



Universidad de Chile - Facultad de Ciencias - Escuela de pregrado

**“PAPEL DEL RECEPTOR GPR43 EXPRESADO EN CÉLULAS LINFOIDES
INNATAS EN EL DESARROLLO DE LA ENCEFALOMIELITIS
AUTOINMUNE EXPERIMENTAL”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento para optar al
Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Daniela Muñoz Madariaga

Directora de seminario de título:

Dra. Carolina Prado Terrazas

Profesora patrocinante:

Dra. María Rosa Bono Merino

02 de agosto de 2023

Santiago-Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el o (la) candidato (a):

DANIELA ALEJANDRA MUÑOZ MADARIAGA

“PAPEL DEL RECEPTOR GPR43 EXPRESADO EN CÉLULAS LINFOIDES INNATAS EN EL DESARROLLO DE LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dra. Carolina Prado Terrazas
Director Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono
Profesor patrocinante

COMISIÓN REVISORA Y EVALUADORA

Dra. Daniela Sauma
Presidente Comisión

Dr. Rodrigo Pacheco
Evaluador

Santiago de Chile,

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de figuras	iv
Lista de abreviaturas	v
Resumen	1
Abstract	2
I. Introducción	3
1.1 Enfermedades neurodegenerativas autoinmunes	3
1.2 Esclerosis múltiple	4
1.3 Eje intestino-SNC	9
1.4 Receptores de ácidos grasos de cadena corta	15
1.5 Células linfoides innatas	16
II. Hipótesis	21
III. Objetivos	21
3.1 Objetivo general	21
3.2 Objetivos específicos	21
IV. Materiales y métodos	22
4.1 Animales	22
4.2 Inducción de encefalomiелitis autoinmune experimental	22
4.3 Extracción de células linfoides innatas de la lámina propia	23

4.4	Anticuerpos y análisis de citometría de flujo	24
4.5	Estimulación de células linfoides innatas <i>Rag1^{-/-} in vitro</i>	26
4.6	Ensayo de presentación antigénica <i>in vitro</i>	26
4.7	Análisis estadístico	27
V.	Resultados	28
5.1	Aumento en la expresión de CD86 y disminución de la producción de IL-2 en células linfoides innatas de la lámina propia colónica de ratones con EAE durante el máximo de severidad	28
5.2	La estimulación <i>in vitro</i> del GPR43 en células linfoides innatas disminuye su capacidad de activar linfocitos Th1.	31
VI.	Discusión y proyecciones	33
VII.	Conclusión	36
	Bibliografía	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. ¿Dónde inicia la EM?	9
Figura 2: La familia de las células linfoides innatas	16
Figura 3: Inducción de EAE en ratones	23
Figura 4: Aumento en la expresión de CD86⁺ en ILC de la LP colónica de ratones con EAE durante el máximo de sintomatología	29
Figura 5: Disminución en la frecuencia de ILC productoras de IL-2 en ratones con EAE durante el máximo de severidad	30
Figura 6. La estimulación del GPR43 en ILC disminuye su capacidad de activar linfocitos T CD4⁺ <i>in vitro</i>	32

ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
BEI	Barrera epitelial intestinal
BFA	Brefeldina A
BFS	Bacterias filamentosas segmentadas
BHE	Barrera hematoencefálica
CDF	Células dendríticas foliculares
CIE	Compartimiento intraepitelial
DPI	Días post-inducción
DTT	Ditiotreitol
EAE	Encefalitis Autoinmune Experimental
EDTA	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico
EM	Esclerosis múltiple
EMRR	Esclerosis múltiple remitente recurrente
FBS	Suero fetal bovino
FFAR	Receptor de ácidos grasos libres, del inglés <i>Free fatty acids receptor</i>
GDP	Guanosina difosfato
GF	Libres de gérmenes, del inglés <i>Germ free</i>
GPCR	Receptor acoplado a proteína G, del inglés <i>G protein coupled receptor</i>
GTP	Guanosina trifosfato
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HDAC	Histonas deacetilasas

HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl) piperazin-1-iletanosulfónico
ILC	Células linfoides innatas, del inglés <i>Innate lymphoid cells</i>
LCF	Líquido cefalorraquídeo
LP	Lamina propia
LTi	Inductoras de tejido linfoide, del inglés <i>lymphoid tissue inducitor</i>
MI	Microbiota intestinal
NCR	Receptor de citotoxicidad natural
PBM	Proteína básica de la mielina
PMA	Forbol-miristato-acetato, del inglés <i>Phorbol myristate acetate</i>
pMOG₃₅₋₅₅	Péptido derivado de glicoproteína de mielina del oligodendrocito, del inglés <i>myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide</i> .
pOT-II	péptido OVA ₃₂₃₋₃₃₉
RAG1KO	Ratones deficientes de enzima activadora de recombinación 1
RNS	Especies reactivas de nitrógeno, del inglés <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés <i>reactive oxygen species</i>
SNC	Sistema nervioso central
SNE	Sistema nervioso entérico
SPF	Libre de patógenos específicos, del inglés <i>specific pathogen free</i>
Treg	Linfocitos T reguladores
Zaq	Zombie Aqua™

RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la desmielinización y neurodegeneración que afecta a millones de individuos a nivel mundial. La patogénesis de esta enfermedad aún no ha sido dilucidada, sin embargo, el eje intestino-SNC (del inglés *Gut-brain axis*) se ha identificado como un componente clave en el desarrollo de la enfermedad. Así, tanto en pacientes como en ratones con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), el modelo de estudio de la enfermedad, se ha observado una disminución de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) asociado a disbiosis. Ya que las células linfoides innatas (ILC) intestinales expresan altos niveles del receptor acoplado a proteína G 43 (GPR43), el principal receptor para los AGCC, y orquestan la respuesta inmune adaptativa, en esta investigación se estudia el papel del GPR43 expresado en ILC de la lámina propia colónica en ratones con EAE. Para esto, se extrajeron células de la LP colónica de ratones con EAE en el máximo de severidad de la enfermedad y se analizó la expresión del MHC-II, moléculas co-estimuladoras y citoquinas en ILC mediante citometría de flujo. También, se realizó un ensayo de presentación antigénica para evaluar el efecto de la estimulación del GPR43 expresado en ILC y sobre la activación de linfocitos T CD4⁺. Los resultados sugieren que la expresión de moléculas co-estimuladoras en las ILC aumenta y la producción de IL-2 disminuye, favoreciendo la actividad de linfocitos T efectores y limitando la función supresora de linfocitos T reguladores (Treg), respectivamente, mecanismos regulados por el GPR43, cuya estimulación es menor en EAE. En conjunto, estos mecanismos contribuyen al desarrollo de la EAE.

ABSTRACT

Multiple sclerosis is an autoimmune disease characterized by demyelination and neurodegeneration that affects millions of individuals worldwide. The disease pathogenesis hasn't been elucidated; however, the gut-brain axis has been identified as a principal component in the development of the disease. Thus, both in patients as in EAE mice -the study model of the disease- a decrease in short-chain fatty acids has been observed and associated with dysbiosis. As ILC express high levels of GPR43, the main receptor for SCFA, and they orchestrate adaptive immunity, in this research the role of GPR43 expressed on ILC from EAE mice colonic lamina propria is studied. To achieve this, the EAE mice colonic lamina propria cells were isolated at the peak of symptomatology and then the expression of MHC-II, co-stimulatory molecules, and cytokines in ILC were analyzed by flow cytometry. Also, the effect of the stimulation of the GPR43 expressed in ILC stimulation on their capacity to activate T CD4⁺ cells. The results suggest that there is an upregulation of costimulatory molecules in ILC and its IL-2 production decreases, promoting T cells activity and restricting the suppressive function of regulatory T cells, respectively, and these mechanisms are regulated by GPR43 which is downregulated during EAE. Overall, these mechanisms contribute to the development of EAE.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades neurodegenerativas autoinmunes

La autoinmunidad y la neurodegeneración son dos procesos diferentes, pero estrechamente relacionados, que están presentes en muchas enfermedades neurológicas. La neurodegeneración se refiere a la pérdida progresiva de la función y estructura neuronal, que causa problemas cognitivos y motores. Por otro lado, la autoinmunidad corresponde a la respuesta inmunitaria contra componentes propios, que puede ocurrir debido a fallas del sistema inmune en el establecimiento de tolerancia para proteger al hospedero de la actividad de linfocitos autorreactivos, y puede ocasionar daño tisular e inflamación (Owen y col., 2013).

La autoinmunidad puede contribuir al desarrollo y progreso de neuroinflamación por medio de la activación de células inmunes reactivas para autoantígenos derivados del sistema nervioso central (SNC). Durante mucho tiempo se consideró al SNC un sistema inmunoprivilegiado debido a la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE), una capa endotelial con permeabilidad selectiva que separa la sangre del líquido cefalorraquídeo (LCF; Escobar & Gómez, 2008). Sin embargo, hoy se sabe que existe una conexión anatómica entre el SNC y el sistema linfático, con un activo sistema de vigilancia inmune de leucocitos en las meninges y el LCF. Al comprometer la integridad de la BHE, las células inmunes autorreactivas se infiltran y promueven inflamación, gliosis y daño neuroaxonal. Estos procesos activan microglías y astrocitos que residen en el SNC, los cuales secretan más factores solubles como citoquinas, quimioquinas y otros elementos neurotóxicos, perpetuando y amplificando la neuroinflamación y la respuesta autoinmune (Dendrou y col., 2015; Lyman y col., 2014; Shabab y col., 2017). Así, la relación entre neurodegeneración y autoinmunidad es bidireccional, puesto que la neurodegeneración participa de la activación de respuestas autoinmunes, a la vez que la autoinmunidad contribuye con el daño neuroaxonal. La comprensión de los mecanismos subyacentes a esta relación es fundamental para

el desarrollo de estrategias terapéuticas para enfermedades autoinmunes caracterizadas por inflamación y neurodegeneración como la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson y la EM.

1.2 Esclerosis Múltiple

La EM es una enfermedad neurodegenerativa autoinmune mediada principalmente por los linfocitos T CD4⁺, que se infiltran al SNC donde promueven la inflamación, desmielinización y degeneración neuroaxonal. La EM es una enfermedad heterogénea, es decir, los pacientes pueden experimentar un amplio rango de sintomatología. El tipo de EM más común (85% de los casos) es de tipo recurrente remitente (EMRR, *Relapsing-remitting* en inglés) en la cual el paciente pasa por episodios alternados de disfunción neurológica llamadas recaídas (“*relapsing*”) y periodos de recuperación llamadas remisiones (“*remitting*”). Un 80% de pacientes EMRR puede evolucionar a EM secundaria progresiva, en la cual cesan las remisiones y progresa la atrofia del SNC. Por otro lado, alrededor de un 10% de los pacientes presenta EM tipo primaria progresiva, caracterizada por ausencia de recaídas y la evolución progresiva de la enfermedad desde un inicio (Dendrou y col., 2015; Miljković y col., 2021).

Relevancia de la investigación de la EM

A nivel mundial se estiman 2,8 millones de personas viviendo con EM, destacando que las mujeres presentan doble probabilidad de padecer la enfermedad que los hombres (Walton y col, 2020). A la fecha, en Chile se han estimado aproximadamente 2.600 pacientes con una incidencia de 14 casos por cada 100.000 habitantes según el Atlas de EM de la Federación Internacional de Esclerosis Múltiple (Coetzee & Thompson, 2020). La EM conlleva impactos emocionales, sociales, y económicos, no sólo para quien padece la patología, sino que también para su entorno familiar. En primer lugar, los síntomas asociados a la EM, que entre los más comunes están

problemas musculares, fatiga, incontinencia y problemas cognitivos, inciden en actividades cotidianas como prácticas deportivas, recreativas, religiosas, laborales y sociales, limitando el día a día y las relaciones del paciente. En efecto, dos tercios de los pacientes reportan sentir que el ámbito social se ve deteriorado a causa de la sintomatología (Halper, 2007).

Además, padecer EM involucra un gran gasto económico. En base a la información que entrega el Ministerio de Salud del Gobierno de Chile (Problemas de Salud - AUGE 85 - Ministerio de Salud), diagnosticar la EM tiene un arancel de aproximadamente 835.000 pesos, los distintos tratamientos mensuales para EMRR suman casi 550.000 pesos, el tratamiento de cada brote cuestan más de 1 millón de pesos y los tratamientos de rehabilitación van desde los 4.500 a los 342.000 pesos. Considerando que la edad promedio a la que se diagnostica la enfermedad es alrededor de los 30 años (Walton y col., 2020), estos costos pueden significar una gran carga económica de por vida para el paciente y su familia.

Patología de la EM

Si bien la causa precisa de la EM aún se desconoce, los estudios indican que existen varios factores que pueden favorecer el desarrollo de la enfermedad como los agentes infecciosos virales o microbianos, hábitos nutricionales, el tabaquismo o predisposición genética. Al respecto, se ha estimado que la genética aporta un 30% al riesgo de desarrollar la enfermedad con más de 100 regiones genéticas identificadas. Aun así, debido a que los factores ambientales contribuyen en mayor proporción a la heterogeneidad, la determinación de las causas se ha complicado (Dendrou y col., 2015; Sospedra & Martin, 2016).

Dos modelos han sido propuestos para explicar la patología detrás de la EM. El primero es el modelo intrínseco que propone la neurodegeneración como evento primario que conduce a la liberación de antígenos a la periferia, donde son reconocidos por células autorreactivas. El segundo

es conocido como modelo extrínseco y sugiere que los linfocitos T autorreactivos escapan de la selección tímica y salen a la periferia. Sin embargo, puede darse el caso de que los linfocitos Tregs sean defectuosos o los linfocitos T sean altamente resistentes a la supresión, de modo que son capaces de sobrevivir a la tolerancia periférica (Parodi & Kerlero de Rosbo, 2021). Es aquí donde pueden ser activados por eventos como el mimetismo molecular, es decir, por similitudes entre un antígeno exógeno con péptidos propios del hospedero (Rojas y col., 2018). Una vez activados, los linfocitos autorreactivos son capaces de traspasar al torrente sanguíneo y migrar hasta el SNC donde podrían ser reactivados por la presentación de péptidos derivados de la mielina, promoviendo la liberación de factores solubles que median el daño axonal y la inflamación. Ya que estos linfocitos pueden desencadenar la inflamación del SNC, también son conocidos como linfocitos encefalitogénicos (Krishnarajah & Becher, 2022)

Papel de las células inmunes adaptativas en el desarrollo de la EM

Las principales subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ involucrados en la EM son los linfocitos Th1 y Th17 reactivos para péptidos provenientes de la mielina. Sin embargo, también se han encontrado estas células en individuos sanos, por lo que es clave determinar las diferencias entre ellos y las personas que desarrollan la enfermedad (Hellings y col., 2001). Por otro lado, se ha descrito que los linfocitos T CD8⁺ específicos para antígenos derivados del SNC participan en una etapa secundaria en el daño neuroaxonal durante los episodios de relapso y la fase crónica. Además, cabe destacar se encuentran con mayor frecuencia en las lesiones neuronales que T CD4⁺, y la cantidad está relacionada con el daño axonal (Sospedra & Martin, 2016). Respecto al papel de los linfocitos B, se ha descrito que su infiltración varía a lo largo de la progresión de la patología y es posible encontrar linfocitos B expandidos clonalmente en las meninges y el LCF. De hecho, se han observado folículos de linfocitos B ectópicos en las meninges de pacientes con EM secundaria

progresiva, pero no en pacientes EMRR (Magliozzi y col., 2007). A partir de lo expuesto, pareciera que los linfocitos T CD4⁺ reactivos para mielina son las células más importantes para la inducción y mantención de la EM, mientras que los linfocitos T CD8⁺ junto con los linfocitos B estarían más bien relacionados con el daño tisular en el SNC. Por otra parte, la función de los linfocitos Treg en el desarrollo de la EM también ha sido explorada. Reportes previos han indicado que existe una disminución en la frecuencia y en la capacidad supresora de los linfocitos Tregs periféricos en pacientes con EM junto con la falta de expansión de Tregs de memoria (Dendrou y col., 2015). Particularmente, se ha encontrado menor número y actividad de Tregs CD4⁺ CD25^{hi}, Tregs tipo 1 productoras de IL-10 y Treg que expresan FoxP3 en los pacientes. Otra alternativa, no necesariamente excluyente, que ha sido propuesta es la presencia de linfocitos efectores autorreactivos altamente resistentes a los mecanismos de supresión (Sospedra & Martin, 2016). De hecho, estudios previos han descrito disminución en la frecuencia y/o en la capacidad supresora de linfocitos Tregs en la periferia de pacientes con EM (Dendrou y col., 2015).

Neuroinflamación progresiva

Una vez los linfocitos autorreactivos se infiltran al SNC, son reactivados por células presentadoras de antígenos (CPAs) residentes. La activación inmune inicia la secreción de mediadores solubles que amplifican la infiltración celular periférica debido a sus efectos atrayentes y la inducción de expresión de moléculas de adhesión en las BHE. Adicionalmente, los linfocitos infiltrados secretan productos neurotóxicos como ROS, especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés *reactive nitrogen species*), glutamato, citoquinas proinflamatorias, entre otras. Estas sustancias promueven el estrés metabólico, desbalance iónico, deficiencia energética y plegamientos defectuosos de proteínas en las neuronas, que culmina en la neurodegeneración. Este daño puede ser extendido desde su punto de origen de forma anterógrada, retrograda y también a

las neuronas pre y postsinápticas. Eventualmente, podrían establecerse estructuras linfoides terciarias conformadas por células plasmáticas, linfocitos B y T y células dendríticas foliculares (CDFs) en las meninges, que cooperan con la secreción de factores solubles proinflamatorios y, en consecuencia, al reclutamiento de microglías y astrocitos que previenen la remielinización, independiente de la infiltración de células inmunes periféricas (Dendrou y col., 2015; Sospedra & Martin, 2016).

Sintomatología

Los pacientes que sufren EM suelen presentar diversos síntomas a nivel sistémico, pero que no necesariamente son iguales en todos los pacientes. Los principales síntomas son problemas motores y cognitivos, incontinencia urinaria, fatiga, alteraciones visuales y frecuentes problemas intestinales. Este último síntoma es común en distintas enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo en Parkinson y Alzheimer, por lo que ha sido un importante foco de estudio en estas enfermedades. A partir de este interés, los investigadores han descrito que la relación entre síntomas gastrointestinales y patologías neurológicas se basa en el eje intestino-SNC (Domingues & Hepworth, 2020; Miljković y col., 2021; Parodi & Kerlero de Rosbo, 2021).

1.3 Eje intestino-SNC

El eje intestino-SNC es una ruta bidireccional compuesta por la barrera epitelial intestinal (BEI), el sistema nervioso entérico (SNE) y la microbiota intestinal (MI). Estos distintos elementos regulan la homeostasis del organismo gracias a la íntima comunicación que existe entre ellos, lo que será abordado más adelante.

Debido a la comunicación bidireccional que lo caracteriza, existe un intenso debate sobre si las patologías tienen inicio en el ambiente intestinal o la inflamación del SNC es un evento anterior (Figura 1; Parodi & Kerlero de Rosbo, 2021).

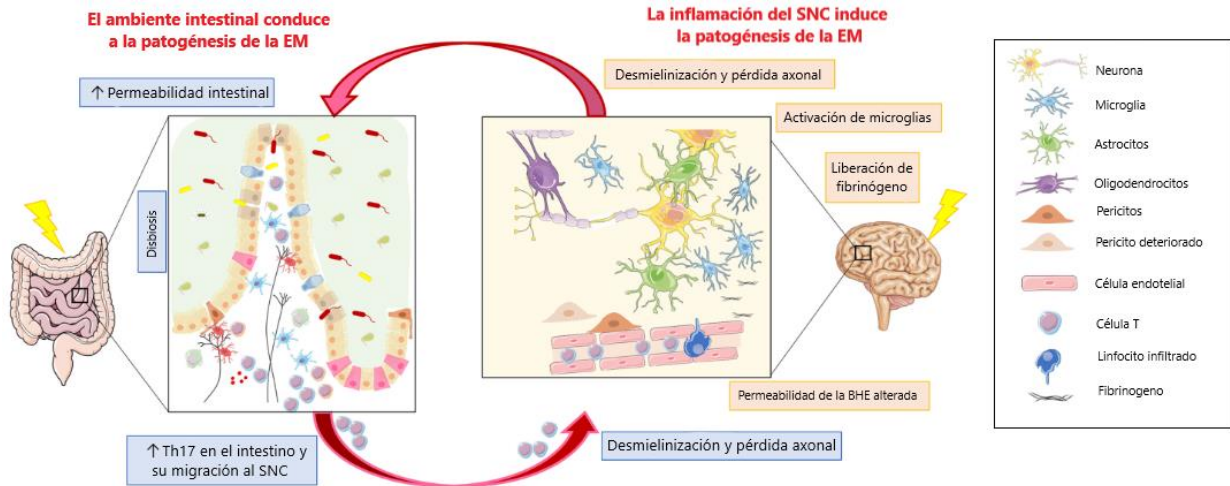


Figura 1. ¿Dónde inicia la EM? Las evidencias que apoyan que la patogénesis se origina en el intestino indican que la disbiosis junto con el aumento en la permeabilidad de la BEI permite a los microorganismos y sus productos ingresar a la LP, promoviendo la inflamación. Las respuestas inflamatorias en el intestino pueden activar a los linfocitos T encefalitogénicos que migran al SNC, donde desencadenan la neuroinflamación que culmina en desmielinización y pérdida axonal. En cambio, la hipótesis que indica que la inflamación del SNC es un evento primario, sugiere que alteraciones en la permeabilidad de la BHE permite el paso de componentes como fibrinógeno, un activador de microglías. Así, se da pie a la infiltración de células inflamatorias y la transmisión de señales al intestino, que alteraran la integridad de la barrera intestinal, perpetuando un ciclo inflamatorio entre el SNC y el tracto gastrointestinal. Imagen adaptada desde Parodi & Kerlero de Rosbo, (2021).

Barrera epitelial intestinal

La BEI es una mucosa semipermeable que recubre el tracto digestivo, permite la absorción de nutrientes y limita la entrada de antígenos o microorganismos dañinos. Se compone principalmente de una monocapa de células unidas por la lámina basal que incluyen enterocitos, células productoras de mucinas y secretoras de péptidos antimicrobianos, llamadas células caliciformes y células de Paneth, respectivamente. Entre medio de estas células se hallan linfocitos, principalmente T CD8⁺, denominados linfocitos intraepiteliales (P. D. Smith y col., 2012). Bajo la capa epitelial se encuentra la lámina propia (LP), formada por tejido conectivo innervado e irrigado, donde reside una gran variedad de células inmunes como linfocitos T (en su mayoría CD4⁺), células plasmáticas, fagocitos, ILC y células dendríticas, siendo estas últimas capaces de penetrar la lámina basal y por entre las células del epitelio para captar antígenos directamente desde el lumen intestinal (P. D. Smith y col., 2012). La integridad de la barrera intestinal es un factor crucial en la mantención de la homeostasis intestinal e inmune, puesto que un aumento en la permeabilidad debido a agentes patológicos o ambientales permite la entrada de microorganismos y/o sus productos a la LP. En consecuencia, se promueve la inflamación no sólo localmente, sino que también nivel sistémico (Parodi & Kerlero de Rosbo, 2021).

Sistema nervioso entérico

El SNE es una gran red de neuronas y células gliales entéricas que inervan el tracto gastrointestinal y forma parte del sistema nervioso periférico. Las terminaciones nerviosas llegan hasta las células epiteliales intestinales, conectándose al SNC vía sistema nervioso simpático y parasimpático. Dentro de las funciones que el SNE regula están la motilidad gástrica, la absorción nutricional y la secreción, de modo que, al cambiar físicamente el ambiente intestinal puede alterar la composición de la microbiota. Por otro lado, también secreta neurotransmisores que actúan sobre

las células inmunes, y cuyos efectos depende de varios factores, como la naturaleza y concentración del neurotransmisor, la afinidad de los receptores, entre otros. A cambio, las neuronas del SNE son responsivas a citoquinas producidas por el sistema inmune intestinal y envían esta información al SNC (Niesler y col., 2021; Parodi & Kerlero de Rosbo, 2021).

Microbiota intestinal

La MI corresponde a la población de microorganismos que colonizan el sistema digestivo, incluye bacterias, hongos, arqueas, virus y protozoos (Jandhyala, 2015). La MI ha coevolucionado con el hospedero estableciendo una relación mutualista, en la cual el humano provee del ambiente ideal para su desarrollo y sustratos por medio de la dieta, mientras que la microbiota a cambio le protege de patógenos, participa de la absorción y descomposición de nutrientes, regula el desarrollo de microglías, la producción hormonal, el metabolismo de antioxidantes, la función de células inmunes, promueve la integridad de la BEI (Haase y col., 2020; Mirza & Mao-Draayer, 2017; Thursby & Juge, 2017). Todos estos efectos son ejercidos por medio de la amplia diversidad de metabolitos microbianos producidos por la MI, entre las cuales están vitaminas, poliaminas, aminoácidos de cadena ramificada y AGCC.

Debido al enorme impacto que ejerce sobre el organismo, en los últimos años ha habido un creciente interés por el papel que la MI podría tener en el desarrollo de diversas enfermedades. La disbiosis, es decir, alteración en la composición microbiana de la MI, ha sido asociada a patologías como la diabetes, la artritis reumatoide, el lupus sistémico eritematoso, la depresión y también a la EM (Yang & Cong, 2021).

Disbiosis en EM

Varias investigaciones han analizado alteraciones en la MI y el ambiente intestinal en la EM, tanto en pacientes como en modelos animales. El modelo de estudio para la EM es la EAE, la cual se puede inducir de manera activa inoculando un antígeno derivado de mielina como como el péptido derivado de glicoproteína de mielina del oligodendrocito (pMOG₃₅₋₅₅, del inglés *myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide*), o de forma pasiva mediante la transferencia adoptiva de linfocitos T reactivos a péptidos derivados de mielina, que desencadenan la fase efectora de la enfermedad (Miller y col., 2007). Lee y col., (2011) estudiaron los efectos de la microbiota en el desarrollo de la EAE y observó que en animales libres de gérmenes (GF, del inglés *Germ-free*) se retrasa la aparición de síntomas clínicos y desarrollan la enfermedad con menor severidad en comparación a ratones libres de patógenos específicos (SPF, del inglés *Specific-pathogen free*). Durante la misma investigación comprobaron que este efecto estaba asociado a una menor producción de citoquinas proinflamatorias IFN γ e IL-17A, un aumento en linfocitos Tregs y la presencia de células dendríticas con menor capacidad de estimular respuestas proinflamatorias por linfocitos T en los animales GF. Sumado a ello, también observaron que al administrar bacterias filamentosas segmentadas (BFS) a los ratones GF, estos recuperaron el desarrollo de los síntomas clínicos a niveles muy similares que los ratones SPF. Esto se debe a que las BFSs indujeron no sólo la producción de IL-17A por linfocitos Th17 en el intestino, sino que también en el SNC. Esta investigación sugiere una participación clave de la MI en el desarrollo de inflamación neurológica y puede ser un potencial foco de atención para el desarrollo terapéutico en distintas patologías.

En un estudio más reciente realizado por Berer y col., (2017) se evaluaron los efectos de la microbiota de gemelos monocigóticos humanos discordantes para la EM, esto significa que uno de los gemelos padece la patología, mientras que el otro es un individuo sano. La transferencia de MI proveniente del gemelo afectado a un modelo murino transgénico de EAE espontánea, promovió

el desarrollo de la enfermedad a niveles significativamente mayores que la transferencia de MI proveniente del gemelo sano. Las diferencias encontradas se asociaban con un aumento en los géneros bacterianos *Akkermansia* y *Sutterella*, junto con una disminución en la secreción de IL-10 en las muestras aisladas desde los pacientes con EM, sugiriendo disbiosis y mayor inflamación en ellos. Específicamente, *Akkermansia* ha sido asociada a rutas inflamatorias, como la expresión de genes de presentación de antígenos y activación del complemento, probablemente debido a que su actividad degradadora de mucus, lo que altera la permeabilidad intestinal (Derrien y col., 2011).

En cuanto a estudios hechos en humanos, se ha comparado la composición de la MI de personas sanas con pacientes con EM. Estos últimos muestran disbiosis con un aumento en *Akkermansia*, *Methanobrevibacter* y *Acinetobacter*, géneros bacterianos relacionados con un aumento en la proporción de linfocitos efectores e inflamación; y una disminución en bacterias *Faecalibacterium prusnitzii* y *Prevotella histicola* y del grupo de *Parabacteroides*, *Bacteroides* y *Butyricimonas*. Estas bacterias tienen en común promover respuestas antiinflamatorias y favorecer la diferenciación de linfocitos a reguladores por sobre efectores, efectos atribuidos al metabolito microbiano más abundante a nivel intestinal, los AGCC (Chen y col., 2016; Haase y col., 2020; Jangi y col., 2016; Miyake y col., 2015; Sepahi y col., 2021).

Ácidos grasos de cadena corta

Los AGCC son cadenas carbonadas que van desde 1 a 6 moléculas de carbono, producidas a partir de la fermentación de la fibra dietética por la MI. En humanos, la concentración máxima está en el colon proximal con alrededor de 100 mmol/kg, pero también se encuentra en cantidades significativas en el colon distal (80 mmol/kg) y el intestino delgado (10 mmol/kg). El acetato (C2), propionato (C3) y butirato (C4) son los AGCC más abundantes en el intestino humano en una proporción de 3:1:1, respectivamente (Sepahi y col., 2021). Dentro de los mecanismos que los

AGCC está la producción de mucus, la expresión de uniones estrechas en la BEI, proporcionan energía a los colonocitos, la regulación de la diferenciación de los linfocitos T y, específicamente el C4, aumenta el fenotipo T regulador y su capacidad supresora (Haase y col., 2020). Otro efecto importante ejercido por los AGCC es promover la integridad de la BHE, ya que, se ha reportado que ratones GF poseen menor expresión de proteínas de uniones estrechas y mayor permeabilidad de la BHE que aquellos con MI normal. Incluso, la transferencia de bacterias productoras de AGCC o la administración oral de C4 directa disminuyen su permeabilidad (Braniste y col., 2014). De este modo, al apoyar el papel protector de la BHE, los AGCC tendrían otro rol fundamental en el desarrollo o prevención de la neuroinflamación.

Resultados previos del laboratorio muestran una disminución significativa de AGCC en ratones con EAE. En particular, en ratones se encontró que poseen menores niveles de C2 sistémico y C3 en heces al dpi 5 y 15, respectivamente (Prado y col., 2023). Consistente con lo anterior, otros estudios señalan que luego del tratamiento oral con AGCC o una dieta alta en fibra, se retrasa la aparición de los síntomas y disminuye la severidad de la enfermedad, tanto en humanos como en ratones (Duscha y col., 2020; Haghikia y col., 2015; Mizuno y col., 2017; Prado y col., 2023).

Muchos de estos efectos desencadenados por los AGCC son iniciados por medio de dos mecanismos. Por una parte, los AGCC pueden ingresar a las células por difusión pasiva o por transportadores monocarboxilados, y afectar la expresión génica por medio de la inhibición de histonas deacetilasas (HDAC). Por otro lado, actúan como ligandos endógenos para los receptores acoplados a proteína G (GPCR del inglés *G protein-coupled receptors*, Dalile y col., 2019).

1.4 Receptores para AGCC

Los GPCR conforman una superfamilia de receptores de membrana que interactúan con proteínas G triméricas para iniciar la cascada de señalización que culmina en varios cambios fisiológicos celulares y sistémicos.

Hasta la fecha, se han descrito 6 GPCRs que reconocen AGCC en humanos: GPR41, GPR42, GPR43, GPR109A, OR51E1 y OR51E2. De estos, GPR41 y el GPR43 son los más estudiados y han sido renombrados como receptor de ácidos grasos libres (FFAR del inglés *free fatty acid receptor*) 3 y FFAR2, respectivamente. Estos receptores difieren en la afinidad por los distintos AGCC (Martin-Gallausiaux y col., 2021), siendo C3=C4=C5>C2>C6 para el GPR41 y C3=C2>C4>C5>C6 para el GPR43. Así, el GPR43 tiene preferencia por las cadenas más cortas, mientras que el GPR41 es más afín por cadenas largas (Dalile y col., 2019; Ulven, 2012a). Por esto, y debido a que en el intestino predominan los AGCC de cadenas más cortas, centraremos el análisis en el rol del GPR43 en el desarrollo patológico de la EM y su relación con el componente digestivo del eje intestino-SNC.

El GPR43 está involucrado en la regulación del apetito y metabolismo, la adipogénesis y la supresión de tumores (Ulven, 2012b). Asimismo, se ha descrito que ejerce efectos inmunomodulatorios en la homeostasis intestinal e inflamación, puesto que media la expansión de linfocitos T reguladores y su pérdida en ratones disminuye la inflamación en modelos de colitis (Maslowski y col., 2009; P. M. Smith y col., 2013). El GPR43 se expresa en un gran rango de células inmunes, pero recientemente se ha determinado que las células con mayor expresión del receptor son células linfoides innatas (ILC del inglés *innate lymphoid cells*; Sepahi y col., 2021).

1.5 Células linfoides innatas

Las ILC son células inmunes ubicadas principalmente en mucosas. Se desarrollan en la médula ósea desde un progenitor linfocítico común y tienden a migrar a tejidos mucosos, pero también pueblan el bazo, nodos linfáticos, el cerebro, meninges y páncreas (Miljković y col., 2021). Estas células están al inicio de la cascada inmunológica y actúan como orquestadoras de la respuesta inmune, puesto que son efectores inmediatos ante una amplia gama de factores endógenos como neuropéptidos, hormonas, citoquinas, entre otros, y se comunican directa e indirectamente con células inmunes innatas y adaptativas (Artis & Spits, 2015; P. D. Smith y col., 2012; Vivier y col., 2018). Las ILC se identifican por la expresión de CD45, CD90.2 (también conocida como Thy1.2) y por la falta de una serie de marcadores superficiales característicos de los mayores linajes celulares hematopoyéticos, por lo cual se identifican como linaje-negativas (Lin^-). De acuerdo con Artis & Spits, (2015) las ILC han sido clasificadas en 4 subgrupos: las células NK, las ILC1, ILC2 e ILC3 (Figura 2).

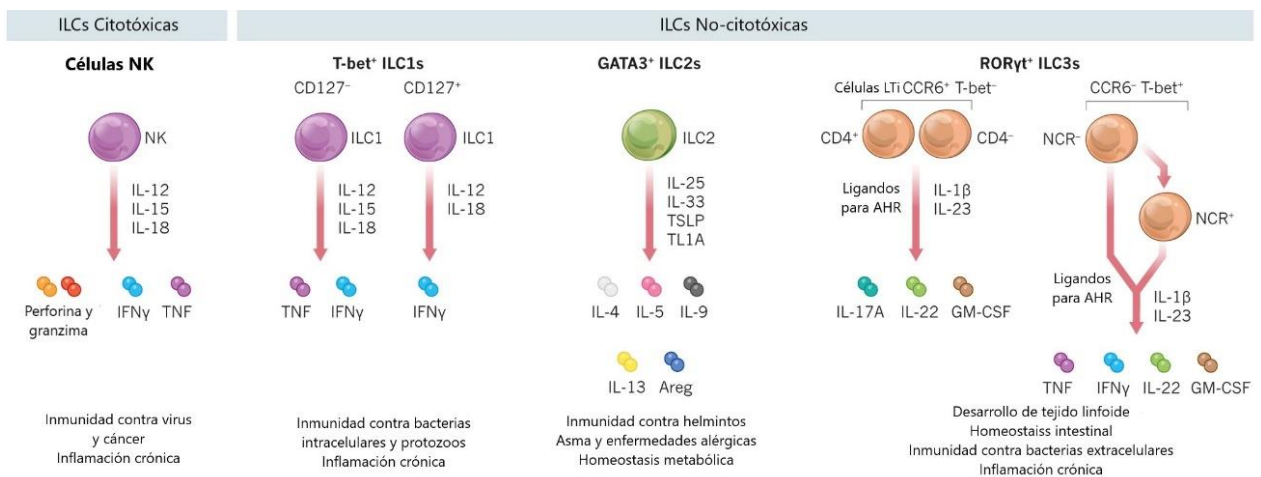


Figura 2: La familia de las ILC. Las distintas subpoblaciones han sido definidas a partir de la expresión de marcadores de superficie, factores de transcripción y patrones de expresión que caracterizan a cada uno. Se distingue una rama citotóxica que incluye a las células NK, y la rama no citotóxica que engloba a las ILC1, ILC2 e ILC3. AHR: receptor de hidrocarburos de arilo; Areg: anferegulina; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; IFN γ : interferón γ ; LTi: inductor de tejido linfocítico; NCR: receptor natural de citotoxicidad; TNF: factor

de necrosis tumoral; TSLP: linfopoyetina estromal tímica. Imagen adaptada desde Artis & Spits, (2015).

Células NK

Las células NK participan de la protección contra virus y tumores mediante actividad citotóxica. Poseen características en común con las ILC1, para ambas el factor de transcripción principal es T-bet, producen IFN γ y son activadas por IL-12, IL-15 e IL-18. Sin embargo, las NK se distinguen por expresar NK1.1 superficial y secretar perforinas (Vivier y col., 2018).

ILC1

Las ILC1 abundan en la piel y son activadas por IL-12, IL-15 e IL-18, interleuquinas secretadas como respuesta a la presencia de microbios intracelulares, virus y tumores en el organismo. Su activación induce la expresión de IFN γ y TNF α para promover la producción de ROS y la actividad citotóxica inmune. Se ha sugerido que tienen un rol en el intestino, donde residen en el compartimento intraepitelial intestinal (CIE). Aquí interactúan con los linfocitos intraepiteliales para el control viral y también se ha observado que participan en la inflamación crónica de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (Artis & Spits, 2015; P. D. Smith y col., 2012).

ILC2

Las ILC2 se caracterizan por la abundancia del factor de transcripción GATA3. Predominan en la mucosa del sistema respiratorio. Cuando los tejidos son invadidos por organismos multicelulares, se secretan IL-25, IL-33 y linfopoyetina estromal tímica para promover la diferenciación y activación de las ILC2, que responden con la producción IL-4, IL-5 e IL-13. Los efectos de estas citoquinas son vasodilatación y producción de mucus, para frenar el ingreso

del parásito. Cabe destacar que poseen plasticidad, es decir, bajo ciertas condiciones pueden reprogramarse para adoptar otro fenotipo celular. Cuando son expuestas a IL-1 β se promueve la expresión del receptor de IL-12. A su vez, esto favorece la inducción del factor de transcripción T-bet, así les dota la capacidad de transdiferenciarse a ILC1s y secretar sus citoquinas características (Artis & Spits, 2015; P. D. Smith y col., 2012).

ILC3

Las ILC3 son células cuyo factor de transcripción maestro es ROR γ t y abundan en el intestino. Responden ante IL-1 β e IL-23, que son secretadas en presencia de microbios extracelulares como bacterias y hongos e inducen la producción de IL-17, IL-22, GM-CSF, TNF α e IL-2 por las ILC3. Estas citoquinas dirigen el reclutamiento de fagocitos, el reforzamiento de la barrera intestinal y la secreción de péptidos antimicrobianos por las células epiteliales intestinales. Este grupo es heterogéneo, ya que pueden distinguirse dos subdivisiones según la presencia del receptor de quimioquinas CCR6. Las CCR6 $^{-}$ también son T-bet $^{+}$ y consiste en dos subpoblaciones por la presencia del receptor de citotoxicidad natural (NCR del inglés *natural cytotoxicity receptor*). Las ILC3 CCR6 $^{+}$ también son conocidos como células inductoras de tejido linfóide (LTi del inglés *lymphoid tissue inducer*) y participan de la generación de nodos linfáticos y placas de Peyer durante el desarrollo fetal. Luego del nacimiento, las LTis se acumulan en la LP intestinal en estructuras llamadas criptoplasmas. La colonización de bacterias activa la producción de la quimioquina CCL20, cuyo efecto es la activación de las LTis en las criptoplasmas, causando el reclutamiento de linfocitos B formando folículos linfoides aislados en la mucosa. Estas formaciones son una fuente importante de linfocitos B productores de IgA. Otra característica particular es su capacidad de transdiferenciación bidireccional con las ILC1. Se ha observado que bajo la expresión de IL-23, IL-1 β y células dendríticas CD14 $^{+}$, la ILC1 pueden adoptar el fenotipo

de ILC3. Por el contrario, la presencia de IL-12 y células dendríticas CD14⁺, dirige la transición de ILC3 a ILC1 (Artis & Spits, 2015; P. D. Smith y col., 2012).

Particularmente, las ILC3 se han identificado como un componente central del eje intestino-SNC en el desarrollo de la EM, ya que regulan la proporción de Th17 y Tregs, reconocen una amplia variedad de mediadores solubles provenientes del SNE y la MI, lo que las hace muy sensibles a perturbaciones en el ambiente (Domingues & Hepworth, 2020; Miljković y col., 2021; Sepahi y col., 2021).

Debido a que expresan al GPR43, las ILC3 intestinales reconocen cambios en las concentraciones de AGCC. La estimulación del receptor induce la producción, principalmente, de IL-22, IL-17, IFN γ o la proliferación celular en estas células. La IL-22 promueve la producción de péptidos antimicrobianos, de mucinas, la hiperplasia de células caliciformes, la expresión de proteínas de uniones estrechas e induce la fucosilación. Todos estos mecanismos tienen como objetivo reforzar la BEI para evitar la translocación bacteriana y desplazar la colonización de patógenos por bacterias mutualistas (Domingues & Hepworth, 2020). La expresión de IL-17 favorece la síntesis de proteínas de las uniones estrechas, péptidos antimicrobianos y la atracción de células mieloides, mientras que IFN γ promueve al fenotipo Th1, activa macrófagos y potencia la expresión del complejo MHC-II. Sin embargo, se ha observado que la sobreexpresión de ambas interleucinas está relacionada con inflamación crónica (Geremia y col., 2011; Klose y col., 2013). En cuanto a los efectos de los AGCC sobre la proliferación celular, un reporte reciente ha descrito que la administración oral de C3 y C2 a ratones GF, promueve la expansión selectiva de las ILC3 colónicas (Chun y col., 2019).

Además de producir mediadores solubles, las ILC3 pueden comunicarse directamente con linfocitos por medio de la presentación antigénica. Las ILC3 tienen un rol supresor, puesto que expresan moléculas MHC-II, pero no inducen la proliferación celular debido a la falta de moléculas

co-estimuladoras superficiales CD80 y CD86, cuya expresión es inhibida por la producción de IL-23. Si las condiciones homeostáticas se ven alteradas, se liberan mediadores proinflamatorios como IL-1 β e IFN γ , que favorecen la expresión de CD80 y CD86 en las ILC3. Esto cambia su función y adoptan un perfil inductor de respuestas de linfocitos T (Lehmann y col., 2020; Domingues & Hepworth, 2020).

Los resultados previos del laboratorio mostraron que ratones que desarrollan EAE presentan significativamente mayor frecuencia de ILC en CIE y LP colónicos y el SNC, en relación con el grupo control, pero en cuanto a número absoluto, este aumento sólo es significativo para las células aisladas de la LP colónica y el SNC. Adicionalmente, se observó una mayor producción de IFN γ e IL-17 en ILC presentes en el SNC de ratones con EAE lo cual sugiere que las ILC estarían contribuyendo a promover la inflamación en el SNC en ratones enfermos. La funcionalidad de las ILC no sólo está afectada a nivel del SNC, sino que también se observan cambios en la LP. La producción de IL-22 es significativamente mayor en la LP de ratones sanos, resultado consistente con una disminución de GPR43 en las ILC extraídas desde la LP colónica de ratones enfermos y una menor disponibilidad de C3 en el colon (Prado y col., 2023) puesto que la secreción de IL-22 es inducida por la estimulación del GPR43 (Domingues & Hepworth, 2020).

Varios estudios han observado una reducción de AGCC en pacientes con EM. Esto también se ha encontrado en ratones con EAE, particularmente durante los días de máxima severidad de la enfermedad. Además, se ha descubierto que las ILC intestinales expresan niveles elevados de GPR43, por sobre otros tipos celulares inmunes. Por lo tanto, la disminución de AGCC en pacientes y ratones sugiere que las funciones y señales de las ILC mediadas por el GPR43 están alteradas. De esta manera, el objetivo de este trabajo es dilucidar el rol del GPR43 expresado en ILC en el desarrollo de la EAE.

II. HIPÓTESIS

Las células linfoides innatas de la lámina propia colónica en encefalomiелitis autoinmune experimental inducen un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias por linfocitos T CD4⁺, mecanismo regulado por medio de la señalización del receptor de ácidos grasos de cadena corta GPR43.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de activación por las células linfoides innatas durante la encefalomiелitis autoinmune experimental y su regulación por medio de la señalización del GPR43.

3.2. Objetivos específicos

- a) Analizar la expresión de MHC-II, moléculas co-estimuladoras y citoquinas en células linfoides innatas extraídas desde la lámina propia colónica de ratones con encefalomiелitis autoinmune experimental.
- b) Evaluar el efecto de la estimulación del receptor de ácidos grasos de cadena corta GPR43 expresado en células linfoides innatas en su capacidad de activar linfocitos T CD4⁺ totales.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales

Se utilizaron ratones WT, OT-II y ratones deficientes para enzima activadora de recombinación 1 (*Rag1*^{-/-}) de 6 a 8 semanas de edad, que fueron adquiridos desde Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Todos las cepas tenían background genético C57BL/6. Los ratones se mantuvieron en el bioterio de la Fundación Ciencia & Vida, a temperaturas entre los 20 y 26°C, agua y alimento *ad libitum* y bajo ciclos de luz-oscuridad de 12 hrs.

Todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo las regulaciones bioéticas de la Fundación Ciencia & Vida (Ñuñoa, Santiago de Chile).

4.2 Inducción de EAE

Se utilizó el modelo de estudio más aceptado para la EM, la EAE, la cual se indujo de forma activa. Para ello se inmunizaron ratones C57BL/6 vía s.c. con 50 ug de péptido MOG₃₅₋₅₅ (pMOG₃₅₋₅₅, Genetal Laboratories, Madison, WI) emulsionado en coadyuvante completo de Freund's (CFA;Invitrogen) suplementado con *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA (Difco Laboratories, Detroit, MI) inactivada por calor. Adicionalmente, se inyectaron vía i.p. 500 ng de toxina Pertussis (PTX;Milipore Corp) los días 0 y 2. Se asignó un puntaje clínico diario de acuerdo con el siguiente criterio: 0, no se observan síntomas; 1, cola flácida; 2, debilidad en patas traseras; 3, parálisis completa de patas traseras; 4, parálisis en patas delanteras; 5, parálisis total o muerte (Figura 3B). Como control se utilizó un grupo de ratones sin inmunizar. Los síntomas suelen aparecer alrededor del día 10, alcanzando un máximo de severidad cercano al 15 dpi (Figura 3A-C).

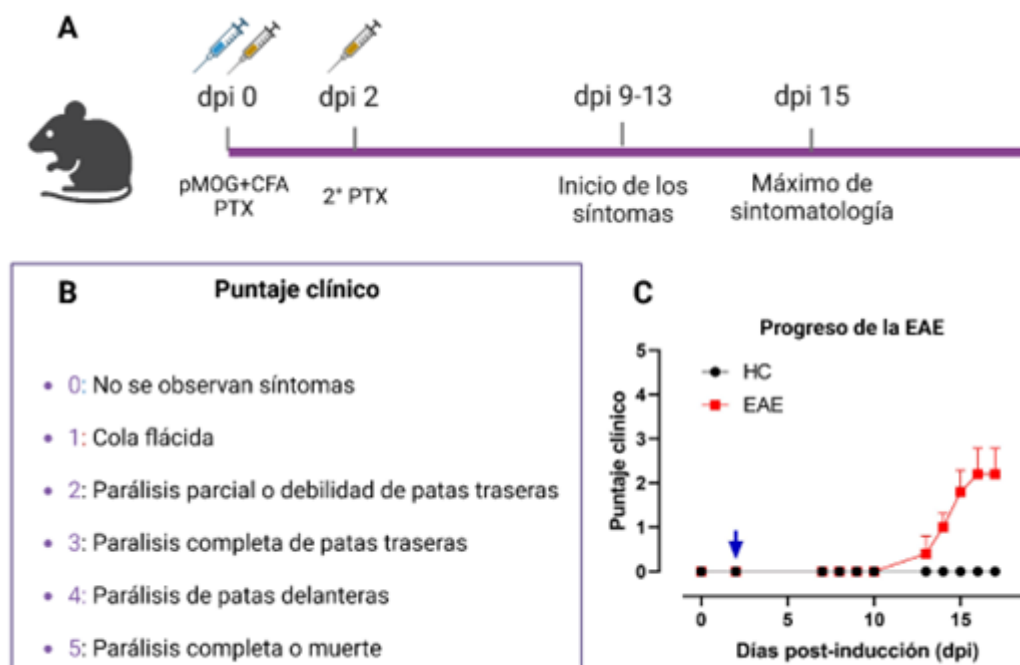


Figura 3: Inducción de EAE en ratones. **A)** El modelo crónico de EAE se induce en ratones por inmunización subcutánea de pMOG emulsificado en CFA, sumado a dos dosis de PTX. **B)** Asignación del puntaje clínico a los síntomas observables **C)** Curva de progreso de la enfermedad obtenida en el laboratorio para ratones C57BL/6 sanos (HC del inglés *healthy controls*) e inmunizados (EAE). La flecha azul indica la segunda dosis de toxina Pertussis.

4.3 Extracción de ILC desde la LP

Se extrajo el colon, se retiró los residuos de grasa y heces, y fue lavado con HBSS con HEPES 10mM. Se cortó longitudinalmente y luego transversalmente en trozos de aproximadamente 1 cm. Las muestras se incubaron en buffer de predigestión (HBSS (Gibco) con Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES, Sigma-Aldrich) 10 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, AppliChem) 5mM, ditioneitol (DTT, Thermo Fisher Scientific) 1mM y suero fetal bovino (FBS, Cytiva) al 5%) en rotación continua por 20 minutos a 37°C, y finalmente se agitaron en un mezclador tipo vórtex durante 20 segundos y eliminó el sobrenadante. El procedimiento se repitió una vez más. Luego, las muestras se incubaron en HBSS con HEPES 10mM en rotación continua por 20 minutos a 37°C. Se agitaron en un mezclador tipo vórtex durante

20 segundos y los tejidos se transfirieron a Tubos C MACS™ para ser digeridos en buffer de digestión (HBSS con Ca⁺²/Mg⁺² con HEPES a 10mM, y FBS al 5%) en presencia de 0,5 mg/mL de Colagenasa D (Gibco), 0,5 ug/mL de DNasa I grado II (Roche), 3 mg/mL liberasa (Roche) en rotación continua por 30 minutos a 37°C. Después, el tejido fue homogenizado en el equipo GentleMACS™ usando el programa de disociación de intestinos y se lavaron con buffer PB (PBS con 0,5% albúmina de suero bovina (BSA, Rockland)) en un *cell strainer* de 70 uM. Se purificaron células mononucleares por medio de centrifugación de gradiente de Percoll 44%/67% (Cytiva). Luego, las células obtenidas fueron teñidas con anticuerpos inmuno-específicos para analizar la expresión de distintas citoquinas y moléculas de superficie, que se indican a continuación.

4.4 Anticuerpos y análisis de citometría de flujo

Para las tinciones superficiales, las suspensiones celulares se incubaron durante 20 min en oscuridad a 4°C en presencia de los anticuerpos (Tabla 1) y el marcador de viabilidad. A continuación, las suspensiones se centrifugaron a 310 g por 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió en PBS 1X para su posterior análisis en el citómetro, o fueron fijadas en 100 uL de PBS 1X con Formaldehído al 1% para medir la expresión intracelular de citoquinas que se detalla a continuación.

Para medir la expresión intracelular de citoquinas, las células se reestimularon con 1 ug/mL de ionomicina (Iono, Sigma-Aldrich) y 50 ng/mL de forbol-miristato-acetato (PMA, Tocris) en presencia de 5ug/mL de brefeldina A (BFA, Biolegend) durante 3 hrs. antes de la tinción. Luego, las células se centrifugaron a 310 g por 5 min y se resuspendieron en 100 uL de Fixation/Permeabilization concentrate (Invitrogen) 1X durante toda la noche. Luego, se centrifugaron a 310 g por 5 min y se resuspendieron en 200 uL de Permeabilization Buffer (Invitrogen) 1X. Las muestras se centrifugaron a 310 g por 5 min, el sobrenadante se descartó y se

agregaron 100 uL de de Permeabilization Buffer 1X. Se tiñó con anticuerpos para citoquinas intracelulares (Tabla 1) por 30 min y nuevamente se agregó 200 uL de de Permeabilization Buffer 1X. Las muestras fueron centrifugadas a 310 g por 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se repitió el mismo paso una vez más y finalmente se resuspendió en 100 uL de PBS 1X para analizar por el citómetro de flujo.

Para discriminar las células vivas de las muertas se usó el marcador de viabilidad Zombie Aqua™ (Zaq) a 1/200 durante 20 min y luego se detuvo agregando PBS con BSA al 0,5% a las muestras. Todos los anticuerpos fueron adquiridos de Biolegend.

Los datos fueron obtenidos en el equipo FACSCanto II (BD Biosciences) y analizados en los programas FACSDiva (BD Biosciences) y FlowJo (Tree Star).

Tabla 1. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Marca	Fluoróforo	Clon	Dilución
CD80	Biolegend	FITC	16-10A1	1/300
TNF α	Biolegend	FITC	MP6-XT22	1/300
Lineage cocktail	Biolegend	PE	-	1/1000
MHC-II	Biolegend	PERCP	MS/114.15.2	1/300
CD45	Biolegend	PE/Cy7	30-F11	1/300
IFN γ	Biolegend	PE/Cy7	clon XMG1.2	1/300
IL-17A-	Biolegend	APC/Cy7	TC11-18H10.1	1/300
CD90.2	Biolegend	APC/Cy7	30-H12	1/300
BV421	Biolegend	CD86	GL-1	1/300
IL-2	Biolegend	BV421	JE56-544	1/300

4.5 Estimulación de ILC *Rag1*^{-/-} *in vitro*

Se obtienen alrededor de 500.000 células mononucleares desde la LP del colon de ratones *Rag1*^{-/-}, se incubaron en medio RPMI (Gibco) suplementado (1% L-glutamina (Gibco), 1% Priuvato (Gibco), β-Mercaptoethanol 0.05 mM (Sigma-Aldrich), 1% Aminoácidos no esenciales (Gibco), 1% penicilina-estreptomina (Gibco) y 10% FBS) en presencia de 20 ng/mL de IL-1β y 1 μg/mL de péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ (pOT-II) por 30 minutos a 37°C. Posteriormente las células fueron lavadas y se incubaron por una hora más en presencia de 1,5 μM 4-CMTB (agonista alostérico del GPR43, Tocris), 60 μM C3 (Wako) o en ausencia de tratamiento. Cuando se indique los ILC tuvieron una incubación previa e 30 minutos con GLPG-0974 (Tocris).

4.6 Ensayo de presentación antigénica *in vitro*

Se extrajo el bazo de ratones OT-II y se trituró en 2 mL de tampón de lisis de glóbulos rojos amonio-cloruro-potasio (ACK; cloruro de amonio 0,15 M, bicarbonato de potasio 0,01 M y EDTA disódico 0,1 mM, pH 7) 1X. La suspensión se completó a 10 mL de ACK 1X y se centrifugó a 522 g por 5 min. Se resuspendió en 10 mL de PBS 1X y se determinó el número de células por medio de conteo en cámara de Neubauer. Considerando que un 20% del bazo corresponde a linfocitos T CD4⁺, desde la suspensión se extrajo la cantidad necesaria para agregar 1,5x10⁵ linfocitos T CD4⁺ por cada de 5x10⁴ células mononucleares aisladas de la LP de ratones *Rag1*^{-/-}. Las muestras se centrifugaron a 522 g por 5 min y se resuspendieron en 1 mL Buffer MACs (0.5% BSA, 2mM de EDTA, PBS 1X).

Las células se incubaron con *CD4*⁺ *T Cell Biotin-Antibody Cocktail* (Miltenyi biotec) a una concentración de 10 μL/10⁷ células por 10 minutos en rotación continua a 4°C. Luego, las células fueron incubadas con *CD4*⁺ *T Cell MicroBead Cocktail* (Miltenyi biotec) a una concentración de 20 μL/10⁷ células por 15 minutos en rotación continua a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 310 g por 5 minutos y se resuspendieron en 1 mL de Buffer MACs para transferirla a la columna LS (Miltenyi biotec). La columna fue lavada con 3 mL de Buffer MACs 3 veces. La suspensión fue recolectada y se realizó un conteo celular

para determinar el total de linfocitos T CD4⁺ purificados. Se centrifugó a 522 g por 5 minutos y se resuspendió en RPMI suplementado a una concentración de 1,5x10³ células/uL. Se agregó 10 uL/mL de penicilina-estreptomina (Gibco) y 2 uL/mL de gentamicina (Gibco).

Luego, se agregaron 100 uL de la suspensión celular a cada pocillo de la placa 96 con células mononucleares aisladas de la LP de ratones *Rag1*^{-/-} y se incubaron durante 72 hrs a 37 °C. Una vez concluido el tiempo, las muestras se fijaron, permeabilizaron y tiñeron como se detalló anteriormente, para analizar la expresión intracelular de citoquinas IL-17 e INFγ por los linfocitos T CD4⁺.

4.7 Análisis estadístico

Se utilizó GraphPad Prism 9 (Dotmatics) para calcular los valores P con Student's-t test no pareado y one-way ANOVA con un 95% de intervalo de confianza. Todos los valores se expresan en la media ± SEM. Los valores P inferiores a 0,05 se consideraron significativos.

V. RESULTADOS

5.1 Aumento en la expresión de CD86 y disminución de la producción de IL-2 en ILC de la lámina propia colónica de ratones con EAE durante el máximo de severidad.

Previamente se ha demostrado que en condiciones homeostáticas, las ILC intestinales expresan MHC-II en ausencia de moléculas co-estimuladoras, adquiriendo un rol supresor de linfocitos efectores. Sin embargo, en contextos de infección o inmunización, las ILC (particularmente ILC3) aumentan la expresión de moléculas co-estimuladoras y, por consecuencia, promueven las respuestas de linfocitos T (Domingues & Hepworth, 2020; Lehmann y col., 2020; Von Burg y col., 2014). Para evaluar diferencias de expresión de moléculas co-estimuladoras en ILC en el contexto de la enfermedad, se indujo EAE a ratones C57BL/6 y durante el máximo de severidad (Figura 4A) se aislaron células mononucleares desde la LP para medir la expresión de MHC-II y moléculas co-estimuladoras en ILC (Figura 4B, C y D). En consistencia con los resultados previamente obtenidos en el laboratorio (Prado et al, resultados no publicados) se observa una tendencia de mayor frecuencia de ILC totales en la LP colónica de ratones con EAE respecto de los controles sanos (Figura 4B y D). Respecto a la expresión de MHC-II, no se detectaron diferencias significativas en la frecuencia de ILC MHC-II⁺ entre ratones inmunizados y controles sanos (Figura 4B). En relación con la expresión de moléculas co-estimuladoras, los datos mostraron un incremento significativo en la expresión de CD86 tanto a nivel de frecuencia (Figura 4B y D) y como de MFI (Figura 4C) de ratones con EAE. Debido a que se ha descrito que las ILC que co-expresan MHC-II y moléculas co-estimuladoras promueven la activación de linfocitos T (Von Burg y col., 2014), también se analizó la frecuencia relativa de ILC MHC-II⁺CD86⁺ (Figura 4B y D). Los resultados indican que existe un aumento significativo en la frecuencia de ILC MHC-II⁺CD86⁺ en ratones con EAE, respecto al grupo control. Finalmente, no se detectó la expresión de CD80 en ILC de ratones sanos ni enfermos (datos no mostrados).

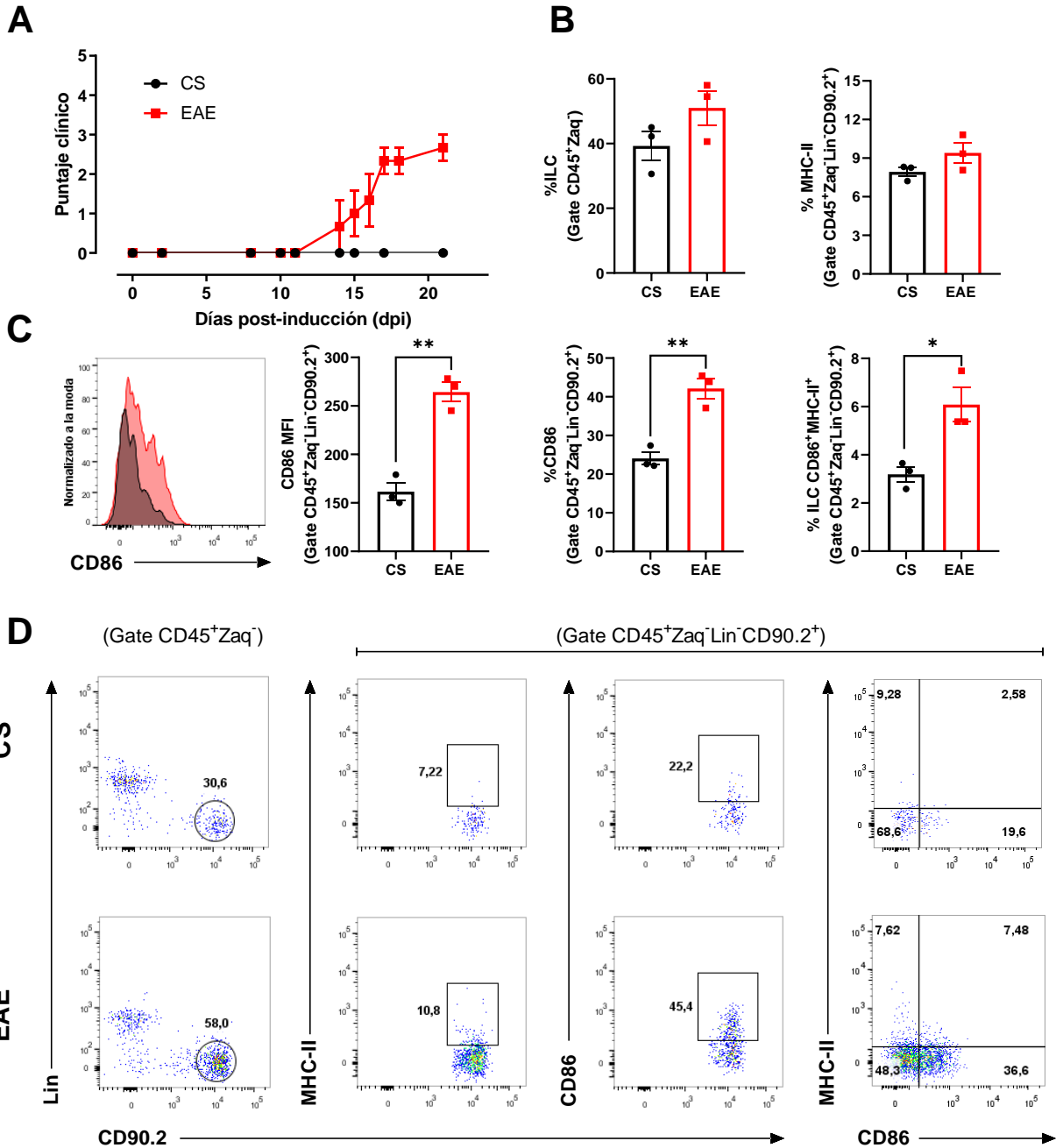


Figura 4: Aumento en la expresión de CD86⁺ en ILC de la LP colónica de ratones con EAE durante el máximo de sintomatología. Se indujo EAE a ratones C57BL/6 (EAE, en rojo) por medio de inmunización s.c. con pMOG₃₅₋₅₅ emulsionado en CFA y dos dosis i.p. de toxina pertussis. Un grupo no fue inmunizado a modo de grupo control sano (CS, en negro). Se evaluó la severidad de la enfermedad asignando un puntaje clínico en base a la severidad de los síntomas observados. **(A)** Puntaje clínico promedio durante el desarrollo de la enfermedad para ratones con EAE y el grupo control sano. Los datos representan la media \pm SEM de 3 ratones por grupo. En el máximo de severidad se aislaron células de la LP colónica de ambos grupos experimentales. **(B)** Frecuencia relativa y expresión de MHC-II y CD86 en ILC. **(C)** Histograma representativo de la expresión de CD86 en ILC. Las barras representan la intensidad de fluorescencia media (MFI)

asociados a la tinción de CD86. **(D)** Dot plots representativos de la frecuencia de ILC ($CD45^+Zaq^-Lin^-CD90.2^+$) y la expresión de MHC-II y CD86. Cada punto equivale a los datos obtenidos desde un ratón. Se indica la media \pm SEM. (C y D) *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ por student's t-test.

Debido a que las ILC también regulan la respuesta inmune por medio de la secreción de citoquinas, se evaluó la expresión de IL-2 y TNF α (Figura 5). En contraste con otros estudios donde se han encontrado mayores niveles de TNF α en pacientes MS (Maguire y col., 2021) y un aumento de ILC que expresan TNF α en otras enfermedades inflamatorias intestinales (Marafini y col., 2015), los resultados aquí obtenidos no demuestran diferencias significativas en la frecuencia de ILC productoras TNF α en la LP colónica entre ambos grupos de estudio (Figura 5A y B). Por otra parte, los resultados sí revelan menor frecuencia de ILC productoras de IL-2 en animales inmunizados respecto de los controles (Figura 5A-B).

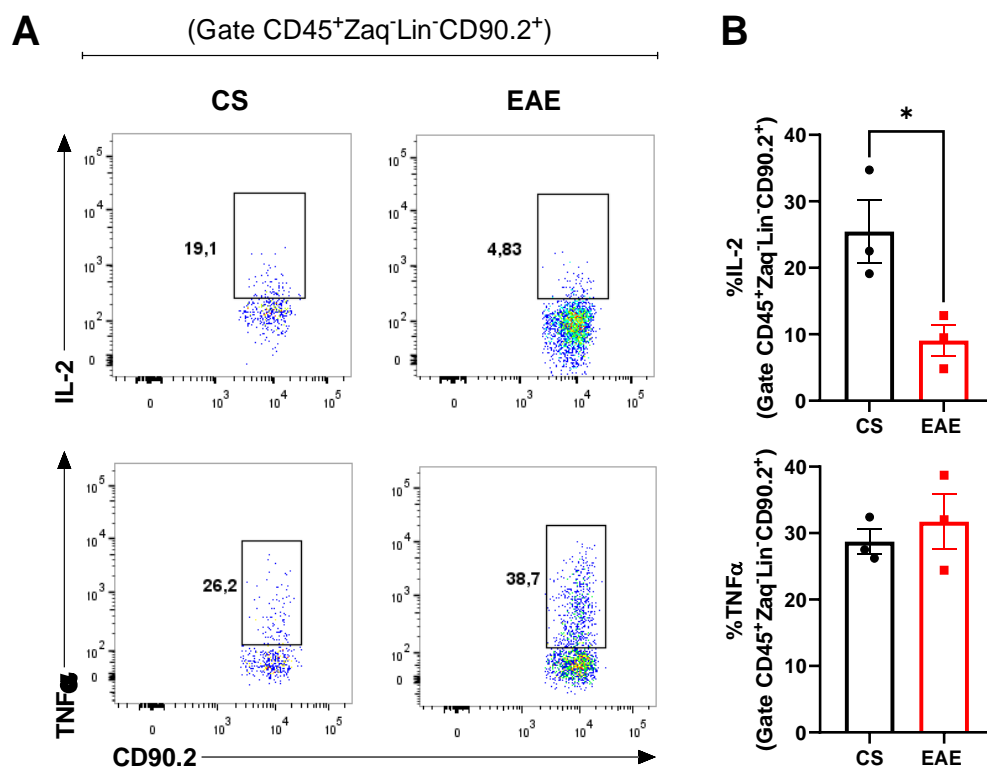


Figura 5: Disminución en la frecuencia de ILC productoras de IL-2 en ratones con EAE durante el máximo de severidad. Se extrajeron células desde la LP de ratones EAE (EAE, en rojo) y ratones controles sanos (CS, en negro) durante el máximo de severidad. Las células fueron re-estimuladas con PMA/Iono en presencia de BFA por 3 hrs previo a la tinción intracelular. **(A)**

Dot plots representativos de la frecuencia relativa de ILC (CD45⁺Zaq⁻Lin⁻CD90.2⁺). Se muestra la expresión de IL-2 y TNF α . **(B)** Frecuencia de IL-2 y TNF α en ILC. Cada punto equivale a los datos obtenidos desde un animal. Se indica la media \pm SEM. *, p<0,05 por student's t-test.

5.2 La estimulación *in vitro* del GPR43 en ILC disminuye su capacidad de activar linfocitos

Th1

Se realizó un ensayo de presentación antigénica para evaluar el efecto de la estimulación del GPR43 expresado en ILC en la activación de linfocitos T CD4⁺. Para ello, se extrajeron células mononucleares de la LP colónica de ratones RAG1^{-/-}, ya que estos ratones tienen mayor cantidad de ILC intestinales (Bando & Colonna, 2016) y también para descartar cualquier influencia de la respuesta inmune adaptativa sobre estas células. Luego, las células de la LP colónica fueron estimuladas en ausencia o en presencia de los agonistas para el GPR43 4-CMTB, o el agonista natural C3, o del antagonista GLPG-0974 junto con 4-CMTB. Una vez incubadas, las células se co-cultivaron con linfocitos T CD4⁺ totales purificados desde el bazo de un ratón OT-II en presencia de pOT-II e IL-1 β durante 3 días para analizar la expresión de IL-17 e IFN γ por los linfocitos T CD4⁺ (Figura 6).

Los resultados indican que las ILC son capaces de activar linfocitos T CD4⁺ específicos para pOT-II *in vitro*. Se observa que la estimulación de las ILC con C3 y 4-CMTB disminuyen la producción de IFN γ e IL-17 por los linfocitos T CD4⁺, en comparación con los que fueron co-cultivados con ILC sin tratamiento. Sin embargo, esta disminución no es estadísticamente significativa. Por otro lado, la estimulación de las ILC con GLPG-0974 previa a la adición de 4-CMTB recupera la producción de IFN γ por los linfocitos T CD4⁺, revirtiendo el efecto del agonista sobre las ILC y su consiguiente interacción (Figura 6A-B). Esto sugiere que la estimulación de GPR43 en ILC reduce su capacidad para activar linfocitos T CD4⁺ productores de IFN γ .

Al analizar la producción de IL-17 por los linfocitos T CD4⁺, no existen diferencias significativas, no obstante, existe una tendencia similar a la obtenida en los resultados para la producción de IFN γ .

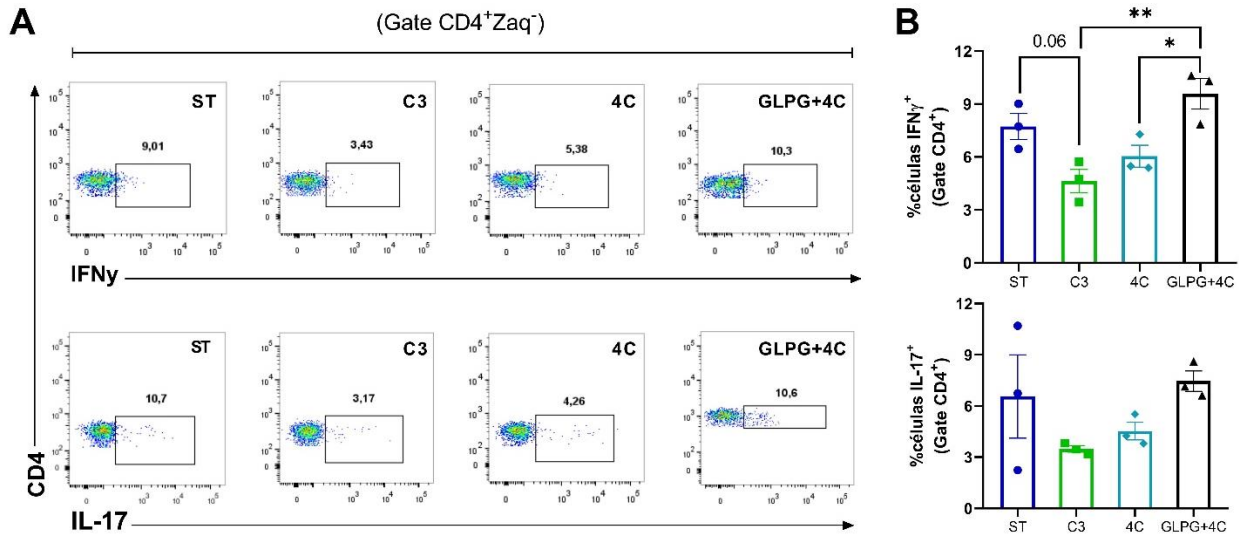


Figura 6. La estimulación del GPR43 en ILC disminuye su capacidad de activar linfocitos T CD4⁺ *in vitro*. Se extrajeron células de la LP colónica de *Rag1*^{-/-} y se incubaron durante 1 hr. con pOT-II 1 μ g/mL e IL-1 β 20 ng/mL, en ausencia (ST, en azul) o presencia de propionato 60 μ M (C3, en verde), de 4-CMTB 1.5 μ M (4C, en celeste) o de GLPG-0974 40 μ M con 4-CMTB (GLPG+4C, en negro). Luego, se co-cultivaron con linfocitos T CD4⁺ purificados desde el bazo de ratones OT-II por 72 hrs a 37°C. Después, las células fueron re-estimuladas con PMA/Iono en presencia de BFA por 3 hrs previo a la tinción intracelular. (A) Dot plots representativos del porcentaje de linfocitos T CD4⁺. Se muestra la expresión de IFN γ e IL-17A. (B) Frecuencia relativa de linfocitos T CD4⁺ obtenidos en (A). Cada punto corresponde a un ratón. Se indica la media \pm SEM. *, p<0.05 por One-way ANOVA.

VI. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

Los resultados del primer objetivo de este estudio demuestran que, en comparación con ratones sanos, existen ciertas diferencias de expresión de señales necesarias para activar linfocitos T en ILC de la LP colónica en ratones EAE durante el máximo de severidad de la enfermedad. En primer lugar, se detectó un aumento en la frecuencia y el MFI de CD86 (Figura 5B, C y D), sugiriendo que en este grupo de ratones no sólo la población de ILC CD86⁺ está más representada, sino que la expresión superficial por célula también aumenta en relación con los ratones control. Por otra parte, también hay un aumento en la frecuencia de la población de ILC MHC-II⁺CD86⁺ en los ratones con EAE (Figura 5B-D). Como ya se ha demostrado, en condiciones homeostáticas las ILC que residen en la LP intestinal tienen un rol inmunoregulador mediado por MHC-II (Robinette & Colonna, 2016). Pero, en contextos inflamatorios se promueve la expresión de moléculas co-estimuladoras estas células, cambiando su fenotipo regulador por uno más bien inductor de respuestas adaptativas (Lehmann y col., 2020). Por lo tanto, los datos sugieren que el aumento de CD86 en ILC en la LP colónica de ratones con EAE, promueve las respuestas por los linfocitos T autorreactivos. En segundo lugar, los datos analizados muestran que en la LP de ratones enfermos, existe una disminución en la producción de IL-2 por las ILC (Figura 5). Algunos autores han propuesto que las ILC3 son la principal fuente celular de IL-2 en el intestino y su secreción favorece la supervivencia y expansión de linfocitos Treg. Además, se ha observado menor producción de IL-2 por ILC3 intestinales en otras patologías autoinmunes, como la enfermedad de Crohn y la diabetes tipo 1, asociado con reducción en la proporción de Treg (Saksida y col., 2023; Zhou y col., 2019). De acuerdo con estos hallazgos, y considerando que la población más abundante de ILC en el intestino son las ILC3, los resultados obtenidos están relacionados con una disminución en la activación y proliferación de linfocitos Treg por las ILC en los ratones con EAE, favoreciendo la actividad y proporción del fenotipo efector. Sin embargo, es importante considerar que los estudios

sobre la función de la IL-2 producida por ILC son escasos y IL-2 es una citoquina pleiotrópica, capaz de entregar señales de proliferación a linfocitos T efectores. Si existen otras explicaciones posibles para la reducción de IL-2 por ILC de la LP colónica en EAE, debe ser analizado más a fondo en estudios posteriores.

En conjunto, estos resultados sugieren dos mecanismos por los cuales las ILC pueden promover las respuestas adaptativas durante el desarrollo de esta enfermedad autoinmune: por un lado, promueven directamente la activación de linfocitos T efectores, debido al aumento de moléculas co-estimuladoras; y por otro, aminora la función de los linfocitos Treg como producto de la disminución de la secreción de IL-2.

El segundo objetivo de la investigación fue comparar el efecto de la estimulación o bloqueo del GPR43 en ILC sobre la activación de linfocitos T. Los datos muestran que la producción de IFN γ por los linfocitos T CD4⁺ totales disminuye cuando son co-cultivados con ILC tratadas con agonistas para el GPR43, y el bloqueo selectivo del receptor recupera la producción de IFN γ (Figura 6). Es decir, la estimulación del GPR43 aminora la capacidad de activación de linfocitos Th1 en las ILC. Aunque se observó un patrón similar al de la producción de IFN γ para IL-17, las diferencias entre condiciones no fueron estadísticamente significativas. La discrepancia podría explicarse por la gran dispersión de los datos de los linfocitos co-cultivados con ILC sin tratamiento previo respecto del resto de condiciones. Esto sugiere que la precisión en la estimación de la media para esta condición es baja y, por tanto, es necesario repetir el experimento para disminuir este valor y obtener resultados más representativos.

Los resultados del segundo objetivo indican que la capacidad activadora de linfocitos en las ILC de la LP colónica de ratones con EAE durante el máximo de sintomatología es mayor respecto de ratones sanos, debido a que no sólo los niveles de AGCC locales en estos ratones son bajos

(Prado y col., 2023), sino que también lo es la expresión de GPR34 en las ILC durante este periodo (Prado y col., resultados no publicados). Por lo tanto, la estimulación del receptor es baja en las ILC, potenciando la respuesta inflamatoria de linfocitos T autorreactivos.

Considerando los resultados previos del laboratorio y los aquí presentados, se infiere que la disminución en la estimulación del GPR43 expresado en ILC de la LP colónica en ratones con EAE durante el máximo de severidad, provoca un aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras en ILC. Este incremento resulta en la pérdida de su calidad de reguladoras de la respuesta inmune, adquiriendo una función que contribuye a la activación de linfocitos T CD4⁺ y su consiguiente producción de citoquinas proinflamatorias como IFN γ , favoreciendo el desarrollo de la enfermedad. No obstante, otro mecanismo no excluyente por el cual se incrementa la expresión de moléculas co-estimuladoras en ILC es la presencia de IFN γ (Lehmann y col., 2020), cuyos valores son elevados en pacientes y ratones con EAE (Duscha y col., 2020). Se recomienda que estudios posteriores evalúen los mecanismos que subyacen en la relación entre la señalización del GPR43 en ILC y la mejor capacidad de activación de linfocitos en las mismas.

Para complementar esta investigación, se propone analizar la relación entre la estimulación del GPR43 expresado en ILC y la proliferación de linfocitos T CD4⁺, por lo que, se sugiere repetir el ensayo de presentación antigénica con linfocitos T CD4⁺ totales purificados marcados con CTV. También sería interesante estudiar la producción de IL-10 en este experimento para evaluar efectos antiinflamatorios asociados a la señalización del GPR43 en ILC.

En conclusión, los hallazgos de este estudio sugieren que la reducción de la estimulación del GPR43 expresado en ILC de la LP de ratones con EAE, favorece su capacidad de activar linfocitos T efectores pro-inflamatorios y disminuye su capacidad de activar de linfocitos Treg durante el máximo de severidad de la enfermedad, contribuyendo al desarrollo de la EAE.

VII. CONCLUSIÓN

La presente investigación ha permitido dilucidar dos vías por las cuales las ILC de la LP colónica promueven la respuesta inmune adaptativa durante el desarrollo de la EAE. Por un lado, ILC presentan un aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras, lo cual favorece su capacidad de activación de linfocitos T efectores. Por otra parte, disminuye la IL-2 producida por las ILC, lo que limita la función supresora de linfocitos Treg y favorece la respuesta inflamatoria. Adicionalmente, se comprobó que estos efectos están directamente ligados a la disminución en la estimulación del GPR43, que es característico de la patología. Estos hallazgos destacan la importancia de investigar la función del GPR43 expresado ILC intestinales en el desarrollo de la EAE para acercarnos al entendimiento de la patogénesis de la EM y sugerir nuevas estrategias terapéuticas tanto de esta enfermedad como en otras enfermedades autoinmunes.

BIBLIOGRAFÍA

- Artis, D., y Spits, H. 2015. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 2015 517:7534, 517(7534), 293–301.
- Bando, J. K., y Colonna, M. 2016. Innate lymphoid cell function in the context of adaptive immunity. En *Nature Immunology* (Vol. 17, Número 7, pp. 783–789). Nature Publishing Group.
- Berer, K., Gerdes, L. A., Cekanaviciute, E., Jia, X., Xiao, L., Xia, Z., Liu, C., Klotz, L., Stauffer, U., Baranzini, S. E., Kümpfel, T., Hohlfeld, R., Krishnamoorthy, G., y Wekerle, H. 2017. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *114*, 10719–10724.
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Guan, N. L., Kundu, P., Gulyás, B., Halldin, C., Hultenby, K., Nilsson, H., Hebert, H., Volpe, B. T., Diamond, B., y Pettersson, S. 2014. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science translational medicine*, 6(263).
- Chen, J., Chia, N., Kalari, K. R., Yao, J. Z., Novotna, M., Soldan, M. M. P., Luckey, D. H., Marietta, E. V., Jeraldo, P. R., Chen, X., Weinshenker, B. G., Rodriguez, M., Kantarci, O. H., Nelson, H., Murray, J. A., y Mangalam, A. K. 2016. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Scientific reports*, 6.
- Chun, E., Lavoie, S., Fonseca-Pereira, D., Bae, S., Michaud, M., Hoveyda, H. R., Fraser, G. L., Gallini Comeau, C. A., Glickman, J. N., Fuller, M. H., Layden, B. T., y Garrett, W. S. 2019. Metabolite-Sensing Receptor Ffar2 Regulates Colonic Group 3 Innate Lymphoid Cells and Gut Immunity. *Immunity*, 51(5), 871-884.e6.

- Coetzee, T., y Thompson, A. J. 2020. Atlas of MS 2020: Informing global policy change. *Multiple Sclerosis Journal*, 26(14), 1807–1808.
- Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B., y Verbeke, K. 2019. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *16 (Gastroenterology & hepatology)*, 461–478.
- Dendrou, C. A., Fugger, L., y Friese, M. A. 2015. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology* 2015 15:9, 15(9), 545–558.
- Derrien, M., Van Baarlen, P., Hooiveld, G., Norin, E., Müller, M., de Vos, W. M., Stintzi, A., Gavrilin, M. A., Threadgill, D., y Carolina, N. 2011. Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila*.
- Domingues, R. G., y Hepworth, M. R. 2020. Immunoregulatory Sensory Circuits in Group 3 Innate Lymphoid Cell (ILC3) Function and Tissue Homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 11, 116.
- Duscha, A., Gisevius, B., Hirschberg, S., Yissachar, N., Stangl, G. I., Eilers, E., Bader, V., Haase, S., Kaisler, J., David, C., Schneider, R., Troisi, R., Zent, D., Hegelmaier, T., Dokalis, N., Gerstein, S., Del Mare-Roumani, S., Amidror, S., Staszewski, O., ... Haghikia, A. 2020. Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Mechanism. *Cell*, 180(6), 1067-1080.e16.
- Escobar, A., y Gómez, B. 2008. Barrera hematoencefálica. *Nurobiología, implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo. Revista Mexicana de Neurociencia*, 395–405.
- Geremia, A., Arancibia-Cárcamo, C. V., Fleming, M. P. P., Rust, N., Singh, B., Mortensen, N. J., Travis, S. P. L., y Powrie, F. 2011. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *The Journal of experimental medicine*, 208(6), 1127–1133.

- Haase, S., Wilck, N., Haghikia, A., Gold, R., Mueller, D. N., y Linker, R. A. (2020). The role of the gut microbiota and microbial metabolites in neuroinflammation. En *European Journal of Immunology* (Vol. 50, Número 12, pp. 1863–1870). Wiley-VCH Verlag.
- Haghikia, A., Jörg, S., Duscha, A., Berg, J., Manzel, A., Waschbisch, A., Hammer, A., Lee, D. H., May, C., Wilck, N., Balogh, A., Ostermann, A. I., Schebb, N. H., Akkad, D. A., Grohme, D. A., Kleiweietfeld, M., Kempa, S., Thöne, J., Demir, S., ... Linker, R. A. 2015. Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine. *Immunity*, 43(4), 817–829.
- Halper, J. (2007). The psychosocial effect of multiple sclerosis: the impact of relapses. *Journal of the neurological sciences*, 256 Suppl 1.
- Hellings, N., Barée, M., Verhoeven, C., Beatrijs D’hooghe, M., Medaer, R., Bernard, C. C. A., Raus, J., y Stinissen, P. 2001. T-Cell Reactivity to Multiple Myelin Antigens in Multiple Sclerosis Patients and Healthy Controls.
- Jandhyala, S. M. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), 8787.
- Jangi, S., Gandhi, R., Cox, L. M., Li, N., Von Glehn, F., Yan, R., Patel, B., Mazzola, M. A., Liu, S., Glanz, B. L., Cook, S., Tankou, S., Stuart, F., Melo, K., Nejad, P., Smith, K., Topçuoğlu, B. D., Holden, J., Kivisäkk, P., ... Weiner, H. L. 2016. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nature communications*, 7.
- Klose, C. S. N., Kiss, E. A., Schwierzeck, V., Ebert, K., Hoyler, T., D’Hargues, Y., Göppert, N., Croxford, A. L., Waisman, A., Tanriver, Y., y Diefenbach, A. 2013. A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR γ t + innate lymphoid cells. *Nature*, 494(7436), 261–265.

- Krishnarajah, S., y Becher, B. 2022. TH Cells and Cytokines in Encephalitogenic Disorders. *Frontiers in Immunology*, 13, 871.
- Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y., y Mazmanian, S. K. 2011. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4615–4622.
- Lehmann, F. M., von Burg, N., Ivanek, R., Teufel, C., Horvath, E., Peter, A., Turchinovich, G., Staehli, D., Eichlisberger, T., Gomez de Agüero, M., Coto-Llerena, M., Prchal-Murphy, M., Sexl, V., Bentires-Alj, M., Mueller, C., y Finke, D. 2020. Microbiota-induced tissue signals regulate ILC3-mediated antigen presentation. *Nature communications*, 11(1).
- Lyman, M., Lloyd, D. G., Ji, X., Vizcaychipi, M. P., y Ma, D. 2014. Neuroinflammation: The role and consequences. *Neuroscience Research*, 79(1), 1–12.
- Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., y Aloisi, F. 2004. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain: a journal of neurology*, 130(Pt 4), 1089–1104.
- Maguire, A. D., Bethea, J. R., y Kerr, B. J. 2021. TNF α in MS and Its Animal Models: Implications for Chronic Pain in the Disease. En *Frontiers in Neurology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A.
- Marafini, I., Monteleone, I., Di Fusco, D., Cupi, M. L., Paoluzi, O. A., Colantoni, A., Ortenzi, A., Izzo, R., Vita, S., De Luca, E., Sica, G., Pallone, F., y Monteleone, G. 2015. TNF- α producing innate lymphoid cells (ILC) are increased in active celiac disease and contribute to promote intestinal atrophy in mice. *PLoS ONE*, 10(5).

- Martin-Gallausiaux, C., Marinelli, L., Blottière, H. M., Larraufie, P., y Lapaque, N. 2021. Conference on diet and digestive disease symposium 2: Sensing and signalling of the gut environment: Sefa: Mechanisms and functional importance in the gut. *Proceedings of the Nutrition Society*, 80(1), 37–49.
- Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Di Yu, Schilter, H. C., Rolph, M. S., MacKay, F., Artis, D., Xavier, R. J., Teixeira, M. M., y MacKay, C. R. 2009. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 2009 461:7268, 461(7268), 1282–1286.
- Miljković, Đ., Jevtić, B., Stojanović, I., y Dimitrijević, M. 2021. ILC3, a Central Innate Immune Component of the Gut-Brain Axis in Multiple Sclerosis. *Frontiers in immunology*, 12.
- Miller, S. D., Karpus, W. J., y Davidson, T. S. 2007. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. *Current Protocols in Immunology*.
- Mirza, A., y Mao-Draayer, Y. 2017. The gut microbiome and microbial translocation in multiple sclerosis. En *Clinical Immunology* (Vol. 183, pp. 213–224)
- Miyake, S., Kim, S., Suda, W., Oshima, K., Nakamura, M., Matsuoka, T., Chihara, N., Tomita, A., Sato, W., Kim, S. W., Morita, H., Hattori, M., y Yamamura, T. 2015. Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. *PloS one*, 10(9).
- Mizuno, M., Noto, D., Kaga, N., Chiba, A., y Miyake, S. 2017. The dual role of short fatty acid chains in the pathogenesis of autoimmune disease models. *PLoS ONE*, 12(2).
- Niesler, B., Kuerten, S., Demir, I. E., y Schäfer, K. H. 2021. Disorders of the enteric nervous system - a holistic view. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 18(6), 393–410.

- Owen, J. A., Punt, J., y Stranford, S. A. 2013. *Kuby Immunología* (7a ed.).
- Parodi, B., y Kerlero de Rosbo, N. 2021. The Gut-Brain Axis in Multiple Sclerosis. Is Its Dysfunction a Pathological Trigger or a Consequence of the Disease? *Frontiers in Immunology*, 12.
- Prado, C., Espinoza, A., Martínez-Hernández, J. E., Petrosino, J., Riquelme, E., Martin, A. J. M., y Pacheco, R. 2023. GPR43 stimulation on TCR $\alpha\beta$ ⁺ intraepithelial colonic lymphocytes inhibits the recruitment of encephalitogenic T-cells into the central nervous system and attenuates the development of autoimmunity. *Journal of Neuroinflammation*, 20(1), 135.
- Problemas de Salud - AUGE 85 - Ministerio de Salud. (s/f). Recuperado el 6 de febrero de 2023, de <https://auge.minsal.cl/problemasdesalud/index/67>
- Rees, J., O'Boyle, C., y MacDonagh, R. 2001. Quality of life: impact of chronic illness on the partner. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 94(11), 563.
- Robinette, M. L., y Colonna, M. 2016. Innate lymphoid cells and the MHC. En *HLA* (Vol. 87, Número 1, pp. 5–11). Blackwell Publishing Ltd.
- Rojas, M., Restrepo-Jiménez, P., Monsalve, D. M., Pacheco, Y., Acosta-Ampudia, Y., Ramírez-Santana, C., Leung, P. S. C., Ansari, A. A., Gershwin, M. E., y Anaya, J. M. 2018. Molecular mimicry and autoimmunity. *Journal of autoimmunity*, 95, 100–123.
- Saksida, T., Paunović, V., Koprivica, I., Mićanović, D., Jevtić, B., Jonić, N., Stojanović, I., y Pejnović, N. 2023. Development of Type 1 Diabetes in Mice Is Associated with a Decrease in IL-2-Producing ILC3 and FoxP3⁺ Treg in the Small Intestine. *Molecules*, 28(8).
- Sepahi, A., Liu, Q. Y., Friesen, L., y Kim, C. H. 2021. Dietary fiber metabolites regulate innate lymphoid cell responses. *Mucosal Immunology*, 14(2), 317–330.

- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., y Mohan, G. 2017. Neuroinflammation pathways: a general review. En *International Journal of Neuroscience* (Vol. 127, Número 7, pp. 624–633). Taylor and Francis Ltd.
- Smith, P. D., Blumberg, R. S., y MacDonald, T. T. 2012. *PRINCIPLES OF MUCOSAL IMMUNOLOGY* (Second). Taylor & Francis Group.
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J. N., y Garrett, W. S. 2013. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic T reg cell homeostasis. *Science*, 341(6145), 569–573.
- Sospedra, M., y Martin, R. 2016. Immunology of Multiple Sclerosis. *Seminars in Neurology*, 36(2), 115–127.
- Thursby, E., y Juge, N. 2017. Introduction to the human gut microbiota. En *Biochemical Journal* (Vol. 474, Número 11).
- Ulven, T. 2012a. Short-chain free fatty acid receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets. *Frontiers in Endocrinology*, 3.
- Ulven, T. 2012b. Short-chain free fatty acid receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets. *Frontiers in Endocrinology*, 3.
- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N. J., Mebius, R. E., Powrie, F., y Spits, H. 2018. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*, 174(5), 1054–1066.
- Von Burg, N., Chappaz, S., Baerenwaldt, A., Horvath, E., Bose Dasgupta, S., Ashok, D., Pieters, J., Tacchini-Cottier, F., Rolink, A., Acha-Orbea, H., y Finke, D. 2014. Activated group 3

innate lymphoid cells promote T-cell-mediated immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35), 12835–12840.

Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N., y Baneke, P. 2020. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 26(14), 1816–1821.

Yang, W., y Cong, Y. 2021. Gut microbiota-derived metabolites in the regulation of host immune responses and immune-related inflammatory diseases. En *Cellular and Molecular Immunology* (Vol. 18, Número 4, pp. 866–877). Springer Nature.

Zhou, L., Chu, C., Teng, F., Bessman, N. J., Goc, J., Santosa, E. K., Putzel, G. G., Kabata, H., Kelsen, J. R., Baldassano, R. N., Shah, M. A., Sockolow, R. E., Vivier, E., Eberl, G., Smith, K. A., y Sonnenberg, G. F. 2019. Innate lymphoid cells support regulatory T cells in the intestine through interleukin-2. *Nature*, 568(7752), 405–409.