 377–384. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0355-7>

Yang, M., & Crawley, J. N. (2009). Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Current Protocols in Neuroscience, Chapter 8*, Unit 8.24. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0824s48>

Youssef, A. E. H., Dief, A. E., El Azhary, N. M., Abdelmonsif, D. A., & El-Fetiany, O. S. (2019). LINGO-1 siRNA nanoparticles promote central remyelination in ethidium bromide-induced demyelination in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 75(1), 89–99.

<https://doi.org/10.1007/s13105-018-00660-6>

Ysrraelit, M. C., & Correale, J. (2019). Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology*, *156*(1), 9–22. <https://doi.org/10.1111/imm.13004>

Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., Mancardi, G., & Uccelli, A. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, *106*(5), 1755–1761. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1496>

Zen, M., Canova, M., Campana, C., Bettio, S., Nalotto, L., Rampudda, M., Ramonda, R., Iaccarino, L., & Doria, A. (2011). The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmunity Reviews*, *10*(6), 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.11.009>

Zhang, X.-M., Lund, H., Mia, S., Parsa, R., & Harris, R. A.

(2014). Adoptive transfer of cytokine-induced immunomodulatory adult microglia attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in DBA/1 mice. *Glia*, *62*(5), 804–817.

<https://doi.org/10.1002/glia.22643>

Zhao, C. B., Coons, S. W., Cui, M., Shi, F. D., Vollmer, T. L., Ma, C. Y., Kuniyoshi, S. M., & Shi, J. (2008). A new EAE model of brain demyelination induced by intracerebroventricular pertussis toxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *370*(1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.161>

Zhuang, X., Xiang, X., Grizzle, W., Sun, D., Zhang, S., Axtell, R. C., Ju, S., Mu, J., Zhang, L., Steinman, L., Miller, D., & Zhang, H.-G. (2011). Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *19*(10), 1769–1779. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.164>

## 10. Lista de anexos

I	Términos de Búsqueda <i>Pubmed</i> Tabla 1.
II	Escala EDSS
III	Escala para la evaluación de grados de EAE
IV	Solicitud patente al IMPI
V	Patente registrada a nivel internacional en la base de datos de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (WIPO)
VI	Carta de aprobación del Comité de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
VII	Carta de aprobación del Comité de Ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
VIII	Artículos publicados durante el desarrollo de este proyecto

- EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis (13,348), experimental allergic encephalomyelitis (3,195)
- TMEV: TMEV "multiple sclerosis"
- MHV: MHV "multiple sclerosis"
- SFV: Semliki "multiple sclerosis"
- Cuprizona: Cuprizone "multiple sclerosis"
- Lisolectina y bromuro de etidio: Ethidium bromide demyelination (187)  
lysolecithin demyelination (413)
- Transgénicos y cepas especiales: "transgenic mice" "multiple sclerosis"

**SISTEMAS FUNCIONALES (FS)****1. Función piramidal**

- 0. Normal.
- 1. Signos anormales sin discapacidad.
- 2. Discapacidad mínima.
- 3. Paraparesia o hemiparesia leve o moderada, monoparesia grave.
- 4. Paraparesia o hemiparesia marcada, tetraparesia moderada o monoplejía.
- 5. Paraplejía, hemiplejía o tetraparesia marcada.
- 6. Tetraplejía.
- V. Desconocida.

**2. Función cerebelosa**

- 0. Normal.
- 1. Signos anormales sin discapacidad.
- 2. Ataxia leve.
- 3. Ataxia moderada del tronco o las extremidades.
- 4. Ataxia grave de todas las extremidades.
- 5. Discapacidad para realizar movimientos coordinados debido a la ataxia.
- V. Desconocida.
- X. Se añade a cada cifra cuando la presencia de debilidad (función piramidal de grado 3 o mayor) dificulta el examen.

**3. Función del tronco cerebral**

- 0. Normal.
- 1. Presencia de signos.
- 2. Nistagmo moderado u otra discapacidad leve.
- 3. Nistagmo grave, debilidad extraocular marcada o discapacidad moderada relacionada con otros pares craneales.
- 4. Disartria marcada u otra discapacidad significativa.
- 5. Discapacidad para deglutir o hablar.
- V. Desconocida.

**4. Función sensitiva**

- 0. Normal.
- 1. Disminución de la sensibilidad vibratoria y del reconocimiento táctil de figuras sobre la piel en 1 o 2 extremidades.
- 2. Ligera disminución de la sensibilidad táctil, dolorosa o postural y/o disminución moderada de la sensibilidad vibratoria en 1 o 2 extremidades o disminución de la sensibilidad vibratoria exclusivamente en 3 o 4 extremidades.

3. Disminución moderada de la sensibilidad táctil, dolorosa o postural y/o pérdida de la sensibilidad vibratoria principalmente en 1 ó 2 extremidades o ligera disminución de la sensibilidad táctil o dolorosa y/o disminución moderada de todas las pruebas propioceptivas en 3 o 4 extremidades.
4. Disminución marcada de la sensibilidad táctil o dolorosa, o pérdida de la propiocepción, solas o asociadas, en 1 o 2 extremidades o disminución moderada de la sensibilidad táctil o dolorosa y/o disminución importante de la sensibilidad propioceptiva en más de 2 extremidades.
5. Pérdida de la sensibilidad en 1 o 2 extremidades como característica predominante o disminución moderada de la sensibilidad táctil o dolorosa y/o pérdida de la propiocepción en la mayor parte del cuerpo por debajo de la cabeza.
6. Pérdida de la sensibilidad por debajo de la cabeza como característica predominante.
- V. Desconocida.

### **5. Función visual**

0. Normal.
1. Escotoma con agudeza visual corregida mejor que 20/30.
2. Escotoma con agudeza visual máxima corregida de 20/30-20/59 en el ojo peor.
3. Escotoma de gran tamaño en el ojo, peor, ó disminución moderada en los campos, pero con una agudeza visual máxima (corregida) de 20/60 a 20/99.
4. Disminución significativa del campo visual con una agudeza visual máxima corregida de 20/100-20/200 en el ojo peor; grado 3 más agudeza visual de 20/60 o menos en el ojo mejor.
5. Agudeza visual máxima corregida menor de 20/200 en el ojo peor; grado 4 más agudeza visual máxima de 20/60 o menos en el ojo mejor.
6. Grado 5 más agudeza visual máxima de 20/60 o menos en el ojo mejor.
- V. Desconocida.
- X. Se añade a los grados 0-6 cuando existe palidez temporal.

### **6. Función intestinal y vesical**

0. Normal.
1. Goteo al inicio de la micción, urgencia miccional o retención urinaria de grado leve.
2. Goteo inicial, urgencia y retención intestinal o urinaria de grado moderado o incontinencia urinaria infrecuente.
3. Incontinencia urinaria frecuente.
4. Necesidad de sondaje prácticamente constante.
5. Pérdida de la función vesical.
6. Pérdida de la función vesical e intestinal.
- V. Desconocida.

### **7. Función cerebral (o cognitiva)**

0. Normal.
1. Alteración del estado de ánimo (sin afectar a la puntuación de la EDSS).

- 2. Deterioro leve de la actividad mental.
- 3. Deterioro moderado de la actividad mental.
- 4. Deterioro marcado de la actividad mental (síndrome cerebral crónico moderado).
- 5. Demencia o síndrome cerebral crónico grave o incompetente.
- V. Desconocida.

### **8. Otras funciones**

- 0. Ninguna.
- 1. Cualquier otro signo neurológico atribuible a la NMO (especifíquese).
- V. Desconocida.

### EDSS

0= examen neurológico normal (todos los ítems de FS son de cero).

1.0= ninguna incapacidad pero signos mínimos solamente en un apartado de la FS.

1.5= ninguna incapacidad, pero signos mínimos en más de un apartado de la FS.

2.0= incapacidad mínima en un apartado de la FS (al menos uno con puntuación de 2).

2.5= incapacidad mínima (dos apartados de la FS puntuando 2).

3.0= incapacidad moderada en un FS (un FS puntúa 3 pero los otros entre 0 y 1). El paciente deambula sin dificultad.

3.5= deambula sin limitaciones, pero tiene moderada incapacidad en una FS (una tiene un grado 3) o bien tiene una o dos FS que puntúan un grado 2 o bien dos FS puntúan un grado 3 o bien 5 FS tienen un grado 2 aunque el resto estén entre 0 y 1.

4.0= deambula sin limitaciones, es autosuficiente, y se mueve de un lado para otro alrededor de 12 horas por día pese a una incapacidad relativamente importante de acuerdo con un grado 4 en una FS (las restantes entre 0 y 1). Capaz de caminar sin ayuda o descanso unos 500 metros.

4.5= deambula plenamente sin ayuda, va de un lado para otro gran parte del día, capaz de trabajar un día completo, pero tiene ciertas limitaciones para una actividad plena, o bien requiere un mínimo de ayuda. El paciente tiene una incapacidad relativamente importante, por lo general con un apartado de FS de

grado 4 (los restantes entre 0 y 1) o bien una combinación alta de los demás apartados. Es capaz de caminar sin ayuda ni descanso alrededor de 300 metros.

5.0= camina sin ayuda o descanso en torno a unos 200 metros; su incapacidad es suficiente para afectarle en funciones de la vida diaria, v.g. trabajar todo el día sin medidas especiales. Los equivalentes FS habituales son uno de grado 5 solamente, los otros entre 0 y 1 o bien combinaciones de grados inferiores por lo general superiores a un grado 4.

5.5= camina sin ayuda o descanso por espacio de unos 100 metros; la incapacidad es lo suficientemente grave como para impedirle plenamente las actividades de la vida diaria. El equivalente FS habitual es de un solo grado 5, otros de 0 a 1, o bien una combinación de grados inferiores por encima del nivel 4.

6.0= requiere ayuda constante, bien unilateral o de forma intermitente (bastón, muleta o abrazadera) para caminar en torno a 100 metros, sin o con descanso. Los equivalentes FS representan combinaciones con más de dos FS de grado 3.

6.5= ayuda bilateral constante (bastones, muletas o abrazaderas) para caminar unos 20 metros sin descanso. El FS habitual equivale a combinaciones con más de dos FS de grado 3+.

7.0= incapaz de caminar más de unos pasos, incluso con ayuda, básicamente confinado a silla de ruedas y posibilidad de trasladarse de ésta a otro lugar, o puede manejarse para ir al lavabo durante 12 horas al día. El equivalente FS habitual son combinaciones de dos o más de un FS de grado 4+. Muy raramente síndrome piramidal grado 5 solamente.

7.5= incapaz de caminar más de unos pasos. Limitado a silla de ruedas. Puede necesitar ayuda para salir de ella. No puede impulsarse en una silla normal pudiendo requerir un vehículo motorizado. El equivalente FS habitual son combinaciones con más de un FS de grado 4+.

8.0= básicamente limitado a la cama o a una silla, aunque puede dar alguna vuelta en la silla de ruedas, puede mantenerse fuera de la cama gran parte del día y es capaz de realizar gran parte de las actividades de la vida diaria. Generalmente usa con eficacia los brazos. El equivalente FS habitual es una combinación de varios sistemas en grado 4.

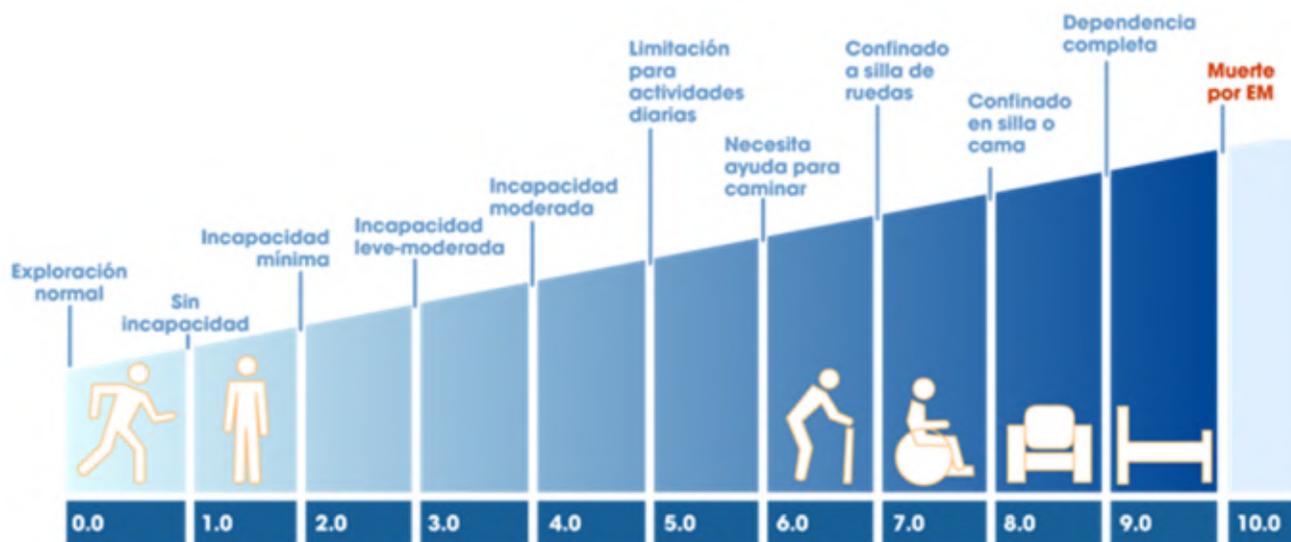
8.5= básicamente confinado en cama la mayor parte del día, tiene un cierto uso útil de uno o ambos brazos, capaz de realizar algunas actividades propias. El FS habitual equivale a combinaciones diversas generalmente de un grado 4+.

9.0= paciente inválido en cama, puede comunicarse y comer. El equivalente FS habitual son combinaciones de un grado 4+ para la mayor parte de los apartados.

9.5= totalmente inválido en cama, incapaz de comunicarse o bien comer o tragar. El equivalente FS habitualmente son combinaciones de casi todas las funciones en grado 4+.

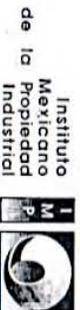
10= muerte por esclerosis múltiple.

**Mc Donald et al, Ann Neurol 2001; 50: 121-127**



Anexo III Escala de Evaluación EAE

Grado	Signos clínicos	Comentarios
0	Sin signos clínicos	Camina normal, cola se mueve, tiene reflejos para no dejarla caer y enrollarla.
1	Cola parcialmente débil	Camina normal, punta de la cola arrastra.
2	Cola paralizada	Cola arrastra, camina normal.
3	Paresis extremidades posteriores, movimiento descoordinado.	Camina con la cadera , cola arrastra.
4	Una extremidad posterior paralizada.	Camina sin coordinación, arrastra una pata trasera y cola.
5	Ambas extremidades posteriores paralizadas.	Arrastra la cola y ambas patas traseras.
6	Ambas extremidades posteriores paralizadas y debilidad extremidades anteriores.	Arrastra cola, patas traseras y una pata delantera no puede mantenerse estirada o hay dificultad para jalar el resto del cuerpo.
7	Ambas extremidades posteriores paralizadas y una extremidades anterior paralizada.	El ratón no se mueve pero muestra fuerza en una pata delantera al estimular. Cola arrastra.
8	Ambas extremidades posteriores paralizadas y ambas extremidades posteriores paralizadas.	El ratón no se mueve, ninguna pata responde a estímulos. La cola arrastra.
9	Moribundo	Sin movimiento, respiración alterada.
10	Muerte	



**INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL**  
 Dirección Divisiva de Patentes

Solicitud de Patente  
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad  
 Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cual:  Modelo Industrial  Dibujo Industrial

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Ciudad Regional del IMPI  
 Sello  
 Folio de entrada  
 Fecha y hora de recepción

Solicitud: **MX/a/2017/005431**  
 Expediente: **25/ISR/2017** Hora: **11:23:12**  
 Folio: **MX/E/2017/030198** **221470**  


Antes de llenar la forma leer las consideraciones generales al reverso

**I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)**

El solicitante es el inventor  El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s): **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
 2) Nacionalidad (es): **MEXICANA**  
 3) Domicilio: calle, número, colonia y código postal: **9° PISO DE LA TORRE DE RECTORIA SM, CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 04510**  
 Poblador, Estado y País: **CONVOYACAN, CIUDAD DE MEXICO, MEXICO.**  
 4) Teléfono (clave): **(59) 56 22 63 29 AL 31** 5) Fax (clave): **(55) 56 65 46 44**

**II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)**

6) Nombre (s): **EDDA LYDIA SCUITTO CONDE, GABRIELA MENESES RUIZ, GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZALEZ, HUGO OSCAR BEREZDINSKY, AGNES ODILE MAREE FLEURY, DUNA RASSY KURI, MARCEL ALBERTO BAUTISTA DOMS, JOSE ALEJANDRO ESPINOSA CERON, IVAN NICOLAS PEREZ OSORIODE Y GOHAR GEVORGYAN MARKOSYAN**  
 7) Nacionalidad (es): **MEXICANA, MEXICANA, ARGENTINA, FRANCESA, MEXICANA, MEXICANA, MEXICANA Y MEXICANA**  
 8) Domicilio: calle, número, colonia y código postal: **PRIVADA DE LA SELVA No. 109, LOMAS DE LA SELVA, C.P. 62270.**  
 Poblador, Estado y País: **CUERNAVACA, MORELOS, MEXICO**  
 9) Teléfono (clave): **10) Fax (clave):**

**III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO (S)**

11) Nombre (s): **MARTHA FIGUEROA PEREZ** 12) RGP-DDAJ-14782  
 13) Domicilio: calle, número, colonia y código postal: **3er PISO DEL EDIFICIO 'B' DE LAS OFICINAS ADMINISTRATIVAS EXTERIORES DE LA ZONA CULTURAL DE CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 04510.**  
 Poblador, Estado y País: **CONVOYACAN, CIUDAD DE MEXICO, MEXICO.** 14) Teléfono (clave): **(55) 56 22 63 29 AL 31** 15) Fax (clave): **(55) 56 65 46 44**  
 16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones:  
**DANIEL OJESTO MARTINEZ PORCAYO, ROCIO JUÁREZ VÁZQUEZ Y RUBEN GONZALEZ GALINDO**

**"USO DE ESTEROIDES ADMINISTRADOS POR VIA INTRANASAL PARA EL CONTROL DE LA NEUROINFLAMACION ASOCIADA A DIFERENTES NEUROPATOLOGIAS"**

17) Denominación o Título de la Invencción:

18) Fecha de divulgación previa

19) Clasificación Internacional

uso exclusivo del IMPI

20) Divisiva de la solicitud

21) Fecha de presentación

22) Prioridad Reclamada:

Numero	Figura jurídica	Fecha de presentación	País	Dia	Mes	Año

Lista de verificación (uso interno)

No. Hojas	No. Hojas
X 1	X 10
X 29	
X 5	
X 1	
X 1	47
TOTAL DE HOJAS	

Observaciones:  
 Se anexa hoja de descuento

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

LIC MARTHA FIGUEROA PEREZ CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 20 DE ABRIL DE 2017  
 Nombre y Firma del Solicitante o su Apoderado Lugar y fecha

# Anexo V Patente en sitio web de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual

WIPO IP PORTAL MENU PATENTSCOPE Covid-19 Update X HELP ENGLISH LOGIN WIPO

Feedback Search Browse Tools Settings

## 1. MX2017005431 - USO DE ESTEROIDES ADMINISTRADOS POR VÍA INTRANASAL PARA EL CONTROL DE LA NEUROINFLAMACIÓN ASOCIADA A DIFERENTES NEUROPATOLOGIAS.

National Biblio. Data

PermaLink Machine translation

<b>Office</b> Mexico	<b>Title</b> [EN] USO DE ESTEROIDES ADMINISTRADOS POR VÍA INTRANASAL PARA EL CONTROL DE LA NEUROINFLAMACIÓN ASOCIADA A DIFERENTES NEUROPATOLOGIAS. [ES] USO DE ESTEROIDES ADMINISTRADOS POR VÍA INTRANASAL PARA EL CONTROL DE LA NEUROINFLAMACIÓN ASOCIADA A DIFERENTES NEUROPATOLOGIAS.
<b>Application Number</b> 2017005431	
<b>Application Date</b> 26.04.2017	
<b>Publication Number</b> 2017005431	
<b>Publication Date</b> 09.11.2018	
<b>Publication Kind</b> A	
<b>IPC</b> A61K 31/573 20060101AFI20060101BHMX	
<b>Applicants</b> UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.	
<b>Inventors</b> Gladis Del Carmen FRAGOSO GONZÁLEZ Edda Lydia SCIUTTO CONDE Gabriela MENESES RUIZ Hugo Oscar BESEDOVSKY Agnès Odile Marie FLEURY Dunja RASSY KJUR Marcel Alberto BAUTISTA DONIS José Alejandro ESPINOSA CERÓN Gohar GEVORGYAN MARKOSYAN Iván Nicolás PÉREZ OSORIO	<b>Abstract</b> [EN] The present invention relates to the use of steroid derivatives administered intranasal for the control of neuroinflammatory processes in subjects having a neurodegenerative, autoimmune, infectious, tumor, and vascular, toxic, septic or traumatic disorder. Said invention is useful for the treatment of neuroinflammatory diseases such as multiple sclerosis, cerebrovascular event, Parkinson's disease and neuropathologies in whose pathogenesis neuroinflammation is an essential component. [ES] La presente se refiere al uso de derivados de esteroides administrados por vía intranasal para el control de procesos neuroinflamatorios en sujetos que tienen un trastorno neurodegenerativo, autoinmune, infeccioso, tumoral, vascular, tóxico, séptico o traumático, preferentemente la invención es útil para el tratamiento de enfermedades neuroinflamatorias como esclerosis múltiple, evento cerebrovascular, enfermedad de Parkinson y neuropatologías en cuya patogenia la neuroinflamación es un componente esencial.

↑



Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía  
Manuel Velasco Suárez  
"2017 Año del Centenario de la Constitución"



México, D. F. a 14 de julio de 2017  
OFICIO N° DIC/243/17

**DRA. TERESA CORONA VÁZQUEZ**  
**INVESTIGADORA PRINCIPAL**  
**P R E S E N T E**

La presente es para informarle que su protocolo de investigación No. 137/16 intitulado: "EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DE METILPREDNISOLONA INTRANASAL PARA EL TRATAMIENTO DE RECAIDAS DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE REMITENTE RECURRENTE", ha sido **APROBADO** por el Comité Científico. No obstante, el desarrollo del protocolo queda sujeto a la aprobación por el Comité de Ética en Investigación.

**ATENTAMENTE**

**DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ**  
**DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN**

C.c.p. Dr. Daniel San Juan Orta.- Jefe del Depto. de Investigación Clínica

Insurgentes Sur # 3877 Col. La Fama 14269 México, D.F. Tel. (55) 56063822

[www.innn.salud.gob.mx](http://www.innn.salud.gob.mx)



*Intranasal Methylprednisolone Effectively Reduces Neuroinflammation in Mice With Experimental Autoimmune Encephalitis.*

**Rassy D**, Bárcena B, Pérez-Osorio IN, Espinosa A, Peón AN, Terrazas LI, Meneses G, Besedovsky HO, Fragoso G, Sciutto E. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2020 Feb 1;79(2):226-237. doi: 10.1093/jnen/nlz128.

*Sepsis: developing new alternatives to reduce neuroinflammation and attenuate brain injury.*

Meneses G, Cárdenas G, Espinosa A, **Rassy D**, Pérez-Osorio IN, Bárcena B, Fleury A, Besedovsky H, Fragoso G, Sciutto E. *Ann N Y Acad Sci.* 2019 Feb;1437(1):43-56. doi: 10.1111/nyas.13985. Epub 2018 Nov 29.

# Intranasal Methylprednisolone Effectively Reduces Neuroinflammation in Mice With Experimental Autoimmune Encephalitis

Dunia Rassy, MSc, Brandon Bárcena, AS, Iván Nicolás Pérez-Osorio, BSc, Alejandro Espinosa, BSc, Alberto N. Peón, PhD, Luis I. Terrazas, PhD, Gabriela Meneses, PhD, Hugo O. Besedovsky, MD, Gladis Frago, PhD, and Edda Sciotto, PhD

## Abstract

Relapsing-remitting multiple sclerosis, the most common form, is characterized by acute neuroinflammatory episodes. In addition to continuous disease-modifying therapy, these relapses require treatment to prevent lesion accumulation and progression of disability. Intravenous methylprednisolone (1–2 g for 3–5 days) is the standard treatment for relapses. However, this treatment is invasive, requires hospitalization, leads to substantial systemic exposure of glucocorticoids, and can only reach modest concentrations in the central nervous system (CNS). Intranasal delivery may represent an alternative to deliver relapse treatment directly to the CNS with higher concentrations and reducing side effects. Histopathological analysis revealed that intranasal administration of methylprednisolone to mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) suppressed the neuroinflammatory peak, and reduced immune cell infiltration and demyelination in the CNS similarly to intravenous administration. Treatment also downregulated Iba1 and GFAP expression. A similar significant reduction of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  levels in the spinal cord was attained in both intranasal and intravenously treated mice. No damage in the nasal cavity was found after intranasal administration. This study demonstrates that

intranasal delivery of methylprednisolone is as efficient as the intravenous route to treat neuroinflammation in EAE.

**Key Words:** Glucocorticoids, Intranasal, Methylprednisolone, Multiple sclerosis, Neuroinflammation.

## INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune, demyelinating, neuroinflammatory disorder of the central nervous system (CNS) (1). It is the most prevalent chronic inflammatory disease of the CNS, with the majority of patients (85%) presenting relapsing-remitting MS (2). This form is characterized by sudden relapses of acute neuroinflammation affecting neurologic functions, followed by periods of remission. Relapses are driven by the infiltration of autoreactive activated lymphocytes and myeloid cells into the CNS (3). Once in the CNS, cytokine release, especially IL-17, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ , further activate microglia and recruit macrophages from the periphery. Damage to myelin occurs either through the combined actions of reactive oxygen species, activated phagocytes, and cytotoxic CD8-positive lymphocytes or activated complement components (3, 4).

Most of these neuroinflammatory episodes are autolimiting, but patients should receive treatment to shorten relapse duration and to avoid disability accumulation (5, 6). Even though innovations in immunomodulatory therapies have improved the quality of life of patients and reduced the frequency of relapses, treatment is still a challenge that needs to be addressed.

The recommended scheme for relapse treatment consists of intravenous administration of methylprednisolone, ranging from 1 to 2 g, for 3 consecutive days, which may be extended for up to 5 days depending on relapse severity (7, 8). This treatment has been useful for reducing short- and long-term sequelae, but as all glucocorticoids, it has several systemic side-effects. Most are short-lived (9), but over time, repeated exposure to high doses of methylprednisolone may lead to glaucoma, diabetes mellitus, cataracts, and a heightened risk of infections (10, 11). These effects are the consequence of high systemic exposure to reach a minimum effective

From the Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City (DR, BB, INP-O, AE, GM, GF, ES); Unidad de Biomedicina (ANP, LIT); Laboratorio Nacional en Salud (LIT), Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, Mexico; and Research Group Immunophysiology, Division of Neurophysiology, Institute of Physiology and Pathophysiology, Philipps Universität (HOB), Marburg, Germany.

Send correspondence to: Edda Sciotto, PhD, Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar s/n, 04510 Coyoacán, Mexico City 5622-3153, Mexico; E-mail: edda@unam.mx

This study was supported by Dirección General de Personal Académico, UNAM (DGAPA-UNAM, grant IN211917 to E.S.), Mexico. This study was also supported by the Institutional program “Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos del Instituto de Investigaciones Biomédicas” U.N.A.M. Additional support was granted by Fundación Miguel Alemán.

The authors have no duality or conflicts of interest to declare.

Supplementary Data can be found at [academic.oup.com/jnen](https://academic.oup.com/jnen).

In agreement with previous research, we observed that methylprednisolone does reduce pro-inflammatory cytokines, but the reductions were only compelling in the spinal cord. We infer that the lack of effect, especially in the periphery, was associated with the timing of cytokine measurement, but it could also be related to the inability of the peripheral immune system to gauge and respond to inflammation in the CNS. The peripheral response is mostly driven by activated MOG-specific T cells, and its role is mainly relevant before EAE onset and CNS infiltration (48). However, during EAE peak, these cells become more abundant in the CNS. IL-6 behavior might also be related to timing since its expression increases around onset and then diminishes (49). Production by macrophages and microglia, in addition to T cells, might explain the slightly higher levels of IL-6 detected in the spinal cord (50).

We were surprised by the fact that methylprednisolone treatment also reduced peripheral IL-4 levels. It is generally believed that glucocorticoids promote the release of anti-inflammatory cytokines, but it has also been reported that these drugs suppress GATA3 activity in Th2 cells, thus inhibiting the release of IL-4 (51). A potentially protective role of IL-4 against the incidence and progression of MS has been proposed (52). The low levels of IL-4 detected herein in the spleen could reflect the better control of inflammation in methylprednisolone-treated mice during the return to homeostasis; this result would be sustained by the lower levels of the peripheral inflammatory TNF $\alpha$  cytokine in methylprednisolone-treated mice.

There is also some evidence that something similar could happen with IL-10. After an intraperitoneal injection of 20 mg/kg of dexamethasone treatment, equivalent to 100 mg/kg of methylprednisolone, IL-10 mRNA expression was reduced and Treg cells underwent apoptosis (53). Since Th2 and Treg cells support remyelination and EAE remission, this finding should be confirmed with intranasal methylprednisolone administration.

Low-dose nasal glucocorticoids are commonly prescribed for rhinitis, sinusitis, asthma, and polyposis. Patients often report temporal side effects such as epistaxis, dryness, or irritation, although these are not necessarily associated with glucocorticoid administration (54). In some cases, ulcerations, ciliary atrophy, and septum perforation have been reported after using intranasal steroids, but they have been related to delivery device misuse (55). Commercially available nasal glucocorticoids are formulated to remain in the nasal cavity, whereas intranasal administration seeks to use it as a passage to the CNS, so we decided to explore whether these side effects were present. From daily visual inspections we could not detect any of these issues but they cannot be ruled out. Histological analysis of nasal cavity sections showed a thickened mucus layer, enlarged glands, and cilia alterations. However, rather than a result of inflammation, it seems mucus production is related to remodeling processes in the nasal cavity, a process promoted by glucocorticoids. Beyond regenerating the mucous layer, steroids can restore its normal function (56). Furthermore, mucociliary clearance and mechanical transport are well-known functions of nasal cilia. The change in orientation after intranasal methylprednisolone administration might be related to increased transport (57).

In summary, our results suggest that intranasal treatment of methylprednisolone may be as effective as the currently employed administration route. Apart from further studies confirming a faster onset and higher concentrations reaching the CNS, it seems intranasal methylprednisolone achieves final immunomodulation similar to the one observed with intravenous treatment. There is a definite advantage in translating these findings into clinical settings considering methylprednisolone has been used in humans for at least 60 years, and it is included in the treatment guidelines for MS relapse in several countries (58–61). Even if, in recent years, oral prednisone has been used in place of intravenous steroids with lower costs of homecare or hospitalization, its use is not feasible in many countries due to the lack of adequate pharmaceutical presentations for oral administration (62). Furthermore, neither the intravenous nor the oral route offers the advantage of permitting a rapid entrance and accumulation of methylprednisolone in the CNS with an eventual reduction of peripheral effects of the synthetic hormone.

Before launching the use of intranasal methylprednisolone in patients, there are several considerations. First, in our experiments we included only female mice. Beyond the fact that C57BL6/J mice from both sexes are equally susceptible to EAE, differences in response to glucocorticoids according to sex have been reported before in rodents. In females, translocation of GR might increase after stressful events (63), but the anti-inflammatory effects of synthetic glucocorticoids seem to be more effective in male rats (64). A sexually dimorphic gene expression pattern is apparently behind differences in response. Altogether this points out at the necessity of exploring the effects of intranasal methylprednisolone in male mice in the short term and for contemplating differences in men and women in the long-term.

Another consideration is the requirement of an adequate pharmaceutical presentation that tackles the relatively low solubility of methylprednisolone, reduces the required administration volume, and maintains its stability. In this study, methylprednisolone was administered by a simple micropipette in each nostril of the mice. Indeed, this procedure can be improved for human administration. The advances in the design of new nasal delivery devices that accurately reach the most innervated areas of the nose will increase the efficiency of the drug to reach the CNS. Also, the use of carriers such as nanomolecules (65, 66), and exosomes (67) might decrease the possibilities of the drug accessing the peripheral circulation, and, potentially, their adverse effects.

Together, the information reported in this study offers experimental evidence to support equivalence between this noninvasive novel approach and the current intravenous treatment. A clinical trial could eventually confirm our findings and offer MS patients the option to access treatment as soon as they experience symptoms.

## ACKNOWLEDGMENTS

CONACYT has provided financial support to Dunia Rassy as a Ph.D. student, registered as scholar 594491. This article is submitted as partial fulfillment of the requirements

to graduate from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The authors are deeply grateful to Marcel A. Bautista Donis for his technical expertise and support related to the EAE model, to Pedro Medina and Dr. Miguel Tapia for their assistance in preparing spinal cord samples and capturing microscope images, and especially to the personnel that works in the Biological Models Unit of the Instituto de Investigaciones Biomédicas.

## REFERENCES

- Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Semin Neurol* 2016;36:115–27
- Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 2015;15:545–58
- Yadav SK, Mindur JE, Ito K, et al. Advances in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2015;28:206–19
- Naegele M, Martin R. The good and the bad of neuroinflammation in multiple sclerosis. In: Goodin DS, ed. *Handbook of Clinical Neurology*. Edinburgh; New York: Elsevier 2014:59–87
- Citterio A, La Mantia L, Ciucci G, et al. Corticosteroids or ACTH for acute exacerbations in multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;4:CD001331
- Bevan C, Gelfand JM. Therapeutic management of severe relapses in multiple sclerosis. *Curr Treat Options Neurol* 2015;17:17
- Krieger S, Sorrells SF, Nickerson M, et al. Mechanistic insights into corticosteroids in multiple sclerosis: War horse or chameleon? *Clin Neurol Neurosurg* 2014;119:6–16
- Sellebjerg F, Barnes D, Filippini G, et al. Acute relapses of multiple sclerosis. In: Nilhus NE, Barnes MP, Brainin M, eds. *European Handbook of Neurological Management*. 2nd ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010:411–9
- Goodin DS. Glucocorticoid treatment of multiple sclerosis [Internet]. 1st ed. Vol. 122, *Handbook of Clinical Neurology*. Edinburgh; New York: Elsevier 2014:455–64
- Iudici M, Valentini G, Van der Goes MC, et al. Glucocorticoids in systemic sclerosis: Weighing up the benefits and risks—A systematic review. *Clin Exp Rheumatol* 2013;31(Suppl 76):157–65
- Jongen PJ, Stavarakaki I, Voet B, et al. Patient-reported adverse effects of high-dose intravenous methylprednisolone treatment: A prospective web-based multi-center study in multiple sclerosis patients with a relapse. *J Neurol* 2016;263:1641–51
- Chen TC, Mackic JB, McComb JG, et al. Cellular uptake and transport of methylprednisolone at the blood-brain barrier. *Neurosurgery* 1996;38:348–54
- Miller DS. Regulation of ABC transporters blood-brain barrier: The good, the bad, and the ugly. *Adv Cancer Res* 2015;125:43–70
- O'Brien JA, Ward AJ, Patrick AR, et al. Cost of managing an episode of relapse in multiple sclerosis in the United States. *BMC Health Serv Res* 2003;3:17
- Dychter SS, Gold DA, Carson D, et al. Intravenous Therapy. *J Infus Nurs* 2012;35:84–91
- Crowe TP, Greenlee MHW, Kanthasamy AG, et al. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sci* 2018;195:44–52
- Jiang Y, Li Y, Liu X. Intranasal delivery: Circumventing the iron curtain to treat neurological disorders. *Expert Opin Drug Deliv* 2015;12:1717–25
- Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci* 2010;99:1654–73
- Illum L. Intranasal delivery to the central nervous system. In: Di L, Kerns EH, eds. *Blood-Brain Barrier in Drug Discovery*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. 2015:535–65
- Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64:614–28
- Meneses G, Gevorkian G, Florentino A, et al. Intranasal delivery of dexamethasone efficiently controls LPS-induced murine neuroinflammation. *Clin Exp Immunol* 2017;190:304–14
- Okuda Y, Okuda M, Bernard C. Gender does not influence the susceptibility of C57BL/6 mice to develop chronic experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Immunol Lett* 2002;81:25–9
- Papenfuss TL, Rogers CJ, Gienapp I, et al. Sex differences in experimental autoimmune encephalomyelitis in multiple murine strains. *J Neuroimmunol* 2004;150:59–69
- Palaszynski KM, Loo KK, Ashouri JF, et al. Androgens are protective in experimental autoimmune encephalomyelitis: Implications for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2004;146:144–52
- Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp* 2014;86:e51275
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008;22:659–61
- Shimizu S. Routes of Administration. In: Hedrich HJ, Bullock G, eds. *The Laboratory Mouse*. London: Academic Press 2004:527–42
- Hanson LR, Fine JM, Svitak AL, et al. Intranasal administration of CNS therapeutics to awake mice. *J Vis Exp* 2013;74:e4440
- Brahmachari S, Pahan K. Sodium benzoate, a food additive and a metabolite of cinnamon, modifies T cells at multiple steps and inhibits adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 2007;179:275–83
- Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005;106:1755–61
- Waterborg JH. The Lowry method for protein quantitation. In: Walker J, ed. *The Protein Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Springer Protocols Handbooks 2009:7–10
- White SR, Dorscheid DR. Corticosteroid-induced apoptosis of airway epithelium: A potential mechanism for chronic airway epithelial damage in asthma. *Chest* 2002;122:278S–84S
- Duchi S, Ovadia H, Touitou E. Nasal administration of drugs as a new non-invasive strategy for efficient treatment of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2013;258:32–40
- Wust S, van den Brandt J, Reichardt HM, et al. Preventive treatment with methylprednisolone paradoxically exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int J Endocrinol* 2012;2012:417017
- Wei Z, Deng X, Hong M, et al. Icaritin has synergistic effects with methylprednisolone to ameliorate EAE via modulating HPA function, promoting anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:20188–97
- Pfizer. *Medrol-Safety Data Sheet* [Internet]. 2017. Available at: [https://pfe-pfizercom-prod.s3.amazonaws.com/products/material\\_safety\\_data/MEDROL\\_\(methylprednisolone\)\\_tablets\\_23-mar-2017.pdf](https://pfe-pfizercom-prod.s3.amazonaws.com/products/material_safety_data/MEDROL_(methylprednisolone)_tablets_23-mar-2017.pdf)
- National Center for Biotechnology Information. *Compound Summary: Solu-Medrol* [Internet]. PubChem Database [cited 19.07.19]. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Solu-Medrol>
- FDA. SOLU-MEDROL® (methylprednisolone sodium succinate for injection, USP), 2011. Available at: [https://www.accessdata.fda.gov/drug-satfda\\_docs/label/2011/011856s103s1041bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drug-satfda_docs/label/2011/011856s103s1041bl.pdf)
- Silva S, Barton E. Intranasal use of drugs in the emergency room and pre-hospital arenas. In: Tintinalli's Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide. 7th ed. New York, NY: McGraw-Hill 2011
- Meneses G, Cárdenas G, Espinosa A, et al. Sepsis: Developing new alternatives to reduce neuroinflammation and attenuate brain injury. *Ann NY Acad Sci* 2019;1437:43–56
- Cruz-Topete D, Cidlowski JA. Glucocorticoids: Molecular mechanisms of action. In: Immunopharmacology and Inflammation. Cham: Springer International Publishing 2018:249–66
- Schweingruber N, Reichardt SD, Lühder F, et al. Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *J Neuroendocrinol* 2012;24:174–82
- Fischer HJ, Schweingruber N, Lühder F, et al. The potential role of T cell migration and chemotaxis as targets of glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Cell Endocrinol* 2013;380:99–107
- Miljković D, Timotijević G, Stojković MM. Astrocytes in the tempest of multiple sclerosis. *FEBS Lett* 2011;585:3781–8
- Liu W-L, Lee Y-H, Tsai S-Y, et al. Methylprednisolone inhibits the expression of glial fibrillary acidic protein and chondroitin sulfate proteoglycans in reactivated astrocytes. *Glia* 2008;56:1390–400
- Fontes JD, Kanazawa S, Jean D, et al. Interactions between the class II transactivator and CREB binding protein increase transcription of ma-



# Sepsis: developing new alternatives to reduce neuroinflammation and attenuate brain injury

Gabriela Meneses,<sup>1</sup> Graciela Cárdenas,<sup>2</sup> Alejandro Espinosa,<sup>1</sup> Dunia Rassy,<sup>1</sup>  
Ivan Nicolás Pérez-Osorio,<sup>1</sup> Brandon Bárcena,<sup>1</sup> Agnes Fleury,<sup>2</sup> Hugo Besedovsky,<sup>3</sup>  
Gladis Fragoso,<sup>1</sup> and Edda Sciutto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SSA, Mexico City, Mexico. <sup>3</sup>The Institute of Physiology and Pathophysiology, Medical Faculty, Philipps University, Marburg, Germany

Address for correspondence: Edda Sciutto, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, Mexico City 04510, Mexico. edda@unam.mx

**Sepsis occurs when a systemic infection induces an uncontrolled inflammatory response that results in generalized organ dysfunction. The exacerbated peripheral inflammation can induce, in turn, neuroinflammation which may result in severe impairment of the central nervous system (CNS). Indeed, the ensuing blood–brain barrier disruption associated with sepsis promotes glial activation and starts a storm of proinflammatory cytokines in the CNS that leads to brain dysfunction in sepsis survivors. Endotoxic shock induced in mice by peripheral injection of lipopolysaccharides closely resembles the peripheral and central inflammation observed in sepsis. In this review, we provide an overview of the neuroinflammatory features in sepsis and of recent progress toward the development of new anti-neuroinflammatory therapies seeking to reduce mortality and morbidity in sepsis survivors.**

**Keywords:** sepsis; inflammation; neuroinflammation; treatment

## Introduction

Inflammation is an essential defensive response to harmful infectious and noninfectious stimuli, widely recognized as vital for survival. However, sustained inflammation can lead to pathological conditions.<sup>1–3</sup> This dual role of the inflammatory response also takes place in the central nervous system (CNS), an anatomic region with particular properties.<sup>4</sup> The CNS had long been considered an immune-privileged compartment due to the lack of a proper lymphatic system.<sup>5,6</sup> Additionally, the tight junctions in the cerebral vasculature that constitute the blood–brain barrier (BBB) limit under homeostatic conditions the entry of ions, large molecules, and circulating cells between the blood and the brain. Even though the CNS exhibits particular immunoregulatory traits, it is continuously monitored by resident and immune cells, such as microglia, astrocytes, neurons, and activated T cells, which may trigger neuroinflammation (NI)

whenever injuries are detected. The quick response against an injury in the CNS causes acute NI, critical for homeostasis maintenance and neuronal survival. Furthermore, persistent NI may lead to cellular dysfunction, affecting brain functions.<sup>4</sup> Thus, the control of subacute and chronic NI processes may help to restore homeostasis in the CNS and its physiological function.<sup>7</sup>

Neuroinflammation is a common feature in many neurological and systemic diseases. It is a major component of the pathology and progression of numerous neurological and neurodegenerative diseases, including those with an autoimmune origin (neuropsychiatric systemic lupus erythematosus<sup>8</sup> and multiple sclerosis<sup>9</sup>), as well as diseases with other mechanisms (traumatic brain injury, stroke, tumors, Alzheimer's, and Parkinson's diseases<sup>10</sup>). NI can also occur in systemic diseases due to an exacerbated peripheral inflammatory response as in sepsis. Under these circumstances, inflammatory

mediators and cells from the periphery can access the CNS directly through the circumventricular organs and specialized brain regions that lack a tight BBB, as well as through afferent fibers of the abdominal vagus nerve. The entry of immunoinflammatory cells, including macrophages and cells of the adaptive immunity into the brain, can be tightly regulated by different mediators like cytokines, chemokines, and sphingolipids that can further increase NI.<sup>10</sup>

Considering that the management of the detrimental impacts of sustained NI in sepsis may contribute to diminishing the effects of sepsis-associated encephalopathy (SAE), it is vital to address this concern. Here, we offer an overview of strategies and therapies that modulate NI in sepsis and its potential therapeutic interest.

### Human sepsis and SAE

Sepsis is a life-threatening condition characterized by multiorgan dysfunction and a dysregulated (neuroimmune–endocrine) host response to an infection.<sup>11,12</sup> In a subset of patients, the failure to control the infection may lead to underlying circulatory, metabolic, and cellular abnormalities,<sup>11</sup> collectively recognized as septic shock.

Both in sepsis and septic shock, the CNS becomes vulnerable due to the breach of the BBB followed by inflammatory and neurotoxic processes.<sup>13</sup> Patients experience an alteration of mental functions, ranging from delirium to coma; this syndrome is known as SAE. Unfortunately, SAE is a clinical syndrome reported in up to 70% of septic patients, and thus a chief cause of brain dysfunction in the intensive care unit (ICU).<sup>14,15</sup>

#### *How to diagnose SAE*

As sepsis progresses in the periphery, the brain is one of the first organs affected. Hence, there is a need for timely detection of acute brain dysfunction. Exclusion of other causes of encephalopathy is the basis for diagnosis.<sup>16,17</sup> The first step upon SAE suspicion in a hospitalized patient would be a neurological examination to identify acute changes in mental status, cognition, sleep patterns, and disorganized thinking. Other alarm signs are agitation, paratonic rigidity, hallucinations, and coma.<sup>18–20</sup>

Once alterations in mental status have been detected, it is essential to rule out other CNS disorders or a direct infection. Sedation, drug use, and electrolyte imbalances may confound the diagno-

sis. On examination, cranial nerves usually remain intact, as well as automatic reflexes (tracheal, pharyngeal, and corneal) in patients with SAE. In unstable patients, a continuous electroencephalography and transcranial Doppler are extremely helpful tools to evaluate encephalopathy.

SAE diagnosis would not be complete without efforts to identify the source of infection and the responsible infectious agent. In this context, the rationale of screening and diagnosing sepsis has been described by a consensus committee of international experts for the Surviving Sepsis Campaign.<sup>21</sup> They recommend hospital systems to have a sepsis screening program for acutely ill and high-risk patients and a mandatory appropriate diagnostic protocol including clinical evaluation, routine microbiologic cultures, and monitoring of biomarkers, such as serum lactate, procalcitonin, presepsin, and proadrenomedullin levels. These measures would contribute to making an early diagnosis and decreasing morbidity and mortality.<sup>22,23</sup>

In the CNS, infectious agents, such as *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*, are capable of inducing severe cardiovascular collapse (septic shock). In these cases, the hallmark clinical signs include sudden onset and rapid neurological deterioration due to abrupt cerebral edema and refractory intracranial hypertension, both associated with an extremely high mortality rate.<sup>24</sup> In patients with this clinical suspicion, it is mandatory to make a brain computed tomography scan before a cytochemical analysis and a multiplex PCR of cerebrospinal fluid.

#### *Treatment and complications of SAE*

Sepsis and SAE are a significant health concern because of their association with high mortality and morbidity as well as the costs they represent for the healthcare system. Sepsis survivors suffer not only from high mortality rates, particularly during SAE,<sup>19,20</sup> but also in the long term due to cognitive decline and critical polyneuropathy/myopathy.<sup>25–27</sup>

The focus of sepsis and SAE treatment is on attacking the source of infection by providing intravenous antibiotic therapy. SAE-specific treatment is directed toward alleviating the symptoms, such as delirium. Although it would prevent the long-term cognitive impairment, there is no specific anti-inflammatory treatment for NI in SAE. The severe side effects, particularly of

long-term administration, of classical steroidal and cyclooxygenase-2-selective nonsteroidal anti-brk inflammatory drugs have limited their use.

Those who survive SAE often experience cognitive impairment for the rest of their lives. For instance, during clinical follow-up, 45% of sepsis survivors had cognitive complaints after 1 year, and some experienced chronic neurocognitive impairments even 6 years after ICU discharge. Following an episode of sepsis, patients are at a 3.3 times higher risk of developing moderate-to-severe neurocognitive impairment.<sup>15,28</sup> This risk might be related to the amount of CCR2<sup>+</sup> monocytes recruited to the CNS during acute septic episodes,<sup>29</sup> highlighting the role of NI in SAE.

### *Pathophysiology of neuroinflammation in sepsis*

**Anatomical structures and routes of entry of pathogens into the CNS.** The CNS is a crucial system that orchestrates the function of other systems to maintain homeostasis and cope with an infectious/stressful challenge. Actually, after an infection, homeostasis maintenance depends on a tight interaction between neurological (autonomic, cortical, and limbic) structures and between the immune and endocrine systems.<sup>30–32</sup>

There are three pathways in the CNS response to sepsis in the presence of a threat: (1) neural, in which the primary afferent (vagal and trigeminal) and sensorial (olfactory) nerves are activated by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and inflammatory cytokines, (2) humoral, orchestrated by circulating inflammatory mediators that reach CNS through the choroid plexus and the circumventricular organs, and (3) through the BBB, in which activated endothelial cells release inflammatory mediators (NOS metabolites).<sup>33</sup>

In this context, during a peripheral infection, the pathogen encounters the host innate immune system. The CNS monitors the infectious challenge through several receptors (pattern recognition receptors (PRRs)) that detect PAMPs. If this system fails to eradicate the invading pathogen, a pathological syndrome characterized by sustained, excessive inflammation develops. Besides, damage-associated molecular patterns are released; these molecules can also activate PRRs, starting a vicious cycle that leads to organ dysfunction,<sup>34</sup> including the CNS.

Axonal cytokine receptors in the vagus nerve monitor visceral inflammation. These afferent vagal fibers reach the nucleus of the solitary tract, which is interconnected with other autonomic nuclei (the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the hypothalamus–pituitary axis) connected to neurobehavioral areas (the amygdala and hippocampus, and the prefrontal and frontal cortices) and neuroendocrine centers.<sup>35</sup> Negative feedback proceeds via peripheral cortisol (adrenal glands).

Additionally, circumventricular organs are strategic sensors because of their vicinity to neuroendocrine structures (the hypophysis and pineal gland) and autonomic centers (the area postrema). These organs constitutively express receptors for inflammatory cytokines and bacterial fragments (innate and adaptive responses) that can be upregulated under the effect of systemic inflammation mediators.<sup>36,37</sup>

Regarding neural routes of dissemination, the trigeminal and olfactory nerves provide a direct pathway of invasion for some particular infectious agents (Herpes simplex virus 1 and *Listeria monocytogenes* (trigeminal), and *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, and *Burkholderia pseudomallei* (olfactory)). Both nerves are portals of entry for other infectious agents (viruses, protozoa, and fungi) with evidence both in animal models and patients, especially in cases where the infectious agent colonizes the nasal mucosa.<sup>38,39</sup> From these locations, infectious agents can reach the brainstem and limbic system by anterograde or retrograde transport.

**CNS cells involved in sepsis and neuroinflammation.** Microglial cells have a primary role during NI in sepsis. Microglia continuously surveys damage within the CNS, retracting and re-extending their processes to the surrounding environment.<sup>40</sup> Microglia express major histocompatibility complex (MHC) and costimulatory molecules on demand, allowing them to present antigens to T cells more successfully than astrocytes.<sup>41</sup> CNS-infiltrating macrophages, apart from adopting similar morphology, undertake the role of microglia.

Microglial cells are versatile enough to exhibit concurrently inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) phenotypes. The activated phagocytic M1 microglia migrate to the injury site where they secrete several cytotoxic and cytotoxic

immune mediators.<sup>42</sup> This function depends on inflammatory mediators (cytokines/chemokines), increased production of reactive oxygen species, and uncontrolled release of glutamate.<sup>43</sup> Activated microglia can also assume a neuroprotective role (M2 phenotype). During acute neuroinflammatory responses, it helps minimize the injury and even contributes to the mending of tissue damage.<sup>44</sup> The M1/M2 polarization may provide a shield against intense, rampant inflammation by restricting recruitment of immune cells and by limiting reactive astrogliosis.

Besides microglia, astrocytes, neurons, and peripheral infiltrating leukocytes are also involved in NI.<sup>45</sup> Astrocytes are critical to maintaining CNS homeostasis, especially at the neurovascular units of the BBB.<sup>46</sup> They deliver metabolites and regulate ion, fluid, neurotransmitter, and growth factor balance. Additionally, they support synapse formation, plasticity, and detect danger signals, producing consequently cytokines and chemokines that activate the adaptive immune response.<sup>47</sup>

During inflammatory conditions, astrocytes experience several changes in their number, morphology, and expression of glial fibrillary acidic protein, and they acquire the ability to present antigens through the expression of MHC class II.<sup>48</sup> Moreover, astrocytes form synapses with T cells, becoming an important source of proinflammatory cytokines and chemokines, which may facilitate cell trafficking into and within the CNS.<sup>49</sup> Additionally, astrocytes can migrate to the damaged site and initiate reactive astrogliosis.<sup>45</sup>

## Models of sepsis associated with neuroinflammation

As stated above, sepsis leads to an exacerbated neuroinflammatory response that may promote an acute and long-term dysfunction in the brainstem, amygdala, and hippocampus leading to psychological disarrays, cognitive injury, and even death. An effective anti-neuroinflammatory treatment may improve the prognosis of sepsis patients.<sup>13,25</sup> Various murine models that resemble the NI that accompanies sepsis have been developed, which are presented in Table 1.<sup>50–58</sup> Even though each model has its strengths and limitations, they offer the possibility to assess new approaches to control NI and study disease mechanisms.

One model is the inoculation of either whole bacteria or cell wall components (e.g., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., and *Pseudomonas* spp.), or bacterial fibrins capable of activating the innate immune system. The most widely used are lipopolysaccharide (LPS) endotoxin inoculation and cecal ligation and puncture (CLP), the latter considered the gold standard of sepsis models. However, regarding systemic inflammation, LPS injection has become a pillar in experimental studies of sepsis.

LPS, a well-known PAMP, is a component of Gram-negative bacteria. When peripherally administered, LPS induces an exacerbated central inflammatory response involving the activation of microglia, perivascular macrophages, and astrocytes, as well as the increased expression of several proinflammatory cytokines, which, in turn, facilitate immune cell infiltration into the CNS. Several LPS-mediated phenomena are related with its capacity to activate the nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway through Toll-like receptor 4 (TLR4) and CD14, both being receptors constitutively expressed on microglia.<sup>54</sup> LPS is specifically recognized by TLR4, eliciting the production of proinflammatory molecules. The magnitude and extension of the induced inflammatory response can be modulated by modifying the dose, the route of administration, and the number of LPS injections administered, and it is affected by the strain and sex of the mouse employed.<sup>53,59,60</sup>

This model mimics much of the physiology of severe sepsis in humans. Manifestations of acute endotoxemia in mice include systemic arterial hypotension, lactic acidosis, impaired myocardial contractility, a short-lived spike in tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) circulating levels, a more prolonged elevation in interleukin (IL) 6 levels, and a delayed increase in the circulating levels of high mobility group box 1. Even if normally responsive mouse strains are remarkably less sensitive than humans to the toxic or lethal effects of LPS, given that the LD<sub>50</sub> for LPS in mice is 1000- to 10,000-fold higher than the LPS dose required to induce severe illness and hypotension in humans,<sup>51</sup> this model is widely used.

Peripheral LPS administration has been extensively reported as a model capable of inducing NI<sup>59</sup> as a consequence of an exacerbated peripheral inflammatory response. NI arises through

**Table 1. Murine sepsis models**

Model of sepsis	Description	Strengths	Limitations	References
<b>Nonsurgical</b>				
Acute endotoxemia	IP or IV injection of LPS	Simple and fast to learn and perform Accompanied by a notable systemic and central inflammation Useful to test the efficacy of anti-inflammatory strategies	Bypasses host–pathogen interactions Higher doses required in animals to produce a shock-like state Short-lived inflammatory response	50–54
Bacterial infusion or injection	IV or IP infusion of <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus aureus</i> , or <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Helps understand host antibacterial mechanisms	Large doses of bacteria needed to breach host defenses Responses may vary between bacterial strains High mortality rates without fluid resuscitation and antibiotic administration	53,54
Bacteria and fibrin clot implantation	IP implantation of fibrin clot with bacteria	Allows for a controlled number of bacteria to be implanted, making it reproducible and reducing early mortality Promotes development of local septic focus	Surgery is required to insert clot Single bacterial strain	52,53,55
Cecal slurry injection	IP injection of cecal contents from a donor rodent	Can be performed in neonatal mice Polymicrobial sepsis	Only helpful to study early inflammation and innate response	53,55,56
Immunocompromised sepsis	Injection of cyclosporine A followed by IP injection of <i>E. coli</i>	Mimics preonset immunocompromise Allows greater bacterial blood counts Involves kidney and liver failure	Reduces cytokine responses	57
Pneumonia	IN or IT inoculation of bacteria	Replicates most common source of sepsis in patients Simple and reproducible mode	Clinical course depends on strain and inoculum dose Not all animals develop septic signs Immune response only in lungs	53,54
<b>Surgical</b>				
Cecal ligation and puncture	Ligation of caecum distal and ileocecal valve, and perforation of the caecum	Considered the gold standard for sepsis Multiple bacterial strains producing peritonitis Severity can be controlled by the size of puncture	Multiple confounding factors: length of caecum ligated, needle size, age, sex, strain, and necrosis Minor systemic inflammation	50,55,58
Colon ascendens stent peritonitis	Plastic stent redirecting stools from colon to the abdominal cavity	Resembles organ dysfunction that occurs in humans Severity can be controlled through a stent size Peritonitis with systemic inflammation	More difficult to perform than cecal ligation and puncture	53–55

IN, intranasal; IP, intraperitoneal; IV, intravenous; IT, intratracheal.

the production of mediators of the inflammatory response as well as from profound alterations in the sphingolipid metabolism at the BBB.<sup>61</sup> Altogether they lead to an increased BBB permeability, BBB endothelial cell activation, glial cell activation, and neurodegeneration.<sup>62</sup>

### **Strategies to control brain inflammation during sepsis**

As outlined above, inflammation is involved in several neuropathophysiological mechanisms in sepsis, including apoptosis, transitory oxidative stress, microglial activation, cytokine expression, and alteration of neuronal transmission. Therefore, targeting the inflammatory status could help us to control some brain manifestations of sepsis. Several brain pathologies include nitric oxide (NO) release. Indeed, in animal models, the inhibition of inducible NO synthase can reduce neuronal apoptosis, although no improvement in consciousness has been achieved.<sup>63</sup> In septic rats, preventing oxidative stress reduces long-term cognitive impairment.<sup>64</sup> As a BBB breach is also involved in brain inflammation during sepsis, systemic TNF- $\alpha$  release allows the passage of molecules, especially inflammatory mediators and immune cells. Therefore, various approaches to preserve BBB integrity have been explored. Particularly, hydrocortisone has been shown to play a protective role against matrix disruption thus maintaining barrier integrity.<sup>65</sup> Immunoglobulin administration has a similar effect on BBB integrity.<sup>66</sup> Additionally, TNF- $\alpha$  inhibition has been found to protect the BBB, reducing inflammation and cerebral edema.<sup>67</sup> Two novel strategies to control brain inflammation, described in detail below, have been recently studied in our research group.<sup>68,69</sup>

### **Anti-neuroinflammatory treatment in sepsis**

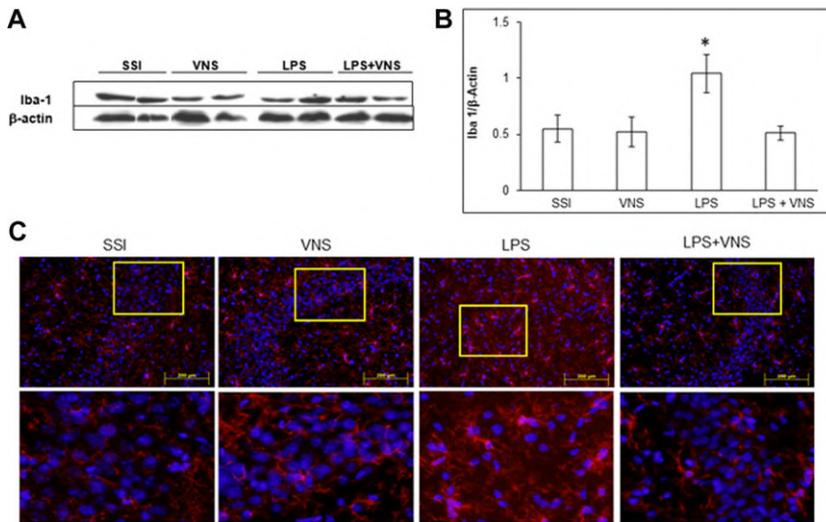
The use of anti-inflammatory treatments in sepsis is controversial. However, it has been reported that low corticosteroid doses administered as replacement therapy for septic shock patients with adrenal insufficiency had a better effect on short-term mortality than high-dose corticosteroid therapy.<sup>70</sup> Moreover, beneficial effects of low dexamethasone doses have been reported in CLP-induced septic mice, reducing the level of peripheral proinflammatory components.<sup>71</sup>

Considering the possible benefits of a tight control of NI, we propose two approaches for its modulation during septic processes, aiming to improve the disease outcome. One of them involves administering low doses of an anti-inflammatory drug directly to the CNS by the intranasal route; the other one employs electrical stimulation of the vagus nerve.<sup>68,69</sup>

### *Electric nerve stimulation to control neuroinflammation in sepsis*

The vagus nerve is the main parasympathetic nerve of the thoracic and abdominal viscera. The longest nerve of the autonomic nervous system, it consists of afferent fibers (80%) that carry information from the body to the brain, and efferent fibers, mainly cholinergic, that convey regulatory information to the CNS. Structurally, the vagus nerve has projections in the CNS from the nucleus of the solitary tract to the nucleus locus coeruleus and the dorsal raphe nucleus where it induces the release of neurotransmitters, such as glutamate, aspartate, acetylcholine, serotonin, and norepinephrine.<sup>72,73</sup> From these nuclei, the efferent fibers reach the medulla where emergent fibers travel along the carotid artery and the jugular vein, innervating multiple peripheral organs.

Electric nerve stimulation has emerged as an alternative to effectively attenuate peripheral inflammation in a variety of pathological conditions, with fewer side effects. Implantable medical devices appear as an attractive treatment of inflammatory diseases. According to recent reports, electrical vagus nerve stimulation (EVNS) can diminish excessive inflammation in a wide variety of animal models.<sup>74</sup> These reports support the feasibility of using implantable vagal nerve stimulation devices to treat chronic inflammation in humans. Moreover, the use of these devices was approved for drug-resistant epilepsy and depression by the U.S. Food and Drug Administration. However, the approved stimulation parameters to trigger the activation of afferent fibers are 0.25–3.5 mA, 20–30 Hz.<sup>75</sup> Different parameters should be applied to stimulate anti-inflammatory efferent fibers. The most frequent acute complications of EVNS implantation include temporary excessive salivation, mild and coercive cough, vocal cord paralysis, lower facial weakness, and, very rarely, bradycardia asystole, all of which are reversible.<sup>76</sup> In the long-term patients,



**Figure 1.** Electric stimulation of the vagus nerve significantly reduced the level of Iba1 expression in the hippocampus 24 h after the electrical stimulus in LPS-treated mice. Source in Ref. 68.

cough, chest pain, thickening of the voice, and feeling of compression of the chest have been observed; these symptoms usually decrease over time, and the device will not have cognitive or systemic effects. Concerning perioperative complications, cardiac arrhythmias have been reported. These effects can be controlled by adjusting stimulation times.<sup>77</sup>

While further research is needed to identify the mechanisms underlying the anti-inflammatory properties of EVNS, its effect has been extensively confirmed in inflammatory pathologies like mood disorders, migraine, arthritis, stroke, cardiovascular diseases, and lupus.<sup>78–82</sup>

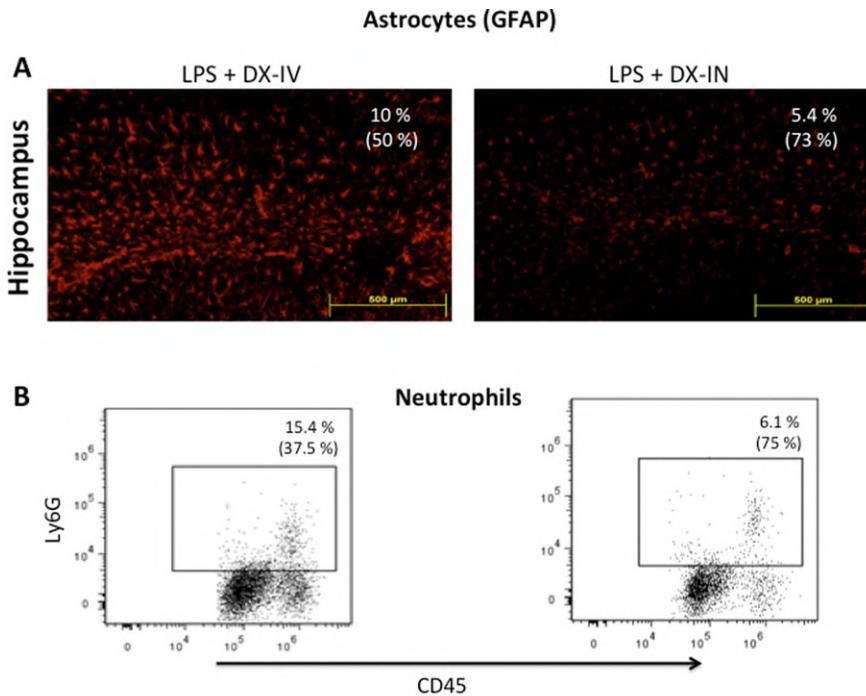
Recently, the anti-neuroinflammatory effectiveness of EVNS in an experimental model of central inflammation induced by intraperitoneal injection of LPS (5 mg/kg of LPS from *E. coli*, 0111: B4 serotype) was evaluated in our research group.<sup>68</sup> Bipolar electrodes were placed in the left cervical vagus nerve and connected to a stimulation module designed by the National University of Mexico, Mexico. Five days after electrode implantation, mice were treated with LPS. Two or three days later, half of the mice were stimulated with a constant voltage at 5 Hz, 0.75 mA, for 30 s, to stimulate the efferent fibers, and the inflammatory status was studied 24 h later. A clear decrease in ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) expression by microglial cells was observed (Fig. 1); additionally, it was demonstrated that the percentage of

CD45<sup>+</sup>/CD11<sup>+</sup> cells, as well as the levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  in the CNS, decreased after EVNS.

The reduction of the expression of Iba1 and the percentage of microglia, as well as the decrease in the levels of proinflammatory cytokines, after a single stimulation of the efferent fibers to the vagus nerve (5 Hz, 0.75 mA, for 30 s) emphasize the potential of this strategy to effectively control NI with few side effects. The mechanisms by which the stimulation of vagal efferent fibers modulates these central immune components have not been studied in detail.

#### *Intranasal administration of glucocorticoids to control neuroinflammation*

When a drug reaches the CNS following intravenous injection, it diffuses into the dense microvasculature of the brain, which irrigates neurons. In order to reach the nervous tissue from the blood in these intracerebral blood vessels, the drug must cross the peculiar endothelium that constitutes the BBB, a scarcely permeable barrier that restricts transport from the blood into the brain through the tight junctions between adjacent cells in the endothelium.<sup>83</sup> Even if drugs eventually cross the BBB, efflux pumps, especially ATP-binding cassette transporters, can decrease CNS drug concentration.<sup>84,85</sup> Due to this, the diluting effects of distribution, plasma protein-binding, and binding to receptors in other organs (which additionally may lead to side effects), the



**Figure 2.** Intranasal administration of dexamethasone was more effective in reducing GFAP immunostaining (A) and the percentage of CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly6G<sup>+</sup> (B) than intravenous administration. Modified from Ref. 69. GFAP, glial fibrillary acidic protein; Ly6G<sup>+</sup>, lymphocyte antigen 6 complex locus G6D.

effective concentration of systemically administered drugs in the brain is usually less than 0.01% of the administered amount.<sup>86</sup>

In contrast, intranasal drug administration offers a noninvasive route to effectively achieve higher concentrations of drugs in the CNS, bypassing the restricting BBB, first-pass metabolism, and other diluting effects.<sup>87,88</sup> A successful delivery strongly depends on the physicochemical properties of the drug (molecular weight, size, and lipophilicity) as well as on the particular properties of the nasal epithelium and the mucociliary system.<sup>89</sup>

Following intranasal administration, a drug can directly reach the CNS via the axons of millions of olfactory nerve neurons that cross the upper posterior nasal mucosa. Drugs can also cross the mucosa to reach the axons of the trigeminal nerve (nasociliary nerve). Both routes allow the drug to reach the brain without crossing the BBB.<sup>90,91</sup> Given that the nasal mucosa is also highly vascularized, a third pathway is possible. An intranasally administered drug can rapidly enter the capillary network reaching the systemic circu-

lation in concentrations similar to intravenously administered drugs.<sup>87,92</sup> Drainage into lymphatic vessels, and eventually to the deep cervical lymph nodes, is also possible.<sup>93</sup>

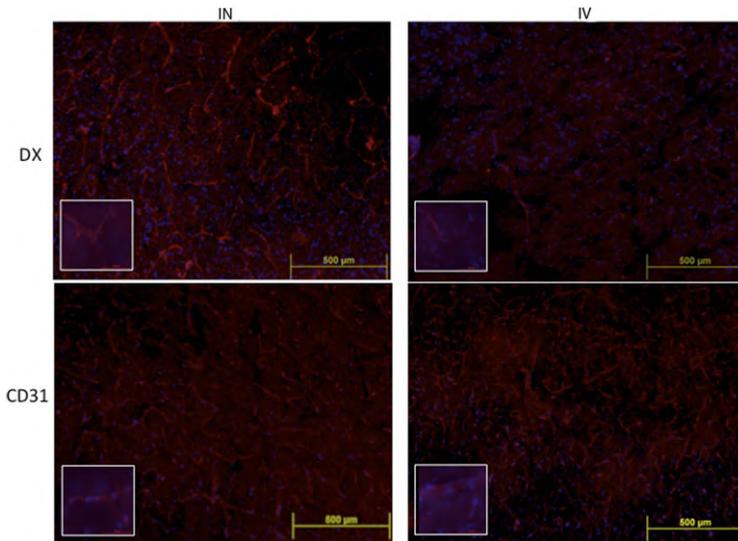
In sepsis instances, the goal of the best anti-inflammatory drug resides in its capacity to control the central and peripheral inflammatory response, without compromising the specific immune response against infectious agents that triggered this pathological condition. Nonsteroidal drugs administered through the intranasal route could fulfill these requirements. Nevertheless, the intranasal administration of drugs offers advantages, such as a quick onset of action, evasion of crossing the BBB and first-pass metabolism, and a smooth and comfortable administration. A drug can be detected in the CNS in concentrations up to 100 times higher when intranasally administered than after intravenous administration<sup>94–96</sup> although the efficacy may vary depending on the species.

Intranasal delivery may be a suitable administration route for a wide variety of drugs and neuroinflammatory indications. As of 2017, there

**Table 2.** Experiences in drug delivery to the central nervous system by the intranasal route

Drug or treatment	Use	Mechanism	Trial stage or report type	Main findings	References
NGF inhibitors	Traumatic brain injury	Neuron preservation, triggers endothelial cell proliferation	Case report	Improvement in imaging, electrophysiological, and clinical tests after IN administration of NGF CSF levels of NGF and doublecortin, associated with neurogenesis, increased after treatment	111
Rivastigmine	PD	Inhibition of acetylcholinesterase	0	Nasal rivastigmine had superior bioavailability than oral and transdermal presentations and showed a rapid onset	112
NeuroEPO	Ischemia Traumatic brain injury	Antiapoptotic, antioxidative, anti-inflammatory, neurotrophic, and angiogenic properties	I	NeuroEPO was safe and well tolerated by healthy volunteers It did not stimulate erythropoiesis	113
Oxytocin	PTSD	Modulation of glucocorticoid and autonomic stress reactivity	II	Beneficial for patients with high acute clinician-rated PTSD symptoms	114
GSH	PD	Antioxidative, prevents mitochondrial dysfunction and cell death	II	GSH levels in CSF increased after intranasal administration	115
Ketorolac or Ket-Trom-Lid	Migraine	Prostaglandin synthesis and vascular permeability	II	IN ketorolac (with and without lidocaine) offered sustained pain relief for at least 24 hours	116,117
Zolmitriptan	Migraine	Serotonergic agonist prevents vasodilation and inflammation	IV	Improvement within 30 min, which resulted in a better than previous migraine treatment	118
Sumatriptan	Migraine	Vasoconstriction, neurotrophin release inhibition, and reduction of pain transmission	Systematic review and meta-analysis	Sumatriptan was superior to placebo for pain relief, but higher doses were associated with more adverse effects	119

IN, intranasal; NGF: nerve growth factor; CSF, cerebrospinal fluid; GSH, glutathione; NeuroEPO, nonhematopoietic recombinant erythropoietin; PD, Parkinson's disease; PTSD, post-traumatic stress disorder; GSH, glutathione; Ket-Trom-Lid, ketorolac/tromethamine with 6% lidocaine.



**Figure 3.** Representative immunofluorescence images of brain slices (4–5 mice per group) obtained 24 h after intranasal (IN) or intravenous (IV) dexamethasone (DX) administration. Merged images of DX (red) or CD31 (red), and 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (blue) staining are shown at 310× (upper panel) and 3100× (bottom panel) magnification, respectively. Brain vessels in the cortex were distinguished more clearly in brains of IN DX-treated (4.82 pixels/mm<sup>2</sup>) than of IV DX-treated (1.97% pixels/mm<sup>2</sup>) mice. Modified from Ref. 69.

were numerous studies published on animal models of Alzheimer’s<sup>97,98</sup> and Parkinson’s<sup>99–102</sup> diseases, and multiple sclerosis,<sup>95,103</sup> among other diseases. The most frequently reported compounds administered by this route are growth factors, hormones, and molecules interfering or modifying the immune response,<sup>104</sup> but as research in the area grows, interference RNAs may become another relevant group of intranasally administered compounds.<sup>105–107</sup> The use of nanoparticles also expands the possibilities of the intranasal route. Nanoparticles can be engineered to have a precise size, to reach a specific target, and to release drugs with the desired speed to achieve an optimal absorption.<sup>108–110</sup>

There are already a few clinical studies exploring the intranasal route for a variety of inflammatory acute and chronic neurological conditions that require considerable systemic exposure.<sup>111–119</sup> These studies are summarized in Table 2. Although some are in early clinical phases, sumatriptan and zolmitriptan, both used to treat migraines, are already on the market. A frequent observation in these studies was the rapid onset of action and increased detectable amounts of the drug in the cerebrospinal fluid, promising better chances of controlling the extent of inflammation.

Notwithstanding the increasing interest in the area, the efficacy of the intranasal route to deliver glucocorticoids to the CNS attracted attention only recently. Intranasal delivery of dexamethasone has been reported to be more efficient than the intravenous route to control NI, reducing astrocyte activation and central neutrophil infiltration in an experimental murine model of sepsis employing LPS (Fig. 2).<sup>69</sup> Further experiments demonstrated that the intranasal route allows a more efficient glucocorticoid distribution as shown in Figure 3. These results open a new avenue toward the control of NI that accompanies different neuropathologies.

### Conclusions and perspectives

As shown in our review, NI in sepsis exhibits a highly complex pathophysiology, characterized by early and late deleterious events in the CNS. Several studies on sepsis have demonstrated that it causes long-term behavioral changes in rodents and human sepsis survivors. The polarization of microglial cells to exert neurotoxic effects, an overexpression of proinflammatory cytokines, and an impaired BBB function play a key role in this process.

Our findings pointed out that intranasal administration of glucocorticoids and EVNS might

represent effective therapeutic tools in reducing sepsis-related NI. The results obtained using both anti-neuroinflammatory therapies reviewed herein indicate the feasibility of translating the current findings into clinical settings. We believe these could reduce the magnitude and duration of chronic NI that accompanies different neuropathologies with minor undesirable side effects.

## Acknowledgments

The authors thank Juan Francisco Rodriguez for copyediting this manuscript, Marisela Hernandez for technical support, and DGAPA-UNAM (IN211917 to E.S.) for financial support. This study was also supported by the institutional program “Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos del IIB” (PROVACADI); and CONACyT (SALUD-2013-01-201448 to E.S.).

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Author contributions

E.S., G.F., and G.M. conceived and designed the experiments. G.M., A.E., N.O., B.B., and G.A. performed the experiments. E.S. and N.O. analyzed the data. E.S., G.F., A.E., D.R., G.M., G.C., A.F., and H.B. drafted the paper.

## References

- Kerschensteiner, M., E. Meinel & R. Hohlfeld. 2010. Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Results Probl. Cell Differ.* **51**: 197–216.
- Karin, M., T. Lawrence & V. Nizet. 2006. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* **124**: 823–835.
- Xu, H., G.T. Barnes, Q. Yang, *et al.* 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**: 1821–1830.
- Kempuraj, D., R. Thangavel, G.P. Selvakumar, *et al.* 2017. Brain and peripheral atypical inflammatory mediators potentiate neuroinflammation and neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* **11**: 216.
- Louveau, A., T.H. Harris & J. Kipnis. 2015. Revisiting the mechanisms of CNS immune privilege. *Trends Immunol.* **36**: 569–577.
- Carson, M.J., J.M. Doose, B. Melchior, *et al.* 2006. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol. Rev.* **213**: 48–65.
- Stonesifer, C., S. Corey, S. Ghanekar, *et al.* 2017. Stem cell therapy for abrogating stroke-induced neuroinflammation and relevant secondary cell death mechanisms. *Prog. Neurobiol.* **158**: 94–131.
- Jeltsch-David, H. & S. Muller. 2014. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus and cognitive dysfunction: the MRL-lpr mouse strain as a model. *Autoimmun. Rev.* **13**: 963–973.
- Dendrou, C.A., L. Fugger & M.A. Friese. 2015. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **15**: 545–558.
- Gualtierotti, R., L. Guarnaccia, M. Beretta, *et al.* 2017. Modulation of neuroinflammation in the central nervous system: role of chemokines and sphingolipids. *Adv. Ther.* **34**: 396–420.
- Singer, M., C.S. Deutschman, C.W. Seymour, *et al.* 2016. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA* **315**: 801–810.
- Seymour, C.W., V.X. Liu, T.J. Iwashyna, *et al.* 2016. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA* **315**: 762–774.
- Heming, N., A. Mazeraud, F. Verdonk, *et al.* 2017. Neuroanatomy of sepsis-associated encephalopathy. *Crit. Care* **21**: 65.
- Kafa, I.M., S. Bakirci, M. Uysal, *et al.* 2010. Alterations in the brain electrical activity in a rat model of sepsis-associated encephalopathy. *Brain Res.* **1354**: 217–226.
- Lamar, C.D., R.A. Hurley & K.H. Taber. 2011. Sepsis-associated encephalopathy: review of the neuropsychiatric manifestations and cognitive outcome. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **23**: 237–241.
- Molnar, L., B. Fülesdi, N. Németh, *et al.* 2018. Sepsis-associated encephalopathy: a review of literature. *Neurol. India* **66**: 352–361.
- Chaudhry, N. & A.K. Duggal. 2014. Sepsis associated encephalopathy. *Adv. Med.* **2014**. <https://doi.org/10.1155/2014/762320>.
- Sweis, R., J. Ortiz & J. Biller. 2016. Neurology of sepsis. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **16**: 21.
- Azabou, E., E. Magalhaes, A. Braconnier, *et al.* 2015. Early standard electroencephalogram abnormalities predict mortality in septic intensive care unit patients. *PLoS One* **10**: e0139969.
- Punia, P., N. Bhardwaj, P. Mathur, *et al.* Profile of fatal *Streptococcal bacteraemia* at a tertiary care Indian hospital. *Indian J. Med. Microbiol.* **33**: 148–151.
- Rhodes, A., L.E. Evans, W. Alhazzani, *et al.* 2017. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Crit. Care Med.* **45**: 486–552.
- Candel, F.J., M. Borges Sá, S. Belda, *et al.* 2018. Current aspects in sepsis approach. Turning things around. *Rev. Esp. Quimioter.* **31**: 298–315.
- Sargentini, V., D. Collepardo, M.D. Alessandro, *et al.* 2017. Role of biomarkers in adult sepsis and their application for a good laboratory practice: a pilot study. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **31**: 1147–1154.
- Radetsky, M. 2014. Fulminant bacterial meningitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **33**: 204–207.
- Widmann, C.N. & M.T. Heneka. 2014. Long-term cerebral consequences of sepsis. *Lancet Neurol.* **13**: 630–636.

26. Schmutzhard, E. & B. Pfausler. 2017. Neurologic complications of sepsis. *Handb. Clin. Neurol.* **141**: 675–683.
27. Hund, E. 2001. Neurological complications of sepsis: critical illness polyneuropathy and myopathy. *J. Neurol.* **248**: 929–934.
28. Iwashyna, T.J., E.W. Ely, D.M. Smith, *et al.* 2010. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA* **304**: 1787–1794.
29. Andonegui, G., E.L. Zelinski, C.L. Schubert, *et al.* 2018. Targeting inflammatory monocytes in sepsis-associated encephalopathy and long-term cognitive impairment. *JCI Insight* **3**: e99364.
30. Andersson, U. & K.J. Tracey. 2012. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* **30**: 313–335.
31. Muscatell, K.A., K. Dedovic, G.M. Slavich, *et al.* 2015. Greater amygdala activity and dorsomedial prefrontal–amygdala coupling are associated with enhanced inflammatory responses to stress. *Brain Behav. Immun.* **43**: 46–53.
32. Hueston, C.M. & T. Deak. 2014. The inflamed axis: the interaction between stress, hormones, and the expression of inflammatory-related genes within key structures comprising the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Physiol. Behav.* **124**: 77–91.
33. Sonnevile, R., F. Verdonk, C. Rauturier, *et al.* 2013. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Ann. Intensive Care* **3**: 15.
34. van der Poll, T., F.L. van de Veerdonk, B.P. Scicluna, *et al.* 2017. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* **17**: 407–420.
35. Dantzer, R. 2001. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav. Immun.* **15**: 7–24.
36. Ganong, W.F. Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **27**: 422–427.
37. Roth, J., E.-M. Harré, C. Rummel, *et al.* 2004. Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. *Front. Biosci.* **9**: 290–300.
38. Kristensson, K. 2011. Microbes’ roadmap to neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**: 345–357.
39. van Riel, D., R. Verdijk & T. Kuiken. 2015. The olfactory nerve: a shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system. *J. Pathol.* **235**: 277–287.
40. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff & F. Helmchen. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science* **308**: 1314–1318.
41. Chastain, E.M.L., D.S. Duncan, J.M. Rodgers, *et al.* 2011. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**: 265–274.
42. Henry, C.J., Y. Huang, A.M. Wynne, *et al.* 2009. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav. Immun.* **23**: 309–317.
43. Ishihara, Y., T. Takemoto, K. Itoh, *et al.* 2015. Dual role of superoxide dismutase 2 induced in activated microglia. *J. Biol. Chem.* **290**: 22805–22817.
44. Shemer, A., D. Erny, S. Jung, *et al.* 2015. Microglia plasticity during health and disease: an immunological perspective. *Trends Immunol.* **36**: 614–624.
45. Michels, M., A.V. Steckert, J. Quevedo, *et al.* 2015. Mechanisms of long-term cognitive dysfunction of sepsis: from blood-borne leukocytes to glial cells. *Intensive Care Med. Exp.* **3**: 30.
46. Liu, C.-Y., Y. Yang, W.-N. Ju, *et al.* 2018. Emerging roles of astrocytes in neuro-vascular unit and the tripartite synapse with emphasis on reactive gliosis in the context of Alzheimer’s disease. *Front. Cell. Neurosci.* **12**: 193.
47. Sofroniew, M.V. & H.V. Vinters. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**: 7–35.
48. Constantinescu, C.S., M. Tani, R.M. Ransohoff, *et al.* 2005. Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23. *J. Neurochem.* **95**: 331–340.
49. Colombo, E. & C. Farina. 2016. Astrocytes: key regulators of neuroinflammation. *Trends Immunol.* **37**: 608–620.
50. van der Poll, T. 2012. Preclinical sepsis models. *Surg. Infect. (Larchmt)* **13**: 287–292.
51. Fink, M.P. 2014. Animal models of sepsis. *Virulence* **5**: 143–153.
52. Nemzek, J.A., K.M.S. Hugunin & M.R. Opp. 2008. Modeling sepsis in the laboratory: merging social science with animal well-being. *Comp. Med.* **58**: 120–128.
53. Lewis, A.J., C.W. Seymour & M.R. Rosengart. 2016. Current murine models of sepsis. *Surg. Infect. (Larchmt)* **17**: 385–393.
54. Kingsley, S.M.K. & B.V. Bhat. 2016. Differential paradigms in animal models of sepsis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **18**: 26.
55. Stortz, J.A., S.L. Raymond, J.C. Mira, *et al.* 2017. Murine models of sepsis and trauma: can we bridge the gap? *ILAR J.* **58**: 90–105.
56. Gentile, L.F., D.C. Nacionales, M.C. Lopez, *et al.* 2014. Host responses to sepsis vary in different low-lethality murine models. *PLoS One* **9**: e94404.
57. Kong, X., J. Zhang, J. Huo, *et al.* 2018. A systematic investigation on animal models of cyclosporine A combined with *Escherichia coli* to simulate the immunosuppressive status of sepsis patients before onset. *Int. Immunopharmacol.* **62**: 67–76.
58. Ozment, T.R., T. Ha, K.F. Breuel, *et al.* 2012. Scavenger receptor class a plays a central role in mediating mortality and the development of the pro-inflammatory phenotype in polymicrobial sepsis. *PLoS Pathog.* **8**: e1002967.
59. Catorce, M.N. & G. Gevorkian. 2016. LPS-induced murine neuroinflammation model: main features and suitability for pre-clinical assessment of nutraceuticals. *Curr. Neuropharmacol.* **14**: 155–164.
60. Meneses, G., M. Rosetti, A. Espinosa, *et al.* 2018. Recovery from an acute systemic and central LPS-inflammation challenge is affected by mouse sex and genetic background. *PLoS One* **13**: e0201375.
61. Vutukuri, R., R. Brunkhorst, R.-I. Kestner, *et al.* 2018. Alteration of sphingolipid metabolism as a putative mechanism underlying LPS-induced BBB disruption. *J. Neurochem.* **144**: 172–185.

62. Qin, L., X. Wu, M.L. Block, *et al.* 2007. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* **55**: 453–462.
63. Kadoi, Y. & F. Goto. 2004. Selective inducible nitric oxide inhibition can restore hemodynamics, but does not improve neurological dysfunction in experimentally-induced septic shock in rats. *Anesth. Analg.* **99**: 212–220.
64. Barichello, T., R.A. Machado, L. Constantino, *et al.* 2007. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis. *Crit. Care Med.* **35**: 2186–2190.
65. Hartmann, C., J. El-Gindi, C. Lohmann, *et al.* 2009. TIMP-3: a novel target for glucocorticoid signaling at the blood–brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**: 182–186.
66. Esen, F., E. Senturk, P.E. Ozcan, *et al.* 2012. Intravenous immunoglobulins prevent the breakdown of the blood–brain barrier in experimentally induced sepsis. *Crit. Care Med.* **40**: 1214–1220.
67. Tsao, N., H.P. Hsu, C.M. Wu, *et al.* 2001. Tumour necrosis factor-alpha causes an increase in blood–brain barrier permeability during sepsis. *J. Med. Microbiol.* **50**: 812–821.
68. Meneses, G., M. Bautista, A. Florentino, *et al.* 2016. Electric stimulation of the vagus nerve reduced mouse neuroinflammation induced by lipopolysaccharide. *J. Inflamm.* **13**: 33.
69. Meneses, G., G. Gevorkian, A. Florentino, *et al.* 2017. Intranasal delivery of dexamethasone efficiently controls LPS-induced murine neuroinflammation. *Clin. Exp. Immunol.* **190**: 304–314.
70. Annane, D., E. Bellissant, P.-E. Bollaert, *et al.* 2009. Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *JAMA* **301**: 2362–2375.
71. van den Berg, J.W., M. van der Zee, R.W.F. de Bruin, *et al.* 2011. Mild versus strong anti-inflammatory therapy during early sepsis in mice: a matter of life and death. *Crit. Care Med.* **39**: 1275–1281.
72. Cheyuo, C., A. Jacob, R. Wu, *et al.* 2011. The parasympathetic nervous system in the quest for stroke therapeutics. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **31**: 1187–1195.
73. Cai, P.Y., A. Bodhit, R. Derequito, *et al.* 2014. Vagus nerve stimulation in ischemic stroke: old wine in a new bottle. *Front. Neurol.* **5**: 107.
74. Zitnik, R.J. 2011. Treatment of chronic inflammatory diseases with implantable medical devices. *Cleve. Clin. J. Med.* **78**(Suppl. 1): S30–S34.
75. Yamamoto, T. 2015. Vagus nerve stimulation therapy: indications, programing, and outcomes. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **55**: 407–415.
76. Ekmekçi, H. & H. Kaptan. 2017. Vagus nerve stimulation. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* **5**: 391–394.
77. Groves, D.A. & V.J. Brown. 2005. Vagal nerve stimulation: a review of its applications and potential mechanisms that mediate its clinical effects. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **29**: 493–500.
78. Albert, U., G. Maina, A. Aguglia, *et al.* 2015. Vagus nerve stimulation for treatment-resistant mood disorders: a long-term naturalistic study. *BMC Psychiatry* **15**: 64.
79. Chen, S.-P., I. Ay, A.L. de Moraes, *et al.* 2016. Vagus nerve stimulation inhibits cortical spreading depression. *Pain* **157**: 797–805.
80. Koopman, F.A., P.R. Schuurman, M.J. Vervoordeldonk, *et al.* 2014. Vagus nerve stimulation: a new bioelectronics approach to treat rheumatoid arthritis? *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **28**: 625–635.
81. Duris, K., J. Lipkova & M. Jurajda. 2017. Cholinergic anti-inflammatory pathway and stroke. *Curr. Drug Deliv.* **14**: 449–457.
82. Bonaz, B., V. Sinniger & S. Pellissier. 2016. Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. *J. Physiol.* **594**: 5781–5790.
83. Witt, K.A. & K.E. Sandoval. 2014. Steroids and the blood–brain barrier. In *Advances in Pharmacology*. T.P. Davis, Ed.: 361–390. Elsevier.
84. Miller, D.S. 2015. Regulation of ABC transporters blood–brain barrier: the good, the bad, and the ugly. *Adv. Cancer Res.* **125**: 43–70.
85. Nau, R., F. Sörgel & H. Eiffert. 2010. Penetration of drugs through the blood–cerebrospinal fluid/blood–brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**: 858–883.
86. Illium, L. 2015. Intranasal delivery to the central nervous system. In *Blood–Brain Barrier in Drug Discovery: Optimizing Brain Exposure of CNS Drugs and Minimizing Brain Side Effects for Peripheral Drugs*. L. Di & E.H. Kerns, Eds.: 535–565. John Wiley & Sons, Inc.
87. Lochhead, J.J. & R.G. Thorne. 2012. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**: 614–628.
88. Quintana, D.S., A.J. Guastella, L.T. Westlye, *et al.* 2016. The promise and pitfalls of intranasally administering psychopharmacological agents for the treatment of psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry* **21**: 29–38.
89. Serralheiro, A., G. Alves, A. Fortuna, *et al.* 2014. Intranasal administration of carbamazepine to mice: a direct delivery pathway for brain targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.* **60**: 32–39.
90. Crowe, T.P., M.H.W. Greenlee, A.G. Kanthasamy, *et al.* 2018. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sci.* **195**: 44–52.
91. Dhuria, S.V., L.R. Hanson & W.H. Frey. 2010. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J. Pharm. Sci.* **99**: 1654–1673.
92. Jiang, Y., Y. Li & X. Liu. 2015. Intranasal delivery: circumventing the iron curtain to treat neurological disorders. *Expert Opin. Drug Deliv.* **12**: 1717–1725.
93. Djupesland, P.G., J.C. Messina & R.A. Mahmoud. 2014. The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: an anatomic, physiologic, and delivery technology overview. *Ther. Deliv.* **5**: 709–733.
94. Fortuna, A., G. Alves, A. Serralheiro, *et al.* 2014. Intranasal delivery of systemic-acting drugs: small-molecules and biomacromolecules. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **88**: 8–27.
95. Zhuang, X., X. Xiang, W. Grizzle, *et al.* 2011. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol. Ther.* **19**: 1769–1779.

96. Wang, Z., L. Xiong, W. Wan, *et al.* 2017. Intranasal BMP9 ameliorates Alzheimer disease-like pathology and cognitive deficits in APP/PS1 transgenic mice. *Front. Mol. Neurosci.* **10**: 32.
97. Mao, Y.-F., Z. Guo, T. Zheng, *et al.* 2016. Intranasal insulin alleviates cognitive deficits and amyloid pathology in young adult APPswe/PS1dE9 mice. *Aging Cell* **15**: 893–902.
98. Rangasamy, S.B., G.T. Corbett, A. Roy, *et al.* 2015. Intranasal delivery of NEMO-binding domain peptide prevents memory loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **47**: 385–402.
99. Chou, M.-L., J.-W. Wu, F. Gouel, *et al.* 2017. Tailor-made purified human platelet lysate concentrated in neurotrophins for treatment of Parkinson's disease. *Biomaterials* **142**: 77–89.
100. Danielyan, L., S. Beer-Hammer, A. Stolzing, *et al.* 2014. Intranasal delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, macrophages, and microglia to the brain in mouse models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Cell Transplant.* **23**(Suppl. 1): S123–S139.
101. He, Q., Y. Li, S. Guo, *et al.* 2016. Inhibition of Rho-kinase by Fasudil protects dopamine neurons and attenuates inflammatory response in an intranasal lipopolysaccharide-mediated Parkinson's model. *Eur. J. Neurosci.* **43**: 41–52.
102. Anitua, E., C. Pascual, R. Pérez-Gonzalez, *et al.* 2015. Intranasal PRGF-Endoret enhances neuronal survival and attenuates NF- $\kappa$ B-dependent inflammation process in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Control. Release* **203**: 170–180.
103. Fransson, M., E. Piras, J. Burman, *et al.* 2012. CAR/FoxP3-engineered T regulatory cells target the CNS and suppress EAE upon intranasal delivery. *J. Neuroinflammation* **9**: 576.
104. Chapman, C.D., W.H. Frey, S. Craft, *et al.* 2013. Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharm. Res.* **30**: 2475–2484.
105. Kim, I.-D., J.-H. Shin, S.-W. Kim, *et al.* 2012. Intranasal delivery of HMGB1 siRNA confers target gene knockdown and robust neuroprotection in the posts ischemic brain. *Mol. Ther.* **20**: 829–839.
106. Yadav, S., S.K. Gandham, R. Panicucci, *et al.* 2016. Intranasal brain delivery of cationic nanoemulsion-encapsulated TNF $\alpha$  siRNA in prevention of experimental neuroinflammation. *Nanomedicine* **12**: 987–1002.
107. Rodriguez, M., J. Lapierre, C.R. Ojha, *et al.* 2017. Intranasal drug delivery of small interfering RNA targeting Beclin1 encapsulated with polyethylenimine (PEI) in mouse brain to achieve HIV attenuation. *Sci. Rep.* **7**: 1862.
108. De Crozals, G., R. Bonnet, C. Farre, *et al.* 2016. Nanoparticles with multiple properties for biomedical applications: a strategic guide. *Nano Today* **11**: 435–463.
109. Samaridou, E. & M.J. Alonso. 2018. Nose-to-brain peptide delivery—the potential of nanotechnology. *Bioorg. Med. Chem.* **26**: 2888–2905.
110. Gao, H. 2016. Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery. *Acta Pharm. Sin. B* **6**: 268–286.
111. Chiaretti, A., G. Conti, B. Falsini, *et al.* 2017. Intranasal nerve growth factor administration improves cerebral functions in a child with severe traumatic brain injury: a case report. *Brain Inj.* **31**: 1538–1547.
112. Morgan, T.M. & B. Soh. 2017. Absolute bioavailability and safety of a novel rivastigmine nasal spray in healthy elderly individuals. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **83**: 510–516.
113. Santos-Morales, O., A. Díaz-Machado, D. Jiménez-Rodríguez, *et al.* 2017. Nasal administration of the neuroprotective candidate NeuroEPO to healthy volunteers: a randomized, parallel, open-label safety study. *BMC Neurol.* **17**: 129.
114. van Zuiden, M., J.L. Frijling, L. Nawijn, *et al.* 2017. Intranasal oxytocin to prevent posttraumatic stress disorder symptoms: a randomized controlled trial in emergency department patients. *Biol. Psychiatry* **81**: 1030–1040.
115. Mischley, L.K., K.E. Conley, E.G. Shankland, *et al.* 2016. Central nervous system uptake of intranasal glutathione in Parkinson's disease. *NPJ Park. Dis.* **2**: 16002.
116. Rao, A.S., B. Gelaye, T. Kurth, *et al.* 2016. A randomized trial of ketorolac vs sumatriptan vs placebo nasal spray (KSPN) for acute migraine. *Headache J. Head Face Pain* **56**: 331–340.
117. Pfaffenrath, V., E. Fenzl, D. Bregman, *et al.* 2012. Intranasal ketorolac tromethamine (SPRIX(R)) containing 6% of lidocaine (ROX-828) for acute treatment of migraine: safety and efficacy data from a phase II clinical trial. *Cephalalgia* **32**: 766–777.
118. Diener, H.-C. & S. Evers. 2007. Effectiveness and satisfaction with zolmitriptan 5 mg nasal spray for treatment of migraine in real-life practice: results of a postmarketing surveillance study. *Clin. Drug Investig.* **27**: 59–66.
119. Menshawy, A., H. Ahmed, A. Ismail, *et al.* 2018. Intranasal sumatriptan for acute migraine attacks: a systematic review and meta-analysis. *Neurol. Sci.* **39**: 31–44.