

TESIS DOCTORAL

**EFECTO DE LA MELATONINA EN LA ESCLEROSIS
MÚLTIPLE EXPERIMENTAL**

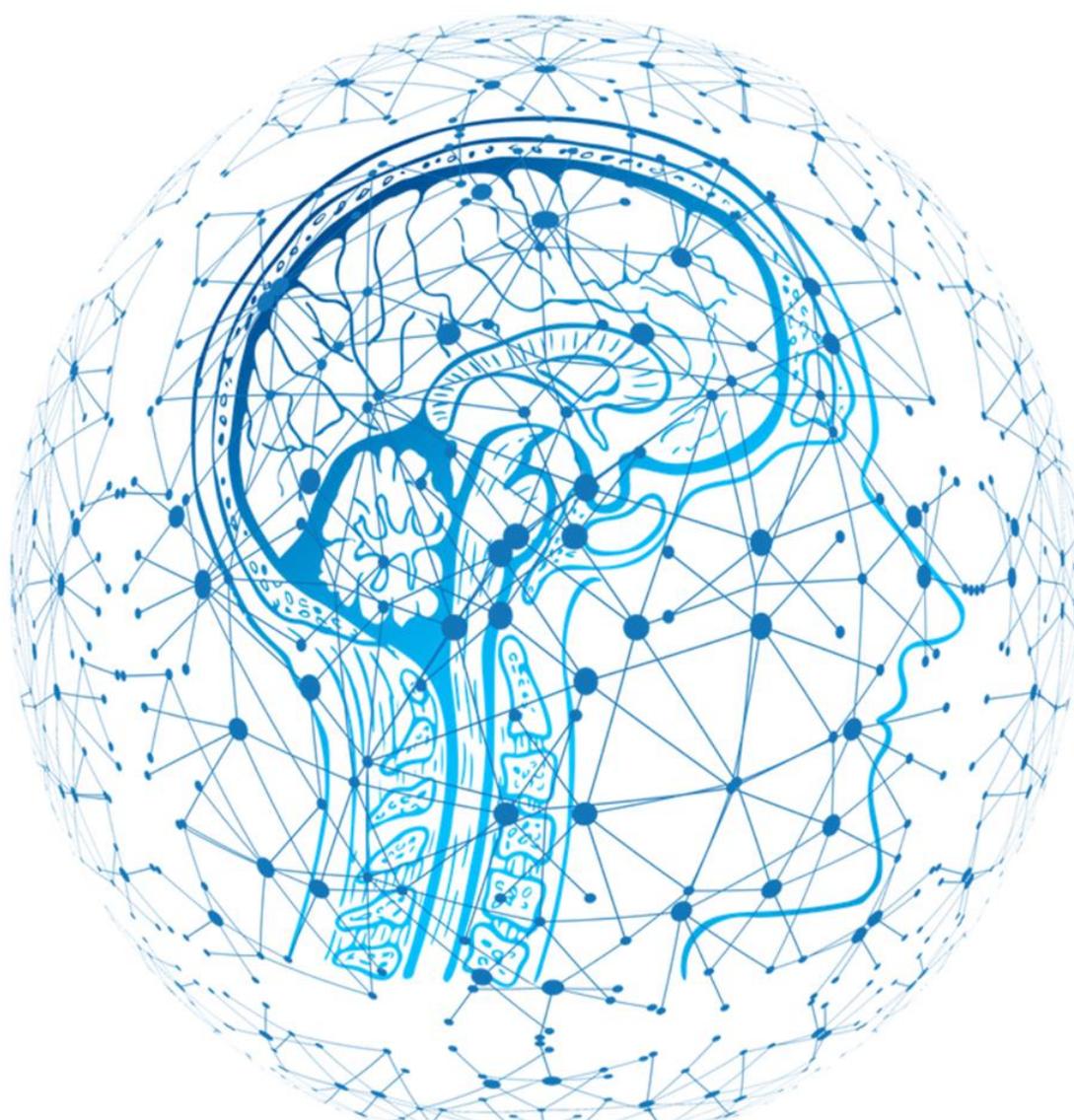
“Effect of melatonin in experimental multiple sclerosis”

ANA MUÑOZ JURADO

Directores:

Begoña M^a Escribano Durán

Isaac Túnez Fiñana



P.D. Biociencias y Ciencias Agroalimentarias
Córdoba. 2022

TITULO: *Efecto de la melatonina en la esclerosis múltiple experimental*

AUTOR: *Ana Muñoz Jurado*

© Edita: UCOPress. 2022
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
Programa de Doctorado en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias



**EFFECTO DE LA MELATONINA EN LA ESCLEROSIS MULTIPLE
EXPERIMENTAL**

“Effect of melatonin in experimental multiple sclerosis”

Memoria de Tesis Doctoral presentada por Ana Muñoz Jurado para optar al Grado de
DOCTOR

Directores:

Dra. Begoña M^a Escribano Durán

Dr. Isaac Túnez Fiñana

2022
Córdoba, España



TÍTULO DE LA TESIS: EFECTO DE LA MELATONINA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE EXPERIMENTAL

DOCTORANDO/A: Ana Muñoz Jurado

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La doctoranda Ana Muñoz Jurado ha realizado bajo nuestra dirección la tesis doctoral mencionada. Ana, ha cumplido sobradamente con las actividades relacionadas por la Comisión Académica del Máster durante sus estudios de doctorado, e incluso ha realizado propuestas optativas, que también han sido validadas, entre las que podemos destacar colaboraciones en Fisiología en la figura de colaborador honorario, numerosos congresos de investigación y cursos para el manejo de los datos o de herramientas bibliográficas.

En cuanto a las publicaciones presentadas como indicio de calidad, hay que destacar dos trabajos originales y una revisión bibliográfica:

-Lactose and Casein Cause Changes on Biomarkers of Oxidative Damage and Dysbiosis in an Experimental Model of Multiple Sclerosis. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 21(8):680-692. DOI: 10.2174/1871527320666211207101113 PMID: 34875994:

-Protective effects of melatonin on changes occurring in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 58 (2022) 103520. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2022.103520>.

-Mechanisms of Action in the Fight of Melatonin Against Multiple Sclerosis (Review). *Inflammopharmacology*, <https://doi.org/10.1007/s10787-022-01011-0>.

Todos ellos están citados en Journal Citation Report en un segundo cuartil.

La lectura de la tesis no se ha podido materializar, hasta el momento, por el retraso en la aceptación y publicación de los trabajos derivados de la misma. La exigencia de la doctoranda ha hecho que no haya sido suficiente el primero de los trabajos publicados, sino que se ha esperado hasta el último de ellos. Aún tiene otra revisión más que ya ha sido cuestionada por los referees y suponemos que en breve, quizás antes de que se lea la tesis, pueda ser aceptada para su publicación.

La doctoranda ha tenido iniciativa y ha aprendido a materializar ideas y publicarlas, haciéndonos el trabajo muy fácil a sus directores. Tiene capacidad de decisión, discute con solvencia sobre temas científicos y es muy trabajadora.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 6 de junio de 2022

Firma del/de los director/es

ESCRIBANO
DURAN
BEGOÑA MARIA
- 30545918D

Firmado digitalmente
por ESCRIBANO DURAN
BEGOÑA MARIA -
30545918D
Fecha: 2022.06.05
20:16:05 +02'00'

Fdo.:Begoña María Escribano Durán

TUNEZ
FIÑANA
ISAAC -
30801139E

Firmado
digitalmente por
TUNEZ FIÑANA
ISAAC - 30801139E
Fecha: 2022.06.06
13:57:36 +02'00'

Fdo.: Isaac Túnez Fiñana

“Take your broken heart, make it into art”

Meryl Streep

(Globos de Oro 2017-Homenaje a Carrie Fisher)

A las mujeres de mi vida.

*A mi madre y a mi abuela, que me han enseñado
a luchar por lo que se desea, a no rendirse nunca por
muchos golpes que te dé la vida
y a mi directora, Begoña, quién me lo ha enseñado
todo sobre el mundo de la investigación*

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis Doctoral no habría sido posible sin la inestimable ayuda, apoyo y confianza de personas que han vivido junto a mí cada momento de este largo proceso. Por ello, quiero dar mi más sincero agradecimiento a:

- A mi director, Isaac Túnez, por la confianza puesta en mí para la realización de la tesis, valorando mi esfuerzo y mis capacidades. Gracias por tus consejos y por tu ayuda en la redacción de las revisiones y los artículos. Gracias por tus conocimientos, tus propuestas y tus ideas.
- A mi madre, quién durante toda su vida ha luchado para que tanto mis hermanos, como yo, saliéramos adelante, a pesar de la multitud de obstáculos que ha tenido que superar. Gracias por enseñarme que todo esfuerzo tiene su recompensa y que jamás hay que rendirse por muchas piedras que haya en el camino. Gracias por escuchar cada una de las cosas que te contaba de la melatonina y la esclerosis múltiple. Gracias por soportar mis cabreos, que no han sido pocos, con tu santa paciencia y, sobre todo, gracias por educarme como lo has hecho.
- A mi familia, especialmente a mi abuela, un pilar fundamental en mi vida, que siempre, de una manera o de otra, consigue que me ría a carcajadas. Gracias por tu apoyo incondicional y por cada uno de tus consejos. Gracias por enseñarme que hay que afrontar la vida tal y como viene, pero que a todo se le puede buscar una solución.
- A Fran, mi Fran. La primera persona que conocí de mi actual centro de trabajo, convirtiéndose en el mejor compañero que he podido tener y, con el paso del tiempo, en uno de mis mejores amigos y compañero de fatigas. Gracias por compartir conmigo tus conocimientos, enseñándome todo lo que sé del mundo de la sanidad animal. Gracias por estar siempre

dispuesto a echar una mano. Gracias por ser mi “Pepito grillo” particular y por frenar al miura en tantas y tantas ocasiones. Gracias por las risas juntos y por los ratos en nuestra recién instaurada “hora del té” (la de cosas que aprendemos en esa hora, I+D+i en toda regla). GRACIAS por tu ayuda y apoyo. Eres un gran veterinario y próximamente, serás un gran doctor.

- A Maleni. Empezamos este camino juntas y ahora nos separa un océano, pero, a pesar de no vernos todos los días, como hacíamos antes, cuando hablamos es como si no hubiera pasado el tiempo. Gracias por ser la calma de mis nervios. Gracias por las intensas conversaciones sobre cualquier tema que se nos ocurriera. Gracias por esos viernes a mediodía que se convirtieron en el momento más esperado de la semana. Gracias por decir las cosas claras. Gracias por escucharme y apoyarme tanto. Gracias por todo lo vivido.
- A Andrés, quien me aguanta todos los días a todas horas. Gracias por no dudar en prestarme tu ayuda siempre que ha hecho falta y por proponer planes cuando necesitaba despejarme. Gracias por querer conocer el mundo junto a mí.
- A mis amigos, José por su fina ironía y su capacidad para hacer reír a la gente. Gracias por sacar lo mejor de mí. A Marina, por entendernos tan bien, por los todos los buenos momentos compartidos.

Y, quizás, está sea la parte que más me ha costado escribir de toda la tesis, porque no tengo palabras para agradecerle todo lo que ha hecho por mí:

- A mi directora, Begoña, quién se ha convertido en una persona fundamental en mi vida. Desde que te conocí dándome clase, te he considerado la mejor profesora que he tenido en mi vida. Ahora, he tenido el privilegio de que seas mi directora de tesis, pudiendo conocerte

personalmente, y he comprobado que además de buena profesora, eres una persona increíble. Fue contigo, junto con Pura, con quien di mis primeros pasos en el mundo de la investigación, con el TFG y, ahora, me convierto en investigadora gracias a ti. Has sido y eres un apoyo enorme tanto en lo profesional como en lo personal. Parecía que el momento de leer la tesis nunca iba a llegar, porque hemos tenido muchísimas piedras en el camino y parecía que todo era mala suerte, pero claro, ¿Cómo íbamos a tener buena suerte? Si toda la buena suerte del mundo ya la tuve yo cuando te conocí. Finalmente, lo hemos conseguido. GRACIAS por confiar en mí. GRACIAS por permitirme aprender de ti. GRACIAS por enseñarme como se deben redactar los artículos, especialmente las discusiones. GRACIAS por enseñarme a sobrellevar la frustración cuando los artículos son rechazados. GRACIAS por tu velocidad corrigiendo y contestando a los correos. GRACIAS por sacar siempre un hueco para vernos, aunque la agenda estuviera muy apretada. GRACIAS por ser uno de mis grandes apoyos. GRACIAS por estar ahí siempre y por ayudarme en todo. GRACIAS por ser mi confidente. GRACIAS por sacarme siempre una sonrisa. GRACIAS por hacer que creyera en mí misma y en lo que soy capaz de hacer. GRACIAS por ser como eres. Y, por último, GRACIAS de corazón, por hacer que cumpla el sueño de vida, ser Doctora.

INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

ANTECEDENTES	1
INTRODUCCIÓN	4
1. MELATONINA	5
1.1. Síntesis, secreción y metabolismo.....	5
1.2. Receptores	7
1.3. Funciones y propiedades	10
2. ESCLEROSIS MÚLTIPLE	20
2.1. Síntomas, etiología, prevalencia y tipos	20
2.2. Mecanismos celulares y moleculares de la Esclerosis Múltiple.....	24
2.3. Factores neurotróficos, neurogénesis y sinaptogénesis.....	37
2.4. Tratamientos actuales.....	39
2.5. Modelo animal de Esclerosis Múltiple: Encefalomiелitis Autoinmune Experimental	50
3. EVIDENCIAS DE LA RELACIÓN ENTRE LA MELATONINA Y LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	52
3.1. Efecto de la Melatonina sobre los principales síntomas de la Esclerosis Múltiple.....	53
OBJETIVOS.....	59
1. Objetivo general	60
2. Objetivos específicos	60
MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
1. Animales.....	62
2. Protocolo experimental	62
2.1. Inducción de EAE	62
2.2. Administración de Melatonina.....	63
3. Toma de muestras y procesamiento.....	64
4. Variables analizadas.....	65
4.1. Evaluación de puntuación clínica.....	65
4.2. Biomarcadores de daño oxidativo en sangre, cerebro, médula espinal, corazón, hígado, riñón, intestinos (delgado y grueso).....	65
4.3. Factor de inflamación	66
4.4. Biomarcadores indirectos de disbiosis.....	67
5. Análisis estadístico	67
RESULTADOS	68
1. Puntuación clínica.....	69

2. Sistema Redox del Glutati3n	70
3. Biomarcadores de Estr3s Oxidativo	72
4. Factor de Inflamaci3n	75
5. Biomarcadores Indirectos de Disbiosis	76
6. Correlaciones de Pearson.....	77
DISCUSI3N.....	82
CONCLUSIONES.....	93
BIBLIOGRAFIA	95
INDICIOS DE CALIDAD	144
PRODUCCI3N CIENT3FICA	147

ABREVIATURAS

AANAT: Arilalquilamina-N-acetiltransferasa

ADNmt: ADN mitocondrial

AFMK: N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina

AG: Acetato de glatiramer

AhR: Receptor de hidrocarburos arilo

AMK: N1-acetil-5-metoxiquinuramina

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ARE: Elemento de respuesta antioxidante

ASMT: N-Acetilserotonina O-metiltransferasa

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés, *Brain-derived neurotrophic factor*)

BHE: Barrera Hematoencefálica

CAT: Catalasa

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CPF: Corteza prefrontal

COX: Ciclooxygenasa

CREB: del inglés, *cAMP response element-binding*

c3OHM: 3-hidroxi melatonina cíclica

DAMPs: Patrones moleculares asociados al daño (del inglés, *Damage-associated molecular pattern*)

EAE: Encefalomiелitis autoinmune experimental

ECH: Epiclorhidrina

EDSS: Escala Expandida del Estado de Discapacidad (del inglés, *Expanded Disability Status Scale*)

EMA: Agencia Europea del Medicamento (del inglés, *European Medicines Agency*)

EM: Esclerosis Múltiple

EM-RR: Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente

EM-PP: Esclerosis Múltiple Progresiva Primaria

EM-SP: Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva

ERK: proteína quinasa regulada por señales extracelulares

FDA: del inglés, *U.S. Food and Drug Administration*

GMPC: Guanosín monofosfato cíclico

GSH: Glutación reducido

GSSG: Disulfuro de glutación oxidado

GPx: Glutación peroxidasa

GRd: Glutación reductasa

GWAS: del inglés, *Genome-Wide Association Studies*

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HO-1: Hemo oxigenasa-1

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1 (del inglés, *Intercellular Adhesion Molecule-1*)

IFN: Interferón

IgG: Inmunoglobulina G

IKK: IκB quinasa

IL-1: Interleucina-1

IL-17: Interleucina-17

IL-22: Interleucina-22

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés, *Inducible nitric oxide synthase*)

IRF3: Factor regulador de interferón 3 (del inglés, *Interferon regulatory factor 3*)

JNK: Cinasas c-Jun N-terminal (del inglés, *Jun N-Terminal Kinase*)

Keap1: Proteína 1 asociada a ECH (del inglés, *Kelch-like ECH-associated protein 1*)

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

LBP: Proteína de unión a LPS (del inglés, *Lipopolysaccharide Binding Protein*)

LPO: Productos de peroxidación lipídica (del inglés, *Lipid peroxidation products*)

LPS: Lipopolisacárido

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno

MDA: Malondialdehído

MMP-9: Metaloproteínasa de la matriz-9

MOG: Glicoproteína de Oligodendrocitos de mielina (*del inglés, myelin oligodendrocyte glycoprotein*)

mPTP: Poro de transición de permeabilidad mitocondrial

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido

NAS: N-acetil-serotonina

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

NGF: Factor de crecimiento nervioso (del inglés *Nerve growth factor*)

NO: Óxido nítrico

NOx: Nitrito total

Nrf2: Factor 2 relacionado con el eritroide nuclear 2

OH: Radical hidroxilo

ONOO⁻: Anión Peroxinitrito

O₂⁻: Anión superóxido

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, *Pathogen-associated molecular patterns*)

PBS: Tampón fosfato salino (del inglés, *Phosphate-buffered saline*)

PC: Proteínas carboniladas

PERK: Proteína quinasa de retículo endoplasmático (del inglés, *Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*)

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasas

PKC: Proteína Quinasa C

pNA: p-nitroamilina

PR: Peroxirredoxina

proCT: Procalcitonina

Psd95: Proteína de densidad postsináptica 95

RAPG: Receptores acoplados a proteína G

RNS: del inglés, *Reactive Nitrogen Species*

ROR: del inglés, *Retinoic acid receptors- related orphan receptors*

ROS: del inglés, *Reactive Oxygen Species*

SCA: Síndrome clínicamente aislado

SIRT3: Sirtuina 3

SNC: Sistema Nervioso Central

SOD: Superóxido dismutasa

tG: Glutación total

TLR4/MD2: Receptor de tipo toll-4/Proteína de diferenciación mieloide-2

TME: Terapias modificadoras de la enfermedad

TMS: del inglés, *Transcranial Magnetic Stimulation*

TNF: Factor de necrosis tumoral

UV: Ultravioleta

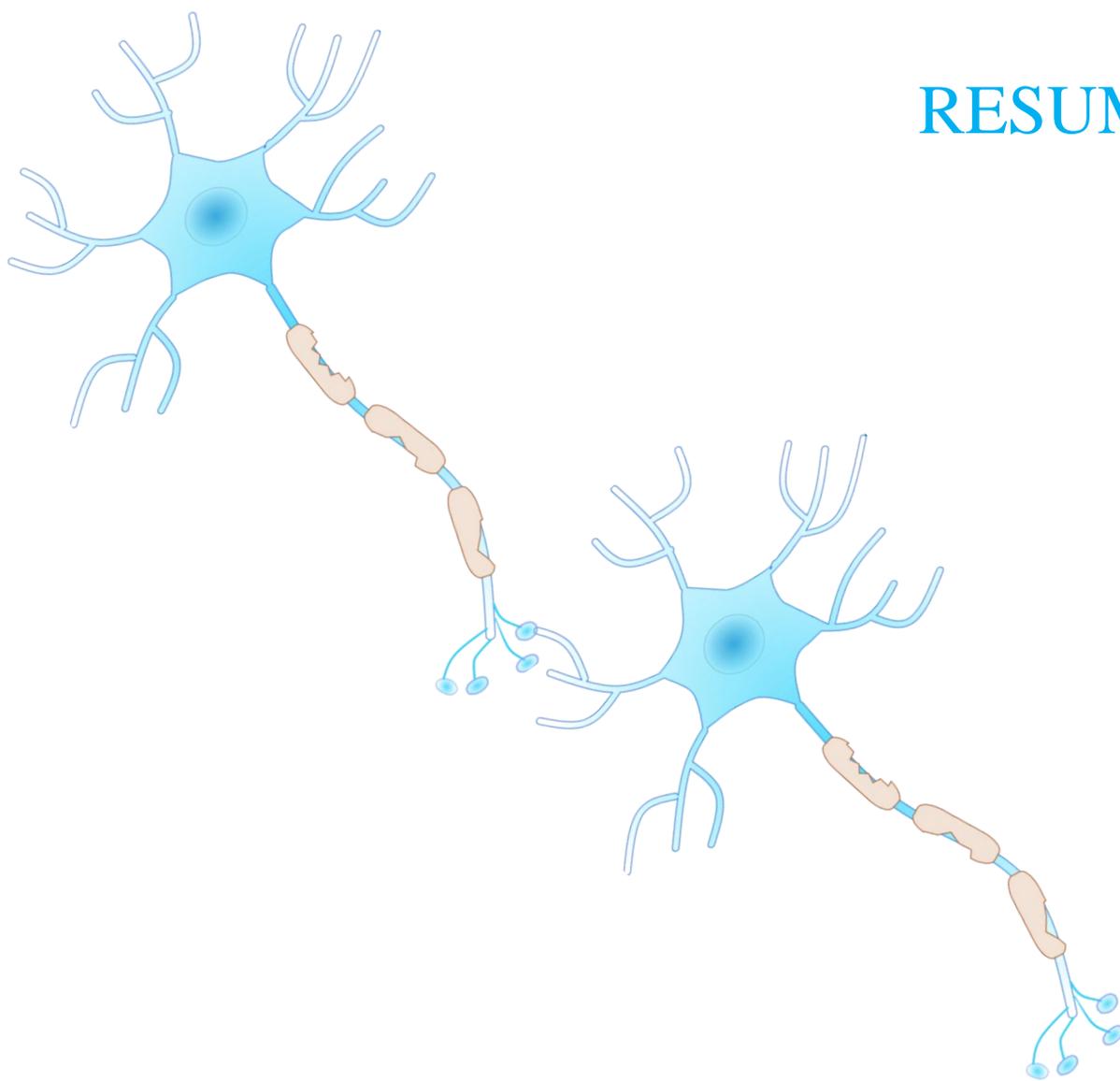
VCAM-1: Molécula 1 de adhesión vascular (del inglés, *Vascular cell adhesion molecule 1*)

VEB: Virus de Epstein-Barr

6-SMT: 6-sulfatoximelatonina



RESUMEN

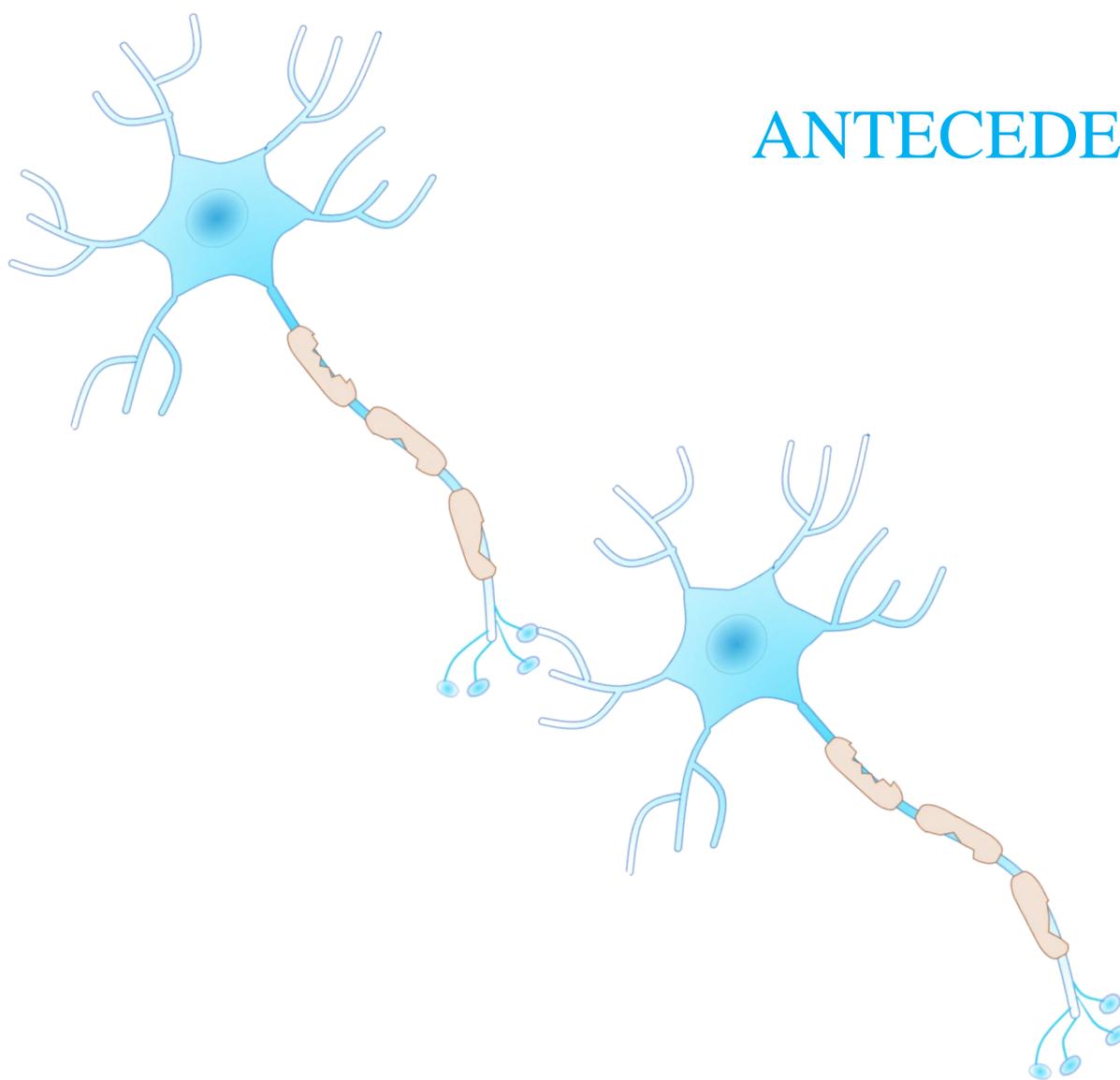


La melatonina es una hormona indol sintetizada a partir de triptófano y secretada principalmente por la glándula pineal en un ritmo circadiano, pudiendo ser secretada por otras fuentes extrapineales como las células del sistema inmunológico, retina, cerebro, piel y tracto gastrointestinal. Se caracteriza por ser una hormona multifuncional, siendo un importante regulador de los procesos fisiológicos y un guardián de la homeostasis corporal, presentando propiedades cronobióticas, antioxidantes, antiinflamatorias e inmunomoduladoras y antiapoptóticas, así como un efecto neuroprotector, contribuyendo a la multiplicación, diferenciación y supervivencia celular en el cerebro. Las diversas funciones que presenta la melatonina hacen que pueda desempeñar un papel importante en los mecanismos fisiopatológicos de enfermedades neuroinmunológicas como la esclerosis múltiple (EM). La EM es una enfermedad crónica inmuno-mediada del sistema nervioso central (SNC), caracterizada por la destrucción de la mielina por células T autorreactivas y por una degeneración axonal, que afecta a 2.8 millones de personas en el mundo, siendo la causa más común de discapacidad no traumática en jóvenes adultos entre los 20-30 años. Durante el curso de la EM, la infiltración de linfocitos y macrófagos autorreactivos al SNC, provoca un aumento de citocinas inflamatorias como el IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-22 y debido a este aumento, se induce una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente), provocando estrés oxidativo. Además, la disbiosis intestinal, se ha asociado con enfermedades que afectan al SNC, viéndose que el eje microbiota-intestino-cerebro, probablemente, juegue un papel crucial en la EM. En base a esto, el objetivo de la presente tesis fue evaluar el efecto de la administración de melatonina en la clínica del modelo animal de EM, la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE). Para ello, se emplearon 25 ratas Dark Agouti, que fueron divididas en cinco grupos (Control, Control+Vehículo, Control+Melatonina, EAE y EAE+Melatonina). La EAE se indujo mediante inyección subcutánea de glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), durante 14 días en los grupos correspondientes. La melatonina fue administrada diariamente durante 51 días, a partir del día 14, con una dosis de 1mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal. El grupo control no fue manipulado y el grupo

Control+Vehículo, fue inoculado con una inyección subcutánea de 100µl de adyuvante completo de Freund. Los animales fueron sacrificados el día 65 y, en condiciones de temperatura controlada, se extrajeron y pesaron el cerebro, la médula espinal, el corazón, el hígado, el riñón y los intestinos. Asimismo, se tomaron muestras de sangre del tronco vascular del cuello. Posteriormente, se analizaron los siguientes parámetros: Evaluación de la puntuación clínica, Biomarcadores de daño oxidativo (Productos de peroxidación lipídica (LPO), Proteínas carboniladas (PC) y Óxido nítrico (NOx)), Sistema Redox del Glutati6n (Glutati6n total (tG), Glutati6n reducido (GSH), Glutati6n oxidado (GSSG), Glutati6n peroxidasa (GPx) y la relaci6n GSH/GSSG), Factor de inflamaci6n (Factor de necrosis tumoral (TNF- α)) y Biomarcadores indirectos de disbiosis (Lipopolisacárido (LPS) y su prote6na de uni6n (LBP)). La administraci6n de melatonina supuso una disminuci6n de la puntuaci6n cl6nica de la enfermedad, evaluada mediante la escala P6rez-Nievas. Asimismo, esta hormona ejerci6 un efecto antioxidante en todos los 6rganos estudiados, reduciendo los biomarcadores de estr6s oxidativo y paralelamente, manteniendo la home6stasis del glutati6n, aumentando los niveles de GSH, GPx y de la relaci6n GSH/GSSG, as6 como disminuyendo los niveles de GSSG. Asimismo, redujo los niveles de TNF- α y mejor6 la disbiosis bacteriana, en el cerebro y la m6dula espinal, disminuyendo la concentraci6n de LPS y LBP. En conclusi6n, de acuerdo con los resultados obtenidos, la melatonina ha demostrado ser un agente eficaz frente al estr6s oxidativo, la inflamaci6n y la disbiosis bacteriana generada por la EAE, al mismo tiempo que ha mejorado la evoluci6n cl6nica de la enfermedad. Ello podr6a sustentar la idea de que esta indolamina podr6a actuar de la misma forma en pacientes con EM.



ANTECEDENTES



Desde nuestro grupo GC-28 Neuroplasticidad y Estrés Oxidativo del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), se realizan estudios sobre el papel que juega el estrés oxidativo y los sistemas antioxidantes en enfermedades neurodegenerativas, especialmente en la esclerosis múltiple (EM). Del mismo modo, analizamos el posible efecto terapéutico que pueden presentar diferentes compuestos dietéticos. En este sentido, la melatonina ha formado parte de varias investigaciones llevadas a cabo por el grupo de investigación. A raíz de estos estudios, pudimos comprobar que esta hormona producía una disminución del estrés oxidativo en el modelo animal de la enfermedad de Huntington (Túnez *et al.*, 2004) y en un modelo de nefropatía inducida por adriamicina (Escribano, Moreno, *et al.*, 2014), así como una disminución de la pérdida neuronal en ratas tratadas con ácido 3-nitropropiónico, lo que sugiere que la melatonina ejerce una acción neuroprotectora (Tasset, Agüera, *et al.*, 2011). Probamos, también, que gracias a la capacidad antioxidante que presenta la melatonina, esta puede modificar la respuesta neuronal al ácido okadaico (Túnez *et al.*, 2003). Gracias al estudio realizado por Bahamonde *et al.* (2014), observamos que el tratamiento con Natalizumab, provocaba un aumento significativo de la melatonina en mujeres con Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente (EM-RR) (Bahamonde *et al.*, 2014). En relación con la EM, hemos realizado numerosos estudios gracias a los que se ha comprobado que los pacientes con EM presentan un estado de oxidación global y que el estrés oxidativo juega un papel importante en la EM-RR (Bahamonde *et al.*, 2014), demostrándose la existencia de estrés oxidativo en tejidos y órganos no nerviosos (Conde *et al.*, 2019). Otro hallazgo importante de nuestro grupo es la demostración de la existencia de una correlación positiva entre el daño oxidativo y la proteína de unión a lipopolisacárido, así como la posible implicación de la disbiosis en la homeostasis y hormesis del eje microbiota-sistema inmune-sistema nervioso central en la EM (Escribano *et al.*, 2017). Asimismo, demostramos que la suplementación con lactosa, caseína, aceite de oliva virgen extra, ácido oleico e hidroxitirosol, ejercen efectos beneficiosos sobre el estrés oxidativo, inflamación y disbiosis que se producen en el modelo animal de EM, la

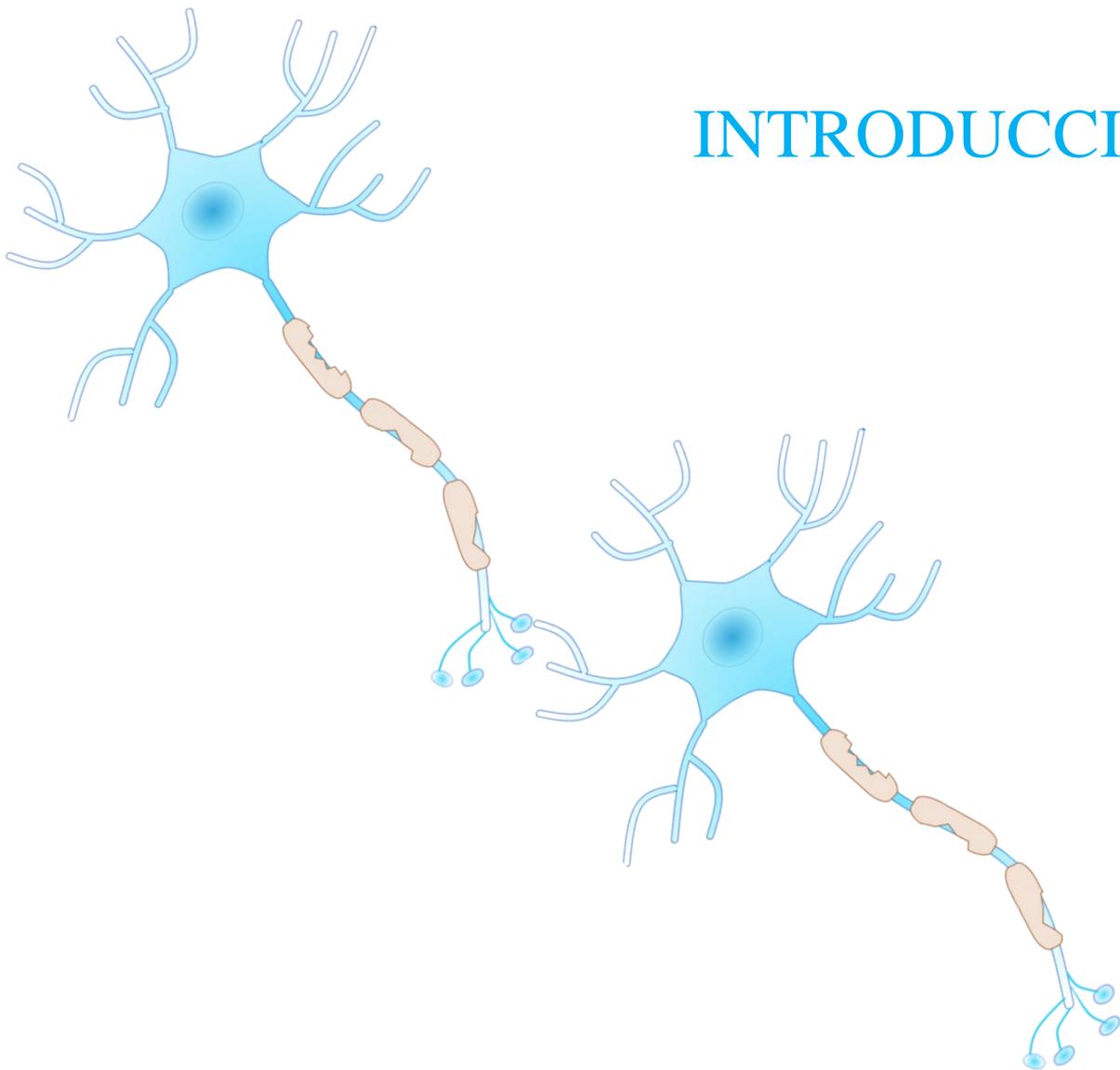
encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) (Conde *et al.*, 2019, 2020; Escribano *et al.*, 2021).

En base a estos antecedentes esta Tesis trata de profundizar en el papel de la hormona melatonina en la EM, centrándonos en su papel como antioxidante, pero también, en su intervención en la inflamación generada por la enfermedad y en el reciente rol protagonista de la disbiosis intestinal y el eje microbiota-sistema nervioso central como causantes de la exacerbación autoinmune, responsables últimos de la inflamación y el estrés oxidativo.

Comienzo, por tanto, describiendo a la hormona melatonina y su función, para continuar el enfoque en la EM, como enfermedad, objeto de esta tesis doctoral, terminando en la posible relación entre patología y hormona, centrándome en las evidencias clínicas que la melatonina produce en la sintomatología de la enfermedad.



INTRODUCCIÓN



1. MELATONINA

1.1. Síntesis, secreción y metabolismo

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina; $C_{13}H_{16}N_2O_2$) fue aislada y caracterizada, por primera vez, en 1958, por Aaron Lerner *et al.* (Lerner *et al.*, 1958), de la glándula pineal bovina (Slominski *et al.*, 2012). Su nombre se debió a la intención de reflejar su efecto de agregación de gránulos de melanina (Lerner *et al.*, 1958; Brennan, Jan and Lyons, 2006). Se trata de una indolamina producida y secretada principalmente por la glándula pineal en un ritmo circadiano (Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014; Carrascal *et al.*, 2018), aunque puede ser secretada por otras fuentes extrapineales como las células del sistema inmunológico, retina, cerebro, piel y tracto gastrointestinal (Carrascal *et al.*, 2018) (Figura 1). La melatonina que no es sintetizada por la glándula pineal, no está regulada por ciclos circadianos, sino que responde a otras señales, ejerciendo un efecto paracrino o autocrino (Carrillo-Vico *et al.*, 2004; Radogna, Diederich and Ghibelli, 2010). Se trata de una hormona ampliamente distribuida, pudiendo encontrarse, además de en todos los mamíferos, en plantas, organismos unicelulares y algas (Slominski *et al.*, 2012).

Su síntesis y secreción, a nivel pineal, están controladas por el núcleo supraquiasmático en el hipotálamo, siendo inducida por la oscuridad e inhibida en presencia de luz (Skarlis and Anagnostouli, 2020). Durante la noche, la melatonina se sintetiza bajo la acción de señales generadas por las fibras nerviosas simpáticas, que transmiten información desde el núcleo supraquiasmático, a través de la liberación del neurotransmisor norepinefrina (Waly and Hallworth, 2015; Nikolaev, Robeva and Konakchieva, 2021). El estímulo de luz, activa la degradación del fotorpigmento, melanopsina en las células ganglionares fotorreceptoras de la retina que, a través de la vía retinohipotalámica, inducen la inhibición de la síntesis de melatonina (Reiter, 1991; Tarocco *et al.*, 2019). La melatonina es sintetizada dentro de los pinealocitos a partir de L-triptófano (Aulinas, 2019). Este, es absorbido desde la circulación

hacia la glándula pineal donde es hidroxilado por la Triptófano-5-hidroxilasa (EC 1.14.16.4) y piridoxal fosfato, produciendo 5-hidroxitriptófano. Tras esto, el 5-hidroxitriptófano es descarboxilado por la L-aminoácido aromático descarboxilasa (EC 4.1.1.28) y produce serotonina. Esta, es convertida en N-acetil-serotonina (NAS) a través de la enzima Arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AANAT; EC 2.3.1.5). Por último, NAS, a través de la O-metilación mediada por la N-Acetilserotonina O-metiltransferasa (ASMT; EC 2.1.1.4), produce melatonina (Arendt, 1998; Pandi-Perumal *et al.*, 2006; Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014; Skarlis and Anagnostouli, 2020). Una vez que la melatonina ha sido sintetizada, es liberada por las células pineales al torrente sanguíneo (Reiter, 2003; Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014). Gracias a su alta solubilidad en agua y lípidos, puede penetrar la membrana celular y llegar a diversos fluidos como saliva, semen, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR) (Claustrat and Leston, 2015; Skarlis and Anagnostouli, 2020). En humanos, la vida media de la melatonina es de entre 30 a 60 minutos (Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014), metabolizándose el 90% de esta en el hígado, donde es hidroxilada a 6-hidroxi melatonina por el citocromo CYP1A2. Posteriormente, se conjuga para una posterior excreción urinaria como 6-sulfatoxi melatonina (6-SMT) (Aulinas, 2019; Skarlis and Anagnostouli, 2020). Además de por la vía hepática, la melatonina también puede degradarse siguiendo la vía indólica alternativa que produce ácido 5-metoxiindolacético, o siguiendo la vía quinúrica, que produce N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) (Slominski *et al.*, 2008, 2012).

La cantidad de melatonina no es constante a lo largo de la vida (Poza *et al.*, 2018). El ritmo de secreción de la melatonina aparece en torno a los 2-3 meses de vida (Kennaway, Stamp and Goble, 1992; Aulinas, 2019) y a partir de entonces, los niveles de esta aumentan de manera exponencial hasta los 8-10 años, momento en el que su síntesis comienza a disminuir hasta alcanzar las concentraciones medias de adultos (Poza *et al.*, 2018; Aulinas, 2019). En adultos,

el nivel sérico nocturno es de 25-85 pg/ml, alcanzando el máximo entre las 4:00-6:00 h y disminuyendo entre las 7:00-9:00h (Akpinar *et al.*, 2008). Los niveles de melatonina se mantienen estables hasta los 35-40 años y a partir de este momento, comienzan a disminuir paulatinamente (Poza *et al.*, 2018; Aulinas, 2019). Asimismo, las concentraciones de melatonina presentan fluctuaciones estacionales, alcanzando su máxima concentración en meses de otoño-invierno (Farez *et al.*, 2015; Mocayar-Marón *et al.*, 2020).

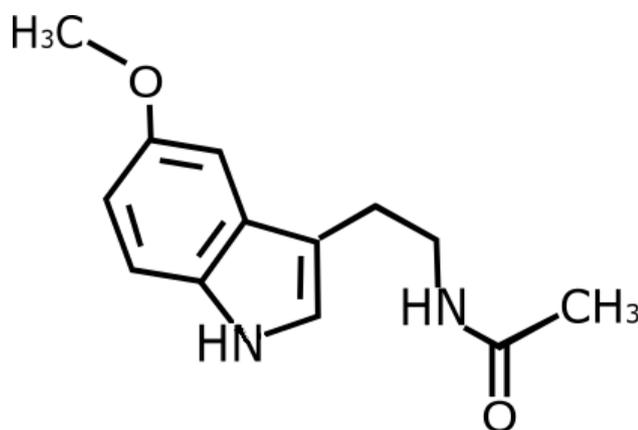


Figura 1. Estructura química de la melatonina. La estructura química de esta hormona indol, se ha conservado durante millones de años (Reiter *et al.*, 2017; D. Zhao *et al.*, 2019). Posee dos grupos funcionales importantes que determinan su especificidad y anfifilicidad: el grupo 5-metoxi y la cadena lateral N-acetilo (Esposito and Cuzzocrea, 2010; Tarocco *et al.*, 2019). Gracias a sus características anfifílicas, la melatonina puede difundirse y atravesar todas las barreras morfofisiológicas (Carloni *et al.*, 2018; Tarocco *et al.*, 2019). Esta estructura determina, también, la alta eficacia de la melatonina en la desintoxicación de radicales libres (Galano, Tan and Reiter, 2018; D. Zhao *et al.*, 2019).

1.2.Receptores

La melatonina produce sus efectos en los tejidos y órganos diana a través de vías dependientes e independientes de receptor (Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014; Kern *et al.*, 2019). Las acciones no mediadas por receptores se deben a las propiedades anfipáticas que posee esta hormona, que le permiten atravesar libremente las membranas celulares y nucleares

(Aulinas, 2019). En cuanto a las vías dependientes de receptor, se han encontrado sitios de unión a melatonina en las membranas de varios tejidos. Esta hormona es considerada un factor pleiotrópico debido a las múltiples localizaciones de formación y expresión de sus receptores (Claustrat and Leston, 2015; Skarlis and Anagnostouli, 2020). Actualmente, se han identificado 3 tipos de receptores de melatonina, los cuales son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (RAPG) (Ng *et al.*, 2017; C. Zhao *et al.*, 2019; Kern *et al.*, 2019). Dichos receptores son MT1, MT2 y MT3, siendo MT1 y MT2, los dos tipos principales de RAPG, expresándose, entre otros lugares, en varias áreas del sistema nervioso central (SNC) (Ng *et al.*, 2017; Soto-Brambila *et al.*, 2017). MT1 y MT2, tienen un motivo estructural general que consta de 7 dominios transmembrana α -helicoidales, conectados con el extremo amino, en el lado extracelular y con el extremo carboxilo en el lado intracelular (Dubocovich *et al.*, 2010; Nikolaev, Robeva and Konakchieva, 2021). MT1, está acoplado a G_i , específicamente a $G_{i\alpha 2}$, $G_{i\alpha 3}$, y $G_{q/11}$ (Slominski *et al.*, 2012). Tiene una longitud de 350 aminoácidos con un peso molecular de 39.374 Da (Ng *et al.*, 2017) y está codificado por el gen MTNR1A en el cromosoma 4q35.1 (Li *et al.*, 2013). Este receptor, se encuentra principalmente en el hipotálamo, hipófisis, hipocampo, retina, núcleo supraquiasmático, cerebelo y glándulas suprarrenales, lo que sugiere que los efectos circadianos y reproductivos de la melatonina, están mediados por MT1 (Mazzucchelli *et al.*, 1996; Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014; Aulinas, 2019). Además, MT1 se expresa también en el sistema cardiovascular, sistema inmunitario, testículos, ovarios, piel, hígado, riñón, placenta, mamas, páncreas y bazo (Slominski *et al.*, 2012).

MT2, se acopla también a G_i (Slominski *et al.*, 2012). Tiene una longitud de 362 aminoácidos con un peso molecular de 40.188 Da (Ng *et al.*, 2017) y está codificado por el gen MTNR1B en el cromosoma 11q21-q22 (Li *et al.*, 2013). Este receptor, se encuentra en el hipocampo, cerebelo, tálamo reticular, sustancia negra, núcleo supraóptico, núcleo rojo

(Musshoff *et al.*, 2002; Comai and Gobbi, 2014; Beriwal *et al.*, 2019), sistema inmunitario, vasos sanguíneos, testículos, tracto gastrointestinal, tejido adiposo y piel (Slominski *et al.*, 2012). La homología de aminoácidos de ambos receptores en humanos, es de aproximadamente el 60% (Nikolaev, Robeva and Konakchieva, 2021) y tanto MT1 como MT2, pueden formar homo y heterodímeros (Slominski *et al.*, 2012). Por último, MT3, se identifica como un sitio de unión a la melatonina ubicado en la enzima citosólica, quinona reductasa 2 (Nosjean *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2017), cuya función y relevancia aún no se conocen bien (Poza *et al.*, 2018).

La activación del receptor MT1 por la melatonina, provoca la inhibición de AMPc (Adenosín monofosfato cíclico), así como la inhibición de la señalización de la proteína quinasa A y la fosforilación de CREB (*cAMP response element-binding*, en inglés). Además, MT1 aumenta la fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y la quinasa 1/2 regulada por señales extracelulares (ERK). Por su parte, la estimulación del receptor MT2 inhibe la formación de AMPc y GMPc (Guanosín monofosfato cíclico), activa la proteína quinasa c (PKC) y disminuye la liberación de dopamina dependiente de calcio en la retina (Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016).

Los receptores huérfanos relacionados con el ácido retinoico (ROR, por su traducción en inglés, *retinoic acid receptors- related orphan receptors*), también han sido descritos como sitios de unión nuclear a melatonina (Soto-Brambila *et al.*, 2017; Kern *et al.*, 2019). La estructura de estos receptores nucleares, consta de un dominio N-terminal, un dominio de unión al ADN que contiene un dominio de doble dedo de zinc, una región bisagra y un sitio de unión al ligando en el extremo carboxilo terminal (Smirnov, 2001; Slominski *et al.*, 2012; Nikolaev, Robeva and Konakchieva, 2021). Estos receptores son factores de transcripción involucrados en el mantenimiento del ritmo circadiano y son esenciales para una función inmune adecuada (Chang, Rosen and Griffin, 2014). La melatonina se une a las variantes ROR α y RZR β (Hardeland *et al.*, 2011), aunque según otros autores, también puede unirse a RZR α y ROR α 2

(Nikolaev, Robeva and Konakchieva, 2021). RZR β se encuentra en el tejido nervioso y RZR α en el tejido adiposo, piel, testículos, cartílago e hígado (Smirnov, 2001; Slominski *et al.*, 2012; Nikolaev, Robeva and Konakchieva, 2021). ROR α actúa como un interruptor molecular implicado en la generación de células Th17 y T reguladoras, estando ambas implicadas en el mantenimiento del equilibrio daño/protección en condiciones inmunitarias como la autoinmunidad (Lardone *et al.*, 2011).

1.3. Funciones y propiedades

La melatonina es un importante regulador de los procesos fisiológicos y un guardián de la homeostasis corporal (Chitimus *et al.*, 2020), cuya actividad funcional tiene un amplio espectro de acción, estando aún en estudio algunas de sus funciones (Patel *et al.*, 2020). La función principal de la melatonina es transmitir información sobre el ciclo diario de luz y oscuridad (Claustrat, Brun and Chazot, 2005), sincronizando el ritmo circadiano con este ciclo (Patel *et al.*, 2020). También, juega un papel clave en la regulación del ciclo sueño-vigilia, desarrollo de la pubertad, adaptación estacional y formación de la memoria (Giannoulia-Karantana *et al.*, 2007; Skarlis and Anagnostouli, 2020). Asimismo, hallazgos sobre la importancia de la melatonina en mamíferos incluyen el control de la función de la retina y regulación de los ciclos reproductivos estacionales en animales fotosensibles (Reiter *et al.*, 2016; Nikolaev, Robeva and Konakchieva, 2021), así como un efecto directo sobre la función ovárica (Nikolaev, Robeva and Konakchieva, 2021). La melatonina es también un agente oncostático natural, estando involucrada en la protección contra el desarrollo de neoplasias malignas (Kostoglou-Athanassiou, 2013). Los efectos antitumorales de la melatonina, están relacionados con su capacidad para inhibir la proliferación, angiogénesis, migración y para estimular la apoptosis de células cancerosas (Nikolaev, Robeva and Konakchieva, 2021).

Además de esto, se sabe que la melatonina es una molécula multifuncional (Onaolapo *et al.*, 2019), demostrándose en los últimos años su capacidad anti-oxidante, anti-inflamatoria

(Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014) y anti-apoptótica, actuando también en respuestas inmunes y homeostasis mitocondrial (Carrascal *et al.*, 2018) y contribuye a la multiplicación, diferenciación y supervivencia celular en el cerebro (Onaolapo *et al.*, 2019).

1.3.1. Capacidad antioxidante

La melatonina, evolucionó hace aproximadamente 3000-2500 millones de años, probablemente en bacterias fotosintéticas, donde se diseñó específicamente para neutralizar los derivados tóxicos del O₂ que se producen durante la fotosíntesis (Noctor *et al.*, 2000; Reiter *et al.*, 2017). Las propiedades antioxidantes de la melatonina se deben, principalmente, a su anillo de indol aromático rico en electrones, funcionando como un donante de estos (Esposito and Cuzzocrea, 2010; Tarocco *et al.*, 2019). Esta indolamina, dispone de diversos mecanismos que la hacen extraordinariamente eficaz para disminuir el daño celular inducido por la destrucción oxidativa de elementos celulares clave que, cuando se dañan, comprometen la función óptima de las células, lo que puede resultar en su apoptosis (Reiter *et al.*, 2016). Se ha demostrado que la melatonina, es dos veces más activa que la vitamina E, que se cree que es el antioxidante lipofílico más eficaz (Ferlazzo *et al.*, 2020).

La actividad antioxidante de la melatonina es un proceso multifacético (Galano, Guzmán-López and Reiter, 2021), disminuyendo el estrés oxidativo, a través de la eliminación de radicales libres tóxicos (Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014) y reduciendo la toxicidad inducida por la peroxidación de lípidos (Reiter, Tan and Galano, 2014). Cuando la melatonina interacciona con los radicales libres, se produce la denominada Cascada de antioxidantes de Melatonina, en la que los metabolitos que se forman, 3-hidroxi-melatonina cíclica (c3OHM), AFMK y N1-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK), son también captadores de radicales, por lo que se prevé que cada molécula de melatonina es capaz de eliminar hasta 10 especies reactivas de

oxígeno y nitrógeno (ROS- *reactive oxygen species* y RNS- *reactive nitrogen species*, respectivamente). Esto es una propiedad única de la melatonina (Reiter, Tan and Galano, 2014). Además, mejora los sistemas de defensa antioxidante ya que, la transducción de señales inducida por la melatonina a través de los receptores MT1 y MT2 (Ferlazzo *et al.*, 2020), promueve la expresión y por tanto, la actividad, de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) (Bahamonde *et al.*, 2014; Soto-Brambila *et al.*, 2017; C. Zhao *et al.*, 2019; Yeganeh-Salehpour *et al.*, 2019; AboTaleb and Alghamdi, 2020) y el ciclo redox del glutatión, estimulando las enzimas glutatión peroxidasa (GPx; EC.1.11.19), glutatión reductasa (GRd; EC.1.8.17) y el glutatión reducido (GSH) (Bahamonde *et al.*, 2014; Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014; Soto-Brambila *et al.*, 2017; Yeganeh-Salehpour *et al.*, 2019; AboTaleb and Alghamdi, 2020). Asimismo, aumenta las defensas antioxidantes, al inducir epigenéticamente a Nrf2 (Factor 2 relacionado con el eritroide nuclear 2) (Ferlazzo *et al.*, 2020) y facilitando su translocación nuclear (Das, Balmik and Chinnathambi, 2020; Fernández-Ortiz *et al.*, 2020). La melatonina, neutraliza también los tóxicos a base de nitrógeno, es decir, al óxido nítrico (NO) y al anión peroxinitrito (ONOO⁻), los cuales promueven el daño nitrosativo y, además, suprime la actividad de la enzima prooxidativa, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). El daño oxidativo, también puede ser mitigado por la melatonina gracias a su capacidad de quelación de metales pesados (Reiter *et al.*, 2016; Galano, Guzmán-López and Reiter, 2021), pudiendo unirse al aluminio, cadmio, cobre, hierro, plomo y zinc (Reiter *et al.*, 2016). Protege a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación y se une al cobre, lo que evita la peroxidación lipídica inducida por este metal (Wakatsuki *et al.*, 2000; Parmar *et al.*, 2002; Galano, Guzmán-López and Reiter, 2021). Todo ello hace que la melatonina sea

una molécula excepcionalmente eficaz contra el estrés oxidativo (Reiter, Tan and Galano, 2014).

Melatonina en las mitocondrias

Se ha podido comprobar que las concentraciones de melatonina en las mitocondrias, son mucho mayores que en otros orgánulos subcelulares (Venegas *et al.*, 2012; Reiter *et al.*, 2021), por lo que se piensa que, además de por la glándula pineal, la melatonina es producida por las mitocondrias (Reiter, Tan, Rosales-Corral, Galano, Jou, *et al.*, 2018). Estos orgánulos, han conservado las dos enzimas necesarias para convertir la serotonina en melatonina, AANAT y ASMT (Suofu *et al.*, 2017; Reiter *et al.*, 2021). De hecho, se ha encontrado que las mitocondrias de ovocitos de roedores, pueden sintetizar melatonina (C. He *et al.*, 2016; Melhuish-Beaupre *et al.*, 2021). Recientemente, también se ha asociado el receptor MT1, con la membrana externa de las mitocondrias (Suofu *et al.*, 2017; D. Zhao *et al.*, 2019), a través del cual, la melatonina controla la liberación de citocromo C de la matriz (D. Zhao *et al.*, 2019; Melhuish-Beaupre *et al.*, 2021). La regulación de las mitocondrias, por la melatonina, está impulsada, en parte, por su inducción del gen circadiano Bmal1 (Beker *et al.*, 2019; Anderson and Maes, 2020). Bmal1 media la desinhibición del Complejo de piruvato deshidrogenasa, lo que permite a la melatonina, aumentar el ciclo del ácido tricarboxílico y la fosforilación oxidativa (Anderson and Maes, 2020), lo que conduce al incremento de Acetil-CoA, el cual es necesario para la activación de la vía melatonérgica de las mitocondrias (Anderson, Rodriguez and Reiter, 2019).

Las mitocondrias, son un lugar importante para la generación de ROS (Reiter, Tan, Rosales-Corral, Galano, Zhou, *et al.*, 2018), siendo un producto normal del metabolismo celular (Holditch *et al.*, 2019). Existen sitios dentro de las

mitocondrias, que presentan un mayor potencial para generar ROS. Estos sitios son el Complejo I y el Complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, que pierden electrones cuando se desvían entre las moléculas donadoras y receptoras (Reiter, Tan, Rosales-Corral, Galano, Zhou, *et al.*, 2018; Mukherjee and Ghosh, 2020). Las ROS generadas por el Complejo I, aparecen en la matriz mitocondrial y las generadas por el Complejo III, se dividen entre la matriz y el espacio intermembrana (Muller, Liu and Van Remmen, 2004; Reiter, Tan, Rosales-Corral, Galano, Zhou, *et al.*, 2018). La melatonina, limita la fuga de electrones de la cadena respiratoria, lo que provoca que se reduzcan menos moléculas de O₂ al radical anión superóxido (O₂⁻), proceso denominado evitación radical (Hardeland, 2005; Reiter *et al.*, 2016). Además, la melatonina disminuye los niveles de ROS, estimulando enzimas antioxidantes como SOD, que elimina O₂⁻ y GPx y peroxirredoxina (PR; EC 1.11.1.15), que eliminan peróxido de hidrógeno (H₂O₂) del microambiente celular (Reiter, Tan, Rosales-Corral, Galano, Zhou, *et al.*, 2018). Aumenta, también, la actividad de las enzimas que intervienen en la fosforilación oxidativa mitocondrial, como NADH-coenzima Q reductasa (Complejo I) y citocromo C oxidasa (Complejo IV) (Martín *et al.*, 2000, 2002; Acuña-Castroviejo *et al.*, 2001; Leon *et al.*, 2004; Túnez *et al.*, 2004), lo que permite que la melatonina optimice la función mitocondrial (Anderson, Rodriguez and Reiter, 2019). Asimismo, para regular el estrés oxidativo en las mitocondrias, la melatonina tiene capacidad para regular al alza la Sirtuina 3 (SIRT3) (Anderson and Maes, 2020; Morris *et al.*, 2021), una desacetilasa dependiente de NAD⁺ (Nicotinamida adenina dinucleótido), que reside principalmente en las mitocondrias, concretamente en la matriz mitocondrial y mantiene la homeostasis de estas (Marcus and Andrabi, 2018; Anderson and Maes,

2020). SIRT3 también aumenta la respiración mitocondrial y su sobreexpresión conduce a una disminución en la producción de ROS (Anderson and Maes, 2020).

Por otro lado, se ha sugerido que la melatonina, pero no las vitaminas C y E, previene los efectos tóxicos de los hidroperóxidos en las mitocondrias, al regenerar su contenido de GSH (Martín *et al.*, 2000).

1.3.2. *Capacidad antiinflamatoria e inmunomoduladora*

La melatonina presenta efectos pleiotrópicos sobre el sistema inmunológico (Carrillo-Vico *et al.*, 2013), pudiendo influir tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la adaptativa (Nikolaev, Robeva and Konakchieva, 2021). Se ha propuesto la hipótesis de que la melatonina actúa como un “buffer del sistema inmune”, es decir, ejerciendo un papel estimulante, bajo condiciones basales o inmunosupresoras o actuando como un antiinflamatorio, en presencia de una respuesta inmune exacerbada (Carrillo-Vico *et al.*, 2013; Ramos González *et al.*, 2018), ejerciendo un papel fundamental en la prevención de este tipo de respuestas (Ivankiv and Oleshchuk, 2020). Las propiedades antiinflamatorias de la melatonina, están bien descritas y mecánicamente definidas (Reiter *et al.*, 2016). Esta hormona, ejerce sus acciones antiinflamatorias e inmunomoduladoras mediante la regulación de los niveles de células T efectoras, células T reguladoras (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2015) y de citocinas proinflamatorias (Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014) en diversas situaciones fisiopatológicas (Tarocco *et al.*, 2019) y a través de sus receptores, que se expresan en la membrana de células T CD4+, T CD8+, células B, monocitos y natural killer (Adamczyk-Sowa, K. Pierzchala, *et al.*, 2014; Carrascal *et al.*, 2018; Ramos González *et al.*, 2018; C. Zhao *et al.*, 2019).

La melatonina, realiza parte de sus funciones antiinflamatorias, al prevenir la translocación nuclear de factor nuclear kappa B (NF- κ B) (García *et al.*, 2015; Tarocco

et al., 2019), mediante la inhibición de su expresión y activación y su unión al ADN (Maldonado *et al.*, 2010; Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014). De esta manera, disminuye la síntesis de mediadores inflamatorios, reprimiendo así la inflamación (Luo, Peng and Wei, 2017; Ramos González *et al.*, 2018; Sánchez-López *et al.*, 2018; C. Zhao *et al.*, 2019). La inhibición de NF- κ B conlleva una reducción en la expresión y activación del inflamasoma NLRP3 (García *et al.*, 2015; Ferlazzo *et al.*, 2020). Los inflamasomas son grandes complejos de proteínas que desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmune innata contra los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) y los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Govindarajan, De Rivero Vaccari and Keane, 2020). El inflamasoma requiere dos señales para activarse, siendo estas, la activación de NF- κ B y la activación de la pro-caspasa 1 (Michaličková, Šíma and Slanař, 2020). Cuando NLRP3 se activa, provoca una activación proteolítica de caspasa-1, facilitando la secreción de citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 (Lahooti *et al.*, 2021) y también, regula las respuestas de células Th1 y Th17 (Feng *et al.*, 2021). La excesiva inducción de la caspasa-1, conduce a la muerte celular programada, proceso denominado piroptosis, caracterizado por la rápida inducción de una respuesta inflamatoria que conduce a la lisis celular (Miao, Rajan and Aderem, 2011; Govindarajan, De Rivero Vaccari and Keane, 2020). Por tanto, la acción de la melatonina sobre NLRP3, conduce a una inhibición de la actividad de la caspasa-1 y de la producción de IL-1 β e IL-18 (García *et al.*, 2015; Ferlazzo *et al.*, 2020).

Se ha podido comprobar también que la melatonina, media en las respuestas inflamatorias, al disminuir los niveles de Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la IL-6 (Ivankiv and Oleshchuk, 2020; Zarezadeh *et al.*, 2020). Asimismo, inhibe la expresión de ciclooxigenasa (COX) e iNOS y limita la producción de cantidades excesivas de

prostanoides, leucotrienos y NO, así como otros mediadores del proceso inflamatorio como, quimiocinas y moléculas de adhesión (Deng *et al.*, 2006; Mauriz *et al.*, 2013; Tarocco *et al.*, 2019).

Gracias a su función antiinflamatoria e inmunorreguladora, la melatonina es eficaz para combatir tanto infecciones bacterianas como virales (Ferlazzo *et al.*, 2020). Las acciones antivirales de la melatonina han sido confirmadas ya que se ha visto, que puede mejorar la tolerancia del huésped contra invasiones de patógenos y disminuir la gravedad y mortalidad de las infecciones por virus tanto neurotrópicos como no neurotrópicos (Tan and Hardeland, 2020; Wongchitrat *et al.*, 2021). Se ha comprobado también, que es capaz de disminuir el título viral o reducir la producción de nueva progenie, al inhibir procesos de replicación viral (Crespo *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2019; Wongchitrat *et al.*, 2021). Con respecto a su actividad antibacteriana, estudios *in vitro* han demostrado que la melatonina, presenta efectos contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Tekbas *et al.*, 2008). Asimismo, tiene efectos antimicrobianos contra *Escherichia coli* y Bacteroidetes, que son responsables del aumento de la disbiosis intestinal (Yildirim *et al.*, 2019; Zarezadeh *et al.*, 2020). En este sentido, la melatonina media en la diafonía entre la microbiota, el intestino y el SNC, jugando un papel vital en la regulación del ritmo de la microbiota intestinal y los metabolitos microbianos (Zarezadeh *et al.*, 2020).

1.3.3. Capacidad antiapoptótica y neuroprotectora

Otra importante característica, que presenta la melatonina, es su capacidad para modular tanto la apoptosis como la neurodegeneración (Fernández *et al.*, 2015).

La muerte celular programada, es un fenómeno fisiológico relacionado con la homeostasis y el buen funcionamiento de tejidos y órganos, sin embargo, las alteraciones en la apoptosis, están relacionadas con diferentes enfermedades (Sainz *et*

al., 2003). La formación de ROS y el daño oxidativo, parecen ser fundamentales para desencadenar los eventos apoptóticos (Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014). La apoptosis puede iniciarse a través de dos vías diferentes: la vía intrínseca y la vía extrínseca (Fisher, 2001). La familia de proteínas BCL-2, constituida por proteínas proapoptóticas, como Bax y por proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, es considerada un punto clave en la regulación de la vía intrínseca de apoptosis celular (Radogna *et al.*, 2008; Radogna, Diederich and Ghibelli, 2010). En condiciones normales, Bcl-2 ejerce su efecto antiapoptótico al unirse a Bax, para inhibir la formación de poros en la membrana mitocondrial externa, lo que provoca que esta se vuelva permeable al paso de factores proapoptóticos, como la citocromo c, que activa la apoptosis dependiente de caspasa (Lucken-Ardjomande and Martinou, 2005; Cahill, Calvert and Zhang, 2006; Radogna, Diederich and Ghibelli, 2010; Shi *et al.*, 2018). En la muerte de células neuronales, la regulación positiva de Bax, inicia la cascada apoptótica (Cahill, Calvert and Zhang, 2006).

Las acciones antiapoptóticas de la melatonina, se pueden considerar en tres categorías diferentes: 1. Papel de la melatonina en la inhibición de la apoptosis en las células inmunitarias; 2. Papel de la melatonina en la prevención de la apoptosis neuronal y 3. Papel de la melatonina en el aumento de la muerte celular en las células cancerosas (Sainz *et al.*, 2003; Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014). La melatonina es capaz de promover un estado de protección celular (Radogna *et al.*, 2008). Algunos estudios sugieren que la melatonina, ejerce sus efectos antiapoptóticos a través de la transducción de señales intracelulares, estimulada por la interacción con sus receptores MT1 y MT2, presentes en la membrana plasmática (Radogna *et al.*, 2007). Sin embargo, la mayoría de los estudios indican que la melatonina suprime la apoptosis, modulando Bcl-2 y Bax (Chen, Zhang and Lee, 2020). Regula positivamente a Bcl-2,

aumentando su expresión y regula negativamente a su afín proapoptótico, Bax, bloqueando su actividad a través del eje SIRT1/NF- κ B, con una consecuente y significativa inhibición de la liberación de citocromo c y de la activación de caspasa-3 (Sun *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2018; Tarocco *et al.*, 2019). La melatonina modula también la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), que es el paso final de la muerte celular (Morciano *et al.*, 2015; Tarocco *et al.*, 2019).

La apoptosis, es una característica de las enfermedades neurodegenerativas tanto crónicas como agudas, por lo que, los efectos antiapoptóticos de la melatonina, juegan también un papel importante en la neurodegeneración (Wang, 2009). Esta hormona presenta una amplia gama de efectos neuroprotectores, al modular los mecanismos fisiopatológicos y las vías de señalización, observados en enfermedades neurodegenerativas (Wongchitrat *et al.*, 2021). La acción neuroprotectora de la melatonina es, presumiblemente, inducida por la acción antioxidante de esta (Lee *et al.*, 2019). Además, su papel neuroprotector está mediado también por la mejora de la vía de supervivencia fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt y la vía quinasa c-Jun N-terminal (JNK) (Kilic *et al.*, 2005; Wang, 2009). La vía PI3K/Akt juega un papel esencial en la supervivencia de células neuronales y la vía JNK está implicada también en la inhibición de la muerte celular (Wang, 2009). Además, también se ha demostrado que la melatonina, participa en la modulación de la neurogénesis tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (Leung *et al.*, 2020).

Todas las propiedades que presenta la melatonina, hacen que pueda desempeñar un papel importante en los mecanismos fisiopatológicos de diversas enfermedades (Gunata, Parlakpınar and Acet, 2020). Esta hormona, presenta un alto perfil de seguridad (Romero *et al.*, 2020) y tiene la capacidad de atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica (BHE), acumulándose en el SNC, llegando a alcanzar niveles

sustancialmente más altos que en sangre (Tan, 2010). Además, la desregulación de la secreción de melatonina en diversas enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la EM, implica un posible papel de la indolamina en la patogénesis autoinmune (Skarlis and Anagnostouli, 2020). En este sentido, se ha demostrado que la melatonina exacerba algunas enfermedades autoinmunes, pero alivia otras, por ejemplo, la EM. La evidencia reciente sugiere que la melatonina podría ejercer efectos relevantes en los procesos inmunológicos que ocurren en esta enfermedad (Farez *et al.*, 2016).

2. ESCLEROSIS MÚLTIPLE

2.1. Síntomas, etiología, prevalencia y tipos

La Esclerosis Múltiple es una enfermedad crónica inmunomediada del SNC (Farez *et al.*, 2015) que provoca un deterioro motor, sensorial y cognitivo (Akpınar *et al.*, 2008; Soto-Brambila *et al.*, 2017; Mado and Adamczyk-Sowa, 2021). La EM tiene un componente autoinmune y se caracteriza por la infiltración de linfocitos en el SNC, lo que provoca neuroinflamación crónica, que ocurre en áreas de materia blanca del SNC (Sánchez-López *et al.*, 2018), desmielinización y gliosis, que ocurren de manera focal o difusa en toda la materia blanca y gris del cerebro y médula espinal (Lassmann, Brück and Lucchinetti, 2007; Lassmann, van Horssen and Mahad, 2012; Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014), así como, diversos grados de patología axonal y oligodendrocitaria y disfunción neurológica progresiva (McQualter and Bernard, 2007; Pérez-Nievas *et al.*, 2010). La desmielinización se propaga a través del SNC y puede variar en forma y tamaño (Soto-Brambila *et al.*, 2017). Además, esta enfermedad puede dar lugar a una gran variedad de síntomas (Huang, Chen and Zhang, 2017) aunque los más comunes son: visión deficiente, fatiga extrema, espasmos (Soto-Brambila *et al.*, 2017) disfunción de la vejiga, parestesias, disestesias, diplopía, ataxia, vértigo, neuralgia

del trigémino y neuritis óptica (Hauser and Goodwin, 2008; Goldenberg, 2012; Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014). Asimismo, está asociada con comorbilidades como la ansiedad, depresión y alteraciones de sueño (Skarlis and Anagnostouli, 2020). Las principales pruebas utilizadas para diagnosticar esta enfermedad son, la resonancia magnética nuclear y el análisis del LCR, observándose una resonancia magnética anormal, con presencia de lesiones focales en la sustancia blanca yuxtacortical (adyacente a la corteza cerebral), la sustancia blanca infratentorial realzadas con gadolinio y existencia de bandas oligoclonales de inmunoglobulina G (IgG), en el LCR (Hauser and Cree, 2020).

Se trata de una enfermedad, cuya etiología aún no se comprende completamente (Elkhodiry and El Tayebi, 2021), siendo la causa más común de discapacidad no traumática en jóvenes adultos (Chen, Zhang and Lee, 2020), entre los 20-30 años (Gunata, Parlakpınar and Acet, 2020), cuya tasa de incidencia, generalmente, disminuye después de los 50 años (Elkhodiry and El Tayebi, 2021). Afecta a 2.8 millones de personas en el mundo (*Number of people with MS / Atlas of MS*, 2020), presentando una mayor prevalencia en mujeres que en hombres, siendo la proporción actual de 3:1 (Zeydan *et al.*, 2020). Asimismo, la fisiopatología y la progresión de los síntomas se presentan de manera diferente según el sexo (Chaves *et al.*, 2021). La aparición de la EM ocurre antes en mujeres que en hombres, sin embargo, el sexo masculino tiene un peor resultado clínico de la enfermedad y una mayor acumulación de discapacidad (Ribbons *et al.*, 2015; Dupuis *et al.*, 2021), presentando niveles más altos de deterioro cognitivo (Beatty and Aupperle, 2002; Chaves *et al.*, 2021). Las mujeres tienen un sistema inmunológico más robusto que el de los hombres, por lo que la preponderancia femenina en la EM (Avila *et al.*, 2018), sugiere que las hormonas sexuales, juegan un papel en la patogénesis de esta enfermedad (Gold and Voskuhl, 2009). En este sentido, la investigación preclínica ha demostrado que los cromosomas sexuales y la testosterona, estrógenos y progesterona, tienen un papel en la modulación inflamatoria y daño estructural en la EM, aunque aún no está claro

por qué existen diferencias en el perfil de las lesiones de la EM entre sexos (Nicot, 2009; Du *et al.*, 2014; Chaves *et al.*, 2021).

La prevalencia de la EM también muestra distintos patrones etnogeográficos, con las estimaciones más altas por 100.000 habitantes registradas en América del Norte, Europa Occidental y Australasia (>100 casos por 100.000 habitantes) y el más bajo en África subsahariana oriental, África subsahariana central y Oceanía (<30 casos por 100.000 habitantes) (Browne *et al.*, 2014; Wallin *et al.*, 2019; Olla *et al.*, 2021; Timasheva *et al.*, 2022). Esta mayor prevalencia puede ser debida a la luz solar limitada en ciertas regiones, donde sus habitantes presentan deficiencias de vitamina D (Ghareghani, Reiter, *et al.*, 2018) siendo esto, un factor de riesgo para el desarrollo y la progresión de la EM (Ascherio, 2013). La latitud está fuertemente correlacionada con la duración e intensidad de la radiación ultravioleta (UV), siendo esta, la principal fuente de vitamina D (Holick, 1995; Simon, Munger and Ascherio, 2012).

Otro factor implicado en el desarrollo de la EM, es la genética, siendo el locus genético del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en el cromosoma 6, un buen candidato para determinar la susceptibilidad a la enfermedad (Stein *et al.*, 2017; Yosefifard *et al.*, 2019). HLA-DRB1*15:01, es el alelo de mayor riesgo para el desarrollo de la EM, el cual se asocia con un riesgo hasta seis veces mayor de padecer la enfermedad en portadores homocigotos (Patsopoulos *et al.*, 2013). Sin embargo, los estudios de asociación de genoma completo (GWAS- *Genome-Wide Association Studies*), han identificado más de 700 variantes genéticas asociadas con la EM (Timasheva *et al.*, 2022). El GWAS más reciente de susceptibilidad a la EM (Patsopoulos *et al.*, 2019), proporciona pruebas convincentes de los efectos de 32 variantes de susceptibilidad independientes en el CMH y 200 variantes de susceptibilidad autosómicas fuera del CMH (Roostaei *et al.*, 2021). La evidencia de GWAS respalda, además, la existencia de patrones de heredabilidad de la EM (Timasheva *et al.*, 2022).

Además de lo anterior, existen más factores que pueden aumentar las probabilidades de padecer EM, como el tabaquismo, la dieta o ciertas infecciones virales (Michaličková, Šíma and Slanař, 2020). Gracias a evidencias experimentales, se sabe que ciertos virus están asociados con la EM (Talbot *et al.*, 2005; Shalaby and Shehata, 2021). La infección por el virus de Epstein-Barr (VEB), supone uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de esta enfermedad (Ascherio, 2013). Un estudio publicado recientemente, prueba la hipótesis de que la EM es causada por VEB en una cohorte compuesta por más de 10 millones de adultos jóvenes, de los cuales 955 fueron diagnosticados con EM. Concluyen que el riesgo de padecer EM es 32 veces mayor después de la infección por VEB, viendo que los niveles séricos de neurofilamentos de cadena ligera, un biomarcador de degeneración neuroaxonal, aumentan después de la seroconversión de VEB (Bjornevik *et al.*, 2022). Además de la infección por VEB, también pueden suponer un riesgo, la infección por Herpesvirus humano 6 (Long *et al.*, 2018; Yosefifard *et al.*, 2019) y por ciertos miembros de la familia de los coronavirus (Matías-Guiu *et al.*, 2020).

En 2014, el comité asesor internacional sobre ensayos clínicos de EM, actualizó la clasificación existente de los subtipos de la enfermedad, basándose en aspectos clínicos, imágenes, marcadores biológicos, progresión y actividad (Elkhodiry and El Tayebi, 2021). Esta actualización, divide los cursos clínicos de la EM en 4 subtipos principales: Síndrome clínicamente aislado (SCA), EM-RR, Esclerosis Múltiple Progresiva Primaria (EM-PP) y Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva (EM-SP) (Lublin *et al.*, 2014; Elkhodiry and El Tayebi, 2021).

SCA denota el primer episodio de síntomas neurológicos causados por una inflamación y que conduce a la desmielinización en el SNC (Compston and Coles, 2008; Miller, Chard and Ciccarelli, 2012; Schwenkenbecher *et al.*, 2017). En el 85% de los pacientes, la EM empieza

con un episodio de este tipo (Compston and Coles, 2008; Miller, Chard and Ciccarelli, 2012; Kuhle *et al.*, 2015; Schwenkenbecher *et al.*, 2017).

La EM-RR es la principal forma de la EM (Adamczyk-Sowa, Paweł Sowa, *et al.*, 2016), afectando al 85% de los pacientes (Michaličková, Šíma and Slanař, 2020). Este subtipo de la enfermedad, se caracteriza por la aparición de síntomas, seguidos de un periodo de remisión clínica (Adamczyk-Sowa, Paweł Sowa, *et al.*, 2016). Durante las recaídas, los síntomas se desarrollan o se exacerban y el grado de remisión, dependerá de la disponibilidad neuronal y de la neuroplasticidad del SNC, una capacidad que disminuye con la acumulación de lesiones (Tomassini *et al.*, 2012; Chaves *et al.*, 2021). Durante la EM-RR, se produce una pérdida axonal y se cree que, cuando esta excede la capacidad compensatoria del SNC, se produce la transición de EM-RR a EM-SP (Dutta and Trapp, 2014). El 70% de los pacientes desarrollará EM-SP, 10-20 años después de un curso remitente-recurrente inicial (Michaličková, Šíma and Slanař, 2020). Esta forma de la enfermedad se caracteriza por un deterioro neurológico progresivo, así como por una ausencia de nuevas lesiones inflamatorias desmielinizantes medidas por resonancia magnética e histopatología. La mayoría de las lesiones de pacientes con EM-SP contienen un núcleo gliótico hipocelular y no muestran inflamación activa (Dutta and Trapp, 2014).

Por otro lado, la EM-PP, es también una forma progresiva, aunque poco frecuente de la enfermedad, que afecta aproximadamente al 15% de los pacientes con EM. Se caracteriza por presentar una progresión implacable desde la primera manifestación clínica de los síntomas, sin que existan periodos notables de remisión y recaída (Correale *et al.*, 2017).

2.2. Mecanismos celulares y moleculares de la Esclerosis Múltiple

2.2.1. Proceso inflamatorio

Al inicio de la EM, las células T CD4+, reconocen péptidos similares a la mielina gracias a las células presentadoras de antígenos, en la periferia (Tavassolifar,

Moghadasi, *et al.*, 2020; Tavassolifar, Vodjgani, *et al.*, 2020), tras lo cual, se infiltran en el SNC, donde se reactivan (Tavassolifar, Vodjgani, *et al.*, 2020). Esto, conduce a una destrucción de la mielina a través de varias moléculas efectoras (Farez *et al.*, 2015; Laribi *et al.*, 2018; Kunkl *et al.*, 2020; Tavassolifar, Moghadasi, *et al.*, 2020). La infiltración de las células efectoras Th1 y Th17, produce un aumento de las citocinas proinflamatorias Interferon- γ (IFN- γ), TNF- α , Interleucina-17 (IL-17) (van den Hoogen, Laman and 't Hart, 2017) e Interleucina-22 (IL-22), las cuales, favorecen la desmielinización (Michaličková, Šíma and Slanař, 2020) y están presentes en las lesiones de la EM (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2017). El TNF- α es una de las citocinas inflamatorias más importante, que desempeña un papel crucial en el daño a los oligodendrocitos y mielina (Ontaneda, Hyland and Cohen, 2012; Mahad, Trapp and Lassmann, 2015; Yosefifard *et al.*, 2019). Asimismo, el nivel de TNF- α en suero y en el LCR, se ha relacionado con la progresión de la EM (Sharief and Hentges, 1991; Álvarez-Sánchez *et al.*, 2017; Yosefifard *et al.*, 2019). Por su parte, la IL-17 e IL-22, están implicadas en la alteración de la BHE y el reclutamiento de células T CD4+ y neutrófilos al SNC (Kebir *et al.*, 2007; Álvarez-Sánchez *et al.*, 2015) y el IFN- γ se encarga del reclutamiento de macrófagos (Kroenke *et al.*, 2008; Álvarez-Sánchez *et al.*, 2015). Otra citocina proinflamatoria, presente en la EM, es la Interleucina-1 (IL-1), que se expresa en el tejido periférico de monocitos y macrófagos (Mendiola and Cardona, 2018; Yosefifard *et al.*, 2019) (Figura 2).

Tras la reacción inflamatoria, se produce un aumento de la permeabilidad de la BHE, por la acción de la metaloproteinasa de la matriz-9 (MMP-9), la cual pertenece a una familia de enzimas responsables de la degradación de las proteínas de la matriz extracelular (Timasheva *et al.*, 2022) y se reclutan otras células inmunes como linfocitos B y monocitos (Adamczyk-Sowa, P. Sowa, *et al.*, 2016; Michaličková *et al.*,

2020). La inflamación, desencadena también la activación de la microglía, que son las células inmunitarias innatas más abundantes del cerebro y comprenden, aproximadamente, el 10% de todas las células gliales (Liu *et al.*, 2022). En condiciones patológicas, la microglía exhibe un fenotipo celular fagocítico (Ljubisavljevic, 2016), mostrando una morfología amebode típica de un macrófago (Guerrero and Sicotte, 2020), que puede actuar en la degradación de la mielina (Tavassolifar, Vodjgani, *et al.*, 2020). Además, la microglía activada produce y secreta citocinas proinflamatorias, quimiocinas, NO y ROS (Thameem Dheen, Kaur and Ling, 2007; Ljubisavljevic, 2016; Liu *et al.*, 2022).

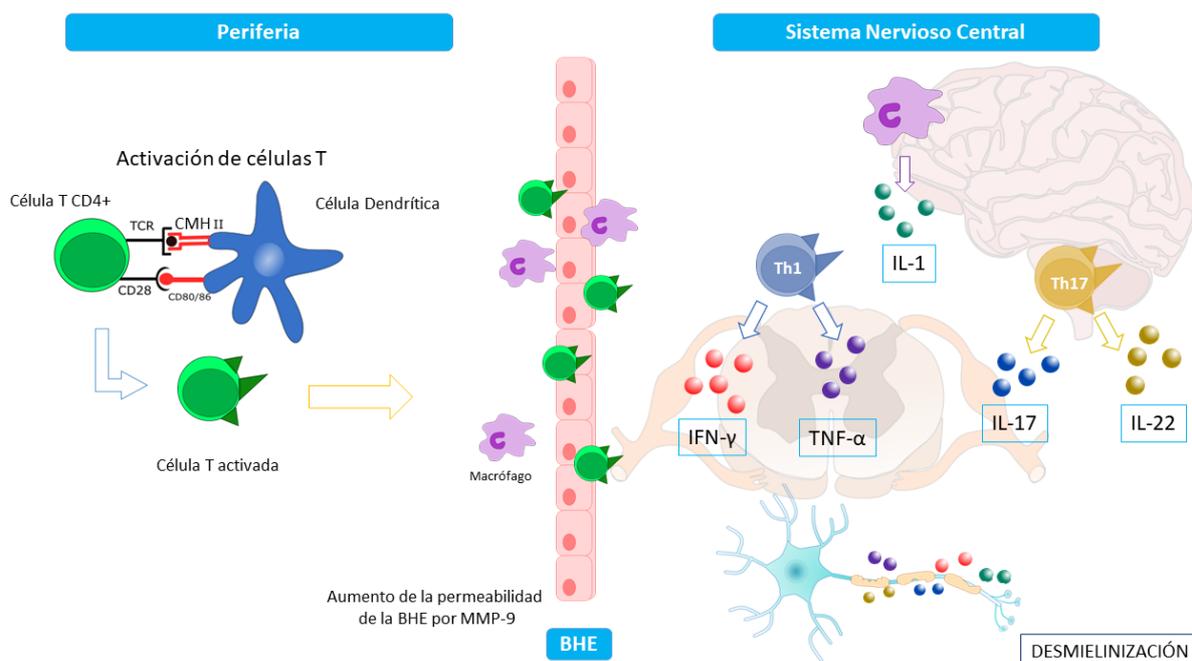


Figura 2. Proceso inflamatorio desencadenante de la EM. TCR: Receptor de células T; CMH II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad II; BHE: Barrera Hematoencefálica; Th1, Th17: Células T helper 1, T helper 17; IL-1, IL-17, IL-22: Interleucina-1, Interleucina-17, Interleucina-22; IFN- γ : Interferón- γ ; TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral- α ; MMP-9: Metaloproteinasas de matriz-9.

2.2.2. Estrés oxidativo

Debido al aumento de citocinas proinflamatorias, se induce una producción excesiva de ROS y RNS (Soto-Brambila *et al.*, 2017; Conde *et al.*, 2019), las cuales son extremadamente inestables y tienen gran capacidad oxidativa (Long *et al.*, 2018). Existen 3 tipos principales de ROS: O_2^- , H_2O_2 y radical hidroxilo (OH^\cdot) (Di Dalmazi *et al.*, 2016; Tavassolifar, Vodjgani, *et al.*, 2020). En condiciones normales, se necesitan concentraciones fisiológicas de ROS como segundos mensajeros para mantener el estado celular (Leto and Geiszt, 2006; Tavassolifar, Vodjgani, *et al.*, 2020). Sin embargo, cuando las concentraciones de ROS son altas, pueden dañar los componentes celulares (Alfadda and Sallam, 2012; Tavassolifar, Vodjgani, *et al.*, 2020). Este exceso de ROS y RNS, favorece aún más la inflamación y provoca estrés oxidativo. El estrés oxidativo se define como una condición en la que, las defensas antioxidantes del organismo resultan insuficientes, debido a la liberación excesiva de oxidantes (Winiarska-Mieczan, 2018; Winiarska-Mieczan *et al.*, 2020), siendo, algunas de sus principales consecuencias, el gran aumento de la peroxidación de lípidos, carbonilación de proteínas, daño oxidativo al ADN nuclear y mitocondrial (Morris *et al.*, 2021), así como trastornos relacionados con mecanismos de replicación del mismo (Winiarska-Mieczan *et al.*, 2020) y daño a tejidos y paredes celulares (Holton and Kirkland, 2020). Además, en la EM, el estrés oxidativo juega un papel relevante en el inicio y evolución de la enfermedad (Escribano *et al.*, 2018), actuando como un mediador de la desmielinización, daño axonal y neurodegeneración (Ramirez-Ramirez *et al.*, 2013; Sánchez-López *et al.*, 2018) (Figura 3).

NF- κ B

El estrés oxidativo inducido por ROS, provoca la estimulación del NF- κ B (Valacchi *et al.*, 2018). NF- κ B, es un factor de transcripción que juega un papel fundamental en diversos procesos fisiológicos, como regulación del ciclo celular,

proliferación y muerte celular (Christian, Smith and Carmody, 2016). En la EM, la actividad de NF- κ B se encuentra desregulada jugando un papel patológico importante, ya que se activa en múltiples células del SNC, incluidas las células T, microglía, macrófagos, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas y regula positivamente la expresión de factores implicados en la patogénesis de la enfermedad, incluidos TNF- α , iNOS, IL-1 α , molécula 1 de adhesión vascular (VCAM-1) y varios factores de crecimiento (Michaličková *et al.*, 2020) (Figura 3).

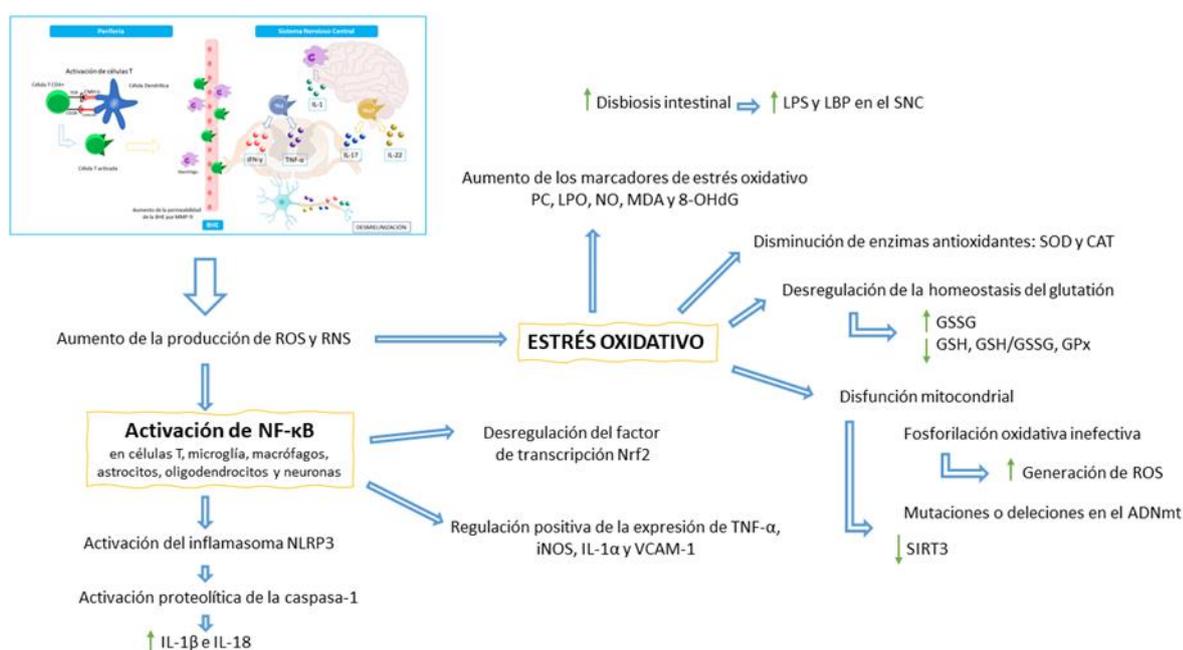


Figura 3. Mecanismos celulares y moleculares implicados en la Esclerosis Múltiple. ROS: Especies reactivas de oxígeno; RNS: Especies reactivas de nitrógeno; NF- κ B: Factor nuclear kappa B; IL-1 β : Interleucina-1 β ; IL-18: Interleucina-18; IL-1 α : Interleucina-1 α ; Nrf2: Factor 2 relacionado con el eritroide nuclear 2; TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α ; iNOS: Óxido nítrico sintasa; VCAM-1: Molécula 1 de adhesión vascular; PC: Proteínas carboniladas; LPO: Productos de peroxidación lipídica; NO: Óxido nítrico; MDA: Malondialdehído; 8-OHdG: 8-hidroxi-2'desoxiguanosina; LPS: Lipopolisacárido bacteriano; LBP: Proteína de unión al lipopolisacárido bacteriano; SNC: Sistema nervioso central; SOD: Superóxido dismutasa; CAT: Catalasa; GSSG: Glutatión oxidado; GSH: Glutatión reducido; GSH/GSSG: Relación glutatión reducido/glutatión oxidado; GPx: Glutatión peroxidasa; ADNmt: ADN mitocondrial; SIRT3: Sirtuina 3.

La activación de NF- κ B, se produce ante una amplia gama de estímulos que van, desde inmunorreceptores, como los receptores de tipo Toll y los receptores de antígenos, hasta los receptores de citocinas y factores de crecimiento, así como el estrés físico, oxidativo y genotóxico (Christian, Smith and Carmody, 2016). Esta activación, involucra dos vías principales de señalización, la vía canónica y no canónica, siendo ambas importantes para regular las respuestas inmunes e inflamatorias (T. Liu *et al.*, 2017). El principal mecanismo para la activación canónica de NF- κ B es la degradación inducible de I κ B α , desencadenada a través de su fosforilación específica por un complejo de I κ B quinasa de múltiples subunidades (IKK) (Oeckinghaus and Ghosh, 2009; T. Liu *et al.*, 2017). Por otro lado, la activación no canónica, no implica la degradación de I κ B, sino que se basa en el procesamiento de la proteína precursora de NF- κ B2, p100 (Sun, 2012; T. Liu *et al.*, 2017). Tras la activación de este factor, se produce un aumento de la inflamación y desmielinización, lo que promueve el desarrollo de la EM (Yue, Stone and Lin, 2018).

Recientemente, se ha empezado a estudiar la implicación de los inflamomas en la patogenia de ciertas enfermedades neurodegenerativas, observándose que el inflamoma NLRP3, desempeña un papel crucial en la EM (Feng *et al.*, 2021). NF- κ B induce la expresión de NLRP3 (Govindarajan, De Rivero Vaccari and Keane, 2020). La activación de NLRP3 en la microglía, juega un papel en el inicio y la progresión de la EM, al reclutar células T activadas en el SNC y prepararlas para liberar citocinas que exacerbaban la respuesta inflamatoria (Govindarajan, De Rivero Vaccari and Keane, 2020; Olcum *et al.*, 2020). Además, recientemente se ha demostrado que NLRP3 se sobreexpresa en los monocitos de pacientes con EM-PP (Malhotra *et al.*, 2020), observándose que estos pacientes, presentan niveles más

altos de IL-1 β , que aquellos pacientes con otras formas de EM. Por ello, se apunta a IL-1 β como un factor pronóstico en pacientes con EM-PP y al inflammasoma NLRP3 como objetivo terapéutico, lo que sería de gran utilidad, ya que no existe una terapia eficaz contra este tipo de EM (Lemprière, 2020; Malhotra *et al.*, 2020).

Otro de los efectos que provoca la activación persistente de NF- κ B, es la desregulación del factor de transcripción Nrf2 (Fernández-Ortiz *et al.*, 2020).

Vía de señalización Nrf2

Nrf2 es el principal regulador de mecanismos protectores antioxidantes (Liddell, 2017), controlando la expresión de enzimas involucradas en estos mecanismos (Tavassolifar, Vodjgani, *et al.*, 2020). Su activación es crucial para los mecanismos de defensa celulares (Shah *et al.*, 2017), ya que mantiene la homeostasis redox en las células al provocar la expresión de genes antioxidantes, antiinflamatorios y citoprotectores (Kahroba *et al.*, 2021). En condiciones normales, el factor de transcripción Nrf2 y Keap1 (Proteína 1 asociada a ECH (epiclorhidrina)) están unidos en el citoplasma (Fukutomi *et al.*, 2014; Long *et al.*, 2018). En condiciones de estrés oxidativo, ROS puede inducir la descomposición de Nrf2 y Keap1, a través de la oxidación de residuos de cisteína (Cys273, Cys288 y Cys151) y la activación de quinasas como PKC, MAPK, PI3Ks y proteína quinasa de retículo endoplasmático (PERK), que provocan la fosforilación de Nrf2 (Kim *et al.*, 2010; Tavassolifar, Vodjgani, *et al.*, 2020). Este, no sufre su degradación citoplasmática normal (Morris *et al.*, 2021) y se transfiere al núcleo donde se heterodimeriza (Katsuoka and Yamamoto, 2016). Los heterodímeros se unen a ARE (Elemento de respuesta antioxidante) en la región promotora de genes diana (Li *et al.*, 2008; Tavassolifar, Vodjgani, *et al.*, 2020; Morris *et al.*, 2021), lo que resulta en la transcripción de genes de respuesta antioxidante (Morris *et al.*, 2021).

En el curso de la EM, ocurre una activación de la vía Nrf2/ARE, pero se piensa que la activación de este y otros mecanismos endógenos de defensa antioxidante, podrían ser insuficientes para prevenir la degeneración neuronal y la propagación de las lesiones (Licht-Mayer *et al.*, 2015). Algunos estudios, han reportado una disminución de Nrf2 en muestras de materia gris de pacientes con EM, correlacionando este hecho con una expresión reducida de genes que intervienen en la fosforilación oxidativa y un aumento del daño oxidativo (Pandit *et al.*, 2009; Michaličková, Šíma and Slanař, 2020). Además, la deficiencia de Nrf2 o un nivel de expresión más bajo, podrían exacerbar la patología del modelo EAE (Johnson *et al.*, 2009; Draheim *et al.*, 2016; Tavassolifar, Moghadasi, *et al.*, 2020).

Ciclo redox del glutatión

El SNC es un tejido muy sensible a los daños porque tiene poca capacidad de regeneración (Ames, 2000; Ljubisavljevic, 2016), siendo especialmente susceptible al daño producido por ROS, debido a las altas demandas de oxígeno del cerebro (20% del O₂ total inspirado), la baja concentración de antioxidantes y la alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (Gonsette, 2008; Miller *et al.*, 2011, 2013). Debido al estrés oxidativo y a la regulación positiva de NF-κB, otro fenómeno crucial que ocurre en la EM, es la alteración de la homeostasis del glutatión (Dwivedi *et al.*, 2020; Michaličková, Šíma and Slanař, 2020).

El glutatión es un importante antioxidante que se encuentra en abundancia y se sintetiza intracelularmente en el citosol de manera estrictamente regulada (Dwivedi *et al.*, 2020). Se trata de un tripéptido lineal, de bajo peso molecular, que se compone de L-γ-glutamil-L-cisteinilglicina, que posee un grupo tiol (-SH) en la fracción de cisteína, lo que lo convierte en un potente antioxidante al interactuar con ROS/RNS (Dwivedi *et al.*, 2020; Tavassolifar, Vodjgani, *et al.*, 2020). El

glutación se encuentra casi exclusivamente en su forma reducida (GSH), que también es la forma activa (Perricone, De Carolis and Perricone, 2009). Mediante la acción de la GPx, se induce la conversión del peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua a través de la oxidación de GSH, el cuál forma disulfuro de glutación oxidado (GSSG) (Mailloux, McBride and Harper, 2013; Tavassolifar, Vodjgani, *et al.*, 2020). Posteriormente, la GRd, que actúa como disulfuro oxidoreductasa dimérica, transfiere un electrón del NADPH al GSSG, proceso que conduce a la regeneración de la reserva de glutación en las células (Ulusu and Tandoğan, 2007; Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013; Dwivedi *et al.*, 2020; Tavassolifar, Vodjgani, *et al.*, 2020) (Figura 4).

El equilibrio de la relación GSH/GSSG es crucial para el mantenimiento del estado redox y la supervivencia celular (Schafer and Buettner, 2001; Dwivedi *et al.*, 2020). Durante el curso de la EM, cuando el estrés oxidativo se prolonga y los sistemas antioxidantes ya no pueden contrarrestar las agresiones mediadas por ROS, la cantidad de GSH disminuye, lo que conduce a la degeneración celular irreversible y apoptosis (Filomeni, Rotilio and Ciriolo, 2002). La disminución de la concentración de GSH, provoca una reducción de los niveles de GPx en pacientes con EM (Tasset, Agüera, *et al.*, 2012; Ljubisavljevic, 2016). Además, la actividad de la CAT, parte principal de la respuesta antioxidante del cerebro, puede verse influida por biodisponibilidad limitada de GSH (Schreibelt *et al.*, 2007; Ljubisavljevic, 2016). Por su parte, los niveles de GRd aumentan, con el fin de eliminar el exceso de GSSG (Filomeni, Rotilio and Ciriolo, 2002).

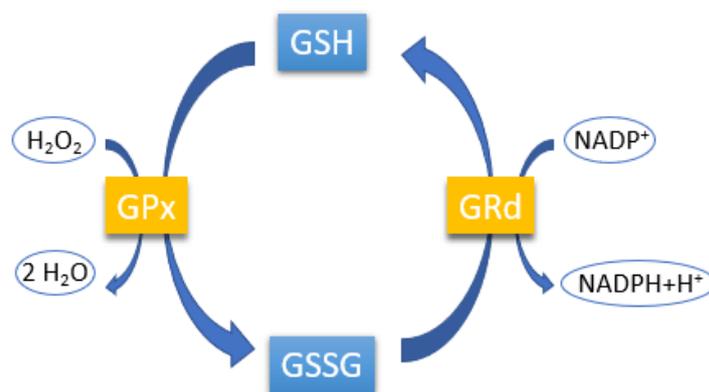


Figura 4. Ciclo redox del glutatión.

Disfunción mitocondrial

Otra consecuencia del estrés oxidativo, es la disfunción mitocondrial (Kahroba *et al.*, 2021). Algunas de las funciones principales de las mitocondrias incluyen actuar sobre la cadena de transporte de electrones en la membrana interna mitocondrial, que está compuesta por cuatro complejos (complejos I, II, III y IV) y además, influyen en la diferenciación de células oligodendrogliales (de Barcelos, Troxell and Graves, 2019). Las neuronas dependen en gran medida de una función mitocondrial adecuada para su supervivencia (Marcus and Andrabi, 2018). El exceso de producción de ROS, provoca una fosforilación oxidativa ineficaz, lo que aumenta aún más la generación de radicales libres, formando un círculo vicioso de disfunción mitocondrial y estrés oxidativo (Haider, 2015; Michaličková, Šíma and Slanař, 2020). La interrupción de la fosforilación oxidativa, perturba el transporte axonal, induciendo disfunción sináptica y posteriormente, neurodegeneración (Reynolds *et al.*, 2004; Baloh *et al.*, 2007; Hor, Santosa and Ng, 2022). El aumento en la producción de ROS, da como resultado daño oxidativo a la membrana mitocondrial, a las proteínas y capacidad de síntesis de ATP (Dwivedi *et al.*, 2020), disminuyendo la producción de este (Holditch *et al.*, 2019). Asimismo, si no se neutraliza adecuadamente el estrés oxidativo, se puede llegar a producir una

desregulación de diversas vías de señalización, incluidas MAPK, PI3K y Nrf2. También puede provocar alteraciones en el metabolismo del hierro (Holditch *et al.*, 2019), mutaciones o deleciones en el ADN mitocondrial (ADNmt), lo que afecta al metabolismo energético (Campbell *et al.*, 2011; Lassmann and van Horssen, 2016; Michaličková, Šíma and Slanař, 2020) y por último muerte celular (Ray, Huang and Tsuji, 2012; Holditch *et al.*, 2019) ya que, la vía intrínseca de la apoptosis, está mediada en parte por la disfunción mitocondrial (Holditch *et al.*, 2019).

En presencia de estrés oxidativo, los niveles de SIRT3 disminuyen (Marcus and Andrabi, 2018). La reducción de los niveles de esta enzima, se han asociado con la patogénia de diversos trastornos neurodegenerativos, incluyendo la EM (Hor, Santosa and Ng, 2022). En esta enfermedad, el análisis de tejidos cerebrales *post mortem*, ha mostrado una expresión reducida de SIRT3 en la materia gris de estos cerebros (Rice *et al.*, 2012; Hor, Santosa and Ng, 2022).

La EM se ha asociado con la disfunción mitocondrial (Soto-Brambila *et al.*, 2017), ya que múltiples estudios en humanos han evidenciado alteraciones mitocondriales en pacientes que la sufren (de Barcelos, Troxell and Graves, 2019), observándose que cualquier anomalía que ocurra en las mitocondrias, puede contribuir al desarrollo y progresión de lesiones en esta enfermedad (Campbell and Mahad, 2011). Algunos defectos mitocondriales reportados, incluyen la disfunción del complejo I en las lesiones de la sustancia blanca, en las cuales también se ha observado daño oxidativo al ADNmt (Lu *et al.*, 2000; Campbell and Mahad, 2011). En las etapas progresivas de la EM se produce una disfunción mitocondrial crónica (Michaličková, Šíma and Slanař, 2020).

2.2.3. *Disbiosis intestinal*

El tracto gastrointestinal, alberga aproximadamente el 95% del microbioma humano, estando constituido por más de 100 billones de bacterias, denominadas colectivamente microbiota intestinal (Qin *et al.*, 2010; Bhattacharjee and Lukiw, 2013; Liu *et al.*, 2022), cuyo peso aproximado es de 2 Kg (Doroszkiwicz, Groblewska and Mroczko, 2021). En condiciones homeostáticas, la microbiota no solo ejerce una gran variedad de funciones relacionadas con la digestión y síntesis de vitaminas, sino que también mantiene la integridad de la barrera intestinal (Fung, Olson and Hsiao, 2017; Parodi and Kerlero de Rosbo, 2021). La microbiota intestinal, juega un papel en una variedad de procesos fisiológicos (Liu *et al.*, 2022), demostrando ser un factor esencial que influye en los componentes celulares y humorales del sistema inmune, así como, en las respuestas de este (Miyake *et al.*, 2015). Existe una comunicación recíproca a través del eje microbiota-intestino-cerebro, entre la microbiota intestinal y el cerebro, que involucra vías de señalización inmunológica, endocrina, neurológica y metabólica (Mayer, Tillisch and Gupta, 2015; Baizabal-Carvallo, 2021; Liu *et al.*, 2022). La perturbación de la población microbiana comensal en el intestino, denominada disbiosis, se ha asociado, frecuentemente, con un aumento de la permeabilidad intestinal, lo que induce inflamación y respuestas inmunitarias tanto locales como sistémicas, así como con diversas enfermedades autoinmunes, incluidas aquellas que afectan al SNC (Noto and Miyake, 2020; Parodi and Kerlero de Rosbo, 2021). Algunos estudios sugieren que estas alteraciones de la microbiota en pacientes con EM, no son el resultado de la enfermedad, sino que están involucradas en la patogénesis de esta (Noto and Miyake, 2020). En el estudio realizado por Nouri *et al.* (2014) en ratas con EAE inducida, pudieron observar manifestaciones intestinales, incluyendo el aumento de la permeabilidad intestinal, 7 días después de inducir la enfermedad, es decir, antes del inicio de los síntomas neurológicos, los cuales comienzan a aparecer alrededor de

los 10 días tras la inducción (Nouri *et al.*, 2014). Los cambios en la microbiota intestinal podrían afectar a la neurotransmisión (Liu *et al.*, 2022) y además, se ha visto que la disbiosis en el modelo EAE, puede provocar una condición proinflamatoria que desencadene el desarrollo de la EM (Ochoa-Repáraz *et al.*, 2011; Wekerle, Berer and Krishnamoorthy, 2013; Escribano *et al.*, 2017). El hecho de que la disbiosis y el aumento de la permeabilidad intestinal, puedan promover una condición inflamatoria sistémica, está respaldado por el aumento de los niveles plasmáticos de lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Teixeira *et al.*, 2013; Escribano *et al.*, 2017; Parodi and Kerlero de Rosbo, 2021).

LPS es uno de los PAMPs mejor caracterizado, que se encuentra en la membrana externa de bacterias Gram-negativas, siendo la principal causa de sepsis bacteriana (Park and Lee, 2013; Iannucci *et al.*, 2020). Está relacionado con fenómenos inflamatorios, estimulando la producción de citocinas proinflamatorias, y, con el estrés oxidativo tanto en el tejido intestinal como en otros órganos (Ghareghani, Reiter, *et al.*, 2018; Conde *et al.*, 2019) Además, LPS es un reflejo del estado de la microbiota intestinal (Conde *et al.*, 2019). LPS está formado por un componente lipídico, el lípido A, que desempeña un importante papel en el proceso inflamatorio y por dos restos de azúcar subdivididos en un polisacárido central y un O-polisacárido de longitud variable (Iannucci *et al.*, 2020). La proteína de unión a LPS, LBP, (por su traducción en inglés- *Lipopolysaccharide Binding Protein*), es una proteína plasmática de inducción aguda (Park and Lee, 2013), de 50kD, sintetizada y secretada en el hígado (Nien *et al.*, 2017), que sirve como biomarcador de endotoxemia por LPS (Escribano *et al.*, 2017).

LBP reconoce a LPS en el suero y se une a la porción del lípido A de este (Nien *et al.*, 2017; Ghareghani, Reiter, *et al.*, 2018) tras lo cual, LPS forma un complejo con el receptor de membrana, CD14 (Ghareghani, Reiter, *et al.*, 2018). CD14 se disocia de

LBP y divide los agregados de LPS en moléculas monoméricas y las presenta al complejo TLR4/MD2 (receptor de tipo toll-4/proteína de diferenciación mieloide-2) (Park and Lee, 2013; Ghareghani, Reiter, *et al.*, 2018; Iannucci *et al.*, 2020). La unión de LPS al complejo TLR4/MD2, desencadena la activación de múltiples componentes de señalización, entre los que se incluyen NF- κ B y el factor regulador de interferón 3 (IRF3) que, a su vez, activan transcripcionalmente citocinas inflamatorias (Kawai and Akira, 2010; Park and Lee, 2013; Ghareghani, Reiter, *et al.*, 2018; Iannucci *et al.*, 2020).

En la EM, se produce un aumento de LPS y de la señalización mediada por este en la lámina propia intestinal, lo que provoca una inflamación crónica y endotoxemia (Camara-Lemarrooy *et al.*, 2018; Boziki *et al.*, 2020). En el estudio realizado por Escribano *et al.* (2017), pudieron observar que existía un aumento significativo de los niveles de LPS y LBP en el cerebro y médula espinal de ratas EAE y una correlación positiva entre el estrés oxidativo y los niveles de LBP en cerebro, médula espinal y sangre (Escribano *et al.*, 2017). Otro estudio realizado por Conde *et al.* (2019), reporta una correlación positiva entre proteínas carboniladas (PC), productos de peroxidación de lípidos (LPO), LPS y LBP, por lo que parte del efecto oxidativo observado en el tejido nervioso y sangre, se asocia con LPS y LBP (Conde *et al.*, 2019).

2.3. Factores neurotróficos, neurogénesis y sinaptogénesis

Los factores de crecimiento son un grupo de proteínas que pueden estimular el crecimiento de tejidos específicos y se expresan en una amplia variedad de organismos. Existen varios tipos de factores de crecimiento entre los que se incluyen: factores de crecimiento similares a insulina, factores de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento derivados de plaquetas y factores de crecimiento nervioso (Razavi *et al.*, 2015).

Los factores neurotróficos o neurotrofinas son importantes proteínas reguladoras que intervienen en varios procesos celulares, incluida la homeostasis del calcio y el flujo sanguíneo del cerebro y que, además, aumentan la neurogénesis, fortalecen la red neuronal y potencian las respuestas regenerativas a la agresión nerviosa (Razavi *et al.*, 2015; Cobianchi *et al.*, 2016), por lo que son fundamentales para la neuroprotección (Cobianchi *et al.*, 2016). La familia de neurotrofinas incluye el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *nerve growth factor*), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*), neurotrofina-3 y neurotrofina-5 (Razavi *et al.*, 2015). Su acción está mediada por dos tipos diferentes de receptores, el receptor de neurotrofina P75 de baja afinidad y receptores de tirosina quinasa.

NGF promueve la regeneración axonal, la supervivencia, la protección y la diferenciación de los oligodendrocitos y, también, facilita la migración y proliferación de precursores de oligodendrocitos a los sitios de daño de mielina (Acosta *et al.*, 2013). Por su parte, BDNF tiene un papel fundamental en el crecimiento y supervivencia neuronal y oligodendroglial (Nociti, 2020), regulando la liberación de neurotransmisores y modulando la homeostasis inflamatoria en el SNC lesionado (Razavi *et al.*, 2015; Nociti, 2020). La evidencia experimental sugiere que ambas neurotrofinas juegan un papel importante en la patología de la EM (Langhnoja, Buch and Pillai, 2021), presentando efectos neuroprotectores en esta enfermedad (Gold *et al.*, 2003). En las primeras etapas del desarrollo de esta, las células T y otras células inmunitarias, protegen a la población neuronal y mejoran su supervivencia, promueven la regeneración de axones y respaldan la remielinización a través de la liberación de un alto nivel de neurotrofinas (Razavi *et al.*, 2015). En las lesiones de EM más antiguas y crónicas, los niveles de neurotrofinas endógenas son bajos (Stadelmann *et al.*, 2002; Nociti, 2020). Esto, podría ser una de las causas de la degeneración axonal en el curso de la etapa progresiva crónica de la EM (Nociti, 2020).

Muchas investigaciones actuales, se centran en el estudio de BDNF como un biomarcador potencial de la EM (Oraby *et al.*, 2021). En las lesiones de la EM, el BDNF está presente en células T, células microgliales y en astrocitos reactivos (Naegelin *et al.*, 2020), de áreas desmielinizantes activas (Nociti, 2020). Se ha visto que los niveles de BDNF son más altos en pacientes durante la fase de recaída que durante la remisión en la EM-RR. Este es debido a que, BDNF, es secretado en respuesta a cascadas inflamatorias y neuroinmunes como mecanismo de defensa frente al daño neuronal y axonal (Oraby *et al.*, 2021). Los resultados de diversos estudios confirman este hecho, mostrando que existe una correlación positiva entre los niveles de BDNF y la actividad de la enfermedad (Stadelmann *et al.*, 2002; Sarchielli *et al.*, 2007). En las lesiones crónicas, existe una disponibilidad reducida de BDNF en las células inmunes, lo que conlleva una pérdida de efectos neuroprotectores, pudiendo contribuir a la degeneración axonal y a la pérdida de neuronas en la EM (Naegelin *et al.*, 2020). Como consecuencia de los bajos niveles de BDNF, se espera que se produzca una disminución del potencial de remisión de los pacientes con EM y se induzca una fase progresiva de la enfermedad (Knaepen *et al.*, 2010; Oraby *et al.*, 2021). Por todo ello, BDNF podría ser utilizado con un biomarcador potencial de la actividad de la EM (Oraby *et al.*, 2021).

2.4. Tratamientos actuales

La EM es un problema mundial, cuya prevalencia sigue aumentando y para la que aún no existe cura (Wallin *et al.*, 2019). El tratamiento de esta enfermedad se basa en un manejo efectivo de la misma, lo que requiere un enfoque multifacético para controlar los ataques agudos, manejar el empeoramiento progresivo y remediar los síntomas molestos o incapacitantes (Hauser and Cree, 2020). El objetivo actual, para el tratamiento de la EM, es apuntar a la cascada inflamatoria, suprimiendo las citocinas proinflamatorias y también reducir el número de recaídas y lesiones (Oraby *et al.*, 2021). Para ello, se utilizan las denominadas terapias modificadoras de la enfermedad (TME), con las que aproximadamente el 70% de los pacientes con EM, son tratados (Winkelmann *et al.*, 2016; Sormani *et al.*, 2021). Estas terapias,

modifican el curso de la enfermedad a través de la supresión o modulación de la función inmunitaria (Hauser and Cree, 2020). Por ello, se clasifican en dos categorías: Inmunomoduladoras, que ayudan a regular o normalizar el sistema inmune; y las Inmunosupresoras, que alteran temporal o permanentemente el funcionamiento del sistema inmune (Mycko, 2020). La mayoría de estas TME, están dirigidas contra las células T CD4+, Th17, células B de memoria (CD19+, CD27+) y vírgenes (CD19+, CD27-) (Berger, Brandstadter and Bar-Or, 2020; Kunkl *et al.*, 2020).

Por otro lado, los síntomas que aparecen durante una recaída suelen tratarse con corticoides como la metilprednisona, la prednisona o la dexametasona. La dexametasona es un potente glucocorticoide, con capacidad inmunosupresora y antiinflamatoria (Medina-Fernandez *et al.*, 2018).

Actualmente, existen diferentes terapias orales, monoclonales infusibles y de anticuerpos monoclonales inyectables, aprobadas por la Agencia Americana del Medicamento (FDA, por sus siglas en inglés-*U.S. Food and Drug Administration*) para la EM (Smith and Kister, 2021). Estas terapias se dividen, principalmente, en dos clases: de primera línea, dentro de la que se incluyen, IFN- β , Acetato de Glatiramer, Teriflunomida y Dimetilfumarato; y de segunda línea, dentro de la cual destacan, Natalizumab, Fingolimod, Alemtuzumab, Cladribina y tratamientos anti-CD20 como Ocrelizumab y Ofatumumab (Anagnostouli, Markoglou and Chrousos, 2020) (Tabla 1).

	Línea	Administración	Tipo de EM para el que está indicado	Efectos secundarios
Interferon-β	1°	Inyección subcutánea/intramuscular	EM-RR	Fiebre, escalofríos, mialgias, artralgias y síntomas similares a la gripe
Acetato de glatiramer	1°	Inyección subcutánea	EM-RR	Fatiga, reacciones relacionadas con la inyección
Teriflunomida	1°	Oral	EM-RR	Diarrea, náuseas, escasez de cabello, neutropenia y linfopenia
Dimetilfumarato	1°	Oral	EM-RR	Posible leucoencefalopatía multifocal progresiva
Natalizumab	2°	Infusión intravenosa	EM-RR	Riesgo infecciones del tracto respiratorio; Leucoencefalopatía multifocal progresiva
Fingolimod	2°	Oral	EM-RR	Transaminasas elevadas, dolor de cabeza, bradicardia, infección por herpes y edema macular
Alemtuzumab	2°	Infusión intravenosa	EM-RR	Linfopenia profunda
Cladribina	2°	Oral	EM-RR y EM-SP	Linfopenia
Rituximab	2°	Infusión intravenosa	No aprobado para EM	Leucoencefalopatía multifocal progresiva; Mayor riesgo de infecciones
Ocrelizumab	2°	Infusión intravenosa	EM-RR y EM-SP	Mayor riesgo de infecciones
Ofatumumab	2°	Inyección subcutánea	EM-RR	Reacciones relacionadas con la inyección; Infecciones del tracto respiratorio superior; Infecciones del tracto urinario

Tabla I. Resumen de las principales Terapias modificadoras de la enfermedad (TME) usadas para el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM). EM-RR: Esclerosis múltiple remitente recurrente; EM-SP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva.

2.4.1. TME de primera línea

Las terapias de primera línea presentan una eficacia modesta, sin embargo, no provocan inmunosupresión en el paciente y tienen excelentes perfiles de seguridad a largo plazo (Gold *et al.*, 2005; Smith and Kister, 2021).

Interferón-β

El IFN-β fue la primera TME disponible para tratar la EM y brindó a los pacientes un tratamiento que redujo las tasas de recaída y retrasó la aparición de discapacidad (Filipi and Jack, 2020). Actualmente, hay cinco tipos de IFN-β aprobados para el tratamiento de las formas recurrentes de la EM: IFN-β 1b (Betaseron®, Bayer HealthCare Pharmaceuticals Inc; Extavia®, Novartis Pharmaceuticals Corp) de administración subcutánea, IFN-β 1a (Rebif®; EMD Serono Inc) de administración subcutánea, IFN-β 1a (Avonex®; Biogen Inc) de administración intramuscular y Peginterferon beta-1a (Plegridy®; Biogen Inc) (Kieseier, 2011).

El mecanismo de acción de esta terapia, aún no se conoce completamente, aunque podría estar relacionado con sus efectos pleiotrópicos que dan como resultado, una amplia acción antiinflamatoria (Severa *et al.*, 2020). Se sabe que el IFN-β aumenta la producción de células Th2 y citocinas antiinflamatorias como IL-10 e IL-4, disminuye la liberación de Th1 y citocinas proinflamatorias como IL-17 y también limita la migración de células inflamatorias a través de la BHE (Kieseier, 2011). Además, presenta potentes efectos antivirales *in vivo* (Hong *et al.*, 2002) y los pacientes que usan esta terapia, muestran un menor riesgo de sufrir infecciones (Sharifian-Dorche *et al.*, 2021). Asimismo, los efectos secundarios que puede provocar el IFN-β son leves, entre los que se encuentran fiebre, escalofríos, mialgias, artralgias y otros síntomas similares a los de la gripe (Munschauer and Kinkel, 1997).

Acetato de glatiramer

El acetato de glatiramer (AG) es un inmunomodulador no esteroideo que modifica la respuesta inmunitaria (Carretero Colomer, 2004), aprobado para el tratamiento de la EM-RR (Tselis, Khan and Lisak, 2007). Se trata de un copolímero

de residuos de aminoácidos, en las mismas proporciones estequiométricas que en la proteína básica de mielina (Tselis, Khan and Lisak, 2007). Bloquea el CMH-II en la sinapsis inmunológica y produce un cambio de la respuesta Th1 a Th2 (Anagnostouli, Markoglou and Chrousos, 2020). Asimismo, bloquea la activación de macrófagos mediada por IFN- γ (Berger, Brandstadter and Bar-Or, 2020; Sharifian-Dorche *et al.*, 2021) y se ha visto que las células dendríticas de pacientes con EM, tratados con AG, producen menos TNF- α e IL-12 y más IL-10 y también induce la secreción de BDNF (Aharoni, 2013). Es una terapia que no tiene propiedades inmunosupresoras sistémicas, por lo que no aumenta el riesgo de infecciones en los pacientes (Giovannoni, 2018; Reyes *et al.*, 2021), además, los principales efectos secundarios que presenta son leves, como fatiga y reacción en el lugar de la inyección (Boster *et al.*, 2015).

Teriflunomida

La teriflunomida es una terapia oral, aprobada por la FDA y por la Agencia Europea del Medicamento (EMA), para el tratamiento de formas recurrentes de la EM (Freedman, 2013). Las aprobaciones de esta terapia, fueron respaldadas por ensayos clínicos de fase 3, que han demostrado que la teriflunomida, presenta un perfil beneficio/riesgo favorable en esta enfermedad (Bar-Or *et al.*, 2014). Se trata de una terapia que bloquea la síntesis de pirimidina *de novo*, mediante la inhibición específica, no competitiva y reversible de la dihidroorotato deshidrogenasa (Bar-Or *et al.*, 2014; Maghzi *et al.*, 2020; Sharifian-Dorche *et al.*, 2021), una enzima que se expresa en niveles elevados en los linfocitos en proliferación (Bar-Or *et al.*, 2014). El bloqueo de la síntesis de pirimidina interrumpe el ciclo celular en la fase S y ejerce un efecto citostático sobre las células T y B autorreactivas (Gold and Wolinsky, 2011; Bar-Or *et al.*, 2014), inhibiendo la proliferación de estas (Anagnostouli, Markoglou and Chrousos, 2020). A través de este mecanismo, la

teriflunomida, disminuye la activación inmune sin una inmunosupresión significativa (Sharifian-Dorche *et al.*, 2021). Los principales efectos secundarios que produce la teriflunomida son, diarrea, náuseas, escasez de cabello, neutropenia y linfopenia (D. He *et al.*, 2016)

Dimetilfumarato

El dimetilfumarato es un éster metílico de ácido fumárico, que se hidroliza en el intestino delgado y que presenta propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Timpani and Rybalka, 2020). Este fármaco inmunomodulador, ejerce sus efectos a través de la activación de la vía de señalización Nrf2 (Scannevin *et al.*, 2012; Hauser and Cree, 2020). Este, modula la inflamación y el estrés oxidativo mediante la regulación positiva de los mecanismos de citoprotección, a través de la expresión de antioxidantes de fase II, principalmente SOD1, NADPH quinona oxidorreductasa 1 y hemo oxigenasa-1 (HO-1) (Timpani and Rybalka, 2020). El dimetilfumarato, también puede ejercer sus efectos a través de vías independientes de Nrf2 (Hauser and Cree, 2020; Timpani and Rybalka, 2020), mediante la inhibición indirecta del mediador inflamatorio NF- κ B o mediante la activación del receptor 2 del ácido hidroxicarboxílico, que modula la infiltración, adhesión y quimiotaxis de las células inmunes (Al-Jaderi and Maghazachi, 2016; Kourakis *et al.*, 2020; Timpani and Rybalka, 2020). Aunque este fármaco es bien tolerado por los pacientes con EM, en algunos casos, puede provocar leucoencefalopatía multifocal progresiva (Mills and Mao-Draayer, 2018; Hauser and Cree, 2020).

2.4.2. TME de segunda línea

Las terapias de segunda línea presentan una mayor eficacia, en comparación con las anteriores, pero tienen un efecto más profundo en el sistema inmunitario, lo que requiere la implementación de estrategias de eliminación de riesgos para prevenir infecciones graves (Smith and Kister, 2021).

Natalizumab

Natalizumab (Tysabri®; Biogen Idec/Elan, Cambridge, MA, USA) es actualmente el tratamiento clínico más exitoso para la EM (Bahamonde *et al.*, 2014). Se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado, que reconoce la cadena $\alpha 4$ del antígeno VLA4, componente de la integrina $\alpha 4\beta 1$, una molécula de adhesión expresada en la superficie de los linfocitos e involucrada en la transmigración a través del endotelio hacia el SNC (Hauser and Cree, 2020; Khoy *et al.*, 2020). La inhibición de $\alpha 4\beta 1$, provoca la reducción de la migración de linfocitos a través de la BHE (Anagnostouli, Markoglou and Chrousos, 2020; Reyes *et al.*, 2021). Este fármaco ha demostrado eficacia contra la EM-RR, pero no para la EM-SP (Khoy *et al.*, 2020). Se administra como infusión intravenosa una vez cada cuatro semanas, siendo eficaz para disminuir las recaídas y retrasar la progresión de la enfermedad (Hauser and Cree, 2020). Aunque presenta pocos efectos adversos, natalizumab se ha asociado con un riesgo ligeramente mayor de sufrir infecciones del tracto respiratorio y el tratamiento a largo plazo aumenta el riesgo de sufrir leucoencefalopatía multifocal progresiva (Hauser and Cree, 2020; Reyes *et al.*, 2021).

Fingolimod

Fingolimod (FTY720, (Gilenya®, Novartis Pharmaceuticals), pertenece a una clase de moléculas que se dirigen al sistema de señalización regulado por esfingolípidos (Ayzenberg, Hoepner and Kleiter, 2016). Inhibe a la esfingosina-1-fosfato, lo que impide la salida de los linfocitos de los ganglios linfáticos, reduciendo el recuento medio total de linfocitos circulantes en sangre periférica en un 73% (Anagnostouli, Markoglou and Chrousos, 2020; Berger, Brandstadter and Bar-Or, 2020; Hauser and Cree, 2020; Sharifian-Dorche *et al.*, 2021). Fue el primer fármaco oral para el tratamiento de la EM-RR, siendo un medicamento

ampliamente utilizado, ya que ha demostrado ser muy eficaz para reducir las tasas de recaídas (Ayzenberg, Hoepner and Kleiter, 2016), cuya dosis recomendada es de 0,5mg una vez al día (Bargiela *et al.*, 2020). Los eventos adversos informados con mayor frecuencia tras el tratamiento con Fingolimod, en los ensayos clínicos, fueron transaminasas elevadas, dolor de cabeza, bradicardia, infección por herpes y edema macular (Ayzenberg, Hoepner and Kleiter, 2016).

Alemtuzumab

Alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal específico de CD52 que agota notablemente los linfocitos T y B (Giovannoni, 2018; Reyes *et al.*, 2021). Este agotamiento, va seguido de la reconstitución y el reequilibrio del sistema inmunitario, lo que da como resultado una supresión prolongada de la EM (Haas *et al.*, 2019). Esta terapia fue aprobada por la EMA en septiembre de 2013, indicada para el tratamiento de la EM-RR activa, definida por características clínicas o de imagen, para el tratamiento de la EM-RR con respuesta inadecuada al IFN- β u otros TME y para el tratamiento de otras formas recurrentes de la enfermedad (Havrdova, Horakova and Kovarova, 2015). Alemtuzumab está asociado con un mayor riesgo de eventos infecciosos debido a que produce linfopenia profunda (Reyes *et al.*, 2021; Sharifian-Dorche *et al.*, 2021). El tratamiento con Alemtuzumab no es para todos los pacientes con EM y la decisión de usarlo debe considerarse cuidadosamente (Havrdova, Horakova and Kovarova, 2015).

Cladribina

Cladribina es un fármaco oral análogo de la desoxiadenosina (Deeks, 2018), que interfiere con el metabolismo celular e inhibe la reparación del ADN, lo que causa apoptosis, especialmente en linfocitos (Berger, Brandstadter and Bar-Or, 2020), causando el agotamiento selectivo tanto de linfocitos B como T (Giovannoni, 2018; Anagnostouli, Markoglou and Chrousos, 2020). Es una terapia recientemente

aprobada por la FDA, siendo el primer y único fármaco aprobado tanto para la EM-RR y para la EM-SP (*FDA approves new oral treatment for multiple sclerosis / FDA, 2019*), cuyo tratamiento es de corta duración, administrándose en dos ciclos cortos con un año de diferencia, aportando una eficacia prolongada (Deeks, 2018). Debido a su mecanismo de acción, la linfopenia es una de las reacciones adversas clínicamente más relevantes, lo que supone un mayor riesgo de infección (Deeks, 2018; Sharifian-Dorche *et al.*, 2021), por lo que es recomendable determinar el recuento de linfocitos antes, durante y después de la administración del fármaco (Deeks, 2018).

Tratamientos Anti-CD20

- Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido a los linfocitos B CD20 positivos, considerándose un inmunosupresor selectivo (Esmaeili *et al.*, 2021). Esta terapia induce la muerte celular a través de apoptosis, reduciendo de esta manera la actividad inflamatoria, la incidencia de recaídas y nuevas lesiones cerebrales (Brancati *et al.*, 2021; Chisari *et al.*, 2021). Rituximab, ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la EM-RR, pero también en el tratamiento de la EM-PP, en los ensayos clínicos aleatorizados de fase 2, HERMES y OLYMPUS (Chisari *et al.*, 2021). Sin embargo, aunque es un tratamiento aprobado desde 1997 para trastornos hematológicos y autoinmunes, aún no está aprobado para su uso en la EM (Brancati *et al.*, 2021).
- Ocrelizumab (Ocrevus®) es un anticuerpo monoclonal humanizado que reduce selectivamente las células B que expresan CD20, al tiempo que preserva la capacidad de reconstitución de estas células y la inmunidad humoral preexistente (Hauser *et al.*, 2021). Es un fármaco aprobado para el

tratamiento de la EM-RR y la EM-PP (Syed, 2018), que se administra por infusión intravenosa cada 24 semanas (Hauser and Cree, 2020), demostrándose que los beneficios clínicos se mantienen durante un periodo de 7 años (Hauser *et al.*, 2021). Esta terapia reduce significativamente la tasa de recaída en comparación con otros TME y también provoca una disminución significativa del riesgo de progresión de la discapacidad (Syed, 2018). Generalmente es un tratamiento bien tolerado, aunque su uso está asociado con un mayor riesgo de infecciones y reacciones relacionadas con la infusión (Syed, 2018; Brancati *et al.*, 2021).

- Ofatumumab (Kesimpta®) es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 completamente humano, aprobado inicialmente para el tratamiento de la leucemia crónica y que, ahora, está aprobado en varios países para el tratamiento de formas recurrentes de EM (Hauser *et al.*, 2020; Kang and Blair, 2022). Ofatumumab se une a una región de CD20 distinta a la de otros anticuerpos anti-CD20 (Hauser *et al.*, 2020), lo que conduce al agotamiento de células B y células T a través de la lisis de células B CD20+ (Kang and Blair, 2022). Se administra mediante inyección subcutánea mensual, presentando un perfil de eficacia similar a Ocrelizumab, con un alto grado de seguridad (Hauser and Cree, 2020). Los eventos adversos informados con mayor frecuencia tras el tratamiento con esta terapia son reacciones relacionadas con la inyección, infecciones del tracto respiratorio superior e infecciones del tracto urinario (Kang and Blair, 2022).

2.4.3. Estimulación Magnética Transcraneal

Además de los tratamientos clínicos, en las últimas décadas se ha sugerido el uso de la estimulación magnética transcraneal (TMS, por su traducción en inglés, *Transcranial Magnetic Stimulation*), como posible tratamiento para mejorar la espasticidad, mejorar la destreza y facilitar la marcha en pacientes con EM (Medina-Fernandez *et al.*, 2017). TMS es un procedimiento no invasivo de inducción electromagnética, que aplica un pulso de campo magnético variable en el tiempo a través del cráneo, provocando pequeñas corrientes eléctricas que inducen cambios en la polarización de las neuronas (Estrada *et al.*, 2015; Medina-Fernandez *et al.*, 2017). TMS modula varios aspectos de los sistemas neurotransmisores y neuromoduladores, así como la expresión de proteínas (Tasset, Medina, *et al.*, 2012).

Gracias a los diferentes estudios realizados en nuestro grupo, hemos podido comprobar que la TMS ejerce un efecto significativo sobre la lesión oxidativa aumentando los niveles de GPx, SOD y GSH y disminuyendo la peroxidación lipídica en el modelo experimental de depresión mayor, inducida por bulbectomía olfatoria, en ratas Wistar (Tasset *et al.*, 2010). Además, la aplicación de TMS en el modelo EAE, mejoró el deterioro motor secundario y produjo una disminución en la proliferación de astrocitos como respuesta al ataque autoinmune, reduciendo el contenido de óxido nítrico, LPS y LBP en el SNC. Del mismo modo, mejoró la densidad de células cerebrales y disminuyó el número de núcleos picnóticos (Medina-Fernández *et al.*, 2017). TMS ejerce también un efecto neuroprotector y provoca un aumento de los niveles de BDNF, del factor neurotrófico derivado de la glía (Tasset, Medina, *et al.*, 2012) y serotonina (Agüera *et al.*, 2020). Recientemente, hemos demostrado que TMS puede mejorar la actividad neuromuscular al detener la atrofia y disminuir las lesiones que se producen en el modelo EAE (Peña-Toledo *et al.*, 2021). Asimismo,

comprobamos que la TMS en comparación con otros medicamentos, como Natalizumab, dimetilfumarato o dexametasona, disminuye los cambios provocados en EAE, de una manera más significativa (Medina-Fernandez *et al.*, 2018). Todo ello, junto con la notable tolerabilidad y seguridad (Estrada *et al.*, 2015), hace que la TMS sea una herramienta potencialmente útil para el tratamiento de la EM como tratamiento *per se* o como adyuvante de otros tratamientos actualmente administrados (Medina-Fernandez *et al.*, 2018). Por estas razones, desde nuestro grupo, se está llevando a cabo un ensayo clínico (*Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) in Multiple Sclerosis - Full Text View - ClinicalTrials.gov*, 2019) para demostrar la eficacia de la TMS en términos de seguridad y mejora clínica, así como observar los cambios moleculares en relación con el tratamiento en pacientes con EM-RR (Agüera *et al.*, 2020).

2.5. Modelo animal de Esclerosis Múltiple: Encefalomiелitis Autoinmune Experimental

Para investigar los mecanismos de las enfermedades que afectan a humanos y encontrar los medios para revertir las condiciones adversas, se utilizan diferentes estrategias dentro de las que se incluye el uso de modelos animales. Estos, permiten comprender la fisiopatología de las enfermedades y desarrollar posibles tratamientos (Khorramizadeh and Saadat, 2020). En relación con la EM, el modelo EAE se ha expandido considerablemente para el estudio de laboratorio de esta enfermedad (Constantinescu *et al.*, 2011).

La EAE fue descrita por primera vez hace casi 90 años, siendo desarrollada por Rivers *et al.* (1933), en un intento por comprender la patogenia de la encefalomiелitis postvacunal ocasionada por la vacuna de la rabia (Rivers, Sprunt and Berry, 1933; Constantinescu *et al.*, 2011). Desde entonces, la EAE se ha convertido en uno de los modelos animales de enfermedades inmunitarias más intensamente estudiado (Baxter, 2007). En este modelo, la interacción entre una variedad de mecanismos neuro e inmunopatológicos induce inflamación, desmielinización, pérdida axonal y gliosis de manera similar a lo encontrado en la EM

(Constantinescu *et al.*, 2011; Medina-Fernandez *et al.*, 2017), así como un deterioro motor (Barthelmes *et al.*, 2016).

La EAE se induce mediante antígenos derivados del SNC (Baxter, 2007) como la proteína básica de mielina, que fue una de las primeras que se purificó a partir de un homogeneizado de la médula espinal; la proteína proteolipídica, que es la proteína transmembrana principal del SNC y la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG, del inglés *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*) que es un componente minoritario que se expresa en la superficie externa de la mielina del SNC (Glatigny and Bettelli, 2018). MOG es un autoantígeno de mielina único, ya que es capaz de inducir, no solo una respuesta de células T encefalitogénicas en especies susceptibles, sino también una respuesta de anticuerpos desmielinizantes (Pérez-Nievas *et al.*, 2010). La sensibilización a los antígenos de mielina, normalmente, se produce mediante el uso de adyuvantes, que suelen contener componentes bacterianos que activan el sistema inmunitario (Constantinescu *et al.*, 2011). Una vez que la EAE se ha inducido, el curso de la enfermedad sigue tres fases: fase preclínica (día 0-9), inicio de la enfermedad (día 10-11) y fase aguda (día 12-14) (Barthelmes *et al.*, 2016).

Existe, además, otro tipo de EAE, la EAE espontánea que se desarrolla en ratones transgénicos que sobreexpresan un receptor de células T contra un péptido de MOG (Barthelmes *et al.*, 2016). Este modelo es especialmente prometedor como sistema para estudiar la patogénesis de la EM y será de gran utilidad para probar compuestos que puedan prevenir la enfermedad (Glatigny and Bettelli, 2018).

EAE es un modelo útil para probar diferentes estrategias terapéuticas en la EM (Peña-Toledo *et al.*, 2021). En este sentido, la EAE ha sido extremadamente valiosa para determinar la eficacia de las TME, de las cuales, varias han sido aprobadas para uso en pacientes con EM (Glatigny and Bettelli, 2018). Asimismo, gracias a este modelo se ha podido comprobar que la administración de melatonina ejerce efectos neuroprotectores, suprimiendo la progresión de la

EAE y los cambios patológicos que en ella se producen y disminuyendo, también, los niveles de estrés oxidativo (Long *et al.*, 2018).

3. EVIDENCIAS DE LA RELACIÓN ENTRE LA MELATONINA Y LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Los pacientes con EM presentan niveles nocturnos reducidos de melatonina, hecho que se ha correlacionado con la severidad de la enfermedad y con síntomas como fatiga, insomnio y depresión. Del mismo modo, los niveles de su principal metabolito en orina, 6-SMT, también se encuentran disminuidos (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2015, 2017), pudiendo corregirse con el tratamiento con Natalizumab (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2015), que ha demostrado su capacidad para aumentar la concentración sérica de melatonina (Bahamonde *et al.*, 2014). Se piensa, que la reducción de los niveles de melatonina, puede reflejar una disfunción hipotalámica en la regulación de la secreción de la indolamina (Akpınar *et al.*, 2008), aunque también podrían deberse a una deposición de calcio en la glándula pineal (Tan *et al.*, 2018; Yosefi-Fard *et al.*, 2020).

Los niveles de melatonina, están inversamente relacionados con la severidad y las recaídas de la EM (Ghareghani, Reiter, *et al.*, 2018). La melatonina se asocia con la estacionalidad de la recaída de esta enfermedad (Kern *et al.*, 2019). En los meses de otoño-invierno, los niveles de esta hormona alcanzan su máximo, lo que supone una relación inversa con la actividad clínica de la EM (Farez *et al.*, 2015) ya que, existe una probabilidad mayor de que los síntomas de esta ocurran en primavera/verano (Yeganeh-Salehpour *et al.*, 2019).

Se ha planteado la hipótesis de que la melatonina, podría tener un efecto profiláctico y terapéutico sobre esta enfermedad (Gunata, Parlakpınar and Acet, 2020), ya que se ha comprobado que la suplementación con esta hormona, contribuye a aliviar los desequilibrios cognitivos y motores (Chen, Zhang and Lee, 2020) y mejora la diferenciación y maduración oligodendroglial, así como la reparación de la mielina (Ghareghani, Sadeghi, *et al.*, 2017). De hecho, desde Mayo de 2018, se está llevando a cabo un ensayo clínico para evaluar el efecto de la administración oral

de 3 mg y 5 mg de melatonina diariamente, en pacientes con EM-RR. El objetivo principal de este estudio es analizar si la suplementación con melatonina afecta al nivel de 6-SMT. También, evaluarán el nivel sérico de melatonina, la calidad de vida, incluida la Escala de Impacto de Fatiga Modificada, la Escala de Impacto de Esclerosis Múltiple y el Índice de Calidad del Sueño de Pittsburgh, así como el número de recaídas de los pacientes (*Melatonin in Patients With Multiple Sclerosis (MS)*. - Full Text View - *ClinicalTrials.gov*, 2018).

3.1.Efecto de la Melatonina sobre los principales síntomas de la Esclerosis Múltiple

La EM es una enfermedad definida por una amplia gama de signos y síntomas que alteran el funcionamiento físico, cognitivo, emocional y social (Harbo, Gold and Tintora, 2013; Sakkas *et al.*, 2019). Tras el diagnóstico de la enfermedad, los síntomas permanecen durante toda la vida (Wallin *et al.*, 2019).

3.1.1. Melatonina y Trastornos del sueño

Los trastornos del sueño y la desregulación del ritmo circadiano tienen una alta prevalencia en las enfermedades neuroinmunes (Morris *et al.*, 2018), influyendo en la actividad de la enfermedad y la frecuencia de las recaídas en los pacientes (Yeganeh-Salehpour *et al.*, 2019). Aproximadamente, entre el 42-65% de los pacientes con EM, sufren este tipo de trastorno (Bamer *et al.*, 2008), suponiendo un problema multifactorial y complejo (Sakkas *et al.*, 2019) que puede agravar el curso de la enfermedad y cuya fisiopatología sigue sin estar clara (Morris *et al.*, 2018).

Varios estudios demuestran que la disminución de los niveles de melatonina, observada en pacientes con EM, está asociada con síntomas como la fatiga, depresión y los trastornos del sueño (Bahamonde *et al.*, 2014).

Gracias a sus propiedades cronobióticas, la melatonina influencia la ritmicidad circadiana y evita desórdenes en los ritmos vigilia/sueño (Li *et al.*, 2019; Aranda *et al.*, 2021). La administración de melatonina aumenta el tiempo total de sueño (Li *et al.*, 2019) y disminuye el número de episodios de vigilia en pacientes con insomnio

(Adamczyk-Sowa, Krystyna Pierzchala, *et al.*, 2014). Respecto al efecto de la melatonina sobre la calidad del sueño, hay resultados contradictorios ya que, Adamczyk-Sowa *et al.* (2014a), afirman que la melatonina es capaz de aumentar la calidad, mientras que Li *et al.* (2019), obtuvieron que la melatonina tenía poco o ningún efecto sobre la eficiencia del sueño. Por ello, aunque la melatonina se postula como un buen tratamiento para mejorar las anomalías del sueño en personas con EM, es necesaria más investigación que confirme su eficacia.

3.1.2. Melatonina y Depresión

La depresión es una de las comorbilidades psiquiátricas más comunes en pacientes con EM (Hassan *et al.*, 2021), con una tasa mayor que en otras enfermedades neurológicas crónicas (Akpınar *et al.*, 2008), presentando una prevalencia del 50% (Marrie *et al.*, 2015). La depresión está relacionada con la fatiga (Fidao *et al.*, 2021) y con el deterioro cognitivo, provocando un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes (Hassan *et al.*, 2021). Además, la ansiedad y la depresión parecen contribuir al inicio de las recaídas clínicas y la neurodegeneración (Tauil *et al.*, 2021). Varios estudios han demostrado que la resistencia al tratamiento para la depresión mayor, se correlaciona con un aumento de los niveles plasmáticos de neurofilamentos de cadena ligera (Rathbone *et al.*, 2018; Domingues *et al.*, 2019), los cuales son un reflejo del daño axonal y unos de los biomarcadores más prometedores para la neurodegeneración en la EM (Tauil *et al.*, 2021).

Los pacientes con EM que tienen depresión, presentan unos niveles séricos nocturnos de melatonina significativamente más bajos que pacientes sin depresión, por lo que las deficiencias de melatonina, podrían estar involucradas en la aparición de este síntoma (Akpınar *et al.*, 2008). Además, estos pacientes presentan anomalías comprobadas en los niveles de serotonina, siendo importante destacar que, la síntesis

de melatonina está bajo control serotoninérgico (Sunami *et al.*, 2012; San Hernandez *et al.*, 2020).

Según los estudios realizados, la melatonina podría tener un efecto similar a los antidepresivos, relacionado con la modulación de los cambios neuroplásticos en el hipocampo (Valdés-Tovar *et al.*, 2018). Esto se debe a que hay evidencia preclínica que demuestra que, el hipocampo es uno de los objetivos principales para las acciones de la melatonina, siendo este, el principal sitio de acción de los antidepresivos (Drevets, Price and Furey, 2008; Valdés-Tovar *et al.*, 2018). En la investigación realizada por Mantovani *et al.* (2003), demuestran que una dosis de 0.001 mg/kg de melatonina, inyectada por vía intraperitoneal produjo un efecto similar a un antidepresivo (Mantovani *et al.*, 2003). Asimismo, se ha reportado que antidepresivos como la fluvoxamina, mejoran el sistema serotoninérgico (Sunami *et al.*, 2012). Dicho antidepresivo también puede aumentar los niveles de melatonina (Härtter *et al.*, 2000; Sunami *et al.*, 2012; Ghareghani, Zibara, *et al.*, 2017). Además, existen estudios que han asociado la depresión con un estado crónico de neuroinflamación (Anderson *et al.*, 2014), encontrando una asociación entre la activación del inflamasoma NLRP3 con un mayor riesgo de depresión (Iwata, Ota and Duman, 2013; Guo *et al.*, 2020). En base a esto, la administración de melatonina podría prevenir la aparición de depresión en pacientes con EM, debido a su capacidad de contrarrestar los efectos del inflamasoma NLRP3.

3.1.3. Melatonina y Osteoporosis

La osteoporosis es uno de los trastornos óseos metabólicos más frecuentes a nivel mundial, siendo la EM-PP una de las principales causas de osteoporosis (Arıcan *et al.*, 2020). La osteoporosis es una enfermedad que se caracteriza por una masa ósea baja y

la destrucción de la microarquitectura del tejido óseo, resultando en un aumento de la fragilidad ósea y mayor susceptibilidad a las fracturas (Klibanski *et al.*, 2001).

En el estudio realizado por Ghareghani *et al.* (2018b), se comprueba por primera vez, que la inducción de EAE provoca una elevación de los niveles séricos de procalcitonina (proCT). La proCT es la precursora de la calcitonina y se ha reportado como un biomarcador de la inflamación sistémica y enfermedades autoinmunes (Meisner, 2002).

La melatonina parece estar involucrada en el proceso de curación ósea ya que, normaliza los metabolitos óseos en la EM (Turgut *et al.*, 2003). Ghareghani *et al.* (2018b), confirman este hecho, obteniendo que los niveles séricos de melatonina estaban inversamente correlacionados con los niveles de proCT y, además, reducía la resorción ósea, presentando un efecto protector en los huesos (Ghareghani, Scavo, *et al.*, 2018). Similares resultados obtienen Sharan *et al.* (2017), reportando que la melatonina actúa como un regulador de la masa ósea, a través de sus receptores MT2. Asimismo, obtienen que la melatonina aumenta el número de osteoblastos y la formación ósea (Sharan *et al.*, 2017).

3.1.4. Melatonina y Alteraciones de memoria

Las deficiencias cognitivas se presentan en el 65% de los pacientes con EM y de ese porcentaje, el 40-50% se corresponde con la pérdida o alteraciones en la memoria (Rahn, Slusher and Kaplin, 2012; Alghamdi and AboTaleb, 2020).

La corteza prefrontal (CPF) y el hipocampo son regiones cerebrales interconectadas que desempeñan un papel central en las funciones cerebrales superiores, entre las que se incluye la memoria (Nickel and Gu, 2018). La neuroinflamación y la desmielinización de los axones que conectan el CPF y el hipocampo, provocan una

disfunción de la memoria (Nickel and Gu, 2018; Alghamdi and AboTaleb, 2020; Kwilas *et al.*, 2021).

Existen estudios que muestran evidencia del papel que juega la melatonina en la protección de la cognición y la preservación de la memoria en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Ng *et al.*, 2017). En el estudio realizado por Alghamdi *et al.* (2020) obtienen que, el tratamiento con melatonina a ratones con defectos de memoria inducidos por cuprinozona, producía un aumento de la expresión de los genes de la sinaptofisina, asociada a la sinapsis y la proteína de densidad postsináptica 95 (Psd95) en la CPF, por lo que se podría decir que la melatonina aporta efectos protectores contra las alteraciones en la memoria, producidas durante la EM (Alghamdi and AboTaleb, 2020). Zhang *et al.* (2016), concluyen que la melatonina tiene capacidad para reducir los deterioros de la memoria, así como los déficits de neuroplasticidad a través de la regulación de la vía de señalización Notch1 (Zhang *et al.*, 2016). Chen *et al.* (2018) confirman que la melatonina mejora el déficit cognitivo mediante la restauración de la mielina (Chen *et al.*, 2018). Además, Ran *et al.* (2018) sugieren que la melatonina puede ejercer efectos terapéuticos sobre la memoria a largo plazo a través de la modulación de los canales de calcio (Ran *et al.*, 2018).

3.1.5. Melatonina y Neuritis óptica

La neuritis óptica es una condición inflamatoria del nervio óptico, que conduce a la pérdida de células ganglionares de la retina (Aranda *et al.*, 2021). El nervio óptico es uno de los principales objetivos de la EM (Sadam *et al.*, 2021). Alrededor del 20% de los pacientes con EM, sufren neuritis óptica como uno de los primeros síntomas y durante el curso de la enfermedad, tiene una prevalencia del 50% (Brodsky *et al.*, 2008).

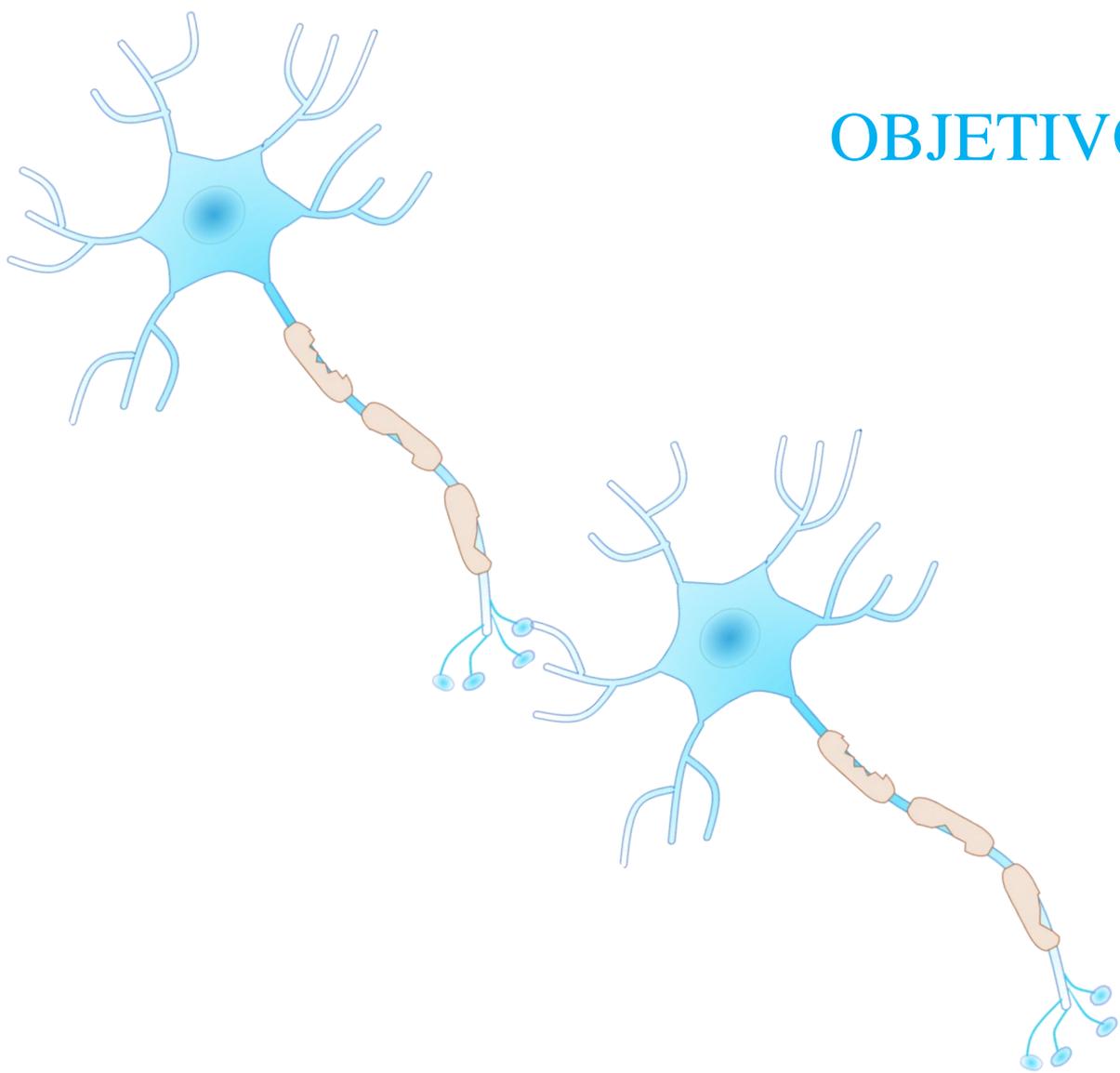
Existen muy pocos estudios que respalden el efecto terapéutico de la melatonina sobre este síntoma, pero el reciente estudio realizado por Aranda *et al.* (2021), afirma

que la melatonina minimizó algunos de los efectos inducidos por la neuritis óptica, así pues, previno la disminución del reflejo pupilar a la luz y las alteraciones del ritmo de la actividad locomotora de la retina (Aranda *et al.*, 2021). A pesar de ello, es necesario realizar más estudios que investiguen el papel y el mecanismo de actuación de la melatonina sobre la neuritis óptica.

Atendiendo a todos los antecedentes indicados, los objetivos de esta tesis doctoral son los siguientes:



OBJETIVOS



1. Objetivo general

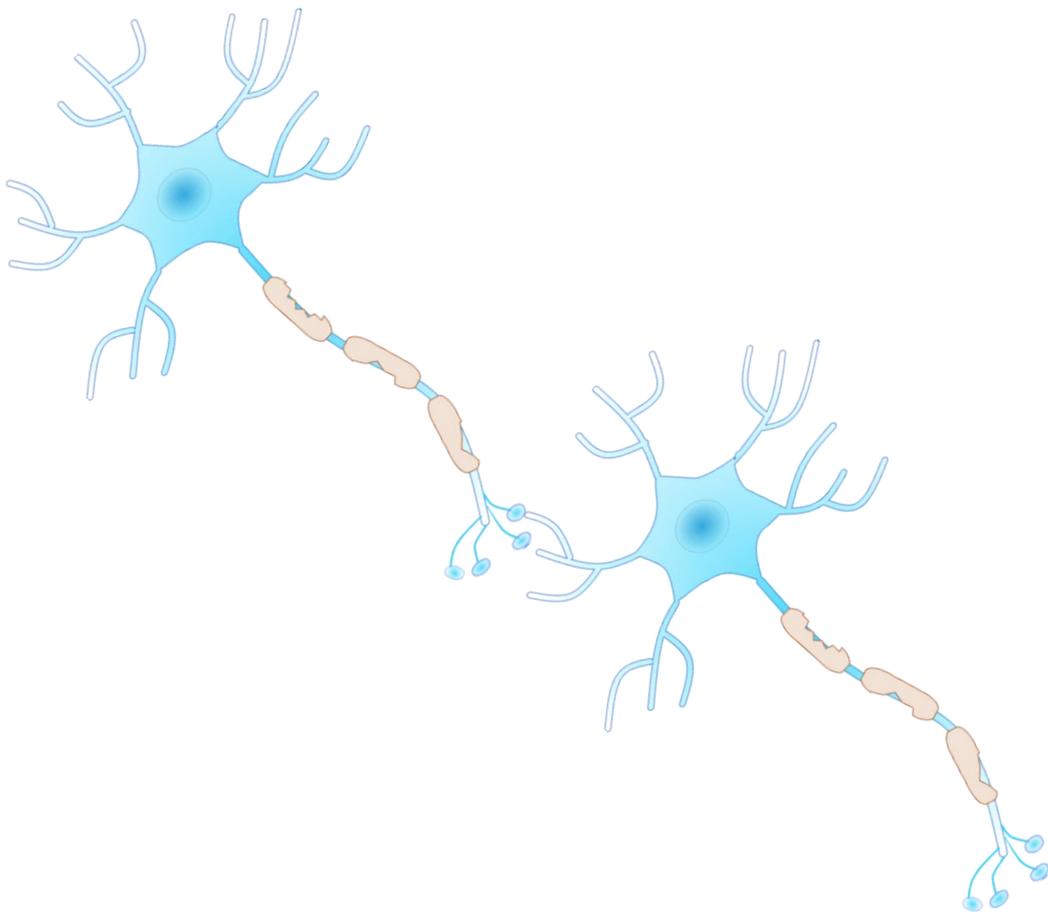
Evaluar el efecto de la administración de melatonina en la clínica del modelo de Esclerosis múltiple, la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental.

2. Objetivos específicos

- Valorar si la administración de melatonina en ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental, modelo animal de la esclerosis múltiple, actúa contra el estrés oxidativo provocado por la enfermedad, tanto en tejido nervioso como en otros órganos y tejidos fundamentales como hígado, riñón, corazón, intestino y sangre.
- Comprobar si la neuroinflamación disminuye en las ratas EAE suplementadas con melatonina con respecto al animal enfermo.
- Verificar si el producto de la disbiosis bacteriana intestinal, el lipopolisacárido de la pared bacteriana y su proteína transportadora, minoran en tejido nervioso con la administración de melatonina.



MATERIAL Y MÉTODOS



1. Animales

Para la realización de este estudio, un total de 25 ratas macho de la cepa Dark Agouti fueron utilizadas. Dicha cepa es la ideal para el estudio de la EM ya que, la inducción de la EAE en estos murinos, muestra un gran parecido clínico y patológico con esta enfermedad en humanos (Stosic-Grujicic *et al.*, 2004). Al comienzo del estudio, los animales, que provenían del Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba, tenían 2 meses de edad y un peso de 190-220g. Estos, fueron alojados en un recinto en condiciones estándar de 12:12 horas de luz/oscuridad, con una temperatura ambiente controlada (22 ± 2 °C) y con acceso “*ab libitum*” al agua y a la comida.

Todos los protocolos realizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba (07/11/2018/157) de acuerdo con las directrices de la Directiva del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/ECC) aprobada por el Consejo de las Comunidades Europeas y el RD 53/2013 aprobado por el Ministro de Presidencia de España (BOE 8 de Febrero, 2013).

2. Protocolo experimental

El estudio incluyó los siguientes grupos: grupo Control, grupo Control+Vehículo, grupo Control+Melatonina, grupo EAE y grupo EAE+Melatonina (Figura 5). El grupo control no fue manipulado y el grupo Control+Vehículo, fue inoculado con una inyección subcutánea de 100µl de adyuvante completo de Freund.

2.1. Inducción de EAE

La inducción de EAE en ratas Dark Agouti, imita ciertos aspectos del curso clínico de la EM-RR, como la desmielinización progresiva y sostenida, la pérdida axonal asociada (Ringheim *et al.*, 2013) y lesiones en la médula espinal con infiltración inflamatoria (Constantinescu *et al.*, 2011). Los adyuvantes de Freund son componentes fundamentales en los protocolos de inducción de muchos modelos animales experimentales de enfermedades autoinmunes. Existen dos tipos de adyuvantes de Freund, incompleto y completo, que actúan

prolongando la vida útil del autoantígeno inyectado, estimulando la activación del sistema inmunitario (Billiau and Matthys, 2001). Para la inducción de la EAE, el protocolo más utilizado se basa en el adyuvante completo de Freund, que induce una fuerte respuesta inflamatoria y ejerce, además de la actividad adyuvante, numerosas propiedades inmunomoduladoras (Stosic-Grujicic *et al.*, 2004). Este tipo de adyuvante, incluye componente micobacterianos que activan a las células Th1, lo que provoca una fuerte hipersensibilidad de tipo retardado contra los autoantígenos (Billiau and Matthys, 2001).

En nuestro estudio, la inducción de la EAE se llevó a cabo mediante inyección subcutánea, en la base dorsal de la cola y durante 14 días, de 100 µl de una solución que contenía 150µg de MOG (fragmento 35-55; Sigma-Aldrich, Madrid, España) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) emulsionada 1:1 en adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.), completado con 400 µg de *Mycobacterium tuberculosis* inactivado por calor (H37Ra, DIFCO, Detroit, MI, EE.UU).

2.2.Administración de Melatonina

La melatonina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) fue administrada a los grupos correspondientes a una dosis de 1 mg/kg de peso corporal inyectada vía intraperitoneal (ip) (en etanol al 5 % en NaCl al 0,9 %), durante 51 días a partir del día 14 hasta el día 65, una vez al día, cinco días a la semana (de lunes a viernes) y en horario de 9:00 a 11:00 de mañana, para así, no interferir con la liberación circadiana de esta (Túnez *et al.*, 2004). Tanto para el grupo Control+Melatonina como para el grupo EAE+ Melatonina, se empleó la misma dosis. La duración de la exposición *in vivo* se determinó sobre la base de estudios previos de nuestro grupo que mostraron el efecto protector de otros antioxidantes (Tasset, Pontes, *et al.*, 2011; Conde *et al.*, 2019, 2020). Durante el período experimental no se observaron alteraciones en el comportamiento de los animales, el sueño o la temperatura corporal.

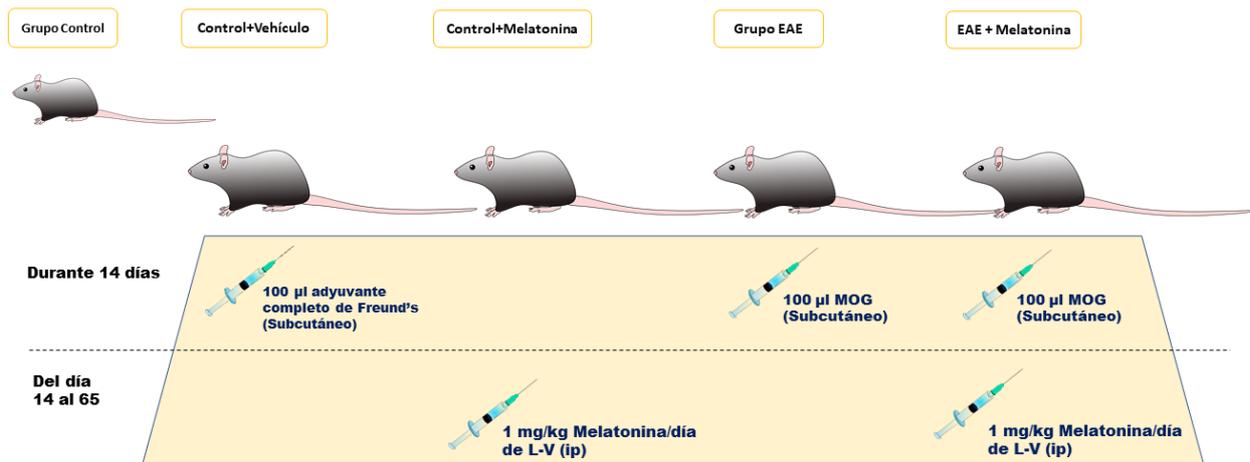


Figura 5. Protocolo Experimental. MOG: Glicoproteína de oligodendrocitos de mielina; L-V: de lunes a viernes; ip: Intraperitoneal.

3. Toma de muestras y procesamiento

A los 65 días, los animales se sacrificaron por decapitación habiendo sido previamente anestesiados con una inyección intraperitoneal de Ketamina 75 mg/kg (Imalgene® 100 mg/ml, Merial Laboratorios, Barcelona). El sacrificio de los animales se llevó a cabo durante la mañana debido a que, en este estudio, no valoramos el ritmo circadiano de la melatonina sino el efecto de la administración exógena de esta. Realizar el sacrificio en este momento nos permite, también, tener una visión objetiva del impacto de la melatonina administrada, sobre los niveles circulantes de los parámetros a analizar, ya que estos podrían verse afectados por la concentración fisiológicamente más elevada de la melatonina, en su pico nocturno.

Se tomaron muestras de sangre del tronco vascular del cuello, que fueron recogidas en tubos con EDTA-K3 (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Los tubos se centrifugaron durante 15 min a 3000 rpm a 4 °C y posteriormente se recolectó el plasma, se congeló y almacenó en alícuotas a -85 °C.

A continuación, y en condiciones de temperatura controlada (0-4°C) se procedió a extraer y pesar el cerebro, la médula espinal, el corazón, el hígado, el riñón y los intestinos (delgado y grueso) para preparar inmediatamente los homogeneizados correspondientes con un homogeneizador mecánico (Tempest Virtis Labsquip, Markham, Canada.). Para la homogeneización se utilizó el tampón Tris (20 mM) a pH 7,4.

4. Variables analizadas

Se analizaron los siguientes parámetros.

4.1. Evaluación de puntuación clínica

La puntuación clínica fue determinada de acuerdo con la escala de Pérez-Nievas (Pérez-Nievas *et al.*, 2010) según la cual: 0: sin signos; 1: parálisis de la cola; 2: debilidad de las patas traseras; 3: parálisis de las patas traseras; 4: parálisis en las patas traseras y debilidad en las patas delanteras; 5: tetrapléjico. Se monitorizó a los animales desde el día 14 al día 65 y se compararon las puntuaciones entre ambos días.

4.2. Biomarcadores de daño oxidativo en sangre, cerebro, médula espinal, corazón, hígado, riñón, intestinos (delgado y grueso)

Se analizaron los niveles de LPO (nmol/mg de hemoglobina en sangre o proteína en cerebro, médula espinal, corazón, hígado, riñón e intestinos), Glutación total (tG) (nmol/mg hemoglobina en sangre o proteína en cerebro, médula espinal, corazón, hígado, riñón, intestino delgado y grueso), GSH (nmol/mg hemoglobina en sangre o proteína en cerebro, columna médula espinal, corazón, hígado, riñón, intestino delgado y grueso), GSSG (nmol/mg de hemoglobina en sangre o proteína en cerebro, médula espinal, corazón, hígado, riñón, intestino delgado y grueso), GPx (nmol/mg de hemoglobina en sangre o proteína en cerebro, médula espinal, corazón, hígado, riñón, intestino delgado y grueso) y la relación GSH/GSSG. Estos parámetros fueron analizados por espectrofotometría con reactivos Bioxytech SA (Oxis International; Portland, OR, USA), con un espectrofotómetro Shimadzu (UV 1603; Kyoto, Japón), empleando los kits de reactivos LPO 586 (LPO), GSH 420 (tG), GSH 400 (GSH) y GSH 412 (GSSG). Para la determinación de GPx se usó el método Flohé and Günzler. Este

método se basa en realizar un ensayo a tiempo fijo que mide el consumo de GSH, un ensayo a tiempo fijo para medir el consumo de H₂O₂ y un monitoreo continuo de la formación de GSSG (Flohé and Günzler, 1984).

Se midieron las PC (nmol/g de hemoglobina en sangre o proteína en cerebro, médula espinal, corazón, hígado, riñón, intestino delgado y grueso) analizando el contenido de carbonilo mediante el método de Levine *et al.* (1990), el cual se basa en la reacción del grupo carbonilo con 2,4-dinitrofenilhidracina para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona. Posteriormente, se hace una medición en un espectrofotómetro Shimadzu (UV-1603; Kyoto, Japón) a una longitud de onda de 360 nm (Levine *et al.*, 1990).

El nitrito total (nitrito + nitrato; NO_x) se midió como marcador de producción de NO y se analizó siguiendo el método de Griess (Ricart-Jané, Llobera and López-Tejero, 2002). Todos los nitratos se redujeron a nitrito y luego se determinó espectrofotométricamente el nitrito total a una longitud de onda de 540 nm con un espectrofotómetro Shimadzu (UV-1603; Kioto, Japón). Para la realización de este método se utiliza el reactivo de Griess, que está compuesto por una mezcla de sulfanilamida al 2% y N-(1-naftil)etilendiamina al 0.2% en agua desionizada. La sulfanilamida reacciona con el nitrito para formar sal de diazonio, que reacciona con el N-(1-naftil)etilendiamina para dar lugar a un producto de color púrpura que presenta un pico de absorbancia a 540nm. Los valores se presentaron en µmol/mg de proteína en cerebro y médula espinal y en µmol/mg de hemoglobina en sangre.

4.3. Factor de inflamación

El TNF- α se determinó mediante ELISA (acrónimo de *enzyme-linked immunosorbent assay*) (Max Discovery #2203). El valor se midió en pg/mg de proteína en cerebro y médula espinal.

El ELISA es un método considerado el estándar de “oro” de los inmunoensayos (Alhaji and Farhana, 2022), que muestra reacciones de antígeno-anticuerpo a través del cambio de

color, obtenido mediante el uso de un conjugado ligado a enzimas y un sustrato enzimático, permitiendo identificar la presencia y concentración de diferentes moléculas (Aydin, 2015). Se trata de una prueba inmunológica muy sensible a través de la que se pueden detectar y cuantificar anticuerpos, antígenos, proteínas, glicoproteínas y hormonas (Alhajj and Farhana, 2022).

4.4. Biomarcadores indirectos de disbiosis

El LPS se evaluó con el kit de cuantificación de endotoxinas cromogénicas Pierceâ LAL proporcionado por Thermo Scientific (EE. UU.). LPS catalizó la activación de una proenzima en el lisado de amebocitos de *Limulus* modificado, que luego catalizó la división de p-nitroamilina (pNA). La tasa de activación fue proporcional a la concentración de endotoxina de la muestra. El pNA liberado se midió fotométricamente a 405–410 nm. Los datos se expresan como unidades de endotoxina/mg de proteína en el cerebro y la médula espinal.

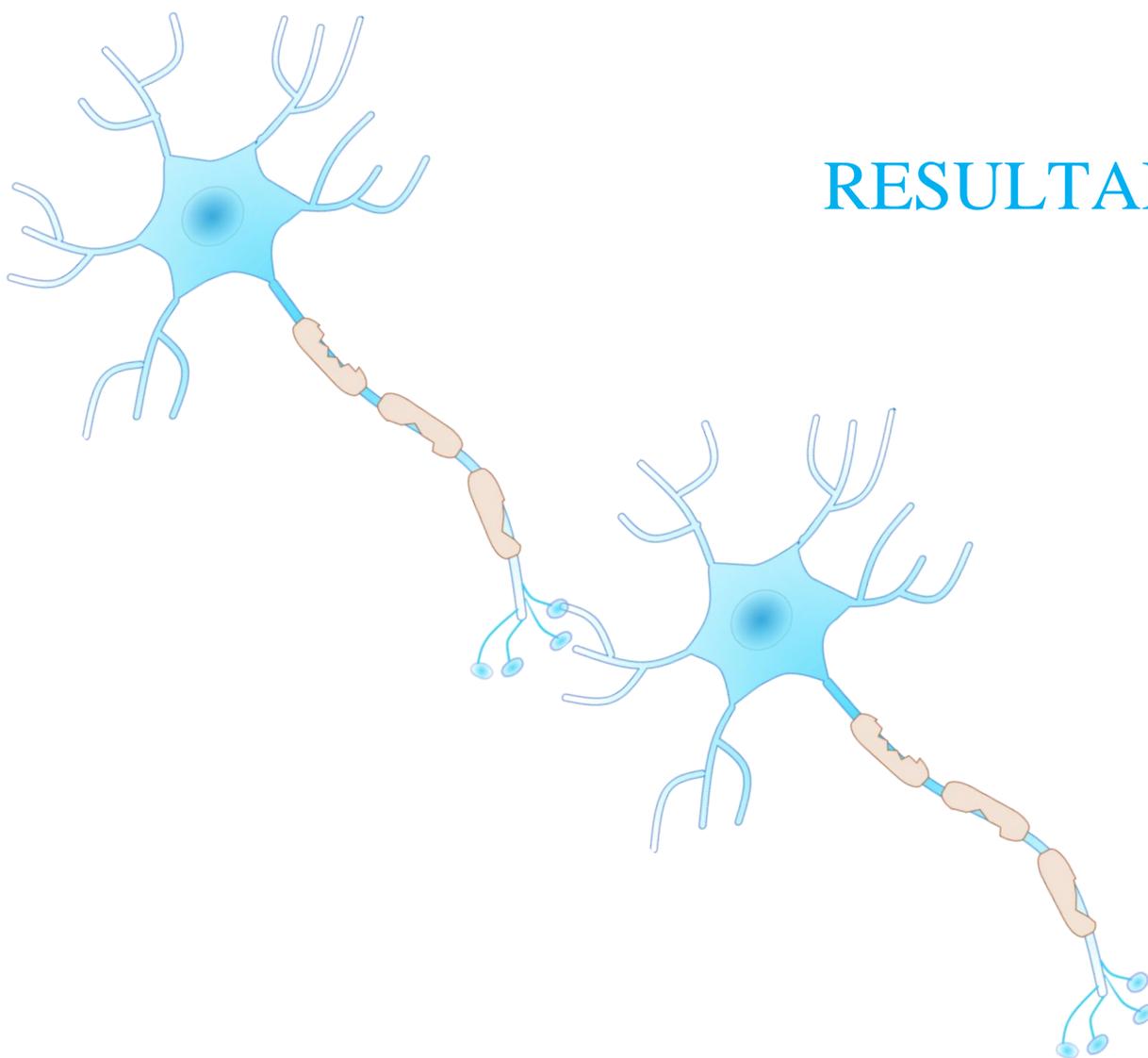
La evaluación de LBP se realizó con el kit ELISA de LBP soluble (Enzo®, Enzo Life Sciences (ELS), NY, EE. UU.). La cantidad de LBP se midió en un lector de microplacas ELISA. Los valores se presentan como pg/mg de proteína en cerebro y médula espinal.

5. Análisis estadístico

El estudio estadístico se realizó con la aplicación SPSS (SPSS INC. Versión 25 para Windows). Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar. Todos los grupos mostraron una distribución normal por lo que se utilizó un ANOVA de una vía y una prueba post-hoc de Bonferroni. Se establecieron diferencias estadísticas entre los diferentes grupos con el grupo control y entre el grupo EAE y EAE +Melatonina. Se realizó una correlación de Pearson para todos los parámetros estudiados. El nivel de significación estadística se fijó en $p < 0,05$.



RESULTADOS



1. Puntuación clínica

A los 14 días de comenzar el experimento, la puntuación clínica media en el grupo EAE fue $1,4000000 \pm 0,54772256$ y en el grupo EAE+Melatonina fue $1,6000000 \pm 0,54772256$. El día 65, la puntuación clínica media del grupo EAE fue $2,0000000 \pm 0,000000$, lo que supone un aumento de $0,60000 \pm 0,54772$ respecto al día 14. Por el contrario, la puntuación clínica media en el grupo EAE+Melatonina el día 65 fue $0,0000000 \pm 0,000000$, lo que indica una disminución de $-1,60000 \pm 0,54772$, en comparación con el día 14. Comparando las diferencias obtenidas entre el día 65 y el día 14, obtenemos diferencias significativas ($p < 0.001$) entre el grupo EAE+Melatonina, y el grupo EAE (Figura 6).

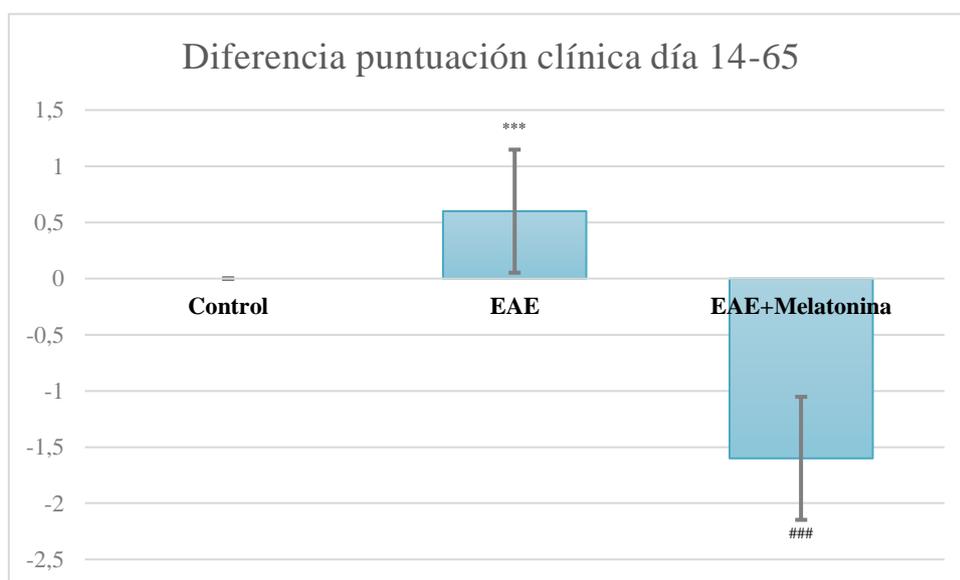


Figura 6. Diferencia entre las puntuaciones clínicas, en ratas Dark Agouti, obtenidas el día 14 frente a las obtenidas el día 65, en el grupo control (ratas sanas), en el grupo con EAE inducido con glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG; grupo EAE) y en el grupo con EAE inducido, suplementado con 1 mg/kg de peso corporal/día, de lunes a viernes de melatonina inyectada vía intraperitoneal (i.p) en etanol al 5 % en NaCl al 0,9 % (EAE+Melatonina). EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental.

*** $p < 0.001$ vs Control; ### $p < 0.001$ vs EAE.

2. Sistema Redox del Glutati3n.

Encontramos un incremento de los niveles de tG en el coraz3n, en el grupo EAE+Melatonina, respecto al grupo EAE ($p<0.001$). Del mismo modo, estos niveles experimentan un aumento en el grupo EAE+Melatonina, en comparaci3n con el grupo control, en sangre ($p<0.01$) y coraz3n ($p<0.001$), mientras que en los intestinos del grupo EAE+Melatonina se produce una disminuci3n de tG ($p<0.01$), respecto al control. En relaci3n con los niveles de GSH, observamos que la EAE provoca una disminuci3n de los mismos en todos los 3rganos analizados, compar3ndolos con los resultados obtenidos en el grupo control. Por el contrario, la suplementaci3n con melatonina (grupo EAE+Melatonina), produjo un aumento de estos niveles ($p<0.001$), en todos los 3rganos, con respecto al grupo EAE. Comparando los resultados de GSH en el grupo EAE+Melatonina con el grupo control, obtenemos que se produce un aumento de los mismos en sangre, intestinos ($p<0.01$) y coraz3n ($p<0.001$) y una disminuci3n en cerebro, h3gado ($p<0.001$) y ri3n3n ($p<0.01$), en el grupo suplementado con melatonina. Los valores de GSSG sufrieron un aumento en el grupo EAE, en todos los 3rganos, con respecto al grupo control, mientras que, en el grupo EAE+Melatonina, GSSG disminuye en todos los 3rganos ($p<0.001$), a excepci3n del h3gado, en el que no hay diferencias en comparaci3n con el grupo EAE. En comparaci3n con el grupo control, los niveles de GSSG aumentan en cerebro, h3gado ($p<0.001$), m3dula espinal y ri3n3n ($p<0.01$) y disminuyen en los intestinos ($p<0.001$) del grupo EAE+Melatonina. La relaci3n GSH/GSSG en el grupo EAE, disminuye en todos los 3rganos estudiados, con respecto al grupo control y, por el contrario, aumenta en el grupo EAE+Melatonina, excepto en el cerebro y el h3gado, los cuales no sufren cambios en comparaci3n con el grupo EAE. En el grupo EAE+Melatonina se produce un aumento en la relaci3n GSH/GSSG en coraz3n ($p<0.05$) e intestinos ($p<0.001$) y una disminuci3n en cerebro, sangre, ri3n3n e h3gado ($p<0.001$), con respecto al grupo control. Por 3ltimo, en el grupo EAE se produce una disminuci3n de los niveles de GPx respecto del grupo control. Estos niveles aumentan en el grupo

EAE+Melatonina, en todos los órganos evaluados, con respecto al grupo EAE. Comparando los resultados de GPx en el grupo EAE+Melatonina con el grupo control, obtenemos que se produce un aumento de estos niveles en sangre ($p<0.001$) y una disminución en cerebro, médula espinal, corazón y riñón ($p<0.001$) (Tabla II).

SISTEMA REDOX DEL GLUTATIÓN					
Cerebro	tG (nmol/mg proteína)	GSH (nmol/mg proteína)	GSSG (nmol/mg proteína)	GSH/GSSG	GPx (nmol/mg proteína)
Control	0.01254±0.00015	0.01090±0.00012	0.00164±0.00013	6.74000±0.59632	0.05036±0.0056
Control+Vehículo	0.01256±0.00050	0.01084±0.00005	0.00170±0.00046	6.82000±1.87334	0.04666±0.00208
Control+Melatonina	0.01278±0.00011	0.00808±0.00025 ^a	0.00472±0.00031 ^a	1.72800±0.14789 ^a	0.04450±0.00334
EAE	0.01280±0.00007	0.00482±0.00008 ^a	0.00794±0.00005 ^a	0.60800±0.01095 ^a	0.02148±0.00554 ^a
EAE+Melatonina	0.01278±0.00025	0.00576±0.00038 ^{a,d}	0.00700±0.00022 ^{a,d}	0.82600±0.08532 ^a	0.03534±0.00522 ^{a,d}
Médula espinal	tG (nmol/mg proteína)	GSH (nmol/mg proteína)	GSSG (nmol/mg proteína)	GSH/GSSG	GPx (nmol/mg proteína)
Control	0.01252±0.00046	0.00988±0.00042	0.00266±0.00009	3.70800±0.16664	0.06138±0.00205
Control+Vehículo	0.01258±0.00004	0.00974±0.00015	0.00282±0.00008	3.45000±0.17790	0.05820±0.00143
Control+Melatonina	0.01282±0.00029	0.00972±0.00055	0.00304±0.00029	3.24400±0.46339	0.05058±0.00106 ^a
EAE	0.01250±0.00024	0.00580±0.00010 ^a	0.00670±0.00022 ^a	0.86800±0.03899 ^a	0.02302±0.00130 ^a
EAE+Melatonina	0.01306±0.00017	0.00952±0.00082 ^d	0.00356±0.00078 ^{b,d}	2.88400±0.94563 ^d	0.03710±0.00363 ^{a,d}
Sangre	tG (nmol/mg Hb)	GSH (nmol/mg Hb)	GSSG (nmol/mg Hb)	GSH/GSSG	GPx (nmol/mg Hb)
Control	0.01172±0.00016	0.01050±0.00012	0.00122±0.00004	8.43000±0.07450	0.03932±0.00484
Control+Vehículo	0.01190±0.00032	0.01052±0.00029	0.00138±0.00004	7.74000±0.13490	0.03592±0.00344
Control+Melatonina	0.01308±0.00171	0.01110±0.00150	0.00198±0.00022	5.56000±0.21656 ^a	0.03812±0.00651 ^b
EAE	0.01312±0.00174	0.00502±0.00074 ^a	0.00808±0.00098 ^a	0.62400±0.02880 ^a	0.02846±0.00254 ^b
EAE+Melatonina	0.01476±0.01476 ^b	0.01266±0.00048 ^{b,d}	0.00210±0.00035 ^d	6.15200±1.08898 ^{a,d}	0.04492±0.00244 ^{a,d}
Corazón	tG (nmol/mg proteína)	GSH (nmol/mg proteína)	GSSG (nmol/mg proteína)	GSH/GSSG	GPx (nmol/mg proteína)
Control	0.01228±0.00018	0.00990±0.00019	0.00238±0.00034	4.26000±0.79659	0.06720±0.00329
Control+Vehículo	0.01208±0.00015	0.00920±0.00012	0.00286±0.00005	3.22200±0.02168	0.05960±0.00176
Control+Melatonina	0.01288±0.00026 ^b	0.01032±0.00071	0.00256±0.00086	4.77200±2.37198	0.06160±0.00213 ^c
EAE	0.01190±0.00012	0.00572±0.00009 ^a	0.00624±0.00017 ^a	0.91600±0.03781 ^b	0.02540±0.00152 ^a
EAE+Melatonina	0.01328±0.00044 ^{a,d}	0.01162±0.00032 ^{a,d}	0.00168±0.00019 ^d	6.98000±0.66359 ^{c,d}	0.05710±0.00474 ^{a,d}
Riñón	tG (nmol/mg proteína)	GSH (nmol/mg proteína)	GSSG (nmol/mg proteína)	GSH/GSSG	GPx (nmol/mg proteína)
Control	0.01250±0.00014	0.01048±0.00004	0.00206±0.00011	5.11200±0.27179	0.03190±0.00096
Control+Vehículo	0.01234±0.00009	0.00994±0.00009	0.00240±0.00000	4.16000±0.04301	0.03450±0.00062
Control+Melatonina	0.01270±0.00058	0.00952±0.00085 ^b	0.00316±0.00085 ^c	3.34600±1.24720 ^a	0.02840±0.00466
EAE	0.01278±0.00038	0.00662±0.00008 ^a	0.00616±0.00033 ^a	1.08200±0.04438 ^a	0.01080±0.00193 ^a

	tG (nmol/mg proteína)	GSH (nmol/mg proteína)	GSSG (nmol/mg proteína)	GSH/GSSG	GPx (nmol/mg proteína)
EAE+Melatonina	0.01268±0.00008	0.00942±0.00029 ^{b,d}	0.00320±0.00037 ^{b,d}	2.97600±0.39563 ^{a,d}	0.01960±0.00218 ^{a,d}
Hígado					
Control	0.01264±0.00011	0.01112±0.00018	0.00150±0.00019	7.59000±0.97419	0.05210±0.00582
Control+Vehículo	0.01310±0.00012	0.01118±0.00010	0.00192±0.00015	5.80000±0.54914	0.05230±0.00362
Control+Melatonina	0.01268±0.00021	0.01076±0.00053	0.00192±0.00035	5.80000±1.27908 ^b	0.05360±0.00585
EAE	0.01254±0.00020	0.00868±0.00008 ^a	0.00384±0.00027 ^a	2.26800±0.15156 ^a	0.02330±0.00478 ^a
EAE+Melatonina	0.01280±0.00014	0.00928±0.00033 ^{a,d}	0.00350±0.00019 ^a	2.63000±0.20917 ^a	0.04050±0.01356 ^e
Intestinos					
Control	0.01242±0.00015	0.00978±0.00004	0.00270±0.00012	3.64200±0.20693	0.02240±0.00073
Control+Vehículo	0.01192±0.00004	0.00932±0.00010	0.00260±0.00014	3.65200±0.23134	0.02270±0.00090
Control+Melatonina	0.01212±0.00010	0.01000±0.00014	0.00210±0.00012 ^a	4.72800±0.30244 ^a	0.02250±0.00098
EAE	0.01218±0.00004	0.00732±0.00008 ^a	0.00484±0.00011 ^a	1.51800±0.05119 ^a	0.00830±0.00064 ^a
EAE+Melatonina	0.01202±0.00033 ^b	0.01020±0.00030 ^{b,d}	0.00182±0.00013 ^{a,d}	5.57200±0.35003 ^{a,d}	0.02210±0.00059 ^d

Tabla II. Valores medios \pm desviación estándar del Ciclo Redox del Glutatión en ratas Control; Control+Vehículo, inoculadas con inyección subcutánea de 100 μ l de adyuvante completo de Freund; Control+Melatonina, inyectadas con una dosis de melatonina de 1 mg/kg de peso corporal/ip (intraperitoneal) en etanol al 5% en NaCl al 0,9%, una vez al día, cinco días a la semana; ratas con encefalomiélitis autoinmune experimental (EAE) inducida mediante glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) (grupo EAE) y ratas con EAE inducida a las que se le inyectó una dosis de melatonina de 1 mg/kg de peso corporal/ip en etanol al 5% en NaCl al 0,9%, una vez al día, cinco días a la semana (grupo EAE+Melatonina). Se analizaron los valores de glutatión total (tG); valores de glutatión reducido (GSH); valores de glutatión oxidado (GSSG); los valores de la relación GSH/GSSG y los valores de glutatión peroxidasa (GPx).

^a p < 0.001 vs Control; ^b p < 0.01 vs Control; ^c p < .05 vs Control; ^d p < 0.001 vs EAE, ^e p < 0.01 vs EAE.

3. Biomarcadores de Estrés Oxidativo

Los niveles de PC aumentan en el grupo EAE, en todos los órganos estudiados, excepto en el corazón, que no presenta diferencias en comparación con el grupo control. Sin embargo, en el grupo EAE+Melatonina, observamos una disminución de PC, salvo en sangre y en el corazón, que no muestran diferencias con respecto al grupo EAE. Comparando el grupo EAE+Melatonina con el grupo control, obtenemos que los niveles de PC experimentan un aumento en cerebro, médula espinal, hígado e intestinos (p<0.001) (Figura 7). Los valores de

LPO sufren un incremento en el grupo EAE, con respecto al grupo control, mientras que en el grupo EAE+Melatonina, se produce una disminución de estos valores, en todos los órganos analizados, salvo en el corazón, en el que LPO aumenta ($p < 0.001$) en comparación con EAE (Figura 8). Con respecto al grupo control, los niveles de LPO en el grupo EAE+Melatonina aumentan en cerebro, médula espinal, corazón, riñón e hígado ($p < 0.001$). Asimismo, NOx aumenta en todos los órganos en el grupo EAE, respecto del control y disminuye en EAE+Melatonina con respecto a EAE. Los niveles de NOx son superiores en el grupo EAE+Melatonina en cerebro, médula espinal, sangre y corazón ($p < 0.001$), en comparación con el grupo control (Figura 9).

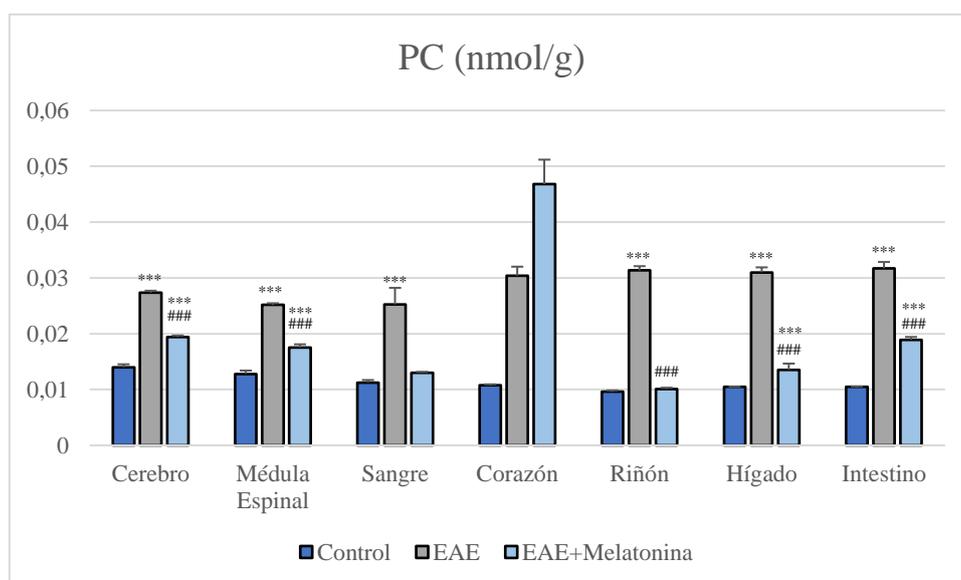


Figura 7. Valores medios \pm desviación estándar de proteínas carboniladas (PC) en el grupo control; grupo con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) inducida mediante inyección subcutánea de 100 μ l de glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) y grupo EAE+Melatonina, con EAE inducida y suplementado con una dosis de melatonina de 1 mg/kg de peso corporal/ip (intraperitoneal) en etanol al 5% en NaCl al 0,9%, una vez al día, cinco días a la semana, en cada uno de los órganos analizados.

*** $p < 0.001$ vs Control; ### $p < 0.001$ vs EAE.

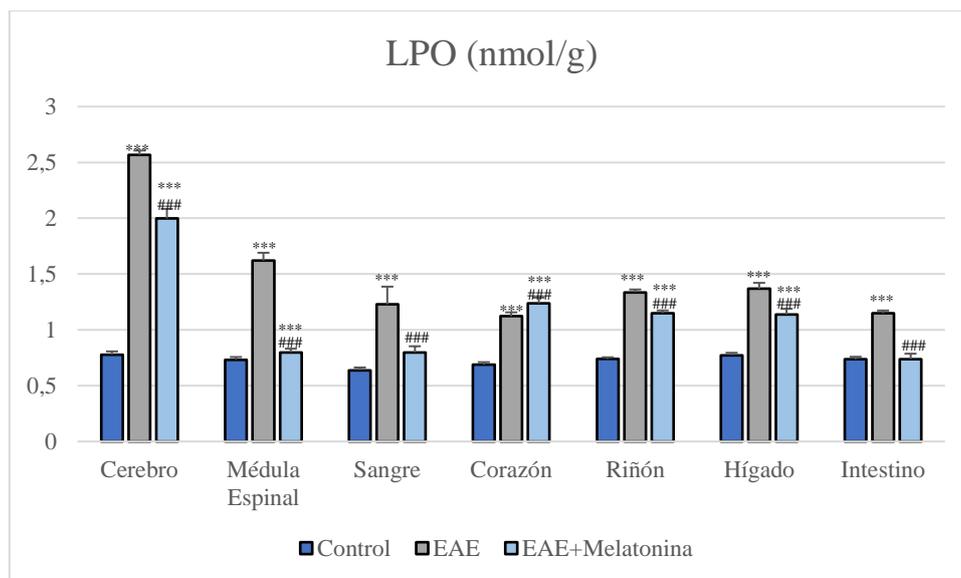


Figura 8. Valores medios \pm desviación estándar de productos de peroxidación lipídica (LPO) en el grupo control; grupo con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) inducida mediante inyección subcutánea de 100 μ l de glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) y grupo EAE+Melatonina, con EAE inducida y suplementado con una dosis de melatonina de 1 mg/kg de peso corporal/ip (intraperitoneal) en etanol al 5% en NaCl al 0,9%, una vez al día, cinco días a la semana, en cada uno de los órganos analizados.

*** $p < 0.001$ vs Control; ### $p < 0.001$ vs EAE.

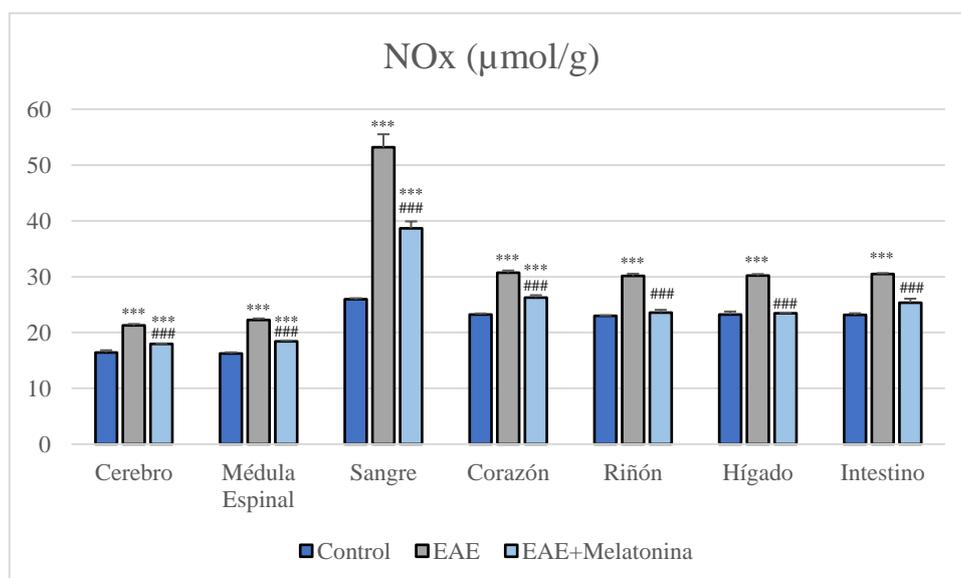


Figura 9. Valores medios \pm desviación estándar de nitrito total (nitrito + nitrato; NO_x) en el grupo control, grupo con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) inducida mediante inyección subcutánea de 100 μ l de glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) y grupo EAE+Melatonina, con EAE inducida y suplementado con una dosis de melatonina de 1 mg/kg de peso corporal/ip (intraperitoneal) en etanol al 5% en NaCl al 0,9%, una vez al día, cinco días a la semana, en cada uno de los órganos analizados.

*** p < 0.001 vs Control; ### p < 0.001 vs EAE.

4. Factor de Inflamación

En el grupo EAE los niveles de TNF- α , experimentan un aumento respecto del grupo control, tanto en el cerebro como en la médula espinal (p<0.001). La adición de melatonina supuso una disminución en los valores de TNF- α con respecto a EAE en cerebro y en la médula espinal (p<0.001). En comparación con el grupo control, los niveles de TNF- α fueron significativamente menores (p<0.05) en el grupo EAE+Melatonina (Tabla 3).

Factor de Inflamación	
Cerebro	TNF- α (pg/mg proteína)
Control	3.5160 \pm 0.08264
Control+Vehículo	4.1480 \pm 0.46262
Control+Melatonina	3.9300 \pm 0.54429
EAE	5.2860 \pm 0.03130 ^a
EAE+Melatonina	2.6760 \pm 0.43270 ^{c,d}
Médula espinal	TNF- α (pg/mg proteína)
Control	2.8820 \pm 0.06419
Control+Vehículo	2.9580 \pm 0.01789
Control+Melatonina	2.9660 \pm 0.02546
EAE	3.5340 \pm 0.11238 ^a
EAE+Melatonina	2.5180 \pm 0.35330 ^{c,d}

Tabla III. Valores medios \pm desviación estándar de TNF- α en ratas Control; Control+Vehículo, inoculadas con inyección subcutánea de 100 μ l de adyuvante completo de Freund; Control+Melatonina, inyectadas con una dosis de melatonina de 1 mg/kg de peso corporal/ip en etanol al 5% en NaCl al 0,9%, una vez al día, cinco días a la semana; ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) inducida mediante glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) (grupo EAE) y ratas con EAE inducida a las que se le inyectó una dosis de

melatonina de 1 mg/kg de peso corporal/ip (intraperitoneal) en etanol al 5% en NaCl al 0,9%, una vez al día, cinco días a la semana (grupo EAE+Melatonina).

^a $p < 0.001$ vs Control; ^c $p < 0.05$ vs Control; ^d $p < 0.001$ vs EAE.

5. Biomarcadores Indirectos de Disbiosis

La EAE provoca un aumento de los niveles de LPS y LBP, tanto en el cerebro como en la médula espinal, en comparación con el grupo control. Sin embargo, la melatonina provoca el efecto opuesto, disminuyendo los niveles de ambos biomarcadores, respecto de EAE. Los niveles de LBP en el grupo EAE+Melatonina disminuyen en el cerebro ($p < 0.001$) y aumentan en la médula ($p < 0.05$), respecto al grupo control (Figura 10 y Figura 11).

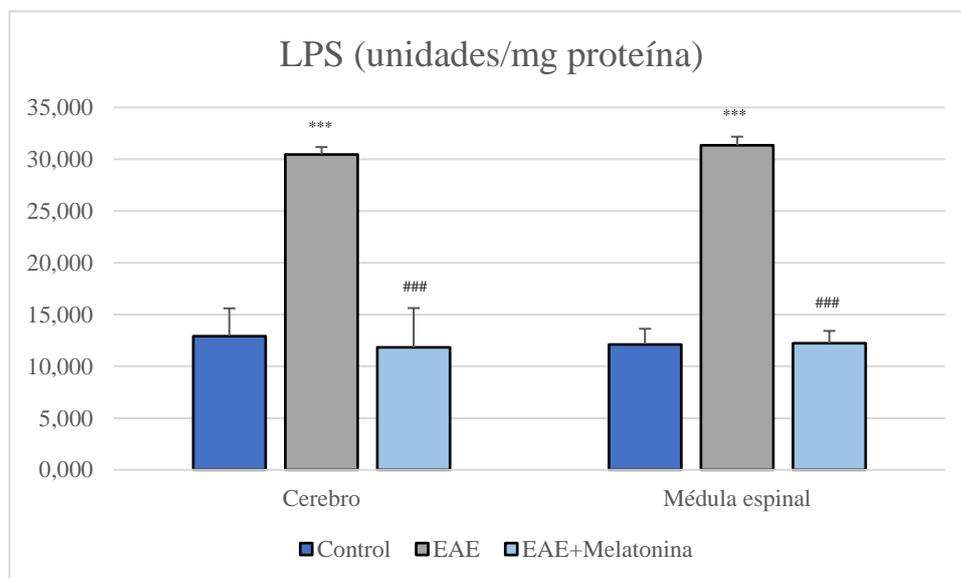


Figura 10. Valores medios \pm desviación estándar de los valores de lipopolisacárido bacteriano (LPS) en el grupo control; grupo con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) inducida mediante inyección subcutánea de 100 μ l de glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) y grupo EAE+Melatonina, con EAE inducida y suplementado con una dosis de melatonina de 1 mg/kg de peso corporal/ip (intraperitoneal) en etanol al 5% en NaCl al 0,9%, una vez al día, cinco días a la semana, en cada uno de los órganos analizados.

*** $p < 0.001$ vs Control; ### $p < 0.001$ vs EAE.

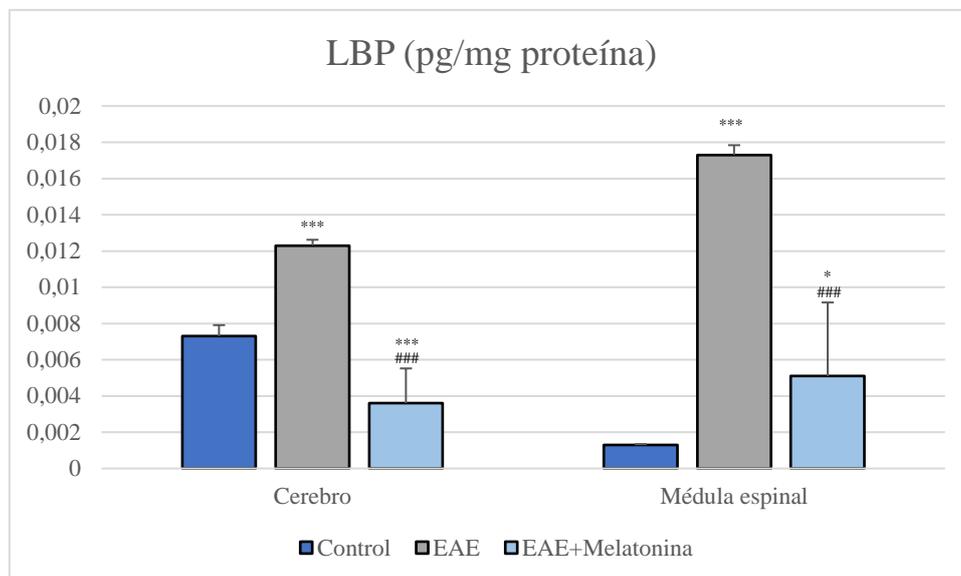


Figura 11. Valores medios \pm desviación estándar de los valores de la proteína de unión al lipopolisacárido (LBP) en el grupo control; grupo con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) inducida mediante inyección subcutánea de 100 μ l de glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) y grupo EAE+Melatonina, con EAE inducida y suplementado con una dosis de melatonina de 1 mg/kg de peso corporal/ip (intraperitoneal) en etanol al 5% en NaCl al 0,9%, una vez al día, cinco días a la semana, en cada uno de los órganos analizados.

*** $p < 0.001$ vs Control; * $p < 0.05$ vs Control; ### $p < 0.001$ vs EAE.

6. Correlaciones de Pearson

Se analizaron las correlaciones entre los parámetros estudiados en todos los órganos. A nivel del SNC, obtenemos tanto en el cerebro como en la médula espinal, correlaciones positivas entre GSSG y los biomarcadores de estrés oxidativo ($p < 0.01$). En la médula espinal, obtenemos también una correlación positiva entre GSSG, TNF- α y los biomarcadores indirectos de disbiosis ($p < 0.01$), mientras que en el cerebro solo obtenemos una correlación positiva entre GSSG y LPS ($p < 0.01$). Asimismo, GSSG muestra correlaciones negativas tanto con GSH como con GPx, en ambos órganos. Por el contrario, GSH muestra correlaciones negativas con LPO, PC y NOx, tanto en el cerebro como en la médula espinal ($p < 0.01$),

correlacionándose negativamente, también, con TNF- α , LPS y LBP, en la médula espinal ($p < 0.01$) y con LPS en el cerebro ($p < 0.01$). Se establecen, además, correlaciones positivas entre GSH y GPx, en el SNC. Por su parte, GPx presenta correlaciones negativas con los biomarcadores de estrés oxidativo, el factor de inflamación y los biomarcadores indirectos de disbiosis bacteriana, en el cerebro y médula espinal. Los biomarcadores de estrés oxidativo tienen correlaciones positivas tanto con TNF- α como con LPS y LBP, en ambos órganos, salvo LPO que no presenta correlación con TNF- α ni con LBP, en el cerebro. Finalmente, en ambos órganos se establecen correlaciones positivas entre TNF- α y los marcadores de disbiosis (Tabla IV).

En el resto de órganos estudiados, se establecen correlaciones positivas entre GSSG y los biomarcadores de estrés oxidativo ($p < 0.01$), salvo en el corazón, en el que solo existe correlación entre GSSG y NOx. Por el contrario, GSH y GPx muestran correlaciones negativas con LPO, PC y NOx en todos los órganos, salvo en el corazón, en el que GSH solo presenta una correlación negativa con NOx y GPx se correlaciona negativamente con LPO y NOx (Tabla V y Tabla VI).

	GSH		GSSG		GSH/GSSG		GPx		PC		LPO		NOx		TNF- α		LPS	
	Cerebro	Médula espinal	Cerebro	Médula espinal	Cerebro	Médula espinal	Cerebro	Médula espinal	Cerebro	Médula espinal	Cerebro	Médula espinal						
GSH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GSSG	-0,995**	-0,980**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GSH/GSSG	0,916**	0,967**	-0,942**	-0,977**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GPx	0,838**	0,796**	-0,827**	-0,866**	0,678**	0,825**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PC	-0,860**	-0,895**	0,848**	0,942**	-0,667**	-0,884**	-0,918**	-0,938**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LPO	-0,966**	-0,954**	0,963**	0,959**	-0,854**	-0,903**	-0,918**	-0,825**	0,929**	0,913**	-	-	-	-	-	-	-	-
NOx	-0,853**	-0,903**	0,855**	0,951**	-0,800**	-0,892**	-0,831**	-0,936**	0,875**	0,993**	0,894**	0,935**	-	-	-	-	-	-
TNF-α	0	-0,653**	0	0,619**	0	-0,500*	-0,447*	-0,431*	0,486*	0,557**	0	0,768**	0,547**	0,585**	-	-	-	-
LPS	-0,564**	-0,941**	0,548**	0,938**	0	-0,870**	-0,730**	-0,781**	0,830**	0,896**	0,682**	0,984**	0,770**	0,916**	0,762**	0,811**	-	-
LBP	0	-0,902**	0	0,914**	0	-0,853**	-0,432*	-0,873**	0,537**	0,948**	0	0,938**	0,583**	0,953**	0,848**	0,645**	0,880**	0,925**

Tabla IV. Correlaciones de Pearson establecidas entre los parámetros del ciclo redox del glutatión (GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; GPx: glutatión peroxidasa y relación GSH/GSSG), los biomarcadores de estrés oxidativo (PC: proteínas carboniladas; LPO: productos de peroxidación lipídica; NOx: nitrito total (nitrito + nitrato)), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y los biomarcadores indirectos de disbiosis (LPS: Lipopolisacárido y LBP: proteína de unión al lipopolisacárido) en el cerebro y la médula espinal. Los valores negativos indican una correlación negativa (inversa) entre los parámetros, mientras que los valores positivos indican una correlación positiva (directa). El valor “0” muestra que no hay correlación entre los parámetros. **p<0.01; *p<0.05.

	GSH			GSSG			GSH/GSSG			GPx			PC			LPO		
	Sangre	Corazón	Riñón	Sangre	Corazón	Riñón	Sangre	Corazón	Riñón	Sangre	Corazón	Riñón	Sangre	Corazón	Riñón	Sangre	Corazón	Riñón
GSH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GSSG	-0,841**	-0,972**	-0,978**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratio	0,766**	0,910**	0,926**	-0,947**	-0,884**	-0,951**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GPx	0,678**	0,824**	0,836**	-0,636**	-0,885**	-0,817**	0,582**	0,596**	0,778**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PC	-0,806**	0	-0,930**	0,992**	0	0,926**	-0,918**	0	-0,789**	-0,634**	0	-0,799**	-	-	-	-	-	-
LPO	-0,673**	0	-0,793**	0,952**	0	0,809**	-0,933**	0	-0,793**	-0,545**	-0,588*	-0,929**	0,957**	0,606**	0,780**	-	-	-
NOx	-0,666**	-0,676**	-0,902**	0,933**	0,790**	0,905**	-0,933**	-0,435*	-0,768**	-0,417*	-0,934**	-0,815**	0,924**	0	0,990**	0,934**	0,756**	0,825**

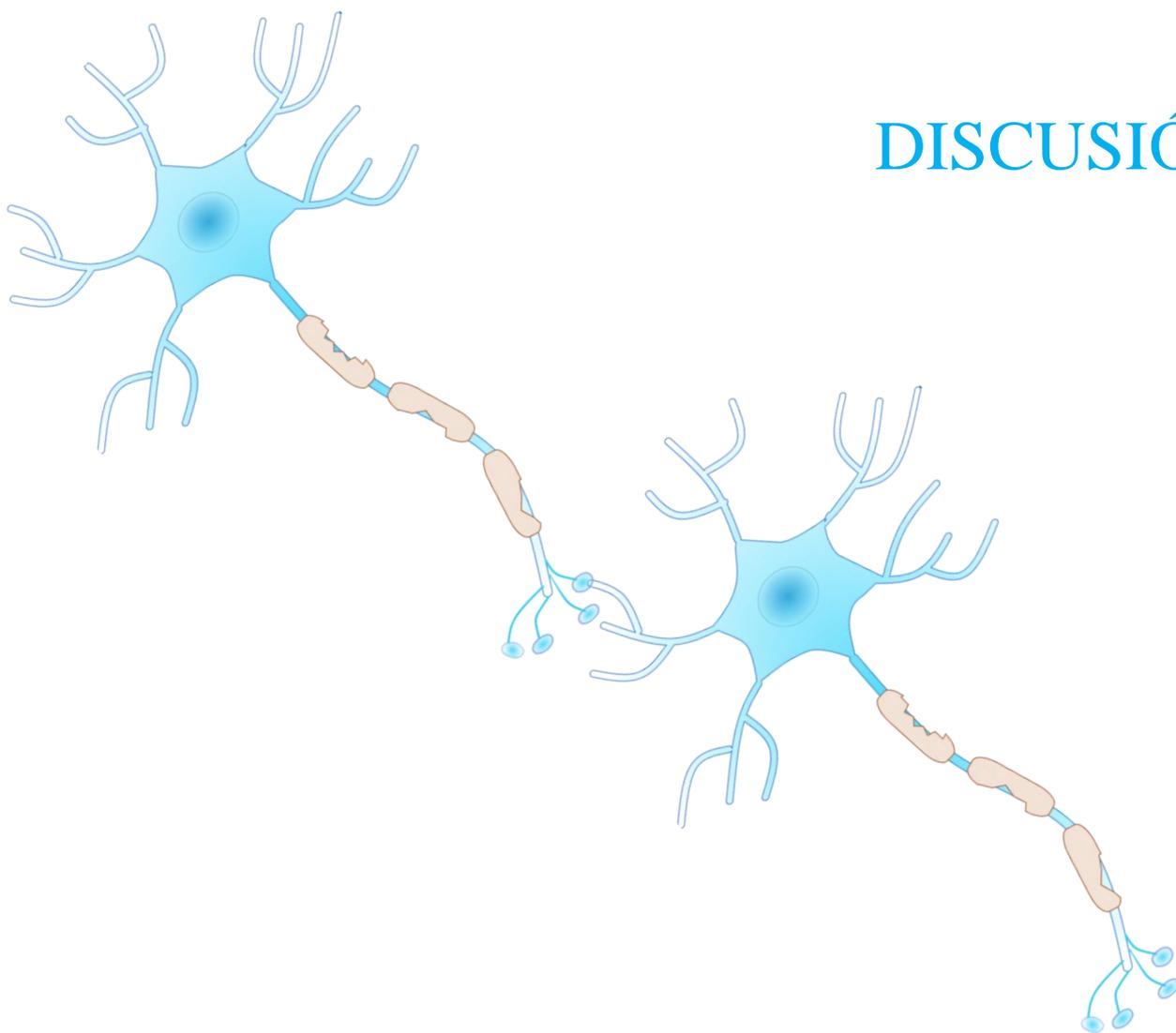
Tabla V. Correlaciones de Pearson establecidas entre los parámetros del ciclo redox del glutatión (GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; GPx: glutatión peroxidasa y relación GSH/GSSG) y los biomarcadores de estrés oxidativo (PC: proteínas carboniladas; LPO: productos de peroxidación lipídica; NOx: nitrito total (nitrito + nitrato)), en sangre, corazón y riñón. Los valores negativos indican una correlación negativa (inversa) entre los parámetros, mientras que los valores positivos indican una correlación positiva (directa). El valor “0” muestra que no hay correlación entre los parámetros. **p<0.01; *p<0.05.

	GSH		GSSG		GSH/GSSG		GPx		PC		LPO	
	Hígado	Intestinos	Hígado	Intestinos	Hígado	Intestinos	Hígado	Intestinos	Hígado	Intestinos	Hígado	Intestinos
GSH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GSSG	-0,972**	-0,973**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GSH/GSSG	0,932**	0,928**	-0,971**	-0,964**	-	-	-	-	-	-	-	-
GPx	0,825**	0,935**	-0,783**	-0,934**	0,705**	0,818**	-	-	-	-	-	-
PC	-0,801**	-0,792**	0,768**	0,777**	-0,683**	-0,591**	-0,843**	-0,920**	-	-	-	-
LPO	-0,950**	-0,912**	0,935**	0,931**	-0,878**	-0,814**	-0,817**	-0,975**	0,882**	0,914**	-	-
NOx	-0,711**	-0,799**	0,682**	0,811**	-0,600**	-0,640**	-0,770**	-0,926**	0,981**	0,988**	0,824**	0,932**

Tabla V. Correlaciones de Pearson establecidas entre los parámetros del ciclo redox del glutati6n (GSH: glutati6n reducido; GSSG: glutati6n oxidado; GPx: glutati6n peroxidasa y relaci6n GSH/GSSG) y los biomarcadores de estr6s oxidativo (PC: prote6nas carboniladas; LPO: productos de peroxidaci6n lip6dica; NOx: nitrito total (nitrito + nitrato)), en h6gado e intestinos. Los valores negativos indican una correlaci6n negativa (inversa) entre los par6metros, mientras que los valores positivos indican una correlaci6n positiva (directa). **p<0.01; *p<0.05.



DISCUSIÓN



La melatonina es una hormona que presenta unas propiedades únicas (Miller *et al.*, 2014) que incluyen la desintoxicación de radicales libres y potentes acciones antioxidantes (Tordjman *et al.*, 2017), capacidad antiinflamatoria e inmunomoduladora y capacidad antiapoptótica, así como un efecto antitumoral y neuroprotector (Reiter *et al.*, 2000; Esposito and Cuzzocrea, 2010; Rosales-Corral *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Bahamonde *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de las amplias aplicaciones clínicas potenciales de la melatonina y su alto perfil de seguridad, es sorprendente ver que el papel de la melatonina en los ensayos clínicos en humanos se ha limitado, principalmente, a los problemas del sueño (Tordjman *et al.*, 2017). Las características que presenta la melatonina serían de gran utilidad en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, las cuales comparten características fisiopatológicas comunes, como la interrupción del ritmo circadiano, el aumento del estrés oxidativo, la neuroinflamación, la pérdida neuronal y la disfunción mitocondrial (Reiter *et al.*, 2007; Chen, Zhang and Lee, 2020; Gunata, Parlakpinar and Acet, 2020).

El primer informe patológico de la EM fue publicado por Jean-Martin Charcot en *Leçons du mardi* en 1868, donde estableció la definición “*La sclerose en plaques*” (Dutta and Trapp, 2014). Se trata de la enfermedad neurológica inflamatoria más común en jóvenes adultos y, actualmente, sigue siendo incurable (Reich, Lucchinetti and Calabresi, 2018; Wallin *et al.*, 2019). A pesar de los diversos medicamentos modificadores de la enfermedad, que reducen la frecuencia de las recaídas y limitan la acumulación de lesiones focales en la sustancia blanca, ninguno de ellos previene o revierte por completo el deterioro neurológico progresivo (Reich, Lucchinetti and Calabresi, 2018). En el transcurso de la EM, se activan diversos mecanismos celulares y moleculares, que provocan inflamación y estrés oxidativo. Estos mecanismos, se activan también en el modelo EAE inducido en ratas Dark Agouti, lo que permite reproducir las características fisiopatológicas de la EM en humanos.

Los resultados de este estudio muestran que la administración de una dosis de 1mg/kg de melatonina durante 51 días provoca un cambio significativo en el curso de la EAE, disminuyendo tanto el estrés oxidativo y la inflamación como la disbiosis y mejorando la evolución clínica de la enfermedad.

Diferentes estudios han demostrado la presencia definitiva de estrés oxidativo en la EM (Holton and Kirkland, 2020). En esta línea, nuestro grupo ha hecho importantes aportaciones al respecto, demostrando que los pacientes con EM presentan niveles elevados de los principales biomarcadores de estrés oxidativo, así como una deficiencia global de antioxidantes (Bahamonde *et al.*, 2014), probando la existencia de estrés oxidativo tanto en órganos nerviosos como en tejidos y órganos no nerviosos (Conde *et al.*, 2019). En el estudio de Miller *et al.* (2013) comprobaron que la administración oral de 10mg diarios de esta hormona todas las tardes a las 18:00h durante 30 días, provocó un aumento estadísticamente significativo de los niveles de SOD y GPx, así como una disminución de malondialdehido (MDA), en los eritrocitos de pacientes con EM-SP (Miller *et al.*, 2013). Del mismo modo, AboTaleb & Alghamdi (2020) evidenciaron el papel como agente antioxidante de la melatonina, al administrar 80 mg/kg de esta, por vía intraperitoneal, diariamente, durante 9 semanas, a ratones con EM inducida por cuprizona, observando un aumento significativo de los niveles de CAT, SOD, GPx y GSH y una reducción de MDA (AboTaleb and Alghamdi, 2020).

En el presente estudio, los resultados obtenidos tras la administración de melatonina muestran un aumento de los niveles de GSH, GSH/GSSG y GPx, así como una disminución de los niveles de GSSG, tanto en sangre como en los órganos estudiados, lo que indica que la melatonina fue capaz de mantener la homeostasis del glutatión, lo que contrarresta el estrés oxidativo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Martín *et al.* (2000) en su estudio, en el que comprueban que la melatonina, previene el daño oxidativo en mitocondrias de cerebro e hígado de ratas tratadas con hidroperóxido de terc-butilo, aumentando los niveles de GSH, GPx y GRd

(Martín *et al.*, 2000). Asimismo, obtenemos que esta indolamina produjo una disminución de los niveles de LPO, que se generan cuando los radicales libres, atacan los lípidos que contienen dobles enlaces carbono-carbono, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados, formando hidroperóxidos lipídicos y MDA, entre otros (Ayala, Muñoz and Argüelles, 2014), así como una reducción de PC. La carbonilación es la forma más frecuente de oxidación irreversible de proteínas, generalmente promovida por ROS (Suzuki, Carini and Butterfield, 2010; Irani, 2017). Estas proteínas se acumulan y están implicadas en la progresión y fisiopatología de enfermedades como la EM (Rogowska-Wrzesinska *et al.*, 2014), por lo que las mediciones de carbonilo permiten evaluar el alcance del estrés oxidativo (Fedorova, Bollineni and Hoffmann, 2014). Del mismo modo, los niveles de NOx sufren una disminución tras la administración de melatonina. El NO es un radical libre que se encuentra en concentraciones superiores a las normales en las lesiones inflamatorias de la EM, ejerciendo diferentes funciones en esta enfermedad como interrupción de la BHE, lesión de los oligodendrocitos y la degeneración axonal (Smith and Lassmann, 2002). Tomados en conjunto, estos resultados permiten establecer una correlación positiva entre GSH y GPx, y una correlación negativa entre los valores de GSSG con los valores de GSH y los del GPx. Del mismo modo, tanto los valores de GSH como los valores de GPx, se correlacionan negativamente con los biomarcadores de estrés oxidativo, confirmando la capacidad de la melatonina para reducir el estrés oxidativo que ocasiona la EAE, y su competencia para potenciar las defensas antioxidantes del organismo. En algunos de los resultados obtenidos, podemos observar que no existen diferencias entre los valores del grupo control y los valores del grupo EAE+Melatonina, lo que indica que la melatonina pudo recuperar los valores basales. Esto ocurre en los niveles de GSH y GSH/GSSG en la médula espinal, GSSG en sangre y corazón, GPx en hígado e intestinos, LPO en sangre, PC y NOx en riñón, NOx en hígado y LPO y NOx en intestinos. Sin embargo, hay órganos que parecen verse poco afectados por la suplementación de melatonina en lo que respecta a los biomarcadores de estrés oxidativo, como es el caso del corazón, ya que

podemos observar que los niveles de PC y LPO, aumentan en dicho órgano en el grupo EAE+Melatonina. Esto podría deberse a la dosis de melatonina utilizada en este estudio, necesitándose, quizás, una dosis más alta de esta hormona para contrarrestar el daño oxidativo que se produce en este órgano. Otros estudios en los que se ha analizado el efecto de la melatonina sobre patologías cardíacas que producían estrés oxidativo, han empleado una dosis más elevada que la administrada en este trabajo. Un estudio realizado por Lagneux *et al.* (2000), en el que analizan el efecto de la melatonina sobre la lesión por isquemia-reperfusión en corazones de ratas, empleó dosis de 1mg/kg/i.p o de 10mg/kg/i.p de la indolamina, obteniendo que el grupo tratado con 10mg/kg experimentó una gran protección frente a esta lesión, mientras que el grupo tratado con 1mg/kg, no mostró diferencias significativas (Lagneux *et al.*, 2000). Igualmente, Yu *et al.* (2015) estudiaron el papel de la melatonina en la lesión por isquemia-reperfusión miocárdica en ratas, administrando 10mg/kg por vía oral de melatonina, tras lo que obtuvieron un aumento de SOD y CAT (Yu *et al.*, 2015). De manera similar, Özdem *et al.* (2017) evaluaron los efectos de la melatonina sobre el estrés oxidativo en los tejidos del corazón después de la inducción de periodontitis experimental en ratas, administrando 10mg/kg/i.p de melatonina diarios durante 2 semanas, observándose una disminución de los niveles de MDA (Özdem *et al.*, 2017). En base a esto, podría plantearse la administración de una dosis más elevada de melatonina y evaluar cómo influye en los niveles de los biomarcadores de estrés oxidativo a nivel cardíaco. Del mismo modo, podría evaluarse si una dosis de melatonina más alta es capaz de recuperar los valores basales de los componentes del sistema redox del glutatión y de los biomarcadores de estrés oxidativo ya que, aunque alguno de ellos se recupera con la dosis empleada, no parece existir un patrón en las recuperaciones observadas.

Además de su capacidad antioxidante, varios estudios han demostrado que la melatonina puede regular la activación del sistema inmunitario, reduciendo la inflamación crónica y aguda (Tarocco *et al.*, 2019). En la EM se produce un desequilibrio de las respuestas de células T, siendo

fundamental para el desarrollo y la progresión de la enfermedad (Long *et al.*, 2018). Se ha comprobado que la melatonina afecta a la diferenciación y a la función de las células T efectoras y reguladoras tanto *in vivo* como *in vitro* (Farez *et al.*, 2015) en la EM. Diversos estudios han analizado el rol que ejerce la melatonina sobre las células T, viéndose que disminuye las respuestas Th1 y Th17 periféricas y centrales, al tiempo que mejora los niveles de células T reguladoras Tr1, aumentando, así, la síntesis de la interleucina antiinflamatoria IL-10, en el modelo EAE (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2015). Del mismo modo, Farez *et al.* (2015) demuestran que la administración de melatonina en ratones con EAE inducida, produjo un aumento de la expresión del factor de transcripción nuclear regulado por IL-3 (NFIL3), bloqueando la diferenciación de células Th17 y, además, potenció la generación de células Tr1 mediante la activación de la vía Erk 1/2 (Farez *et al.*, 2015). Sin embargo, la administración *in vitro* de melatonina a células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EM-RR, redujo las respuestas Th1 y Th22, pero no afectó a los subconjuntos Th17 y Tr1 (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2017). Otros estudios confirman el efecto que posee la melatonina sobre las citocinas proinflamatorias, viéndose que tiene capacidad para reducir la producción de estas, especialmente el TNF- α , IL-1 β e IFN- γ (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2015, 2017; Sánchez-López *et al.*, 2018; Anderson, Rodriguez and Reiter, 2019; Yosefifard *et al.*, 2019) y de aumentar los niveles de citocinas antiinflamatorias, como la IL-10, mediante un mecanismo dependiente de MT1 (Xu *et al.*, 2018), promoviendo un ambiente de citocinas más protector (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2017). Xu *et al.* (2018) en su estudio, confirman que la melatonina inhibe la producción de citocinas proinflamatorias, viéndose que disminuye la producción de TNF- α e IL-6, mediada por el receptor de tipo toll 9 (Xu *et al.*, 2018). En nuestro estudio, obtenemos una marcada disminución de los niveles del factor de inflamación TNF- α en el SNC. Además, comprobamos que existe una correlación positiva entre el TNF- α y los biomarcadores de estrés oxidativo, lo que apoya el hecho de que el proceso inflamatorio induce estrés oxidativo y reduce la capacidad antioxidante celular (Khansari, Shakiba and Mahmoudi, 2009), estableciéndose una

asociación entre el daño inflamatorio y oxidativo y el aumento de la activación periférica del sistema inmunitario en la EM. Esto, podría ser una consecuencia de la desregulación de la microbiota intestinal observada en la EM y relacionada con el curso de la enfermedad.

El posible efecto de la melatonina sobre la microbiota intestinal y LPS, aún no está del todo claro (Ghareghani, Reiter, *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2020). En el estudio realizado por Carrillo-Vico *et al.* (2005) observaron que la administración intraperitoneal de 10 mg/kg de melatonina, antes y después de inyectar LPS a ratones con shock séptico inducido, tuvo un efecto protector, siendo capaz de contrarrestar parcialmente el aumento de los niveles de citocinas proinflamatorias inducidas por LPS, como TNF- α , IL-12 e IFN- γ , mientras que aumentaba el nivel de IL-10 tanto a nivel local como sistémico (Carrillo-Vico *et al.*, 2005). Yu *et al.* (2017) administraron melatonina a células epiteliales mamarias bovinas estimuladas con LPS y concluyeron que esta hormona inhibía la vía de señalización LPS-CD14-TLR4 y protegía del daño oxidativo, regulando al alza la expresión de Nrf2 y HO-1 (Yu *et al.*, 2017). Otros estudios han demostrado que la melatonina reducía el estrés oxidativo inducido por LPS, a través de la activación de la vía de Nrf2 y también, reducía la neuroinflamación aguda y la neurodegeneración (Shah *et al.*, 2017). Del mismo modo, la melatonina puede proteger las células epiteliales alveolares humanas contra el estrés oxidativo, inhibiendo eficazmente la transición epitelio-mesenquimatoso, inducida por LPS, a través de la regulación positiva de la vía Nrf2 (Ding *et al.*, 2020). Además, recientemente se ha demostrado que la melatonina es capaz de revertir la disbiosis intestinal de ratones con colitis inducida, controlando la microbiota mediante la diferenciación de células caliciformes y, también, induce Reg3 β , un péptido antimicrobiano contra bacterias Gram negativas (Kim *et al.*, 2020). En nuestro estudio obtenemos un efecto de la melatonina similar al reportado por Kim *et al.* (2020), viendo que esta hormona reduce los niveles de los biomarcadores indirectos de disbiosis en el SNC, observándose, además, una recuperación de los niveles basales de LPS en el cerebro y la médula espinal.

Una gran cantidad de evidencia clínica indica que el eje microbiota-intestino-cerebro juega un papel crucial en la EM (Parodi and Kerlero de Rosbo, 2021), pudiendo ser la disbiosis intestinal, el desencadenante de la activación del sistema inmune en esta enfermedad. La disbiosis provocaría el desarrollo de inflamación subaguda, la cual produciría una alteración en la expresión de las moléculas de adhesión vascular y de la BHE, facilitando la transmigración de leucocitos al SNC y la aparición del fenómeno neuroinflamatorio (Escribano *et al.*, 2017). En este sentido, se ha comprobado que LPS tiene capacidad para inducir estrés oxidativo y neuroinflamación, lo que posteriormente conduce a daño y disfunción cerebral (Shah *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2017). La disbiosis, podría ser el inicio de una cascada de señales que provocaría el aumento de los niveles de LPS y LBP y tras la unión de LPS a TLR4 se produciría la activación de NF- κ B y la expresión de citocinas proinflamatorias. El incremento de los niveles de citocinas induciría un aumento excesivo de la producción de ROS y RNS, lo que desencadenaría estrés oxidativo, el cuál favorecería, aún más, la activación de NF- κ B. El aumento en los niveles de este factor ha sido comprobado recientemente por nuestro grupo de investigación, observándose que la inducción de EAE, producía un incremento significativo de NF- κ B en cerebro, médula espinal y sangre (Escribano *et al.*, 2021). La activación de este factor provoca una desregulación de Nrf2, lo que conlleva una disminución de las defensas antioxidantes del organismo, como GSH y GPx y un aumento de factores inflamatorios como TNF- α . Todos estos eventos explicarían los resultados que obtenemos en el grupo inducido con EAE, apoyándose, además, en la obtención de correlaciones positivas entre los biomarcadores indirectos de disbiosis, el factor de inflamación y los biomarcadores de estrés oxidativo. La suplementación con melatonina podría interferir en esta cascada de señales proinflamatorias y prooxidativas a diferentes niveles. En primer lugar, la melatonina tiene capacidad para reducir la formación de LPS (Z. Liu *et al.*, 2017), controlando, por tanto, la disbiosis intestinal y, además, inhibe directamente a TLR4 (Arioz *et al.*, 2019), lo que impediría la unión de LPS a este receptor, provocando una disminución en la activación de NF- κ B

y en la liberación de citocinas proinflamatorias (Yao, Lu and Ling, 2016), reduciendo así, la generación ROS/RNS y con ello, el estrés oxidativo. La disminución del estrés oxidativo ejercería, también, un efecto inhibitorio sobre la activación de NF- κ B. Igualmente, la melatonina puede actuar inhibiendo la señalización de NF- κ B (Arioz *et al.*, 2019), disminuyendo su fosforilación (Z. Liu *et al.*, 2017), bloqueando así la vía canónica de activación de este factor (Ahmed *et al.*, 2017) y por tanto, impidiendo su translocación nuclear (Arioz *et al.*, 2019). La inhibición de NF- κ B conlleva una disminución en los niveles de TNF- α y en la producción de nitrito/nitrato, al reducir la expresión de iNOS (Shah *et al.*, 2017). Estos efectos se complementarían con la capacidad de la melatonina de estimular las defensas antioxidantes del organismo, favoreciendo la activación de Nrf2, facilitando su translocación nuclear y su unión a ARE, comprobándose, también, que la melatonina puede regular positivamente cualquier enzima antioxidante que se transcriba en respuesta a una señal Nrf2/ARE (Vriend and Reiter, 2015), aumentando, así, los niveles de GPx. Del mismo modo, el aumento de la actividad de Nrf2, conduce a una acumulación de GSH (Wardyn, Ponsford and Sanderson, 2015). Nrf2 regula la expresión de mecanismos protectores antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Pareek *et al.*, 2011), ejerciendo además un efecto antiinflamatorio, al regular negativamente la vía de señalización de NF- κ B (Jiang *et al.*, 2014) e inhibir la producción de IL-17 y células Th1 y Th17, lo que afecta directamente al progreso de la enfermedad en el modelo EAE (Pareek *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2017), jugando también un papel clave en la regulación de la migración e infiltración celular, ya que, a través de HO-1, inhibe MMP-9 (Ahmed *et al.*, 2017) (Figura 12). En esta línea, recientemente, se ha publicado que la melatonina podría reducir los niveles de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) a través de la vía de señalización ROR α /miR-233/STAT-3, la cual está implicada en la regulación de esta molécula. La melatonina aumentaría la expresión de miR-223 a través de su receptor ROR α , lo que provocaría una disminución de la expresión de STAT-3, que desencadenaría la supresión de ICAM-1 (Yi and

Yang, 2021), reduciendo así la infiltración de células inflamatorias en el SNC (Maldonado *et al.*, 2010; Escribano, Colin-Gonzalez, *et al.*, 2014).

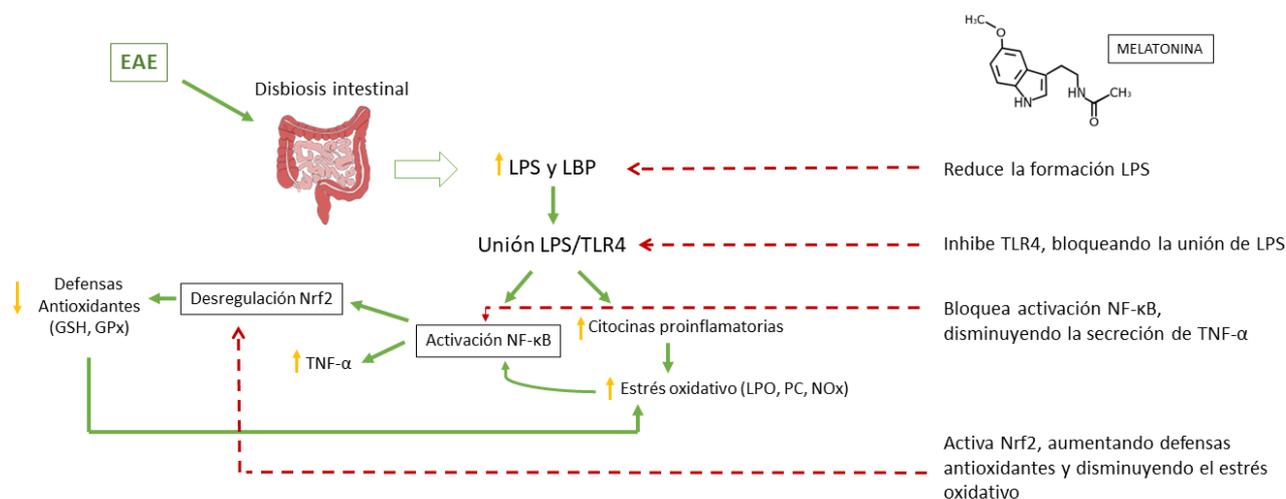


Figura 12. Posibles mecanismos de actuación de la melatonina sobre la cascada de eventos inflamatorios y oxidativos que podrían tener lugar en el curso de la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE). LPS: Lipopolisacárido; LBP: Proteína de unión al lipopolisacárido; TLR4: Receptor de tipo toll 4; LPO: Productos de peroxidación lipídica; NOx: nitrito total (nitrito + nitrato); NF-κB: Factor nuclear kappa B; TNF-α: Factor de necrosis tumoral; Nrf2: Factor 2 relacionado con el eritroide nuclear 2; GSH: Glutatión reducido; GPx: Glutatión peroxidasa.

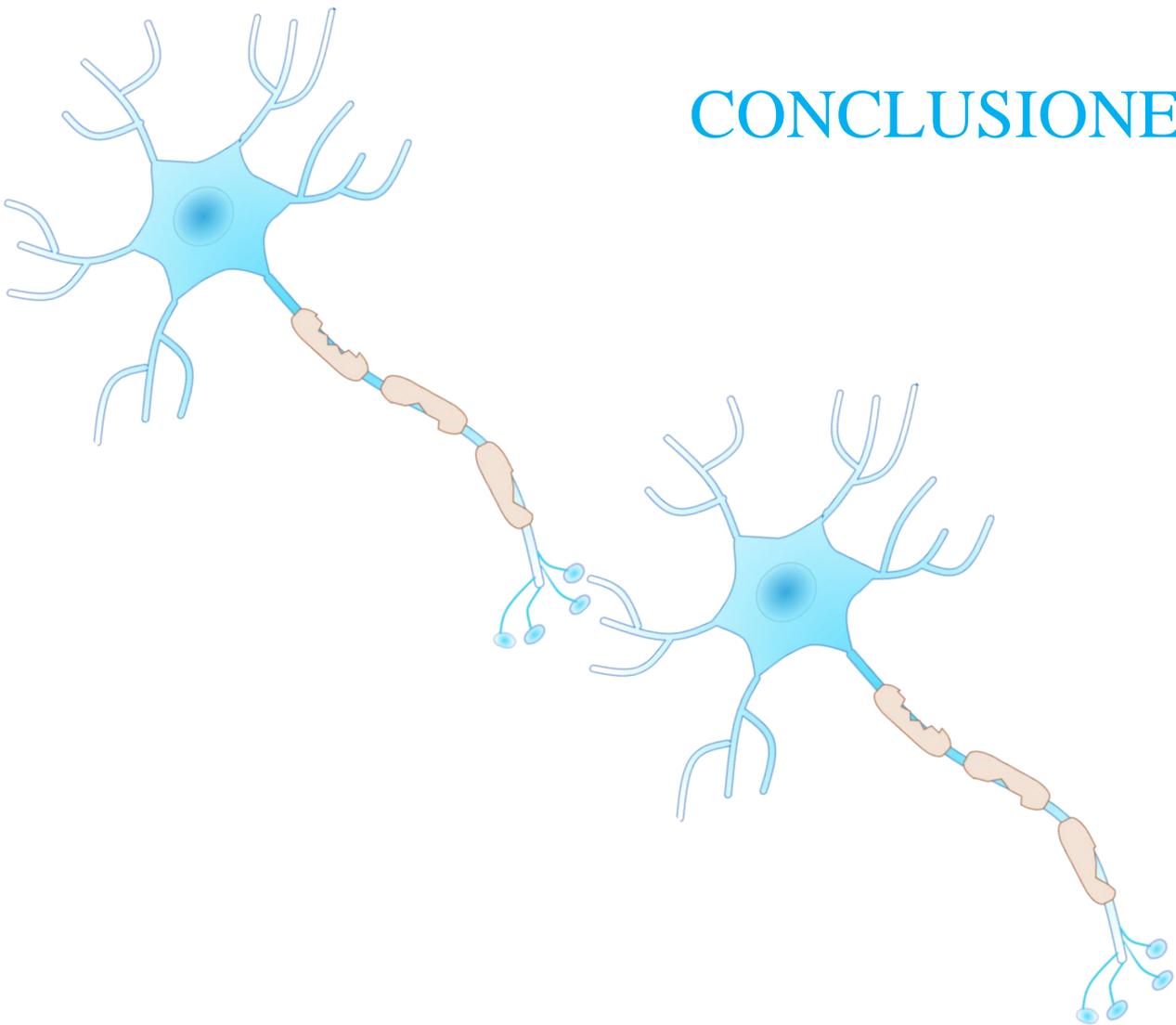
Todo ello, conllevaría una disminución en la evolución de la enfermedad, tal y como observamos en este estudio, en el que la puntuación clínica de la EAE descendió más 1.5 puntos en la escala Pérez-Nievas *et al.* (2010), tras 51 días de suplementación con melatonina. Estos resultados coinciden con lo observado en otros estudios en los que se ha visto que, una disminución en los niveles séricos de melatonina, se asocia con un mayor deterioro del estado clínico del paciente (Alimoradian *et al.*, 2018), existiendo una correlación inversa entre estos niveles y la Escala Expandida del Estado de Discapacidad (EDSS) (Bao *et al.*, 2016), una escala bien definida y ampliamente utilizada para evaluar los casos de EM, basada en una entrevista realizada por el médico y un examen neurológico. Esta escala consta de 20 puntos con incrementos de 0.5, donde “0” indica examen neurológico normal y “10” indica muerte por EM (Çinar and Yorgun, 2018). López-González *et al.* (2015) obtienen también una disminución de la EDSS en un paciente con

EM-PP que comenzó a tomar una dosis oral diaria de 50 mg de melatonina, que fue aumentando cada 6 meses, hasta llegar a los 300mg al día, aunque la disminución se produjo a los 4 años de comenzar el tratamiento (López-González *et al.*, 2015). Contrariamente a lo expuesto, en el estudio realizado por Ghorbani *et al.* (2013) no encuentran una relación entre los niveles séricos de melatonina y la EDSS en pacientes con EM (Ghorbani *et al.*, 2013). Del mismo modo, Drake *et al.* (2018) no obtienen diferencias en la EDSS tras la administración oral de 2mg al día de melatonina durante 6 semanas a pacientes con EM (Drake *et al.*, 2018), aunque estos resultados podrían explicarse por la dosis utilizada, ya que 2 mg de melatonina son considerados una dosis baja en humanos.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la melatonina podría ser un buen candidato para tratar la EM, ya sea sola o como adyuvante de otros tratamientos tradicionales. Además, podría resultar útil para tratar las formas progresivas de la enfermedad, para las cuales no hay terapias eficaces. La evidencia sugiere que el tratamiento de la EM progresiva debe basarse en una combinación de estrategias antiinflamatorias, inmunomoduladoras, regenerativas y neuroprotectoras, cumpliendo la melatonina, con dichas características y presentando la capacidad de atravesar fácilmente la BHE, lo que podría retrasar las etapas progresivas de EM. Sin embargo, se necesitan más ensayos clínicos para determinar la dosis exacta de melatonina, así como el tiempo de uso necesario para eliminar el estrés oxidativo y el estado inflamatorio en humanos, ya que algunas enfermedades autoinmunes parecen volverse más propensas a la producción de moléculas proinflamatorias cuando la melatonina se usa en dosis altas. Asimismo, debería evaluarse si existe un momento óptimo para la administración de melatonina, en pacientes con EM, atendiendo a las variaciones estacionales que se producen en la secreción de esta. Del mismo modo, las investigaciones futuras deben centrarse en estudiar los mecanismos moleculares específicos implicados en el papel de la melatonina, como antioxidante, inmunomodulador y antiinflamatorio en el SNC y en órganos y tejidos no nerviosos.



CONCLUSIONES



En base a los resultados obtenidos en este estudio, podemos concluir que la melatonina muestra un efecto potencialmente positivo en el modelo animal de EM, viéndose que:

Primera. - Mantiene la homeostasis del glutatión tanto a nivel nervioso (cerebro y médula espinal) como en tejidos y órganos no nerviosos (sangre, corazón, hígado, riñón e intestinos) y, paralelamente, disminuye los principales biomarcadores de estrés oxidativo, por lo que además de actuar como un antioxidante *per se*, potencia las defensas antioxidantes del organismo.

Segunda. - Ejerce un efecto antiinflamatorio al disminuir los niveles de TNF- α en el cerebro y la médula espinal.

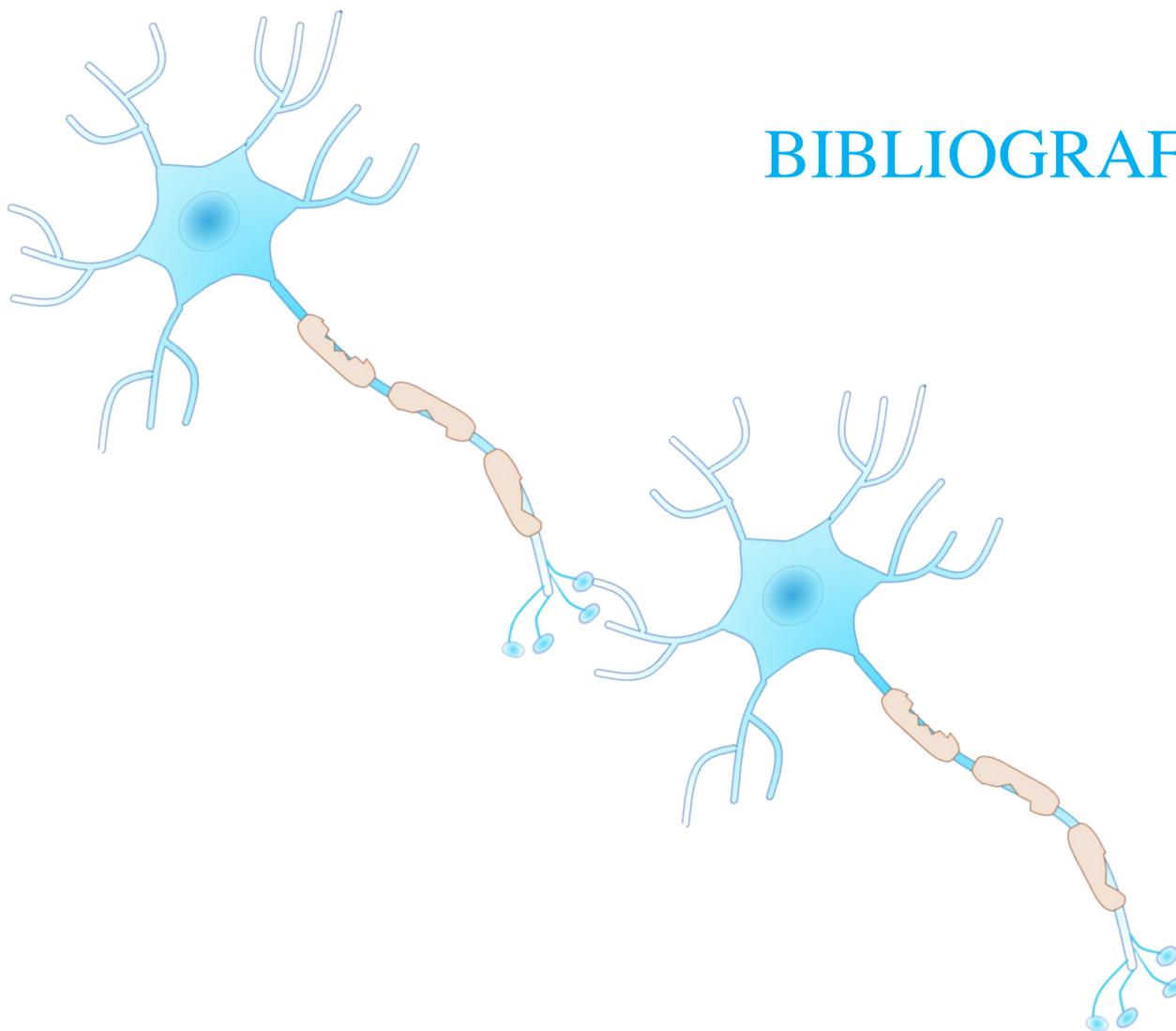
Tercera. - Mejora la disbiosis bacteriana intestinal, al disminuir los niveles de Lipopolisacárido bacteriano (LPS) y su proteína transportadora (LBP) en el Sistema Nervioso Central (SNC).

Cuarta. - Provoca una disminución de la puntuación clínica de la enfermedad, evaluada de acuerdo con la escala Pérez-Nievas, mediante la que se detectan signos de la enfermedad, lo que indica una mejora en el estado clínico de los animales.

Quinta. - El corazón parece verse poco afectado por la melatonina en lo que respecta a los biomarcadores de estrés oxidativo, produciéndose un aumento de los productos de peroxidación lipídica (LPO) y las proteínas carboniladas (PC), lo que puede deberse a la dosis administrada, requiriendo, quizás, una dosis más alta.



BIBLIOGRAFIA



- AboTaleb, H. A. and Alghamdi, B. S. (2020) 'Neuroprotective Effects of Melatonin during Demyelination and Remyelination Stages in a Mouse Model of Multiple Sclerosis', *Journal of Molecular Neuroscience*, 70(3), 386–402. doi: 10.1007/s12031-019-01425-6.
- Acosta, C. M. R. *et al.* (2013) 'Exploring the role of nerve growth factor in multiple sclerosis: implications in myelin repair', *CNS & neurological disorders drug targets*, 12(8), 1242–1256. doi: 10.2174/18715273113129990087.
- Acuña-Castroviejo, D. *et al.* (2001) 'Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics', *Journal of pineal research*, 30(2), 65–74. doi: 10.1034/j.1600-079X.2001.300201.x.
- Adamczyk-Sowa, M., Pierzchala, K., *et al.* (2014) 'Influence of melatonin supplementation on serum antioxidative properties and impact of the quality of life in multiple sclerosis patients', *Journal of Physiology and Pharmacology*, 65(4), 543–50.
- Adamczyk-Sowa, M., Pierzchala, Krystyna, *et al.* (2014) 'Melatonin acts as antioxidant and improves sleep in MS patients', *Neurochemical Research*, 39(8), 1585–1593. doi: 10.1007/s11064-014-1347-6.
- Adamczyk-Sowa, M., Sowa, Paweł, *et al.* (2016) 'Changes in serum ceruloplasmin levels based on immunomodulatory treatments and melatonin supplementation in multiple sclerosis patients', *Medical Science Monitor*, 22, 2484–2491. doi: 10.12659/msm.895702.
- Adamczyk-Sowa, M., Sowa, P., *et al.* (2016) 'Effect of melatonin supplementation on plasma lipid hydroperoxides, homocysteine concentration and chronic fatigue syndrome in multiple sclerosis patients treated with interferons-beta and mitoxantrone', *Journal of Physiology and Pharmacology*, 67(2), 235–42.
- Agüera, E. *et al.* (2020) 'Clinical and Neurochemical Effects of Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) in Multiple Sclerosis: A Study Protocol for a Randomized Clinical Trial', *Frontiers in*

- Neurology*, 11, 750. doi: 10.3389/fneur.2020.00750.
- Aharoni, R. (2013) 'The mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and beyond', *Autoimmunity Reviews*, 12(5), 543–553. doi: 10.1016/j.autrev.2012.09.005.
- Ahmed, S. M. U. *et al.* (2017) 'Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation', *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863(2), 585–597. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.11.005.
- Akpinar, Z. *et al.* (2008) 'The association of nocturnal serum melatonin levels with major depression in patients with acute multiple sclerosis', *Psychiatry Research*, 161(2), 253–257. doi: 10.1016/j.psychres.2007.11.022.
- Al-Jaderi, Z. and Maghazachi, A. A. (2016) 'Utilization of Dimethyl Fumarate and Related Molecules for Treatment of Multiple Sclerosis, Cancer, and Other Diseases', *Frontiers in Immunology*, 7, 278. doi: 10.3389/fimmu.2016.00278.
- Alfadda, A. A. and Sallam, R. M. (2012) 'Reactive Oxygen Species in Health and Disease', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 936486. doi: 10.1155/2012/936486.
- Alghamdi, B. S. and AboTaleb, H. A. (2020) 'Melatonin improves memory defects in a mouse model of multiple sclerosis by up-regulating cAMP-response element-binding protein and synapse-Associated proteins in the prefrontal cortex', *Journal of Integrative Neuroscience*, 19(2), 229–237. doi: 10.31083/j.jin.2020.02.32.
- Alhaji, M. and Farhana, A. (2022) *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, *StatPearls*. StatPearls Publishing. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/> (Accessed: 5 March 2022).
- Alimoradian, A. *et al.* (2018) 'Evaluation of the Serum Melatonin Levels in the Treatment of Patients with Multiple Sclerosis', *Journal of Arak University of Medical Sciences*, 21(2), 55–64. Available at: <http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-5484-en.html> (Accessed: 31 March 2022).

- Álvarez-Sánchez, N. *et al.* (2015) ‘Melatonin controls experimental autoimmune encephalomyelitis by altering the T effector/regulatory balance’, *Brain, Behavior, and Immunity*, 50, 101–114. doi: 10.1016/j.bbi.2015.06.021.
- Álvarez-Sánchez, N. *et al.* (2017) ‘Melatonin reduces inflammatory response in peripheral T helper lymphocytes from relapsing-remitting multiple sclerosis patients’, *Journal of Pineal Research*, 63(4). doi: 10.1111/jpi.12442.
- Ames, A. (2000) ‘CNS energy metabolism as related to function’, *Brain research. Brain research reviews*, 34(1–2), 42–68. doi: 10.1016/s0165-0173(00)00038-2.
- Anagnostouli, M., Markoglou, N. and Chrousos, G. (2020) ‘Psycho-neuro-endocrino-immunologic issues in multiple sclerosis: a critical review of clinical and therapeutic implications’, *Hormones*, 19(4), 485–496. doi: 10.1007/s42000-020-00197-8.
- Anderson, G. *et al.* (2014) ‘Role of immune-inflammatory and oxidative and nitrosative stress pathways in the etiology of depression: Therapeutic implications’, *CNS Drugs*, 28(1), 1–10. doi: 10.1007/s40263-013-0119-1.
- Anderson, G. and Maes, M. (2020) ‘Sirtuins, Mitochondria and the Melatonergic Pathway in Alzheimer’s Disease’, in *Sirtuin Biology in Medicine*, pp. 117–135. doi: 10.1016/B978-0-12-814118-2.00015-X.
- Anderson, G., Rodriguez, M. and Reiter, R. J. (2019) ‘Multiple sclerosis: Melatonin, orexin, and ceramide interact with platelet activation coagulation factors and gut-microbiome-derived butyrate in the circadian dysregulation of mitochondria in glia and immune cells’, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5500. doi: 10.3390/ijms20215500.
- Aranda, M. L. *et al.* (2021) ‘Chronobiotic effect of melatonin in experimental optic neuritis’, *Neuropharmacology*, 182, 108401. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108401.
- Arendt, J. (1998) ‘Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian

- physiology', *Reviews of reproduction*, 3(1), 13–22. doi: 10.1530/ror.0.0030013.
- Arioz, B. I. *et al.* (2019) 'Melatonin attenuates LPS-induced acute depressive-like behaviors and microglial NLRP3 inflammasome activation through the SIRT1/Nrf2 pathway', *Frontiers in Immunology*, 10, 1511. doi: 10.3389/fimmu.2019.01511.
- Arıcan, A. Ç. *et al.* (2020) 'Factors affecting bone mineral density in male patients with primary progressive multiple sclerosis', *Türk Osteoporoz Dergisi*, 26(2), 115–120. doi: 10.4274/tod.galenos.2020.98700.
- Ascherio, A. (2013) 'Environmental factors in multiple sclerosis', *Expert Review of Neurotherapeutics*, 13(12 Suppl), 3–9. doi: 10.1586/14737175.2013.865866.
- Aulinas, A. (2019) *Physiology of the Pineal Gland and Melatonin*, Endotext. MDText.com, Inc. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK550972/> (Accessed: 14 January 2022).
- Avila, M. *et al.* (2018) 'The Role of Sex Hormones in Multiple Sclerosis', *European Neurology*, 80(1–2), 93–99. doi: 10.1159/000494262.
- Ayala, A., Muñoz, M. F. and Argüelles, S. (2014) 'Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 360438. doi: 10.1155/2014/360438.
- Aydin, S. (2015) 'A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA', *Peptides*, 72, 4–15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.
- Ayzenberg, I., Hoepner, R. and Kleiter, I. (2016) 'Fingolimod for multiple sclerosis and emerging indications: appropriate patient selection, safety precautions, and special considerations', *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 12, 261–72. doi: 10.2147/TCRM.S65558.
- Bahamonde, C. *et al.* (2014) 'Elevated melatonin levels in natalizumab-treated female patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: Relationship to oxidative stress', *European Journal of*

- Pharmacology*, 730(1), 26–30. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.02.020.
- Baizabal-Carvalho, J. (2021) ‘Gut microbiota: a potential therapeutic target for Parkinson’s disease’, *Neural Regeneration Research*, 16(2), 287–288. doi: 10.4103/1673-5374.290896.
- Baloh, R. H. *et al.* (2007) ‘Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations’, *The Journal of neuroscience*, 27(2), 422–430. doi: 10.1523/jneurosci.4798-06.2007.
- Bamer, A. M. *et al.* (2008) ‘Prevalence of sleep problems in individuals with multiple sclerosis’, *Multiple Sclerosis*, 14(8), 1127–30. doi: 10.1177/1352458508092807.
- Bao, A. *et al.* (2016) ‘Correlation between Serum Levels of Melatonin TNF-A and EDSS Scores in Multiple Sclerosis Patients’, *Journal of Kunming Medical University*, (12), 100–103. Available at: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/wpr-514107> (Accessed: 31 March 2022).
- Bar-Or, A. *et al.* (2014) ‘Teriflunomide and Its Mechanism of Action in Multiple Sclerosis’, *Drugs*, 74(6), 659–74. doi: 10.1007/s40265-014-0212-x.
- de Barcelos, I. P., Troxell, R. M. and Graves, J. S. (2019) ‘Mitochondrial Dysfunction and Multiple Sclerosis’, *Biology*, 8(2), 37. doi: 10.3390/biology8020037.
- Bargiela, N. F. *et al.* (2020) ‘Fingolimod in multiple sclerosis: profile of use in habitual practice’, *European Journal of Hospital Pharmacy*, 27(6), 346–349. doi: 10.1136/ejpharm-2018-001840.
- Barthelmes, J. *et al.* (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), 53933. doi: 10.3791/53933.
- Baxter, A. G. (2007) ‘The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis’, *Nature Reviews Immunology*, 7(11), 904–912. doi: 10.1038/nri2190.
- Beatty, W. W. and Aupperle, R. L. (2002) ‘Sex differences in cognitive impairment in multiple

- sclerosis', *The Clinical neuropsychologist*, 16(4), 472–480. doi: 10.1076/clin.16.4.472.13904.
- Beker, M. C. *et al.* (2019) 'Interaction of melatonin and Bmal1 in the regulation of PI3K/AKT pathway components and cellular survival', *Scientific reports*, 9(1), 19082. doi: 10.1038/s41598-019-55663-0.
- Berger, J., Brandstadter, R. and Bar-Or, A. (2020) 'COVID-19 and MS disease-modifying therapies', *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*, 7(4), e761. doi: 10.1212/nxi.0000000000000761.
- Beriwal, N. *et al.* (2019) 'Role of immune-pineal axis in neurodegenerative diseases, unraveling novel hybrid dark hormone therapies', *Heliyon*, 5(1), e01190. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01190.
- Bhattacharjee, S. and Lukiw, W. J. (2013) 'Alzheimer's disease and the microbiome', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 153. doi: 10.3389/fncel.2013.00153.
- Billiau, A. and Matthys, P. (2001) 'Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases', *Journal of Leukocyte Biology*, 70(6), 849–860. doi: 10.1189/jlb.70.6.849.
- Bjornevik, K. *et al.* (2022) 'Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis.', *Science*, 375(6578), 296–301. doi: 10.1126/science.abj8222.
- Boster, A. L. *et al.* (2015) 'Glatiramer acetate: long-term safety and efficacy in relapsing-remitting multiple sclerosis', *Expert review of neurotherapeutics*, 15(6), 575–586. doi: 10.1586/14737175.2015.1040768.
- Boziki, M. K. *et al.* (2020) 'Microbiome in Multiple Sclerosis: Where Are We, What We Know and Do Not Know', *Brain Sciences*, 10(4), 234. doi: 10.3390/brainsci10040234.
- Brancati, S. *et al.* (2021) 'Rituximab in Multiple Sclerosis: Are We Ready for Regulatory Approval?', *Frontiers in Immunology*, 12, 661882. doi: 10.3389/fimmu.2021.661882.

- Brennan, R., Jan, J. E. and Lyons, C. J. (2006) 'Light, dark, and melatonin: emerging evidence for the importance of melatonin in ocular physiology', *Eye*, 21(7), 901–908. doi: 10.1038/sj.eye.6702597.
- Brigelius-Flohé, R. and Maiorino, M. (2013) 'Glutathione peroxidases', *Biochimica et biophysica acta*, 1830(5), 3289–3303. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
- Brodsky, M. *et al.* (2008) 'Multiple sclerosis risk after optic neuritis: Final optic neuritis treatment trial follow-up', *Archives of Neurology*, 65(6), 727–32. doi: 10.1001/archneur.65.6.727.
- Browne, P. *et al.* (2014) 'Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity', *Neurology*, 83(11), 1022–4. doi: 10.1212/wnl.0000000000000768.
- Cahill, W. J., Calvert, J. H. and Zhang, J. H. (2006) 'Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 26(11), 1341–1353. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600283.
- Camara-Lemarroy, C. R. *et al.* (2018) 'The intestinal barrier in multiple sclerosis: Implications for pathophysiology and therapeutics', *Brain*, 141(7), 1900–1916. doi: 10.1093/brain/awy131.
- Campbell, G. R. *et al.* (2011) 'Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis', *Annals of Neurology*, 69(3), 481–92. doi: 10.1002/ana.22109.
- Campbell, G. R. and Mahad, D. J. (2011) 'Mitochondria as Crucial Players in Demyelinated Axons: Lessons from Neuropathology and Experimental Demyelination', *Autoimmune Diseases*, 2011, 262847. doi: 10.4061/2011/262847.
- Carloni, S. *et al.* (2018) 'Melatonin Acts in Synergy with Hypothermia to Reduce Oxygen-Glucose Deprivation-Induced Cell Death in Rat Hippocampus Organotypic Slice Cultures', *Neonatology*, 114(4), 364–371. doi: 10.1159/000491859.
- Carrascal, L. *et al.* (2018) 'Role of Melatonin in the Inflammatory Process and its Therapeutic Potential', *Current Pharmaceutical Design*, 24(14), 1563–1588. doi:

10.2174/1381612824666180426112832.

- Carretero Colomer, M. (2004) 'Acetato de glatiramero', *Offarm*, 23(9), 140–142. Available at: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-acetato-glatiramero-13067359> (Accessed: 7 February 2022).
- Carrillo-Vico, A. *et al.* (2004) 'Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance', *FASEB journal*, 18(3), 537–539. doi: 10.1096/fj.03-0694fje.
- Carrillo-Vico, A. *et al.* (2005) 'Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: Regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects', *Journal of Pineal Research*, 39(4), 400–408. doi: 10.1111/j.1600-079X.2005.00265.x.
- Carrillo-Vico, A. *et al.* (2013) 'Melatonin: Buffering the immune system', *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 8638–8683. doi: 10.3390/ijms14048638.
- Chang, M. R., Rosen, H. and Griffin, P. R. (2014) 'RORs in Autoimmune Disease', *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 378, 171–182. doi: 10.1007/978-3-319-05879-5_8.
- Chaves, A. R. *et al.* (2021) 'Sex-specific disruption in corticospinal excitability and hemispheric (a)symmetry in multiple sclerosis', *Brain research*, 1773, 147687. doi: 10.1016/j.brainres.2021.147687.
- Chen, B. H. *et al.* (2018) 'Melatonin improves vascular cognitive impairment induced by ischemic stroke by remyelination via activation of ERK1/2 signaling and restoration of glutamatergic synapses in the gerbil hippocampus', *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 108, 687–697. doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.077.
- Chen, D., Zhang, T. and Lee, T. H. (2020) 'Cellular mechanisms of melatonin: Insight from neurodegenerative diseases', *Biomolecules*, 10(8), 1–26. doi: 10.3390/biom10081158.

- Chisari, C. G. *et al.* (2021) ‘Rituximab for the treatment of multiple sclerosis: a review’, *Journal of Neurology*, 269(1), 159–183. doi: 10.1007/s00415-020-10362-z.
- Chitimus, D. M. *et al.* (2020) ‘Melatonin’s impact on antioxidative and anti-inflammatory reprogramming in homeostasis and disease’, *Biomolecules*, 10(9), 1–28. doi: 10.3390/biom10091211.
- Christian, F., Smith, E. L. and Carmody, R. J. (2016) ‘The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation’, *Cells*, 5(1), 12. doi: 10.3390/cells5010012.
- Çinar, B. and Yorgun, Y. (2018) ‘What We Learned from The History of Multiple Sclerosis Measurement: Expanded Disability Status Scale’, *Archives of Neuropsychiatry*, 55(Suppl 1), S69–S75. doi: 10.29399/npa.23343.
- Claustrat, B., Brun, J. and Chazot, G. (2005) ‘The basic physiology and pathophysiology of melatonin’, *Sleep Medicine Reviews*, 9(1), 11–24. doi: 10.1016/j.smrv.2004.08.001.
- Claustrat, B. and Leston, J. (2015) ‘Melatonin: Physiological effects in humans’, *Neuro-Chirurgie*, 61(2–3), 77–84. doi: 10.1016/j.neuchi.2015.03.002.
- Cobianchi, S. *et al.* (2016) ‘Neuroprotective Effects of Exercise Treatments After Injury: The Dual Role of Neurotrophic Factors’, *Current Neuropharmacology*, 15(4), 495–518. doi: 10.2174/1570159x14666160330105132.
- Comai, S. and Gobbi, G. (2014) ‘Unveiling the role of melatonin MT2 receptors in sleep, anxiety and other neuropsychiatric diseases: A novel target in psychopharmacology’, *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 39(1), 6–21. doi: 10.1503/jpn.130009.
- Compston, A. and Coles, A. (2008) ‘Multiple sclerosis’, *The Lancet*, 372(9648), 1502–1517. doi: 10.1016/s0140-6736(08)61620-7.
- Conde, C. *et al.* (2019) ‘Extra-virgin olive oil modifies the changes induced in non-nervous organs and tissues by experimental autoimmune encephalomyelitis models’, *Nutrients*, 11(10), 2448. doi:

10.3390/nu11102448.

Conde, C. *et al.* (2020) 'The protective effect of extra-virgin olive oil in the experimental model of multiple sclerosis in the rat', *Nutritional Neuroscience*, 23(1), 37–48. doi: 10.1080/1028415X.2018.1469281.

Constantinescu, C. S. *et al.* (2011) 'Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)', *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1079–106. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x.

Correale, J. *et al.* (2017) 'Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment', *Brain*, 140(3), 527–546. doi: 10.1093/brain/aww258.

Crespo, I. *et al.* (2016) 'Melatonin inhibits the sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate signaling pathway in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin', *Journal of Pineal Research*, 61(2), 168–76. doi: 10.1111/jpi.12335.

Di Dalmazi, G. *et al.* (2016) 'Reactive oxygen species in organ-specific autoimmunity', *Auto-Immunity Highlights*, 7(1), 11. doi: 10.1007/s13317-016-0083-0.

Das, R., Balmik, A. A. and Chinnathambi, S. (2020) 'Melatonin Reduces GSK3 β -Mediated Tau Phosphorylation, Enhances Nrf2 Nuclear Translocation and Anti-Inflammation', *ASN Neuro*, 12, 1759091420981204. doi: 10.1177/1759091420981204.

Deeks, E. D. (2018) 'Cladribine Tablets: A Review in Relapsing MS', *CNS Drugs*, 32(8), 785–796. doi: 10.1007/s40263-018-0562-0.

Deng, W. G. *et al.* (2006) 'Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding', *Blood*, 108(2), 518–524. doi: 10.1182/blood-2005-09-3691.

Ding, Z. *et al.* (2020) 'Melatonin prevents LPS-induced epithelial-mesenchymal transition in human alveolar epithelial cells via the GSK-3 β /Nrf2 pathway', *Biomedicine and Pharmacotherapy*,

132, 110827. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110827.

- Domingues, R. B. *et al.* (2019) 'Neurofilament light chain in the assessment of patients with multiple sclerosis', *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 77(6), 436–441. doi: 10.1590/0004-282x20190060.
- Doroszkiewicz, J., Groblewska, M. and Mroczko, B. (2021) 'The Role of Gut Microbiota and Gut–Brain Interplay in Selected Diseases of the Central Nervous System', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 10028. doi: 10.3390/ijms221810028.
- Draheim, T. *et al.* (2016) 'Activation of the astrocytic Nrf2/ARE system ameliorates the formation of demyelinating lesions in a multiple sclerosis animal model', *Glia*, 64(12), 2219–2230. doi: 10.1002/glia.23058.
- Drake, M. J. *et al.* (2018) 'Results of a randomized, double blind, placebo controlled, crossover trial of melatonin for treatment of Nocturia in adults with multiple sclerosis (MeNiMS)', *BMC Neurology*, 18(1), 107. doi: 10.1186/s12883-018-1114-4.
- Drevets, W. C., Price, J. L. and Furey, M. L. (2008) 'Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: Implications for neurocircuitry models of depression', *Brain Structure and Function*, 213(1–2), 93–118. doi: 10.1007/s00429-008-0189-x.
- Du, S. *et al.* (2014) 'XY sex chromosome complement, compared with XX, in the CNS confers greater neurodegeneration during experimental autoimmune encephalomyelitis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(7), 2806–2811. doi: 10.1073/pnas.1307091111.
- Dubocovich, M. L. *et al.* (2010) 'International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors', *Pharmacological reviews*, 62(3), 343–380. doi: 10.1124/pr.110.002832.
- Dupuis, M. L. *et al.* (2021) 'The role of vitamin D in autoimmune diseases: could sex make the difference?', *Biology of Sex Differences*, 12(1), 12. doi: 10.1186/s13293-021-00358-3.

- Dutta, R. and Trapp, B. D. (2014) 'Relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: insights from pathology', *Current opinion in neurology*, 27(3), 271–278. doi: 10.1097/wco.0000000000000094.
- Dwivedi, D. *et al.* (2020) 'Glutathione in Brain: Overview of Its Conformations, Functions, Biochemical Characteristics, Quantitation and Potential Therapeutic Role in Brain Disorders', *Neurochemical research*, 45(7), 1461–1480. doi: 10.1007/s11064-020-03030-1.
- Elkhodiry, A. A. and El Tayebi, H. M. (2021) 'Scavenging the hidden impacts of non-coding RNAs in multiple sclerosis', *Non-coding RNA Research*, 6(4), 187–199. doi: 10.1016/j.ncrna.2021.12.002.
- Escribano, B. M., Moreno, A., *et al.* (2014) 'Impact of Light/Dark Cycle Patterns on Oxidative Stress in an Adriamycin-Induced Nephropathy Model in Rats', *PLoS ONE*. Edited by N. Ashton, 9(5), e97713. doi: 10.1371/journal.pone.0097713.
- Escribano, B. M., Colin-Gonzalez, A., *et al.* (2014) 'The Role of Melatonin in Multiple Sclerosis, Huntington's Disease and Cerebral Ischemia', *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 13(6), 1096–1119. doi: 10.2174/1871527313666140806160400.
- Escribano, B. M. *et al.* (2017) 'Lipopolysaccharide Binding Protein and Oxidative Stress in a Multiple Sclerosis Model', *Neurotherapeutics*, 14(1), 199–211. doi: 10.1007/s13311-016-0480-0.
- Escribano, B. M. *et al.* (2018) 'Neuroprotective effect of S-allyl cysteine on an experimental model of multiple sclerosis: Antioxidant effects', *Journal of Functional Foods*, 42, 281–288. doi: 10.1016/j.jff.2017.12.068.
- Escribano, B. M. *et al.* (2021) 'Lactose and Casein Cause Changes on Biomarkers of Oxidative Damage and Dysbiosis in an Experimental Model of Multiple Sclerosis', *CNS & neurological disorders drug targets*, 21(8), 680–692. doi: 10.2174/1871527320666211207101113.
- Esmacili, S. *et al.* (2021) 'Rituximab and risk of COVID-19 infection and its severity in patients with

- MS and NMOSD', *BMC Neurology*, 21(1), 1–8. doi: 10.1186/s12883-021-02218-4.
- Esposito, E. and Cuzzocrea, S. (2010) 'Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system', *Current neuropharmacology*, 8(3), 228–242. doi: 10.2174/157015910792246155.
- Estrada, C. *et al.* (2015) 'Cognitive Impairment After Sleep Deprivation Rescued by Transcranial Magnetic Stimulation Application in Octodon degus', *Neurotoxicity Research*, 28(4), 361–371. doi: 10.1007/s12640-015-9544-x.
- Farez, M. F. *et al.* (2015) 'Melatonin Contributes to the Seasonality of Multiple Sclerosis Relapses', *Cell*, 162(6), 1338–1352. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.025.
- Farez, M. F. *et al.* (2016) 'Anti-inflammatory effects of melatonin in multiple sclerosis', *BioEssays*, 38(10), 1016–1026. doi: 10.1002/bies.201600018.
- FDA approves new oral treatment for multiple sclerosis* / FDA (2019). Available at: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-oral-treatment-multiple-sclerosis> (Accessed: 11 February 2022).
- Fedorova, M., Bollineni, R. C. and Hoffmann, R. (2014) 'Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies', *Mass Spectrometry Reviews*, 33(2), 79–97. doi: 10.1002/mas.21381.
- Feng, Y. S. *et al.* (2021) 'The involvement of NLRP3 inflammasome in the treatment of neurodegenerative diseases', *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 138, 111428. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111428.
- Ferlazzo, N. *et al.* (2020) 'Is Melatonin the Cornucopia of the 21st Century?', *Antioxidants*, 9(11), 1088. doi: 10.3390/antiox9111088.
- Fernández-Ortiz, M. *et al.* (2020) 'Melatonin/Nrf2/NLRP3 connection in mouse heart mitochondria during aging', *Antioxidants*, 9(12), 1–22. doi: 10.3390/antiox9121187.
- Fernández, A. *et al.* (2015) 'Melatonin and endoplasmic reticulum stress: relation to autophagy and

- apoptosis', *Journal of pineal research*, 59(3), 292–307. doi: 10.1111/jpi.12264.
- Fidao, A. *et al.* (2021) 'Depression mediates the relationship between fatigue and mental health-related quality of life in multiple sclerosis', *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 47, 102620. doi: 10.1016/j.msard.2020.102620.
- Filipi, M. and Jack, S. (2020) 'Interferons in the Treatment of Multiple Sclerosis: A Clinical Efficacy, Safety, and Tolerability Update', *International Journal of MS Care*, 22(4), 165–172. doi: 10.7224/1537-2073.2018-063.
- Filomeni, G., Rotilio, G. and Ciriolo, M. R. (2002) 'Cell signalling and the glutathione redox system', *Biochemical Pharmacology*, 64(5–6), 1057–1064. doi: 10.1016/s0006-2952(02)01176-0.
- Fisher, D. E. (2001) 'Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer', *Hematology/oncology clinics of North America*, 15(5), 931–956. doi: 10.1016/s0889-8588(05)70258-6.
- Flohé, L. and Günzler, W. A. (1984) 'Assays of Glutathione Peroxidase', *Methods in Enzymology*. 105, 114-21. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05015-1.
- Freedman, M. S. (2013) 'Teriflunomide in relapsing multiple sclerosis: therapeutic utility', *Therapeutic advances in chronic disease*, 4(5), 192–205. doi: 10.1177/2040622313492810.
- Fukutomi, T. *et al.* (2014) 'Kinetic, Thermodynamic, and Structural Characterizations of the Association between Nrf2-DLGex Degron and Keap1', *Molecular and Cellular Biology*, 34(5), 832–46. doi: 10.1128/mcb.01191-13.
- Fung, T. C., Olson, C. A. and Hsiao, E. Y. (2017) 'Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease', *Nature neuroscience*, 20(2), 145–155. doi: 10.1038/nn.4476.
- Galano, A., Guzmán-López, E. G. and Reiter, R. J. (2021) 'Potentiating the benefits of melatonin through chemical functionalization: Possible impact on multifactorial neurodegenerative

- disorders’, *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11584. doi: 10.3390/ijms222111584.
- Galano, A., Tan, D. X. and Reiter, R. J. (2018) ‘Melatonin: A Versatile Protector against Oxidative DNA Damage’, *Molecules*, 23(3), 530. doi: 10.3390/molecules23030530.
- García, J. A. *et al.* (2015) ‘Disruption of the NF- κ B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor- α and blocks the septic response in mice’, *FASEB Journal*, 29(9), 3863–3875. doi: 10.1096/fj.15-273656.
- Ghareghani, M., Zibara, K., *et al.* (2017) ‘Fluvoxamine stimulates oligodendrogenesis of cultured neural stem cells and attenuates inflammation and demyelination in an animal model of multiple sclerosis’, *Scientific reports*, 7(1), 4923. doi: 10.1038/s41598-017-04968-z.
- Ghareghani, M., Sadeghi, H., *et al.* (2017) ‘Melatonin Increases Oligodendrocyte Differentiation in Cultured Neural Stem Cells’, *Cellular and molecular neurobiology*, 37(7), 1319–1324. doi: 10.1007/s10571-016-0450-4.
- Ghareghani, M., Reiter, R. J., *et al.* (2018) ‘Latitude, Vitamin D, Melatonin, and Gut Microbiota Act in Concert to Initiate Multiple Sclerosis: A New Mechanistic Pathway’, *Frontiers in immunology*, 9, 2484. doi: 10.3389/fimmu.2018.02484.
- Ghareghani, M., Scavo, L., *et al.* (2018) ‘Melatonin therapy reduces the risk of osteoporosis and normalizes bone formation in multiple sclerosis’, *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 32(2), 181–187. doi: 10.1111/fcp.12337.
- Ghorbani, A. *et al.* (2013) ‘The Role of Melatonin in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis: A Case-Control Study’, *International Journal of Preventive Medicine*, 4(Suppl 2), S180-4. Available at: /pmc/articles/PMC3678214/ (Accessed: 31 March 2022).
- Giannoulia-Karantana, A. *et al.* (2007) ‘Melatonin and immunomodulation: Connections and potential clinical applications’, *NeuroImmunoModulation*, 13(3), 133–44. doi: 10.1159/000097258.

- Giovannoni, G. (2018) 'Disease-modifying treatments for early and advanced multiple sclerosis: a new treatment paradigm', *Current opinion in neurology*, 31(3), 233–243. doi: 10.1097/wco.0000000000000561.
- Glatigny, S. and Bettelli, E. (2018) 'Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS)', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(11), a028977. doi: 10.1101/cshperspect.a028977.
- Gold, R. *et al.* (2005) 'The long-term safety and tolerability of high-dose interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis: 4-year data from the PRISMS study', *European journal of neurology*, 12(8), 649–656. doi: 10.1111/j.1468-1331.2005.01083.x.
- Gold, R. and Wolinsky, J. S. (2011) 'Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide', *Acta neurologica Scandinavica*, 124(2), 75–84. doi: 10.1111/j.1600-0404.2010.01444.x.
- Gold, S. M. *et al.* (2003) 'Basal serum levels and reactivity of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor to standardized acute exercise in multiple sclerosis and controls', *Journal of Neuroimmunology*, 138(1–2), 99–105. doi: 10.1016/s0165-5728(03)00121-8.
- Gold, S. M. and Voskuhl, R. R. (2009) 'Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis', *Progress in Brain Research*, 175, 239–251. doi: 10.1016/s0079-6123(09)17516-7.
- Goldenberg, M. M. (2012) 'Multiple sclerosis review', *P and T*, 37(3), 175–184. Available at: /pmc/articles/PMC3351877/ (Accessed: 26 February 2021).
- Gonsette, R. (2008) 'Oxidative stress and excitotoxicity: a therapeutic issue in multiple sclerosis?', *Multiple sclerosis*, 14(1), 22–34. doi: 10.1177/1352458507080111.
- Govindarajan, V., De Rivero Vaccari, J. P. and Keane, R. W. (2020) 'Role of inflammasomes in multiple sclerosis and their potential as therapeutic targets', *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 1–15. doi: 10.1186/s12974-020-01944-9.

- Guerrero, B. L. and Sicotte, N. L. (2020) ‘Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe?’, *Frontiers in Immunology*, 11, 374. doi: 10.3389/fimmu.2020.00374.
- Gunata, M., Parlakpınar, H. and Acet, H. A. (2020) ‘Melatonin: A review of its potential functions and effects on neurological diseases’, *Revue Neurologique*, 176(3), 148–165. doi: 10.1016/j.neurol.2019.07.025.
- Guo, Y. *et al.* (2020) ‘Fingolimod suppressed the chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors via affecting microglial and NLRP3 inflammasome activation’, *Life Sciences*, 263, 118582. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118582.
- Haas, J. *et al.* (2019) ‘Alemtuzumab in multiple sclerosis: Short- And long-term effects of immunodepletion on the peripheral Treg compartment’, *Frontiers in Immunology*, 10, 1204. doi: 10.3389/fimmu.2019.01204.
- Haider, L. (2015) ‘Inflammation, Iron, Energy Failure, and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis’, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 725370. doi: 10.1155/2015/725370.
- Harbo, H. F., Gold, R. and Tintora, M. (2013) ‘Sex and gender issues in multiple sclerosis’, *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 6(4), 237–48. doi: 10.1177/1756285613488434.
- Hardeland, R. (2005) ‘Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance’, *Endocrine*, 27(2), 119–130. doi: 10.1385/endo:27:2:119.
- Hardeland, R. *et al.* (2011) ‘Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule’, *Progress in Neurobiology*, 93(3), 350–384. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.12.004.
- Härtter, S. *et al.* (2000) ‘Increased bioavailability of oral melatonin after fluvoxamine coadministration’, *Clinical pharmacology and therapeutics*, 67(1), 1–6. doi: 10.1067/mcp.2000.104071.

- Hassan, T. A. *et al.* (2021) 'Fractional anisotropy measurements of the left dorsolateral prefrontal cortex for therapeutic response assessment after repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in relapsing remitting multiple sclerosis patients suffering from depression', *Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine*, 52(1), 20. doi: 10.1186/s43055-020-00404-x.
- Hauser, S. and Goodwin, D. (2008) 'Multiple sclerosis and other demyelinating diseases', in *Harrison's principles of internal medicine*. 17th edn. New York: McGraw-Hill Medical, pp. 2611–21.
- Hauser, S. L. *et al.* (2020) 'Ofatumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis', *New England Journal of Medicine*, 383(6), 546–557. doi: 10.1056/NEJMoa1917246.
- Hauser, S. L. *et al.* (2021) 'Safety of Ocrelizumab in Patients With Relapsing and Primary Progressive Multiple Sclerosis', *Neurology*, 97(16), e1546–e1559. doi: 10.1212/WNL.00000000000012700.
- Hauser, S. L. and Cree, B. A. C. (2020) 'Treatment of Multiple Sclerosis: A Review', *The American journal of medicine*, 133(12), 1380–1390. doi: 10.1016/j.amjmed.2020.05.049.
- Havrdova, E., Horakova, D. and Kovarova, I. (2015) 'Alemtuzumab in the treatment of multiple sclerosis: key clinical trial results and considerations for use', *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 8(1), 31–45. doi: 10.1177/1756285614563522.
- He, C. *et al.* (2016) 'Mitochondria Synthesize Melatonin to Ameliorate Its Function and Improve Mice Oocyte's Quality under in Vitro Conditions', *International journal of molecular sciences*, 17(6), 939. doi: 10.3390/ijmsi17060939.
- He, D. *et al.* (2016) 'Teriflunomide for multiple sclerosis', *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016(3), CD009882. doi: 10.1002/14651858.CD009882.pub3.
- Holditch, S. J. *et al.* (2019) 'Recent Advances in Models, Mechanisms, Biomarkers, and Interventions in Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury', *International journal of molecular sciences*, 20(12), 3011. doi: 10.3390/ijms20123011.

- Holick, M. F. (1995) 'Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D', *American Journal of Clinical Nutrition*, 61(3 suppl), 638S-645S. doi: 10.1093/ajcn/61.3.638S.
- Holton, K. F. and Kirkland, A. E. (2020) 'Moving past antioxidant supplementation for the dietary treatment of multiple sclerosis', *Multiple Sclerosis Journal*, 26(9), 1012–1023. doi: 10.1177/1352458519893925.
- Hong, J. *et al.* (2002) 'Anti-viral properties of interferon beta treatment in patients with multiple sclerosis', *Multiple sclerosis*, 8(3), 237–242. doi: 10.1191/1352458502ms794oa.
- van den Hoogen, W. J., Laman, J. D. and 't Hart, B. A. (2017) 'Modulation of multiple sclerosis and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis by food and gut microbiota', *Frontiers in Immunology*, 8, 1081. doi: 10.3389/fimmu.2017.01081.
- Hor, J. H., Santosa, M. M. and Ng, S. Y. (2022) 'Role of SIRT3 and Mitochondrial Dysfunction in Neurodegeneration', *Neuromethods*, 173, 99–120. doi: 10.1007/978-1-0716-1712-0_5.
- Huang, S. H. *et al.* (2019) 'Melatonin possesses an anti-influenza potential through its immune modulatory effect', *Journal of Functional Foods*, 58, 189–198. doi: 10.1016/j.jff.2019.04.062.
- Huang, W. J., Chen, W. W. and Zhang, X. (2017) 'Multiple sclerosis: Pathology, diagnosis and treatments (review)', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(6), 3163–3166. doi: 10.3892/etm.2017.4410.
- Iannucci, A. *et al.* (2020) 'Toll-like receptor 4-mediated inflammation triggered by extracellular IFI16 is enhanced by lipopolysaccharide binding', *PLoS Pathogens*, 16(9), e1008811. doi: 10.1371/journal.ppat.1008811.
- Irani, D. N. (2017) 'Cerebrospinal fluid protein carbonylation identifies oxidative damage in autoimmune demyelination', *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 4(2), 145–150. doi: 10.1002/acn3.379.
- Ivankiv, Y. I. and Oleshchuk, O. M. (2020) 'Immunomodulatory effect of melatonin supplementation

- in experimental diabetes', *Pharmacologia*, 67(4), 223–228. doi: 10.3897/pharmacologia.67.e55437.
- Iwata, M., Ota, K. T. and Duman, R. S. (2013) 'The inflammasome: Pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses', *Brain, Behavior, and Immunity*, 31, 105–14. doi: 10.1016/j.bbi.2012.12.008.
- Jiang, T. *et al.* (2014) 'Nrf2 suppresses lupus nephritis through inhibition of oxidative injury and the NF- κ B-mediated inflammatory response', *Kidney International*, 85(2), 333–343. doi: 10.1038/ki.2013.343.
- Johnson, D. A. *et al.* (2009) 'The absence of the pro-antioxidant transcription factor Nrf2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis', *Toxicological Sciences*, 114(2), 237–46. doi: 10.1093/toxsci/kfp274.
- Kahroba, H. *et al.* (2021) 'The role of Nrf2 in neural stem/progenitors cells: From maintaining stemness and self-renewal to promoting differentiation capability and facilitating therapeutic application in neurodegenerative disease', *Ageing Research Reviews*, 65, 101211. doi: 10.1016/j.arr.2020.101211.
- Kang, C. and Blair, H. A. (2022) 'Ofatumumab: A Review in Relapsing Forms of Multiple Sclerosis', *Drugs*, 82(1), 55–62. doi: 10.1007/s40265-021-01650-7.
- Katsuoka, F. and Yamamoto, M. (2016) 'Small Maf proteins (MafF, MafG, MafK): History, structure and function', *Gene*, 586(2), 197–205. doi: 10.1016/j.gene.2016.03.058.
- Kawai, T. and Akira, S. (2010) 'The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors', *Nature Immunology*, 11(5), 373–384. doi: 10.1038/ni.1863.
- Kebir, H. *et al.* (2007) 'Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation', *Nature Medicine*, 13(10), 1173–5. doi: 10.1038/nm1651.
- Kennaway, D. J., Stamp, G. E. and Goble, F. C. (1992) 'Development of melatonin production in infants and the impact of prematurity', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*,

75(2), 367–369. doi: 10.1210/jcem.75.2.1639937.

Kern, S. *et al.* (2019) ‘Clinical relevance of circadian melatonin release in relapsing-remitting multiple sclerosis’, *Journal of Molecular Medicine*, 97(11), 1547–1555. doi: 10.1007/s00109-019-01821-w.

Khansari, N., Shakiba, Y. and Mahmoudi, M. (2009) ‘Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer’, *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, 3(1), 73–80. doi: 10.2174/187221309787158371.

Khorramizadeh, M. R. and Saadat, F. (2020) ‘Animal models for human disease’, in *Animal Biotechnology*, pp. 153–171. doi: 10.1016/B978-0-12-811710-1.00008-2.

Khoy, K. *et al.* (2020) ‘Natalizumab in Multiple Sclerosis Treatment: From Biological Effects to Immune Monitoring’, *Frontiers in Immunology*, 11, 549842. doi: 10.3389/fimmu.2020.549842.

Kieseier, B. C. (2011) ‘The mechanism of action of interferon- β in relapsing multiple sclerosis’, *CNS Drugs*, 25(6), 491–502. doi: 10.2165/11591110-000000000-00000.

Kilic, Ü. *et al.* (2005) ‘Signal transduction pathways involved in melatonin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia in mice’, *Journal of pineal research*, 38(1), 67–71. doi: 10.1111/j.1600-079X.2004.00178.x.

Kim, K. C. *et al.* (2010) ‘Up-regulation of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression by eckol, a phlorotannin compound, through activation of Erk and PI3K/Akt’, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(2), 297–305. doi: 10.1016/j.biocel.2009.11.009.

Kim, S. W. *et al.* (2020) ‘Melatonin controls microbiota in colitis by goblet cell differentiation and antimicrobial peptide production through Toll-like receptor 4 signalling’, *Scientific Reports*, 10(1), 2232. doi: 10.1038/s41598-020-59314-7.

Klibanski, A. *et al.* (2001) ‘Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy’, *Journal of the American*

- Medical Association*, 285(6), 785–795. doi: 10.1001/jama.285.6.785.
- Knaepen, K. *et al.* (2010) ‘Neuroplasticity exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: A systematic review of experimental studies in human subjects’, *Sports Medicine*, 40(9), 765–801. doi: 10.2165/11534530-000000000-00000.
- Kostoglou-Athanassiou, I. (2013) ‘Therapeutic applications of melatonin’, *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism*, 4(1), 13–24. doi: 10.1177/2042018813476084.
- Kourakis, S. *et al.* (2020) ‘Dimethyl Fumarate and Its Esters: A Drug with Broad Clinical Utility?’, *Pharmaceuticals (Basel)*, 13(10), 1–15. doi: 10.3390/ph13100306.
- Kroenke, M. A. *et al.* (2008) ‘IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition’, *Journal of Experimental Medicine*, 205(7), 1535–41. doi: 10.1084/jem.20080159.
- Kuhle, J. *et al.* (2015) ‘Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study’, *Multiple sclerosis*, 21(8), 1013–1024. doi: 10.1177/1352458514568827.
- Kunkl, M. *et al.* (2020) ‘T Helper Cells: The Modulators of Inflammation in Multiple Sclerosis’, *Cells*, 9(2), 482. doi: 10.3390/cells9020482.
- Kwilasz, A. J. *et al.* (2021) ‘Experimental autoimmune encephalopathy (EAE)-induced hippocampal neuroinflammation and memory deficits are prevented with the non-opioid TLR2/TLR4 antagonist (+)-naltrexone’, *Behavioural Brain Research*, 396, 112896. doi: 10.1016/j.bbr.2020.112896.
- Lagneux, C. *et al.* (2000) ‘Protective effects of melatonin against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart’, *Life Sciences*, 66(6), 503–509. doi: 10.1016/s0024-3205(99)00620-7.
- Lahooti, B. *et al.* (2021) ‘Therapeutic role of inflammasome inhibitors in neurodegenerative disorders’, *Brain, Behavior, and Immunity*, 91, 771–783. doi: 10.1016/j.bbi.2020.11.004.
- Langhnoja, J., Buch, L. and Pillai, P. (2021) ‘Potential role of NGF, BDNF, and their receptors in

- oligodendrocytes differentiation from neural stem cell: An in vitro study', *Cell Biology International*, 45(2), 432–446. doi: 10.1002/cbin.11500.
- Lardone, P. J. *et al.* (2011) 'Melatonin synthesized by T lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor', *Journal of Pineal Research*, 51(4), 454–462. doi: 10.1111/j.1600-079x.2011.00909.x.
- Laribi, B. *et al.* (2018) 'Characterization of CD4+ and CD8+ T Cell Subsets and Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4) in MS Patients Treated with Fingolimod (FTY-720): A Follow-up Study', *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*, 17(4), 346–360. doi: 10.18502/ijaai.v17i4.94.
- Lassmann, H., Brück, W. and Lucchinetti, C. F. (2007) 'The immunopathology of multiple sclerosis: An overview', *Brain Pathology*, 17(2), 210–218. doi: 10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x.
- Lassmann, H. and van Horssen, J. (2016) 'Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862(3), 506–10. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.09.018.
- Lassmann, H., van Horssen, J. and Mahad, D. (2012) 'Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis', *Nature reviews. Neurology*, 8(11), 647–656. doi: 10.1038/nrneurol.2012.168.
- Lee, J. G. *et al.* (2019) 'The neuroprotective effects of melatonin: Possible role in the pathophysiology of neuropsychiatric disease', *Brain Sciences*, 9(10), 285. doi: 10.3390/brainsci9100285.
- Lemprière, S. (2020) 'NLRP3 inflammasome activity as biomarker for primary progressive multiple sclerosis', *Nature Reviews Neurology*, 16(7), 350–350. doi: 10.1038/s41582-020-0366-y.
- Leon, J. *et al.* (2004) 'Melatonin and mitochondrial function', *Life sciences*, 75(7), 765–790. doi: 10.1016/j.lfs.2004.03.003.
- Lerner, A. B. *et al.* (1958) 'ISOLATION OF MELATONIN, THE PINEAL GLAND FACTOR THAT LIGHTENS MELANOCYTES¹', *Journal of the American Chemical Society*, 80(10), 2587.

doi: 10.1021/ja01543a060.

- Leto, T. L. and Geiszt, M. (2006) 'Role of Nox family NADPH oxidases in host defense', *Antioxidants & redox signaling*, 8(9–10), 1549–1561. doi: 10.1089/ars.2006.8.1549.
- Leung, J. W. H. *et al.* (2020) 'Protective Effects of Melatonin on Neurogenesis Impairment in Neurological Disorders and Its Relevant Molecular Mechanisms', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 1–30. doi: 10.3390/ijms21165645.
- Levine, R. L. *et al.* (1990) 'Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins', *Methods in Enzymology*, 186, 464–78. doi: 10.1016/0076-6879(90)86141-h.
- Li, D. Y. *et al.* (2013) 'Melatonin receptor genes in vertebrates', *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11208–11223. doi: 10.3390/ijms140611208.
- Li, T. *et al.* (2019) 'Exogenous melatonin as a treatment for secondary sleep disorders: A systematic review and meta-analysis', *Frontiers in Neuroendocrinology*, 52, 22–28. doi: 10.1016/j.yfrne.2018.06.004.
- Li, W. *et al.* (2008) 'Heterodimerization with small Maf proteins enhances nuclear retention of Nrf2 via masking the NESzip motif', *Biochimica et biophysica acta*, 1783(10), 1847–1856. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.05.024.
- Licht-Mayer, S. *et al.* (2015) 'Cell type-specific Nrf2 expression in multiple sclerosis lesions', *Acta Neuropathologica*, 130(2), 263–277. doi: 10.1007/s00401-015-1452-x.
- Liddell, J. R. (2017) 'Are astrocytes the predominant cell type for activation of Nrf2 in aging and neurodegeneration?', *Antioxidants*, 6(3), 65. doi: 10.3390/antiox6030065.
- Liu, C. *et al.* (2022) 'The gut microbiome: implications for neurogenesis and neurological diseases', *Neural regeneration research*, 17(1), 53–58. doi: 10.4103/1673-5374.315227.
- Liu, J. *et al.* (2016) 'MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective', *Annual review of pharmacology and toxicology*, 56, 361–83. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010814-124742.

- Liu, T. *et al.* (2017) 'NF- κ B signaling in inflammation', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1), 1–9. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
- Liu, Z. *et al.* (2017) 'Melatonin alleviates inflammasome-induced pyroptosis through inhibiting NF- κ B/GSDMD signal in mice adipose tissue', *Journal of pineal research*, 63(1). doi: 10.1111/jpi.12414.
- Ljubisavljevic, S. (2016) 'Oxidative Stress and Neurobiology of Demyelination', *Molecular neurobiology*, 53(1), 744–758. doi: 10.1007/s12035-014-9041-x.
- Long, T. *et al.* (2018) 'Neuroprotective Effects of Melatonin on Experimental Allergic Encephalomyelitis Mice Via Anti-Oxidative Stress Activity', *Journal of Molecular Neuroscience*, 64(2), 233–241. doi: 10.1007/s12031-017-1022-x.
- López-González, A. *et al.* (2015) 'Melatonin treatment improves primary progressive multiple sclerosis: A case report', *Journal of Pineal Research*, 58(2), 173–177. doi: 10.1111/jpi.12203.
- Lu, F. *et al.* (2000) 'Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis', *Journal of the neurological sciences*, 177(2), 95–103. doi: 10.1016/s0022-510x(00)00343-9.
- Lublin, F. D. *et al.* (2014) 'Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions', *Neurology*, 83(3), 278–86. doi: 10.1212/wnl.0000000000000560.
- Lucken-Ardjomande, S. and Martinou, J. C. (2005) 'Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane', *Comptes Rendus Biologies*, 328(7), 616–631. doi: 10.1016/j.crvi.2005.05.002.
- Luo, Y., Peng, M. and Wei, H. (2017) 'Melatonin promotes brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression and anti-apoptotic effects in neonatal hemolytic hyperbilirubinemia via a phospholipase (PLC)- mediated mechanism', *Medical Science Monitor*, 23, 5951–5959. doi: 10.12659/msm.907592.

- Mado, H. and Adamczyk-Sowa, M. (2021) 'Multiple sclerosis patients and COVID-19', *The Egyptian journal of neurology, psychiatry and neurosurgery*, 57(1), 43. doi: 10.1186/s41983-021-00287-3.
- Maghzi, A. H. *et al.* (2020) 'COVID-19 in teriflunomide-treated patients with multiple sclerosis', *Journal of Neurology*, 267(10), 2790–2796. doi: 10.1007/s00415-020-09944-8.
- Mahad, D. H., Trapp, B. D. and Lassmann, H. (2015) 'Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis', *The Lancet Neurology*, 14(2), 183–193. doi: 10.1016/s1474-4422(14)70256-x.
- Mailloux, R. J., McBride, S. L. and Harper, M. E. (2013) 'Unearthing the secrets of mitochondrial ROS and glutathione in bioenergetics', *Trends in biochemical sciences*, 38(12), 592–602. doi: 10.1016/j.tibs.2013.09.001.
- Maldonado, M. D. *et al.* (2010) 'Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation', *Pharmacological Research*, 62(3), 282–287. doi: 10.1016/j.phrs.2009.11.014.
- Malhotra, S. *et al.* (2020) 'NLRP3 inflammasome as prognostic factor and therapeutic target in primary progressive multiple sclerosis patients', *Brain*, 143(5), 1414–1430. doi: 10.1093/brain/awaa084.
- Mantovani, M. *et al.* (2003) 'Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: Evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway', *Neuroscience Letters*, 343(1), 1–4. doi: 10.1016/s0304-3940(03)00306-9.
- Marcus, J. M. and Andrabi, S. A. (2018) 'SIRT3 Regulation Under Cellular Stress: Making Sense of the Ups and Downs', *Frontiers in Neuroscience*, 12, 799. doi: 10.3389/fnins.2018.00799.
- Marrie, R. A. *et al.* (2015) 'The incidence and prevalence of psychiatric disorders in multiple sclerosis: A systematic review', *Multiple Sclerosis Journal*, 21(3), 305–17. doi:

10.1177/1352458514564487.

- Martín, M. *et al.* (2000) 'Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress', *FASEB journal*, 14(12), 1677–1679. doi: 10.1096/fj.99-0865fje.
- Martín, M. *et al.* (2002) 'Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria', *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(4), 348–357. doi: 10.1016/s1357-2725(01)00138-8.
- Matías-Guiu, J. *et al.* (2020) 'Should we expect neurological symptoms in the SARS-CoV-2 epidemic?', *Neurologia*, 35(3), 170–175. doi: 10.1016/j.nrl.2020.03.001.
- Mauriz, J. L. *et al.* (2013) 'A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives', *Journal of pineal research*, 54(1), 1–14. doi: 10.1111/j.1600-079x.2012.01014.x.
- Mayer, E. A., Tillisch, K. and Gupta, A. (2015) 'Gut/brain axis and the microbiota', *The Journal of Clinical Investigation*, 125(3), 926–38. doi: 10.1172/jci76304.
- Mazzucchelli, C. *et al.* (1996) 'The melatonin receptor in the human brain: cloning experiments and distribution studies', *Brain research. Molecular brain research*, 39(1–2), 117–126. doi: 10.1016/0169-328x(96)00017-4.
- McQualter, J. L. and Bernard, C. C. A. (2007) 'Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair', *Journal of neurochemistry*, 100(2), 295–306. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04232.x.
- Medina-Fernandez, F. *et al.* (2017) 'Effects of transcranial magnetic stimulation on oxidative stress in experimental autoimmune encephalomyelitis', *Free radical research*, 51(5), 460–469. doi: 10.1080/10715762.2017.1324955.
- Medina-Fernandez, F. *et al.* (2018) 'Comparative of transcranial magnetic stimulation and other treatments in experimental autoimmune encephalomyelitis', *Brain research bulletin*, 137, 140–

145. doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.11.018.

Medina-Fernández, F. J. *et al.* (2017) ‘Transcranial magnetic stimulation modifies astrocytosis, cell density and lipopolysaccharide levels in experimental autoimmune encephalomyelitis’, *Life Sciences*, 169, 20–26. doi: 10.1016/j.lfs.2016.11.011.

Meisner, M. (2002) ‘Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin’, *Clinica Chimica Acta*, 323(1–2), 17–29. doi: 10.1016/s0009-8981(02)00101-8.

Melatonin in Patients With Multiple Sclerosis (MS). - Full Text View - *ClinicalTrials.gov* (2018). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03498131> (Accessed: 3 September 2021).

Melhuish-Beaupre, L. M. *et al.* (2021) ‘Melatonin’s neuroprotective role in mitochondria and its potential as a biomarker in aging, cognition and psychiatric disorders’, *Translational Psychiatry*, 11(1), 1–10. doi: 10.1038/s41398-021-01464-x.

Mendiola, A. S. and Cardona, A. E. (2018) ‘The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases’, *Journal of Neural Transmission*, 125(5), 781–795. doi: 10.1007/s00702-017-1732-9.

Miao, E. A., Rajan, J. V. and Aderem, A. (2011) ‘Caspase-1-induced pyroptotic cell death’, *Immunological reviews*, 243(1), 206–214. doi: 10.1111/j.1600-065x.2011.01044.x.

Michaličková, D. *et al.* (2020) ‘Targeting Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in multiple sclerosis’, *European Journal of Pharmacology*, 873, 172973. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.172973.

Michaličková, D., Šíma, M. and Slanař, O. (2020) ‘New insights in the mechanisms of impaired redox signaling and its interplay with inflammation and immunity in multiple sclerosis’, *Physiological Research*, 69, 1–19. doi: 10.33549/physiolres.934276.

Miller, D. H., Chard, D. T. and Ciccarelli, O. (2012) ‘Clinically isolated syndromes’, *The Lancet. Neurology*, 11(2), 157–169. doi: 10.1016/s1474-4422(11)70274-5.

Miller, E. *et al.* (2011) ‘Effects of whole-body cryotherapy on a total antioxidative status and activities of antioxidative enzymes in blood of depressive multiple sclerosis patients’, *The world journal*

of biological psychiatry, 12(3), 223–227. doi: 10.3109/15622975.2010.518626.

- Miller, E. *et al.* (2013) ‘Melatonin reduces oxidative stress in the erythrocytes of multiple sclerosis patients with secondary progressive clinical course’, *Journal of neuroimmunology*, 257(1–2), 97–101. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.02.012.
- Miller, E. *et al.* (2014) ‘Melatonin Redox Activity. Its Potential Clinical Applications in Neurodegenerative Disorders’, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(2), 163–169. doi: 10.2174/1568026615666141209160556.
- Mills, E. A. and Mao-Draayer, Y. (2018) ‘Aging and lymphocyte changes by immunomodulatory therapies impact PML risk in multiple sclerosis patients’, *Multiple sclerosis*, 24(8), 1014–1022. doi: 10.1177/1352458518775550.
- Miyake, S. *et al.* (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), e0137429. doi: 10.1371/journal.pone.0137429.
- Mocayar-Marón, F. J. *et al.* (2020) ‘Daily and seasonal mitochondrial protection: Unraveling common possible mechanisms involving vitamin D and melatonin’, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 199, 105595. doi: 10.1016/j.jsbmb.2020.105595.
- Morciano, G. *et al.* (2015) ‘Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury’, *Journal of molecular and cellular cardiology*, 78, 142–153. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.08.015.
- Morris, G. *et al.* (2018) ‘The putative role of oxidative stress and inflammation in the pathophysiology of sleep dysfunction across neuropsychiatric disorders: Focus on chronic fatigue syndrome, bipolar disorder and multiple sclerosis’, *Sleep Medicine Reviews*, 41, 255–265. doi: 10.1016/j.smr.2018.03.007.
- Morris, G. *et al.* (2021) ‘Increasing Nrf2 Activity as a Treatment Approach in Neuropsychiatry’,

Molecular Neurobiology, 58(5), 2158–2182. doi: 10.1007/s12035-020-02212-w.

Mukherjee, S. and Ghosh, A. (2020) ‘Molecular mechanism of mitochondrial respiratory chain assembly and its relation to mitochondrial diseases’, *Mitochondrion*, 53, 1–20. doi: 10.1016/j.mito.2020.04.002.

Muller, F. L., Liu, Y. and Van Remmen, H. (2004) ‘Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane’, *The Journal of biological chemistry*, 279(47), 49064–49073. doi: 10.1074/jbc.m407715200.

Munschauer, F. E. and Kinkel, R. P. (1997) ‘Managing side effects of interferon-beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis’, *Clinical therapeutics*, 19(5), 883–893. doi: 10.1016/s0149-2918(97)80042-2.

Musshoff, U. *et al.* (2002) ‘Melatonin receptors in rat hippocampus: Molecular and functional investigations’, *Hippocampus*, 12(2), 165–73. doi: 10.1002/hipo.1105.

Mycko, M. (2020) ‘B cell targeting therapies in MS patients during the SARS-CoV-2 pandemic - when immunosuppression meets infection?’, *Neurologia i neurochirurgia polska*, 54(6), 490–501. doi: 10.5603/PJNNS.a2020.0083.

Naegelin, Y. *et al.* (2020) ‘Levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with multiple sclerosis’, *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 7(11), 2251–2261. doi: 10.1002/acn3.51215.

Ng, K. Y. *et al.* (2017) ‘Melatonin receptors: distribution in mammalian brain and their respective putative functions’, *Brain Structure and Function*, 222(7), 2921–2939. doi: 10.1007/s00429-017-1439-6.

Nickel, M. and Gu, C. (2018) ‘Regulation of central nervous system myelination in higher brain functions’, *Neural Plasticity*, 2018, 6436453. doi: 10.1155/2018/6436453.

Nicot, A. (2009) ‘Gender and sex hormones in multiple sclerosis pathology and therapy’, *Frontiers in*

Bioscience (Landmark Edition), 14(12), 4477–515. doi: 10.2741/3543.

Nien, H. C. *et al.* (2017) ‘High serum lipopolysaccharide-binding protein level in chronic hepatitis C viral infection is reduced by anti-viral treatments’, *PLoS ONE*, 12(1), e0170028. doi: 10.1371/journal.pone.0170028.

Nikolaev, G., Robeva, R. and Konakchieva, R. (2021) ‘Membrane Melatonin Receptors Activated Cell Signaling in Physiology and Disease’, *International journal of molecular sciences*, 23(1), 471. doi: 10.3390/ijms23010471.

Nociti, V. (2020) ‘What is the role of Brain derived neurotrophic factor in Multiple Sclerosis neuroinflammation?’, *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 7(3), 291–299. doi: 10.20517/2347-8659.2020.25.

Noctor, G. *et al.* (2000) ‘Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling’, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1402), 1465–75. doi: 10.1098/rstb.2000.0707.

Nosjean, O. *et al.* (2000) ‘Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2’, *The Journal of biological chemistry*, 275(40), 31311–31317. doi: 10.1074/jbc.M005141200.

Noto, D. and Miyake, S. (2020) ‘Gut dysbiosis and multiple sclerosis’, *Clinical Immunology*, 235, 108380. doi: 10.1016/j.clim.2020.108380.

Nouri, M. *et al.* (2014) ‘Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis, and can be induced by adoptive transfer of auto-reactive T cells’, *PloS one*, 9(9), e106335. doi: 10.1371/journal.pone.0106335.

Number of people with MS / Atlas of MS (2020). Available at: <https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms> (Accessed: 28 December 2021).

- Ochoa-Repáraz, J. *et al.* (2011) ‘Gut, bugs, and brain: Role of commensal bacteria in the control of central nervous system disease’, *Annals of Neurology*, 69(2), 240–247. doi: 10.1002/ana.22344.
- Oeckinghaus, A. and Ghosh, S. (2009) ‘The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation’, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(4), a000034. doi: 10.1101/cshperspect.a000034.
- Olcum, M. *et al.* (2020) ‘Microglial NLRP3 inflammasome activation in multiple sclerosis’, *Advances in protein chemistry and structural biology*, 119, 247–308. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.08.007.
- Olla, S. *et al.* (2021) ‘Combining Human Genetics of Multiple Sclerosis with Oxidative Stress Phenotype for Drug Repositioning’, *Pharmaceutics*, 13(12), 2064. doi: 10.3390/pharmaceutics13122064.
- Onaolapo, O. J. *et al.* (2019) ‘Melatonin and Melatonergic Influence on Neuronal Transcription Factors: Implications for the Development of Novel Therapies for Neurodegenerative Disorders’, *Current Neuropharmacology*, 18(7), 563–577. doi: 10.2174/1570159x18666191230114339.
- Ontaneda, D., Hyland, M. and Cohen, J. A. (2012) ‘Multiple sclerosis: New insights in pathogenesis and novel therapeutics’, *Annual Review of Medicine*, 63, 389–404. doi: 10.1146/annurev-med-042910-135833.
- Oraby, M. I. *et al.* (2021) ‘Serum level of brain-derived neurotrophic factor in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis: a potential biomarker for disease activity’, *Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, 57(1), 40. doi: 10.1186/s41983-021-00296-2.
- Özdem, M. *et al.* (2017) ‘Antioxidant effects of melatonin in heart tissue after induction of experimental periodontitis in rats’, *Journal of oral science*, 59(1), 23–29. doi: 10.2334/josnusd.16-0034.
- Pandi-Perumal, S. R. *et al.* (2006) ‘Melatonin: Nature’s most versatile biological signal?’, *The FEBS*

journal, 273(13), 2813–2838. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05322.x.

- Pandit, A. *et al.* (2009) ‘Impaired regulation of electron transport chain subunit genes by nuclear respiratory factor 2 in multiple sclerosis’, *Journal of the Neurological Sciences*, 279(1–2), 14–20. doi: 10.1016/j.jns.2009.01.009.
- Pareek, T. K. *et al.* (2011) ‘Triterpenoid modulation of IL-17 and Nrf-2 expression ameliorates neuroinflammation and promotes remyelination in autoimmune encephalomyelitis’, *Scientific reports*, 1, 201. doi: 10.1038/srep00201.
- Park, B. S. and Lee, J. O. (2013) ‘Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes’, *Experimental & Molecular Medicine*, 45(12), e66–e66. doi: 10.1038/emm.2013.97.
- Parmar, P. *et al.* (2002) ‘Melatonin protects against copper-mediated free radical damage’, *Journal of pineal research*, 32(4), 237–242. doi: 10.1034/j.1600-079x.2002.01859.x.
- Parodi, B. and 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, 718220. doi: 10.3389/fimmu.2021.718220.
- Patel, N. *et al.* (2020) ‘Structure-based discovery of potent and selective melatonin receptor agonists’, *eLife*, 9, e53779. doi: 10.7554/eLife.53779.
- Patsopoulos, N. A. *et al.* (2013) ‘Fine-Mapping the Genetic Association of the Major Histocompatibility Complex in Multiple Sclerosis: HLA and Non-HLA Effects’, *PLoS Genetics*. Edited by G. Gibson, 9(11), e1003926. doi: 10.1371/journal.pgen.1003926.
- Patsopoulos, N. A. *et al.* (2019) ‘Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility’, *Science*, 365(6460), eaav7188. doi: 10.1126/science.aav7188.
- Peña-Toledo, M. A. *et al.* (2021) ‘Transcranial magnetic stimulation improves muscle involvement in experimental autoimmune encephalomyelitis’, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8589. doi: 10.3390/ijms22168589.

- Pérez-Nievas, B. G. *et al.* (2010) 'Chronic immobilisation stress ameliorates clinical score and neuroinflammation in a MOG-induced EAE in Dark Agouti rats: Mechanisms implicated', *Journal of Neuroinflammation*, 7, 60. doi: 10.1186/1742-2094-7-60.
- Perricone, C., De Carolis, C. and Perricone, R. (2009) 'Glutathione: a key player in autoimmunity', *Autoimmunity reviews*, 8(8), 697–701. doi: 10.1016/j.autrev.2009.02.020.
- Poza, J. J. *et al.* (2018) 'Melatonin in sleep disorders', *Neurologia*. S0213-4853(18)30200-7 doi: 10.1016/j.nrl.2018.08.002.
- Qin, J. *et al.* (2010) 'A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing', *Nature*, 464(7285), 59–65. doi: 10.1038/nature08821.
- Radogna, F. *et al.* (2007) 'Melatonin antagonizes apoptosis via receptor interaction in U937 monocytic cells', *Journal of pineal research*, 43(2), 154–162. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00455.x.
- Radogna, F. *et al.* (2008) 'Melatonin antagonizes the intrinsic pathway of apoptosis via mitochondrial targeting of Bcl-2', *Journal of pineal research*, 44(3), 316–325. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00532.x.
- Radogna, F., Diederich, M. and Ghibelli, L. (2010) 'Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation', *Biochemical pharmacology*, 80(12), 1844–1852. doi: 10.1016/j.bcp.2010.07.041.
- Rahn, K., Slusher, B. and Kaplin, A. (2012) 'Cognitive impairment in multiple sclerosis: a forgotten disability remembered', *Cerebrum*, 2012, 14.
- Ramirez-Ramirez, V. *et al.* (2013) 'Efficacy of fish oil on serum of TNF α , IL-1 β , and IL-6 oxidative stress markers in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 709493. doi: 10.1155/2013/709493.
- Ramos González, E. J. *et al.* (2018) 'Estudio comparativo de melatonina contra los tratamientos inmunomoduladores (interferón beta y acetato de glatirámico) en un modelo murino de

- esclerosis múltiple’, *Neurologia*, 36(4), 262–270. doi: 10.1016/j.nrl.2018.01.007.
- Ran, D. *et al.* (2018) ‘Melatonin attenuates hLRRK2-induced long-term memory deficit in a drosophila model of Parkinson’s disease’, *Biomedical Reports*, 9(3), 221–226. doi: 10.3892/br.2018.1125.
- Rathbone, E. *et al.* (2018) ‘Cerebrospinal fluid immunoglobulin light chain ratios predict disease progression in multiple sclerosis’, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 89(10), 1044–1049. doi: 10.1136/jnnp-2018-317947.
- Ray, P. D., Huang, B. W. and Tsuji, Y. (2012) ‘Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling’, *Cellular signalling*, 24(5), 981–90. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
- Razavi, S. *et al.* (2015) ‘Neurotrophic factors and their effects in the treatment of multiple sclerosis’, *Advanced Biomedical Research*, 4(1), 53. doi: 10.4103/2277-9175.151570.
- Reich, D. S., Lucchinetti, C. F. and Calabresi, P. A. (2018) ‘Multiple Sclerosis’, *The New England journal of medicine*. Edited by D. L. Longo, 378(2), 169–180. doi: 10.1056/NEJMra1401483.
- Reiter, R. *et al.* (2000) ‘Melatonin and its relation to the immune system and inflammation’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917, 376–386. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05402.x.
- Reiter, R. J. (1991) ‘Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions’, *Endocrine reviews*, 12(2), 151–180. doi: 10.1210/edrv-12-2-151.
- Reiter, R. J. (2003) ‘Melatonin: clinical relevance’, *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 17(2), 273–285. doi: 10.1016/s1521-690x(03)00016-2.
- Reiter, R. J. *et al.* (2007) ‘Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions’, *Advances in medical sciences*, 52, 11–28.
- Reiter, R. J. *et al.* (2016) ‘Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers’, *Journal of pineal research*, 61(3), 253–278. doi: 10.1111/jpi.12360.
- Reiter, R. J. *et al.* (2017) ‘Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution’s best

- ideas', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(21), 3863–3881. doi: 10.1007/s00018-017-2609-7.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Rosales-Corral, S., Galano, A., Jou, M. J., *et al.* (2018) 'Melatonin mitigates mitochondrial meltdown: Interactions with SIRT3', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2439. doi: 10.3390/ijms19082439.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Rosales-Corral, S., Galano, A., Zhou, X. J., *et al.* (2018) 'Mitochondria: Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions', *Molecules*, 23(2), 509. doi: 10.3390/molecules23020509.
- Reiter, R. J. *et al.* (2021) 'Melatonin synthesis in and uptake by mitochondria: implications for diseased cells with dysfunctional mitochondria', *Future Medicinal Chemistry*, 13(4), 335–339. doi: 10.4155/fmc-2020-0326.
- Reiter, R. J., Tan, D. X. and Galano, A. (2014) 'Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity', *Frontiers in Physiology*, 5, 377. doi: 10.3389/fphys.2014.00377.
- Reyes, S. *et al.* (2021) 'Update on the management of multiple sclerosis during the COVID-19 pandemic and post pandemic: An international consensus statement', *Journal of neuroimmunology*, 357, 577627. doi: 10.1016/j.jneuroim.2021.577627.
- Reynolds, I. J. *et al.* (2004) 'Mitochondrial trafficking in neurons: a key variable in neurodegeneration?', *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 36(4), 283–286. doi: 10.1023/B:JOB.0000041754.78313.c2.
- Ribbons, K. A. *et al.* (2015) 'Male sex is independently associated with faster disability accumulation in relapse-onset MS but not in primary progressive MS', *PLoS ONE*, 10(6), e0122686. doi: 10.1371/journal.pone.0122686.
- Ricart-Jané, D., Llobera, M. and López-Tejero, M. D. (2002) 'Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method', *Nitric Oxide -*

Biology and Chemistry, 6(2), 178–185. doi: 10.1006/niox.2001.0392.

- Rice, C. M. *et al.* (2012) ‘Mitochondrial sirtuins--a new therapeutic target for repair and protection in multiple sclerosis’, *The European journal of neuroscience*, 35(12), 1887–1893. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08150.x.
- Ringheim, G. E. *et al.* (2013) ‘Teriflunomide Attenuates Immunopathological Changes in the Dark Agouti Rat Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis’, *Frontiers in Neurology*, 4, 169. doi: 10.3389/fneur.2013.00169.
- Rivers, T. M., Sprunt, D. H. and Berry, G. P. (1933) ‘OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS’, *The Journal of experimental medicine*, 58(1), 39–52. doi: 10.1084/jem.58.1.39.
- Rogowska-Wrzesinska, A. *et al.* (2014) ‘Analysis of protein carbonylation--pitfalls and promise in commonly used methods’, *Free radical research*, 48(10), 1145–1162. doi: 10.3109/10715762.2014.944868.
- Romero, A. *et al.* (2020) ‘Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and Its Neuroinvasive Capacity: Is It Time for Melatonin?’, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 42(3), 489–500. doi: 10.1007/s10571-020-00938-8.
- Roostaei, T. *et al.* (2021) ‘Proximal and distal effects of genetic susceptibility to multiple sclerosis on the T cell epigenome’, *Nature communications*, 12(1), 7078. doi: 10.1038/s41467-021-27427-w.
- Rosales-Corral, S. *et al.* (2012) ‘Alzheimer’s disease: pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin’, *Journal of pineal research*, 52(2), 167–202. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00937.x.
- Sadam, H. *et al.* (2021) ‘Identification of two highly antigenic epitope markers predicting multiple sclerosis in optic neuritis patients’, *EBioMedicine*, 64, 103211. doi:

10.1016/j.ebiom.2021.103211.

- Sainz, R. M. *et al.* (2003) ‘Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells’, *Cellular and molecular life sciences*, 60(7), 1407–1426. doi: 10.1007/s00018-003-2319-1.
- Sakkas, G. K. *et al.* (2019) ‘Sleep Abnormalities in Multiple Sclerosis’, *Current Treatment Options in Neurology*, 21(1), 4. doi: 10.1007/s11940-019-0544-7.
- San Hernandez, A. *et al.* (2020) ‘Multiple Sclerosis and Serotonin: Potential Therapeutic Applications’, *Cureus*, 12(11), e11293. doi: 10.7759/cureus.11293.
- Sánchez-López, A. L. *et al.* (2018) ‘Efficacy of Melatonin on Serum Pro-inflammatory Cytokines and Oxidative Stress Markers in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis’, *Archives of Medical Research*, 49(6), 391–398. doi: 10.1016/j.arcmed.2018.12.004.
- Sarchielli, P. *et al.* (2007) ‘Production of brain-derived neurotrophic factor by mononuclear cells of patients with multiple sclerosis treated with glatiramer acetate, interferon- β 1a, and high doses of immunoglobulins’, *Multiple Sclerosis*, 13(3), 313–331. doi: 10.1177/1352458506070146.
- Scannevin, R. H. *et al.* (2012) ‘Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway’, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 341(1), 274–284. doi: 10.1124/jpet.111.190132.
- Schafer, F. Q. and Buettner, G. R. (2001) ‘Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple’, *Free radical biology & medicine*, 30(11), 1191–1212. doi: 10.1016/s0891-5849(01)00480-4.
- Schreibelt, G. *et al.* (2007) ‘Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology’, *Brain research reviews*, 56(2), 322–330. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.07.005.

- Schwenkenbecher, P. *et al.* (2017) 'Clinically Isolated Syndrome According to McDonald 2010: Intrathecal IgG Synthesis Still Predictive for Conversion to Multiple Sclerosis', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2061. doi: 10.3390/ijms18102061.
- Severa, M. *et al.* (2020) 'Three Decades of Interferon- β in Multiple Sclerosis: Can We Repurpose This Information for the Management of SARS-CoV2 Infection?', *Frontiers in Immunology*, 11, 1459. doi: 10.3389/fimmu.2020.01459.
- Shah, S. A. *et al.* (2017) 'Melatonin Stimulates the SIRT1/Nrf2 Signaling Pathway Counteracting Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Oxidative Stress to Rescue Postnatal Rat Brain', *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 23(1), 33–44. doi: 10.1111/cns.12588.
- Shalaby, N. M. and Shehata, H. S. (2021) 'Could SARS-CoV-2 herald a surge of multiple sclerosis?', *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, 57(1), 22. doi: 10.1186/s41983-021-00277-5.
- Sharan, K. *et al.* (2017) 'Regulation of bone mass through pineal-derived melatonin-MT2 receptor pathway', *Journal of Pineal Research*, 63(2), e12423. doi: 10.1111/jpi.12423.
- Sharief, M. K. and Hentges, R. (1991) 'Association between Tumor Necrosis Factor- α and Disease Progression in Patients with Multiple Sclerosis', *New England Journal of Medicine*, 325(7), 467–72. doi: 10.1056/nejm199108153250704.
- Sharifian-Dorche, M. *et al.* (2021) 'COVID-19 and disease-modifying therapies in patients with demyelinating diseases of the central nervous system: A systematic review', *Multiple sclerosis and related disorders*, 50, 102800. doi: 10.1016/j.msard.2021.102800.
- Shi, L. *et al.* (2018) 'Melatonin regulates apoptosis and autophagy Via ROS-MST1 pathway in subarachnoid hemorrhage', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 93. doi: 10.3389/fnmol.2018.00093.
- Simon, K. C., Munger, K. L. and Ascherio, A. (2012) 'Vitamin D and multiple sclerosis:

- Epidemiology, immunology, and genetics’, *Current Opinion in Neurology*, 25(3), 246–251. doi: 10.1097/WCO.0b013e3283533a7e.
- Skarlis, C. and Anagnostouli, M. (2020) ‘The role of melatonin in Multiple Sclerosis’, *Neurological Sciences*, 41(4), 769–781. doi: 10.1007/s10072-019-04137-2.
- Slominski, A. *et al.* (2008) ‘Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions’, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 19(1), 17–24. doi: 10.1016/j.tem.2007.10.007.
- Slominski, R. M. *et al.* (2012) ‘Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions’, *Molecular and cellular endocrinology*, 351(2), 152–166. doi: 10.1016/j.mce.2012.01.004.
- Smirnov, A. N. (2001) ‘Nuclear melatonin receptors’, *Biochemistry*, 66(1), 19–26. doi: 10.1023/a:1002821427018.
- Smith, K. J. and Lassmann, H. (2002) ‘The role of nitric oxide in multiple sclerosis’, *The Lancet. Neurology*, 1(4), 232–241. doi: 10.1016/s1474-4422(02)00102-3.
- Smith, T. and Kister, I. (2021) ‘Infection Mitigation Strategies for Multiple Sclerosis Patients on Oral and Monoclonal Disease-Modifying Therapies’, *Current neurology and neuroscience reports*, 21(7), 36. doi: 10.1007/s11910-021-01117-y.
- Sormani, M. *et al.* (2021) ‘Disease-Modifying Therapies and Coronavirus Disease 2019 Severity in Multiple Sclerosis’, *Annals of neurology*, 89(4), 780–789. doi: 10.1002/ana.26028.
- Soto-Brambila, A. P. *et al.* (2017) ‘Relapsing Remitting Multiple Sclerosis and its Relationship with the Immune System and Oxidative Stress’, *Current Immunology Reviews*, 14(1), 15–23. doi: 10.2174/1573395514666171226154300.
- Stadelmann, C. *et al.* (2002) ‘BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: Neuroprotective interactions between immune and neuronal cells?’, *Brain*, 125(1), 75–85. doi: 10.1093/brain/awf015.

- Stein, E. M. *et al.* (2017) 'The Epidemic of Despair Among White Americans: Trends in the Leading Causes of Premature Death, 1999-2015', *American journal of public health*, 107(10), 1541–1547. doi: 10.2105/AJPH.2017.303941.
- Stosic-Grujicic, S. *et al.* (2004) 'Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats without adjuvant', *Clinical and Experimental Immunology*, 136(1), 49–55. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02418.x.
- Sun, F. Y. *et al.* (2002) 'Neuroprotection by melatonin against ischemic neuronal injury associated with modulation of DNA damage and repair in the rat following a transient cerebral ischemia', *Journal of pineal research*, 33(1), 48–56. doi: 10.1034/j.1600-079X.2002.01891.x.
- Sun, S. C. (2012) 'The noncanonical NF- κ B pathway', *Immunological reviews*, 246(1), 125–140. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01088.x.
- Sunami, E. *et al.* (2012) 'A preliminary study of fluvoxamine maleate on depressive state and serum melatonin levels in patients after cerebral infarction', *Internal medicine*, 51(10), 1187–1193. doi: 10.2169/internalmedicine.51.6699.
- Suofu, Y. *et al.* (2017) 'Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(38), E7997–E8006. doi: 10.1073/pnas.1705768114.
- Suzuki, Y. J., Carini, M. and Butterfield, D. A. (2010) 'Protein Carbonylation', *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(3), 323–5. doi: 10.1089/ars.2009.2887.
- Syed, Y. Y. (2018) 'Ocrelizumab: A Review in Multiple Sclerosis', *CNS Drugs*, 32(9), 883–890. doi: 10.1007/s40263-018-0568-7.
- Talbot, P. J. *et al.* (2005) 'Coronaviruses and Neuroantigens: myelin proteins, myelin genes', in *Experimental Models of Multiple Sclerosis*. Nature Publishing Group, pp. 781–791. doi: 10.1007/0-387-25518-4_43.

- Tan, D.-X. (2010) 'Melatonin and Brain', *Current Neuropharmacology*, 8(3), 161. doi: 10.2174/157015910792246263.
- Tan, D. X. *et al.* (2018) 'Pineal Calcification, Melatonin Production, Aging, Associated Health Consequences and Rejuvenation of the Pineal Gland', *Molecules*, 23(2), 301. doi: 10.3390/molecules23020301.
- Tan, D. X. and Hardeland, R. (2020) 'Targeting host defense system and rescuing compromised mitochondria to increase tolerance against pathogens by melatonin may impact outcome of deadly virus infection pertinent to COVID-19', *Molecules*, 25(19), 4410. doi: 10.3390/molecules25194410.
- Tarocco, A. *et al.* (2019) 'Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care', *Cell Death & Disease*, 10(4), 1–12. doi: 10.1038/s41419-019-1556-7.
- Tasset, I. *et al.* (2010) 'Antioxidant-like effects and protective action of transcranial magnetic stimulation in depression caused by olfactory bulbectomy', *Neurochemical Research*, 35(8), 1182–1187. doi: 10.1007/s11064-010-0172-9.
- Tasset, I., Agüera, E., *et al.* (2011) 'Melatonin improves 3-nitropropionic acid induced behavioral alterations and neurotrophic factors levels', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(8), 1944–1949. doi: 10.1016/j.pnpbp.2011.09.005.
- Tasset, I., Pontes, A. J., *et al.* (2011) 'Olive oil reduces oxidative damage in a 3-nitropropionic acid-induced huntington's disease-like rat model', *Nutritional Neuroscience*, 14(3), 106–11. doi: 10.1179/1476830511Y.0000000005.
- Tasset, I., Medina, F. J., *et al.* (2012) 'Neuroprotective effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on a Huntington's disease rat model: effects on neurotrophic factors and neuronal density', *Neuroscience*, 209, 54–63. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.02.034.

- Tasset, I., Agüera, E., *et al.* (2012) 'Peripheral oxidative stress in relapsing-remitting multiple sclerosis', *Clinical biochemistry*, 45(6), 440–444. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.01.023.
- Tauil, C. B. *et al.* (2021) 'Depression and anxiety disorders in patients with multiple sclerosis: association with neurodegeneration and neurofilaments', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 54(3), e10428. doi: 10.1590/1414-431X202010428.
- Tavassolifar, M. J., Moghadasi, A. N., *et al.* (2020) 'Redox Imbalance in CD4+ T Cells of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients', *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 8860813. doi: 10.1155/2020/8860813.
- Tavassolifar, M. J., Vodjgani, M., *et al.* (2020) 'The Influence of Reactive Oxygen Species in the Immune System and Pathogenesis of Multiple Sclerosis', *Autoimmune diseases*, 2020, 5793817. doi: 10.1155/2020/5793817.
- Teixeira, B. *et al.* (2013) 'Low sensitivity to glucocorticoid inhibition of in vitro Th17-related cytokine production in multiple sclerosis patients is related to elevated plasma lipopolysaccharide levels', *Clinical immunology*, 148(2), 209–218. doi: 10.1016/j.clim.2013.05.012.
- Tekbas, O. F. *et al.* (2008) 'Melatonin as an antibiotic: new insights into the actions of this ubiquitous molecule', *Journal of pineal research*, 44(2), 222–226. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00516.x.
- Thameem Dheen, S., Kaur, C. and Ling, E.-A. (2007) 'Microglial activation and its implications in the brain diseases', *Current medicinal chemistry*, 14(11), 1189–1197. doi: 10.2174/092986707780597961.
- Timasheva, Y. *et al.* (2022) 'Multilocus evaluation of genetic predictors of multiple sclerosis', *Gene*, 809, 146008. doi: 10.1016/j.gene.2021.146008.
- Timpani, C. and Rybalka, E. (2020) 'Calming the (Cytokine) Storm: Dimethyl Fumarate as a Therapeutic Candidate for COVID-19', *Pharmaceuticals*, 14(1), 1–15. doi:

10.3390/ph14010015.

Tomassini, V. *et al.* (2012) ‘Neuroplasticity and functional recovery in multiple sclerosis’, *Nature reviews. Neurology*, 8(11), 635–46. doi: 10.1038/nrneurol.2012.179.

Tordjman, S. *et al.* (2017) ‘Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits’, *Current Neuropharmacology*, 15(3), 434–443. doi: 10.2174/1570159X14666161228122115.

Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) in Multiple Sclerosis - Full Text View - ClinicalTrials.gov (2019). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04062331> (Accessed: 28 February 2022).

Tselis, A., Khan, O. and Lisak, R. P. (2007) ‘Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis’, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 3(2), 259–267. doi: 10.2147/ndt.2007.3.2.259.

Túnez, I. *et al.* (2003) ‘Protective melatonin effect on oxidative stress induced by okadaic acid into rat brain’, *Journal of pineal research*, 34(4), 265–268. doi: 10.1034/j.1600-079X.2003.00039.x.

Túnez, I. *et al.* (2004) ‘Protective effect of melatonin on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes in an animal model of Huntington’s disease’, *Journal of Pineal Research*, 37(4), 252–256. doi: 10.1111/j.1600-079X.2004.00163.x.

Turgut, M. *et al.* (2003) ‘Changes in vascularity of cartilage endplate of degenerated intervertebral discs in response to melatonin administration in rats’, *Neurosurgical Review*, 26(2), 133–8. doi: 10.1007/s10143-003-0259-8.

Ulusu, N. N. and Tandoğan, B. (2007) ‘Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver’, *Molecular and cellular biochemistry*, 303(1–2), 45–51. doi: 10.1007/s11010-007-9454-1.

Valacchi, G. *et al.* (2018) ‘OxInflammation: From subclinical condition to pathological biomarker’, *Frontiers in Physiology*, 9, 858. doi: 10.3389/fphys.2018.00858.

Valdés-Tovar, M. *et al.* (2018) ‘Circadian modulation of neuroplasticity by melatonin: a target in the

- treatment of depression', *British Journal of Pharmacology*, 175(16), 3200–3208. doi: 10.1111/bph.14197.
- Venegas, C. *et al.* (2012) 'Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations', *Journal of pineal research*, 52(2), 217–227. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00931.x.
- Vriend, J. and Reiter, R. J. (2015) 'The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: a review of its regulation by melatonin and the proteasome', *Molecular and cellular endocrinology*, 401, 213–220. doi: 10.1016/j.mce.2014.12.013.
- Wakatsuki, A. *et al.* (2000) 'Melatonin inhibits oxidative modification of low-density lipoprotein particles in normolipidemic post-menopausal women', *Journal of pineal research*, 28(3), 136–142. doi: 10.1034/j.1600-079X.2001.280302.x.
- Wallin, M. T. *et al.* (2019) 'Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016', *The Lancet Neurology*, 18(3), 269–285. doi: 10.1016/s1474-4422(18)30443-5.
- Waly, N. E. and Hallworth, R. (2015) 'Circadian Pattern of Melatonin MT1 and MT2 Receptor Localization in the Rat Suprachiasmatic Nucleus', *Journal of circadian rhythms*, 13(1), 1–7. doi: 10.5334/jcr.ab.
- Wang, X. (2009) 'The antiapoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases', *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 15(4), 345–357. doi: 10.1111/j.1755-5949.2009.00105.x.
- Wang, Y. *et al.* (2013) 'The expression of inflammatory cytokines on the aorta endothelia are up-regulated in pinealectomized rats', *Inflammation*, 36(6), 1363–1373. doi: 10.1007/s10753-013-9676-1.
- Wardyn, J. D., Ponsford, A. H. and Sanderson, C. M. (2015) 'Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways', *Biochemical Society Transactions*, 43(4), 621–6. doi:

10.1042/bst20150014.

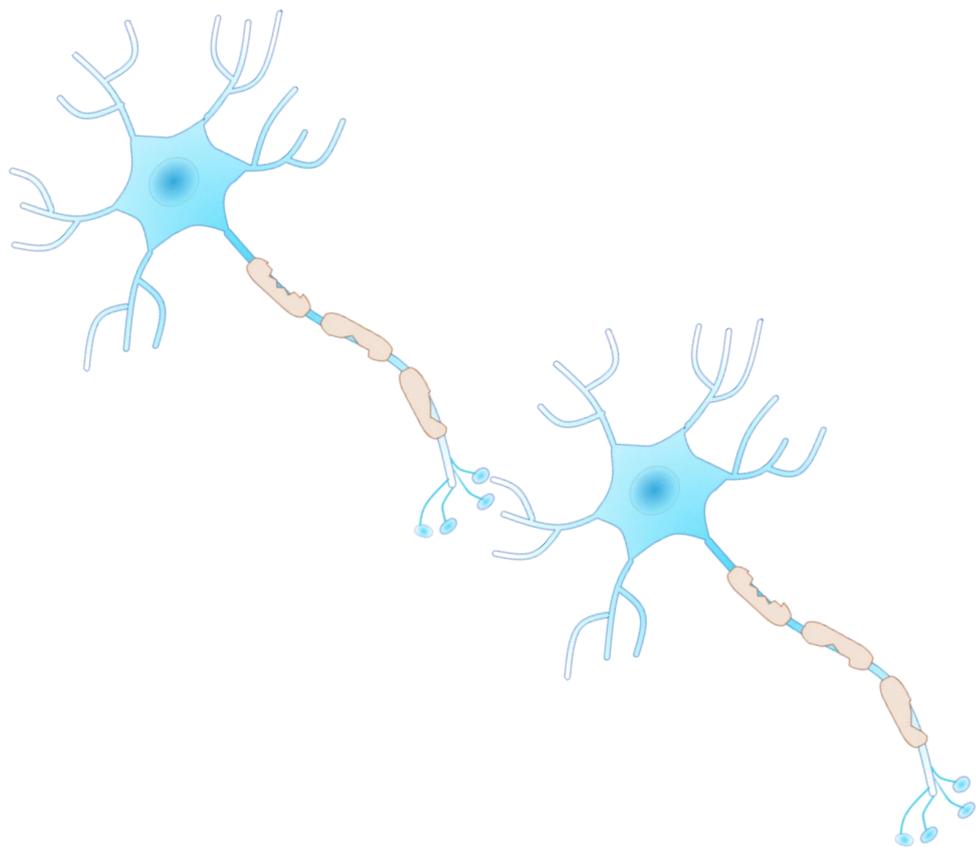
- Wekerle, H., Berer, K. and Krishnamoorthy, G. (2013) 'Remote control-triggering of brain autoimmune disease in the gut', *Current Opinion in Immunology*, 25(6), 683–689. doi: 10.1016/j.coi.2013.09.009.
- Winiarska-Mieczan, A. (2018) 'Protective effect of tea against lead and cadmium-induced oxidative stress—a review', *BioMetals*, 31(6), 909–926. doi: 10.1007/s10534-018-0153-z.
- Winiarska-Mieczan, A. *et al.* (2020) 'The role of dietary antioxidants in the pathogenesis of neurodegenerative diseases and their impact on cerebral oxidoreductive balance', *Nutrients*, 12(2), 435. doi: 10.3390/nu12020435.
- Winkelmann, A. *et al.* (2016) 'Disease-modifying therapies and infectious risks in multiple sclerosis', *Nature reviews. Neurology*, 12(4), 217–233. doi: 10.1038/nrneurol.2016.21.
- Wongchitrat, P. *et al.* (2021) 'Role of melatonin on virus-induced neuropathogenesis—a concomitant therapeutic strategy to understand SARS-CoV-2 infection', *Antioxidants*, 10(1), 1–31. doi: 10.3390/antiox10010047.
- Xu, X. *et al.* (2018) 'Melatonin suppresses TLR9-triggered proinflammatory cytokine production in macrophages by inhibiting ERK1/2 and AKT activation', *Scientific Reports*, 8(1), 15579. doi: 10.1038/s41598-018-34011-8.
- Yao, L., Lu, P. and Ling, E. A. (2016) 'Melatonin Suppresses Toll Like Receptor 4-Dependent Caspase-3 Signaling Activation Coupled with Reduced Production of Proinflammatory Mediators in Hypoxic Microglia', *PLoS ONE*, 11(11), e0166010. doi: 10.1371/journal.pone.0166010.
- Yeganeh-Salehpour, M. *et al.* (2019) 'Melatonin and Multiple Sclerosis: From Plausible Neuropharmacological Mechanisms of Action to Experimental and Clinical Evidence', *Clinical Drug Investigation*, 39(7), 607–624. doi: 10.1007/s40261-019-00793-6.

- Yi, S. and Yang, Y. (2021) 'Melatonin attenuates low shear stress-induced pyroptosis and endothelial cell dysfunction via the ROR α /miR-223/STAT-3 signalling pathway', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(6), 1392. doi: 10.3892/etm.2021.10828.
- Yildirim, A. *et al.* (2019) 'The effects of antibiotics and melatonin on hepato-intestinal inflammation and gut microbial dysbiosis induced by a short-term high-fat diet consumption in rats', *The British journal of nutrition*, 122(8), 841–855. doi: 10.1017/s0007114519001466.
- Yosefi-Fard, M. *et al.* (2020) 'Effect of melatonin on serum levels of inf-1 β and vitamin b12 in patients with multiple sclerosis: A randomized controlled trial', *Iranian Journal of Toxicology*, 14(1), 19–24. doi: 10.32598/ijt.14.1.19.
- Yosefifard, M. *et al.* (2019) 'A randomized control trial study to determine the effect of melatonin on serum levels of IL-1 β and TNF- α in patients with multiple sclerosis', *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 18(6), 649–654. doi: 10.18502/ijaai.v18i6.2177.
- Yu, G. M. *et al.* (2017) 'The anti-inflammatory and antioxidant effects of melatonin on LPS-stimulated bovine mammary epithelial cells', *PLoS ONE*, 12(5), e0178525. doi: 10.1371/journal.pone.0178525.
- Yu, L. *et al.* (2015) 'Membrane receptor-dependent Notch1/Hes1 activation by melatonin protects against myocardial ischemia–reperfusion injury: in vivo and in vitro studies', *Journal of Pineal Research*, 59(4), 420–433. doi: 10.1111/jpi.12272.
- Yue, Y., Stone, S. and Lin, W. (2018) 'Role of nuclear factor κ b in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis', *Neural Regeneration Research*, 13(9), 1507–1515. doi: 10.4103/1673-5374.237109.
- Zarezadeh, M. *et al.* (2020) 'Melatonin supplementation and pro-inflammatory mediators: a systematic review and meta-analysis of clinical trials', *European journal of nutrition*, 59(5), 1803–1813. doi: 10.1007/s00394-019-02123-0.

-
- Zeydan, B. *et al.* (2020) ‘Reproductive history and progressive multiple sclerosis risk in women’, *Brain Communications*, 2(2), fcaa185. doi: 10.1093/braincomms/fcaa185.
- Zhang, S. *et al.* (2016) ‘Protective effect of melatonin on soluble A β 1-42-induced memory impairment, astrogliosis, and synaptic dysfunction via the Musashi1/Notch1/Hes1 signaling pathway in the rat hippocampus’, *Alzheimer’s Research and Therapy*, 8(1), 40. doi: 10.1186/s13195-016-0206-x.
- Zhao, C. *et al.* (2019) ‘Potential role of melatonin in autoimmune diseases’, *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 48, 1–10. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.07.002.
- Zhao, D. *et al.* (2019) ‘Melatonin synthesis and function: Evolutionary history in animals and plants’, *Frontiers in Endocrinology*, 10, 249. doi: 10.3389/fendo.2019.00249.
- Zhu, W. *et al.* (2017) ‘NLRP3 inflammasome activation contributes to long-term behavioral alterations in mice injected with lipopolysaccharide’, *Neuroscience*, 343, 77–84. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.11.037.



INDICIOS DE CALIDAD



1. Protective effects of melatonin on changes occurring in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis

- Autores: Begoña María Escribano*, A. Muñoz-Jurado, J. Caballero-Villarraso, M.E. Valdelvira, A.I. Giraldo, E. Paz-Rojas, F. Gascón, A. Santamaría, E. Agüera, Isaac Túnez*
- Revista (año.vol. pag): Multiple Sclerosis and Related Disorders (2022 58:103520)
- Base de datos en la que está indexada la revista: JCR
- Índice de impacto y cuartil de la revista en el año de publicación del artículo: 4.339/ Q2
- Categoría de la revista: Clinical Neurology

2. Lactose and Casein Cause Changes on Biomarkers of Oxidative Damage and Dysbiosis in an Experimental Model of Multiple Sclerosis

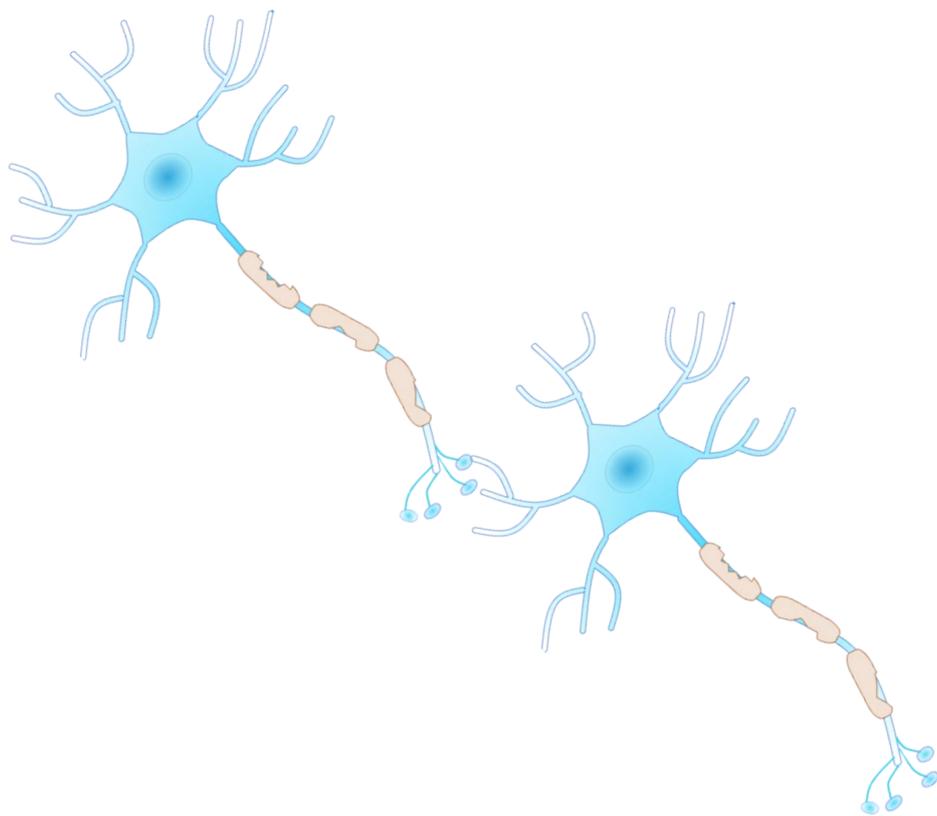
- Autores: Begoña M. Escribano*, Ana Muñoz-Jurado, Evelio Luque, Cristina Conde, Montse Feijóo, Manuel LaTorre, Manuel E. Valdelvira, Paula Buendía, Ana I. Giraldo, Javier Caballero-Villarraso, Abel Santamaría, Eduardo Agüera and Isaac Túnez*
- Revista (año.vol. pag): CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (2022 21(8):680-692)
- Base de datos en la que está indexada la revista: JCR
- Índice de impacto y cuartil de la revista en el año de publicación del artículo: 4.388 / Q2
- Categoría de la revista: Neurosciences/ Pharmacology & Pharmacy

3. Melatonin and Multiple Sclerosis: Antioxidant, Anti-inflammatory and Immunomodulator mechanism of action

- Autores: Ana Muñoz-Jurado*, Begoña M^a Escribano, Javier Caballero-Villarraso, Alberto Galván, Eduardo Agüera, Abel Santamaría, Isaac Túnez*
- Revista (año.vol.pag): Inflammopharmacology (2022)
- Base de datos en la que está indexada la revista: JCR
- Índice de impacto y cuartil de la revista en el año de publicación del artículo: 4.473/Q1/Q2
- Categoría de la revista: Toxicology/Immunology



PRODUCCIÓN CIENTÍFICA



Contribuciones a Congresos:

1. IX Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba (3-6 de mayo 2021)

- Título: Efecto de la Melatonina en la Esclerosis Múltiple Experimental
- Autores: Ana Muñoz Jurado, Begoña M. Escibano, Isaac Túnez
- Tipo: Poster

2. III Congreso Internacional Multidisciplinar de Investigadores en Formación (29 de noviembre y el 3 de diciembre de 2021)

- Título: Efecto de la Melatonina Sobre la Disbiosis Ocasionada por la Esclerosis Múltiple Experimental
- Autores: Ana Muñoz Jurado, Begoña M^a Escibano Durán, Manuel Elías Valdelvira, Isaac Túnez Fiñana
- Tipo: Comunicación Oral

3. X Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba (3-6 de mayo 2022)

- Título: Capacidad Antioxidante y Antiinflamatoria de la Melatonina en la Esclerosis Múltiple Experimental.
- Autores: Ana Muñoz Jurado, Begoña M. Escibano, Isaac Túnez
- Tipo: Comunicación Oral