



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ENUCLEACIÓN
SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T
ANTE ANTÍGENOS DE SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL DE RATAS SUJETAS A LESIÓN DE
MEDULA ESPINAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

QUELETZÚ PAULINA ASPRA POLO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ANA CECILIA RIVAS CAICEDO
2010**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A mis padres Hugo y Patricia por el amor y confianza que me han brindado

A Hugo y a Vero porque con sus logros sentaron altos precedentes.

A mi tutora Ana por su paciencia, dedicación y enseñanza.

A mis compañeros de laboratorio que me guiaron en el trabajo experimental.

A mis profesores y sinodales, en especial a Gabriel Gutiérrez Ospina, por el apoyo que recibí de ellos en todo momento.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta tesis, mi más sincero agradecimiento.

*A todos aquellos hombres y mujeres que trabajan para que en México haya
educación pública, laica y gratuita.*

Indice

Resumen.	1
Introducción	2
Antecedentes	
Linfocitos T	4
Linfocitos T en neuroprotección	17
Diferenciación experimental de LT	20
Justificación	24
Pregunta	24
Hipótesis	25
Objetivo	25
Materiales y métodos	27
Resultados	34
Discusión	48
Conclusión	58
Bibliografía	59

Resumen

La preservación del tejido nervioso de la médula espinal después de una lesión en individuos adultos es limitada y depende de las características del ambiente extracelular. En los últimos años se ha evidenciado que los linfocitos T ayudan a mantener un ambiente que permite la preservación del tejido medular después de una lesión, a través de regular el proceso inflamatorio local. Central en este proceso es la decisión de los linfocitos de diferenciarse en efectores o reguladores; ya que la adquisición de alguno de estos fenotipos pudiese favorecer o menoscabar las posibilidades de preservación tisular neural. Por esta razón, en el presente trabajo evaluamos el efecto de la exposición antigénica neural temprana sobre la respuesta proliferativa y diferenciación *in vitro* de LT CD4⁺ y CD25⁺ obtenidos de ratas adultas. La exposición antigénica inicial fue lograda mediante la enucleación al nacimiento, con la idea de que dicha exposición promoviera la generación de linfocitos favorecedores de la preservación de tejido nervioso en la edad adulta. Nuestros resultados indican que la enucleación de ratas al nacimiento aumenta la respuesta proliferativa de los LT CD4⁺, más no de los CD25⁺, en comparación con los animales control. Sin embargo esta modificación no se asoció a un mejoramiento del desempeño motriz después de una lesión de médula espinal en la rata adulta, lo que sugiere que el nivel de preservación en los animales enucleados es equivalente al de las ratas control.

Introducción

La preservación del tejido nervioso de la médula espinal después de una lesión en individuos adultos es limitada, por lo que grandes esfuerzos se han hecho para desarrollar estrategias de neuroprotección del tejido lesionado. Un elemento celular fundamental para el desarrollo de procedimientos de neuroprotección es el linfocitos T, ya que se ha documentado que la inyección de LT autorreactivos específicos para proteína básica de mielina (PBM) mejora el mantenimiento de la estructura de médula espinal de las ratas en caso de lesión subsecuente (Hauben *et al* 2000, Moalem *et al* 1999, 2000; aunque ver Jones *et al* 2004). Además, en este mismo sentido, el subtipo de LT CD4⁺ que se encuentre activado parece ser importante debido a que, por ejemplo, la presencia de LT CD4⁺CD25⁺ disminuye la supervivencia de las células ganglionares de la retina en caso de lesión al nervio óptico (NO) (Kipnis *et al* 2002). Ambos resultados sugieren que la decisión de los linfocitos de diferenciarse en efectores o reguladores mejora o empeora las posibilidades de preservación tisular.

Una manera a través de la cual se puede guiar el proceso de diferenciación de los LT es mediante la presentación antigénica. En apoyo a esto se ha observado que la lesión de la médula espinal en individuos adultos genera una respuesta inmune dependiente de LT, que disminuye la pérdida neuronal al realizar una segunda lesión en el nervio óptico 7 días después (Yoles *et al* 2001). Es decir, la exposición previa a antígenos neurales parece mejorar la preservación del tejido neural dañado en una segunda ocasión. Por esta razón, en el presente trabajo evaluamos el efecto de la exposición antigénica neural temprana sobre la respuesta proliferativa y diferenciación *in vitro* de LT CD4⁺ y CD25⁺ obtenidos de ratas adultas enucleadas o no al nacimiento. Nuestros resultados indican que la enucleación de ratas al nacimiento aumenta la respuesta proliferativa de los LT

CD4⁺, más no de los CD25⁺, en comparación con los animales control. Sin embargo esta modificación no se asoció a un mejoramiento del desempeño motriz después de una lesión de médula espinal en la rata adulta, lo que sugiere que el nivel de preservación medular en los animales enucleados es equivalente al de las ratas control.

Antecedentes

Linfocitos T

Los linfocitos T (LT) son células hematopoyéticas que se originan en hígado fetal y médula ósea fetal y adulta. Abandonan la médula ósea en forma de precursores de células T por la vía del flujo sanguíneo (al onceavo día de gestación en ratones y en humanos a la octava o novena semana de gestación) para arribar al timo, donde reciben el nombre de timocitos. En etapas embrionarias tempranas, la llegada de precursores de LT al timo se da mediante una vía independiente de vasculatura y está regulada por la expresión de dos quimiocinas y sus receptores, CCL21 y CCL25. En etapas embrionarias tardías y en estados postnatales, la colonización de precursores ocurre de forma dependiente de vasculatura y se da en el área córtico-medular del timo. Una vez en el timo, los timocitos comienzan su desarrollo como dobles negativos (DN; carecen de expresión de los coreceptores CD4 y CD8) en el área subcapsular. Esta etapa se divide en 3 estadios debido a la expresión diferencial del CD44 y CD25. De forma paralela, el desarrollo de los timocitos DN promueve la diferenciación de células del estroma tímico y desencadena la formación de un ambiente córtico-epitelial. Como se muestra en la figura 1, la migración de los timocitos a la zona capsular está mediada por el receptor de quimiocinas 4 (CXCR4) y el receptor de quimiocinas CC (CCR7). En este momento aún no expresan el receptor de células T (TCR). Será hasta que se trasladen a la corteza del timo cuando empiecen el ensamblaje de las cadenas β y α del TCR. Este hecho permitirá que el timocito reciba señales que lo inducirán a expresar los correceptores CD4 y CD8 en su superficie, momento en el que se conocen como dobles positivos^{1,2}.

Las moléculas CD4 y CD8 son correceptores, es decir tienen capacidad de reconocer el MHC y de transducir señales³. El correceptor CD4 es una glucoproteína monomérica de

membrana compuesta por cuatro dominios extracelulares, una región transmembranal hidrofóbica y una cola citoplásmica que contiene 3 residuos de serina por lo que puede ser fosforilada. Los dominios extracelulares del CD4 se unen al dominio $\beta 2$ de las moléculas de MHC presentes en las APCs y junto con el TCR se forma un complejo. Una vez formada, la molécula CD4 es sometida a un cambio conformacional que permite que su dominio próximo a la membrana interactúe con otros complejos CD4-MHCII-TCR, lo que es necesario para posteriores eventos de señalización³. Por su parte el correceptor CD8 es una glicoproteína heterodimérica, aunque también puede presentar formas homodiméricas, que se une a los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del MHC I. El CD8, en contraste al CD4, no forma complejos multiméricos².

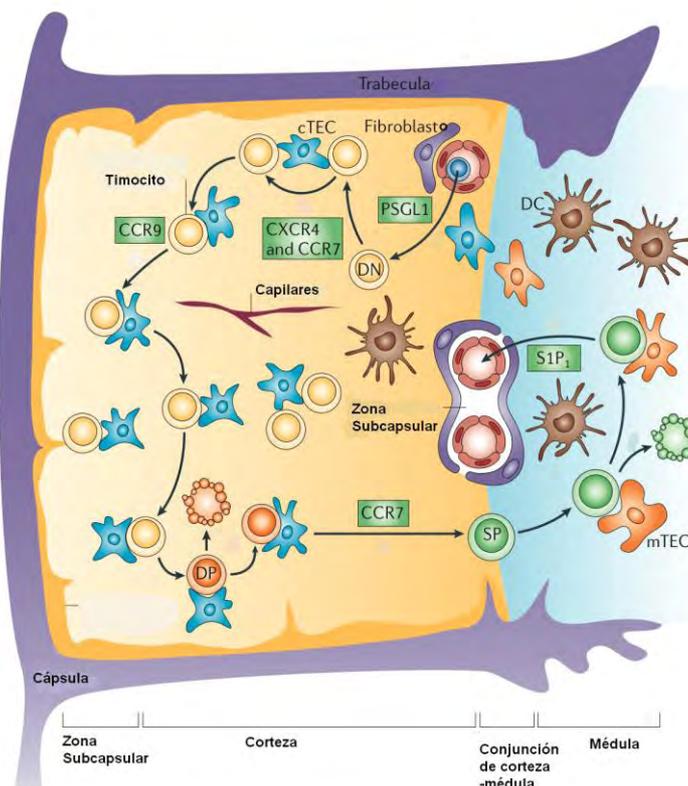


Fig.1. Esquema que ilustra el proceso de diferenciación de los LT en el parénquima del timo. En la parte superior de la imagen se muestra la entrada de las células progenitoras

de los LT al parénquima tímico a través de la vasculatura que se encuentra en la región cortico-medular, un proceso regulado por la glicoproteína ligando PSGL1. Hacia la región capsular se observa la migración de timocitos dobles negativos (DN) $CD4^-CD8^-$ regulado mediante señales de quimiocinas y los receptores CXCR4 y CCR7. En la parte inferior izquierda del esquema se encuentran los timocitos dobles positivos ($CD4^+CD8^+$) que interactúan con células del estroma localizadas en la corteza para la selección positiva y negativa. Los timocitos dobles positivos seleccionados positivamente sobreviven y se diferencian en simples positivos que aumentan la expresión del receptor CCR7 por lo que son atraídos a la médula en donde se encuentran los ligandos. En la médula se seleccionan los timocitos simples positivos y se eliminan los LT autorreactivos, ahí mismo es donde se generan LT reguladores. Los timocitos simples positivos que han madurado y que expresan el receptor de esfingosina 1 fosfato ($S1P_1$) son enviados a la circulación en la zona subcapsular altamente vascularizada. Tomada de Takahama³

Selección positiva

En la corteza del timo, los timocitos dobles positivos interactúan mediante su TCR con los MHC expresados por células epiteliales tímicas así como células dendríticas que componen el estroma del timo. Los timocitos cuyo TCR sea incapaz de unirse a los MHCs presentes entrarán en un proceso de apoptosis denominado *muerte por negligencia*, que se desencadena al carecer de las señales necesarias para su supervivencia^{1,2,3}. La selección positiva permite únicamente la supervivencia de aquellas células T cuyos receptores reconozcan débilmente moléculas propias del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Este proceso es responsable de la creación de un repertorio de células T con reconocimiento restringido a MHC

propio^{1,2,3}. Una vez ocurrida la selección positiva, los timocitos se convertirán en simples positivos al expresar únicamente un correceptor de TCR; éste puede ser CD4 o CD8. Al convertirse en simples positivos, los timocitos aumentan su expresión de CCR7 lo que los guiará a la médula del timo cuyo estroma expresa el ligando a CCR7 como se muestra en la fig 1³.

Selección Negativa

La población de timocitos restringidos al reconocimiento del MHC propio que sobrevive a la selección positiva comprende algunas células con receptores de baja y alta afinidad para antígenos propios. Estos últimos son sujetos a selección negativa mediante una interacción con células presentadoras de antígenos (CPA) derivadas de médula ósea, es decir células del estroma, células dendríticas y macrófagos en el área medular del timo. También existe evidencia de que CD circulantes tienen acceso al timo para interactuar en esta fase con los timocitos⁴. La unión fuerte del receptor del linfocito inmaduro a antígenos propios induce activamente la apoptosis del linfocito en cuestión. En la médula del timo, a la par del proceso de selección negativa, ocurre también un proceso de tolerancia central que consiste en evitar la respuesta ante antígenos propios mediante la presentación de éstos antígenos por células de estroma y las células dendríticas. La expresión promiscua de antígenos propios se da gracias a la expresión de una proteína reguladora de autoinmunidad (AIRE) y permite la exportación de células T incapaces de reconocer moléculas propias^{5,6}.

Una vez que los LT han madurado abandonan el timo para entrar a diversos órganos mediante flujo sanguíneo. La entrada a la sangre ocurre mediante el flujo eferente de los vasos linfáticos o venas de drenaje. Los LT maduros así como los vírgenes entran a los órganos linfoides después de haber circulado por otros tejidos. Los linfocitos entran al nódulo linfático atravesando vénulas capilares corticales conocidas como vénulas de

endotelio alto, las cuales tienen sitios de reconocimiento de superficie para LT y linfocitos B⁷.

Desarrollo de la respuesta inmune mediada por LT

La respuesta inmune mediada por los LT forma parte de la inmunidad adaptativa; ésta actúa en respuesta a organismos patógenos capaces de atravesar las barreras físicas de la inmunidad innata. Si dichos patógenos invaden tejidos, los macrófagos y las células dendríticas que residen en dichos tejidos son capaces de fagocitarlos, secretar sustancias tóxicas para los patógenos y secretar moléculas señalizadoras o citocinas que actúan por medio de receptores para inducir la activación de células específicas como los linfocitos T. Una vez que macrófagos y células dendríticas han fagocitado patógenos, son capaces de digerirlos en su interior y seleccionar moléculas que serán acopladas a moléculas de superficie como el complejo mayor de histocompatibilidad I y II (MHCI y MHCII respectivamente) Las células dendríticas (CD) constituyen un vínculo importante entre la inmunidad innata y la adaptativa. Las CD descienden de linajes mieloides de tejido hematopoyético. Expresan constitutivamente altos niveles de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII), así como algunas moléculas de la familia de coestimuladores B7².

El MHC es un conjunto de proteínas y glicoproteínas involucrados en la presentación de antígenos a los LT. El MHC puede ser de tipo I o II, ambos tipos presentan dominios externos, transmembranales y citoplásmicos. El MHC I se encuentra en la mayoría de las células con núcleo del organismo, se asocia con péptidos y los presenta a células T CD8+. Por lo general éstos péptidos son derivados de proteínas intracelulares endógenas que son procesadas hasta péptidos en el citosol, de donde son transportados hacia la cisterna del retículo endoplásmico en donde interactúan con las moléculas de MHCI. Por otro lado el MHC tipo II se asocia a péptidos y los presenta a células T

CD4+. Los péptidos que se asocian al MHCII son derivados de proteínas extracelulares, propias o externas, degradadas mediante un proceso de endocitosis. El MHCII es expresado por células presentadoras de antígeno (CPA) que son: macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Después de que las células dendríticas capturan el antígeno en el tejido por fagocitosis o endocitosis migran a linfa y entran a ganglios linfáticos y otros órganos linfoides en donde presentan el antígeno a los linfocitos T².

Diferenciación de linfocitos T.

Cuando los LT vírgenes, que nunca han entrado en contacto con algún antígeno, encuentran su antígeno específico se desencadena la activación y diferenciación de los mismos. Los LT vírgenes se caracterizan por poseer cromatina condensada, poco citoplasma y poca actividad transcripcional. Estas células circulan entre los vasos sanguíneos y órganos del sistema linfático como los ganglios linfáticos (GL). Si la célula T no encuentra su antígeno en algún ganglio linfático entra al ducto torácico por medio de la linfa eferente para entrar en sangre en donde puede encontrar o trasladarse al sitio donde se ubique su antígeno. Aproximadamente 48hrs después de haber entrado en contacto con su antígeno por primera vez, la célula virgen lleva a cabo ciclos repetidos de división celular produciendo una clona TCR-específica para un determinado antígeno. Éste proceso depende de la señal que emite el acoplamiento del complejo TCR y la señal coestimuladora derivada de la interacción CD28-B7. Estas señales inducen la transcripción del gen para IL2 y la cadena α del receptor de gran afinidad para IL2. Los LT activados de esta forma se dividen de 2 a 3 veces por día durante 4-5 días generando progenie que se puede diferenciar en células efectoras o de memoria. La diferenciación hacia células efectoras se da cuando éstas encuentran moléculas coestimuladoras, se trata de las glucoproteínas B7-1 y B7-2, expresadas por las células presentadoras de antígeno, en especial por las células dendríticas, y permiten

que la progenie de los linfocitos activen células fagocíticas y linfocitos B^{1,2}. El encuentro con el antígeno puede generar LT de memoria, que se caracterizan por mantenerse en la fase G0 del ciclo celular y tener menos requerimientos para activarse que las vírgenes; sin embargo al tener un segundo encuentro con su antígeno presentan una respuesta mas rápida y efectiva².

El reconocimiento del antígeno y la interacción del CD28, presente en el LT, con el B7 en la CPA desencadena la proliferación de los LT. La proliferación está mediada por una vía de crecimiento autócrina en la que la célula T secreta citocinas de promoción de crecimiento al mismo tiempo que expresa receptores para las mismas. El principal factor de crecimiento autócrino es IL2. El resultado de la proliferación es la expansión clonal que genera un gran número de células².

Las células T CD4⁺ ejercen la mayoría de sus funciones como células ayudadoras mediante citocinas y se pueden dividir en dos subtipos, dependiendo de la expresión y secreción particular de citocinas : linfocitos T ayudadores tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2), y tipo 17 (Th17). Las citocinas son proteínas o glicoproteínas de bajo peso molecular, son secretadas por diversos tipos celulares e intervienen, entre otros aspectos, en el desarrollo de células inmunes; algunas citocinas tienen funciones efectoras de acción local. Las citocinas se unen a receptores específicos en la membrana de las células blanco desencadenando la transducción de vías que finalmente modifican la expresión de genes. Algunas citocinas son conocidas por nombres comunes como las quimiocinas, las interleucinas, interferones y el TNF^{1,2}.

La diferenciación de LT en Th1, Th2, o Th17 ocurre en los primeros días después del contacto directo con las células presentadoras de antígeno. En la determinación de dicho fenotipo se involucran numerosos factores como son la

naturaleza y afinidad del antígeno, el tipo de señalización del TCR, las señales que desencadena el co-receptor y las citocinas que se encuentren en el ambiente extracelular. Cuando el TCR reconoce el antígeno específico se induce la liberación de señales intracelulares, como la proteína cinasa (PKC), iones de calcio, y el factor nuclear κ B (NF- κ B), que llevan a la diferenciación del LT en un Th1, Th2, o Th17. La interacción que mantiene el LT con las células presentadoras de antígeno como las células dendríticas también es importante puesto que éstas últimas presentan co-receptores como el CD40, CD80 y CD86, cuya señalización en conjunto con la del TCR lleva a la diferenciación de los LT⁸.

Los linfocitos Th1 se encuentran asociados a la promoción de inflamación y producción de subtipos de anticuerpos IgG. El Interferón γ (IFN γ), una citocina característica del Th1 (ver Tabla1), activa macrófagos, incrementa la actividad microbicida de los mismos, y aumenta su nivel de expresión de MHCII y de interleucina 12 (IL-12).

La diferenciación de los Linfocitos Th1 comienza con la secreción de IL12 e IFN α , β , y γ liberadas por macrófagos, células dendríticas, y asesinas naturales (NK) debido a la activación por patógenos intracelulares. La unión del IFN γ a LT vírgenes sin diferenciar lleva a la activación del factor de transcripción STAT1, por la vía de JAK1 y JAK2⁷. La vía STAT1 aumenta la producción del factor de transcripción T-bet. T-bet induce la expresión de IFN γ y la expresión del receptor para IL12. Una vez que las células responden a IL12, mediante activación de los factores de transcripción STAT4, STAT3 y NF- κ B se potencia la producción de IFN γ ^{2,8}.

Por otro lado, los linfocitos Th2 estimulan la activación y diferenciación de eosinófilos y linfocitos B; promueven la producción de inmunoglobulinas M y E y secretan interleucina 4 (IL4), 5 (IL5), 10 (IL10) y 13 (IL13) (ver Tabla 1). Los linfocitos Th2 permiten una mejor respuesta hacia parásitos helmintos y son responsables del

desarrollo de asma y reacciones alérgicas. La diferenciación hacia éste subgrupo se inicia con la señalización concertada del TCR con su antígeno, y el receptor de IL4, con IL4 liberado por células asesinas naturales, linfocitos T, eosinófilos y mastocitos. IL4 induce la producción del factor de transcripción STAT6, lo que a su vez aumenta la expresión del factor de transcripción GATA-3 el cual tiene capacidades de autoactivación para llevar a cabo cambios epigenéticos que permitan la regulación de los genes para IL4, IL5, IL9, IL10 e IL13. GATA-3 y T-bet son antagonistas el uno del otro, de forma que cuando los niveles de IFN γ e IL12 y T-bet son altos, la producción de GATA-3 se inhibe y viceversa^{1,2}.

Los linfocitos Th17 se caracterizan por la producción de interleucina 17 tipo A y tipo F (IL17A e IL17F), interleucina 6 (IL6) y TNF α . Los linfocitos Th17, se observan en tejidos linfoides en todo el organismo aunque se encuentran predominantemente en la mucosa de pulmones y del aparato digestivo; éste tipo de LT se ha visto involucrado en procesos de inflamación de tejidos y activación de neutrófilos^{8,9}.

Secreción de citocina	Th1	Th2
IL2	+	-
IL12	++	
IFN	++	-
TNF	++	-
GM-CSF	++	+
IL3	++	++
IL4	-	++
IL5	-	++
IL10	-	++
IL13	-	++

Tabla 1 Perfil de secreción de citocinas de células T_H1 y T_H2. Tomado de Goldsby².

Existe otro tipo de LT CD4⁺ que son capaces de inhibir la actividad de los LT efectoras Th1 y Th2, se trata de los LT reguladores (LTreg). Los LTregs representan un linaje de células con un tiempo largo de vida intermitótica en ausencia de antígeno. Se ha evidenciado que los LTregs al acoplar su antígeno específico inician procesos de proliferación, incrementan la expresión de CD25 e inhiben la proliferación y producción de citocinas por otros LT estimulados¹⁰. El CD25 es la cadena α del receptor de IL2, representa junto con el factor de transcripción Foxp3 un marcador importante de LTregs. Se ha visto que en ratones, el receptor para IL2 requiere la presencia de 3 cadenas (α , β y γ) para unirse a IL2 con gran afinidad, permitiendo que la unión del CD25 con IL2 sea de mediana afinidad¹¹.

Los LTregs se desarrollan en el interior y exterior del timo. El desarrollo de los LTregs en el timo depende de las interacciones de alta afinidad entre el TCR y su ligando en células epiteliales tímicas. Para el desarrollo y activación de los Tregs es necesaria la presencia de IL2. La fuente principal de IL2 en periferia son los LT efectoras activados, esto quiere decir que la secreción mantenida de IL2 permitirá la activación de LTregs y la posterior inhibición de LT efectoras¹¹.

Los LTregs también pueden desarrollarse a partir de precursores de LT CD4 en la periferia por lo que reciben el nombre de LTregs adaptativos (aTreg). Los aTregs se desarrollan en paralelo con los LT efectoras y se trasladan a los sitios de inflamación para poner fin a la inflamación una vez que el reto antigénico ha sido superado⁹. Lo anterior se ha confirmado induciendo la conversión de LT vírgenes en células que expresan Foxp3⁺ CD4⁺ y CD25⁺ mediante la aplicación de antígeno en dosis sub inmunogénicas, y además se ha observado que la población de LT puede ser expandida mediante la presentación inmunogénica del antígeno sin alterar su fenotipo Foxp3⁺

CD25⁺. Dichas células activadas muestran actividad mas supresora que las poblaciones no expandidas de LT CD25⁺¹².

De acuerdo a Vignali 2008¹³ los LTregs pueden suprimir la respuesta inmune mediante diferentes mecanismos como la secreción de citocinas inhibitorias. Los LTregs inhiben la respuesta inmune secretando citocinas como Interleucina 10 (IL10), que inhibe la activación de macrófagos y antagoniza la acción de Interferón γ (IFN γ); de la misma forma pueden secretar Factor de crecimiento transformante (TGF- β) el cual inhibe la proliferación de células B y T. Recientemente se ha descrito una citocina inhibitoria denominada Interleucina 35 (IL35). Se trata de un miembro de la familia de citocinas IL2. Se le encuentra expresada en LTregs mientras que en LT efectores o inactivados está ausente. La IL35 suprime la proliferación de LT *in vitro*, mientras que su expresión ectópica confiere capacidades reguladoras en LT vírgenes. Los LTregs pueden generar citólisis en otros LT ya que se ha visto que expresan la granzima A y B¹³.

Se ha observado que los LTregs tienen capacidad de inducir apoptosis mediada por privación de IL2, sin embargo, no se trata de un mecanismo imprescindible para la supresión de LT efectores¹³. Los Treg son capaces de transmitir AMP cíclico, un segundo mensajero capaz de inhibir la proliferación de los LT y su producción de IL2, a través de uniones estrechas hacia las células efectoras¹³. Últimamente se ha sugerido que la liberación de nucleósidos de adenosina por parte de los LTregs, al acoplarse a los receptores 2A de adenosina en los LT efectores suprime su actividad¹³.

Existen otros mecanismos mediante los cuales se puede inducir la falta de respuesta de los LT fuera del desarrollo en el timo sin generar LT reguladores. Éstos son:

Anergia. El término anergia incluye un rango de condiciones celulares que colectivamente comparten fenotipos como una baja proliferación y producción característica de citocinas. Las clonas de LT en estado de anergia producen cantidades

muy pequeñas de IL2, aunque dicho estado se puede revertir añadiendo IL2 exógeno durante la re-estimulación^{1,2}. El estado de anergia puede ser inducido por la deficiencia de coestimuladores –como B7-1, B7-2 presentes en las CPAs, que se acoplan al correceptor CD28 ubicado en LT. En estado de homeostasis los antígenos propios son reconocidos sin moléculas coestimuladoras ni procesos de inflamación. Se ha observado que la administración de antígenos extraños presentados a LT fuera de un contexto inflamatorio y sin el acoplamiento de coestimuladores resulta en LT en estados poco proliferativos o anérgicos. Otro correceptor de coestimuladores (B7) es CTLA4. CTLA4 compite con CD28 y desencadena señales inhibitoras que bloquean las señales que normalmente dispara el TCR^{1,2}.

Delección. En el proceso de desarrollo de los LT en el timo ocurre un proceso de delección que es mecanismo de tolerancia central. Se trata de un proceso en el cual la estimulación repetida por antígenos persistentes resulta en la muerte de las células activadas mediante procesos de apoptosis². La delección de LT puede ocurrir mediante la expresión de Bim, una proteína pro-apoptótica integrante de la familia de proteínas Bcl-2. La familia de proteínas Bcl-2 controla la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Bim es activado gracias al reconocimiento de antígenos propios sin coestimuladores o factores de crecimiento². Se ha observado que una alta concentración de IL-2 aumenta la sensibilidad de células T a una muerte por apoptosis mediada por FasL, una proteína transmembranal que pertenece a la familia de proteínas del TNF y que al unirse con su receptor induce apoptosis².

Ignorancia. Este fenómeno se presenta como resultado de que las barreras anatómicas impiden el contacto entre los linfocitos T y moléculas del tejido impidiendo una respuesta inmune^{2,13}. Experimentalmente, la diferenciación de los LT se ha inducido mediante la aplicación del antígeno en una sola dosis con una carga antigénica alta para

producir LT efectores, o en dosis pequeñas y continuas para generar LT reguladores. En experimentos realizados en ratones han indicado que la aplicación de dosis subcutáneas de antígeno de 0.001µg diaria por 10 días, es suficiente para inducir un incremento en la frecuencia de LT CD4⁺ CD25⁺ derivados de LT vírgenes periféricos. Estos linfocitos mostraron una reducida capacidad proliferativa en presencia del antígeno pero con capacidad supresora sobre células CD4⁺ CD25⁻ independiente del perfil de citocinas, Th1 o Th2, expresado¹⁴. La aplicación del antígeno se puede dar en conjunto con un adyuvante. Los adyuvantes son utilizados principalmente en la aplicación de vacunas puesto que los antígenos son incapaces, generalmente, de provocar una respuesta inmune suficiente o la deseada. Uno de los adyuvantes más utilizados para despertar la respuesta inmune mediada por células es el adyuvante de Freund. Es una solución de agua en aceite (incomplete Freund's adjuvant IFA) a la que se le puede añadir restos no vivos de bacterias (Mycobacterium), a la cual se le denomina CFA (complete Freund's adjuvant), que desvía la respuesta hacia Th1. Al respecto, se ha evidenciado que los LT estimulados con antígeno sin adyuvantes, se mantienen en un estado de anergia hasta meses después de la aplicación del antígeno, sin embargo sólo pueden mantenerse así por más tiempo si el antígeno se encuentra presente en la periferia¹⁵.

Cabe mencionar que, aparte de los adyuvantes, los antígenos utilizados deben permitir la regeneración sin desencadenar autoinmunidad. Con este fin se han diseñado péptidos similares a moléculas como la proteína básica de mielina pero con modificaciones en algunos residuos, dos de ellos son el péptido G91 y el A96, ambos son péptidos modificados a partir de PBM, se les ha administrado por separado en ratas sometidas a contusión severa de médula espinal, y se observa una mejora significativa en la recuperación motriz en comparación con las ratas controles¹⁶. Otro péptido modificado es el A91 y se ha visto que la inmunización subcutánea del mismo, en conjunto con el

antioxidante glutatión monoetil éster, justo después de una LME incrementa la recuperación de las capacidades motoras de ratas sujetas a lesión de médula espinal y contrarresta los efectos de la degeneración secundaria¹⁷. Este estudio indica también que la doble inmunización con el péptido A91 provoca un estado de inactivación en los LT, los autores sugieren que la continua administración de dicho péptido puede generar un estado de latencia en los LT denominado anergia clonal; la doble administración del péptido A91 anula el efecto protector, reflejado en la mejora motriz, que produce una sola inmunización con A91¹⁷.

En ratones se ha mostrado que la inmunización con 50µg de mielina bovina purificada, 2 veces por semana durante las 3 semanas previas a la hemisección de médula espinal, indujo un aumento significativo en la regeneración de axones a larga distancia y en brotes del tracto corticoespinal, en comparación con los inmunizados con el dominio de 66 residuos de Nogo (Nogo-66) y la glucoproteína asociada a mielina (MAG) y con los tratados con PBS¹⁸.

Inducción de la diferenciación de LT

La manipulación de la diferenciación de los LT ha permitido estimar el importante papel que juegan los diferentes subtipos de LT en el mantenimiento de la homeostasis del SNC, así como también en procesos de regeneración y neuroprotección. Tal es el caso del giro dentado en el hipocampo, en donde se ha observado que la neurogénesis inducida por un ambiente enriquecido aumenta significativamente en ratones transgénicos que presentan una mayor expresión del receptor de células T específicas para PBM¹⁹. También se ha visto que la eliminación sistémica de los LTCD4⁺ reduce significativamente la neurogénesis en el hipocampo y capacidades de aprendizaje²⁰. En los últimos años se ha visto que la neurogénesis se puede dar en la médula espinal de ratones adultos bajo condiciones fisiológicas normales, las células generadas presentan

un fenotipo GABAérgico y se localizan en la parte dorsal de médula espinal; la neurogénesis se ve aumentada en ratones transgénicos cuyos LT reconocen PBM²¹.

Linfocitos T en neuroprotección

Los efectos regenerativos de los LT han sido poco estudiados, sin embargo se han realizado estudios en los que se observa que la vacunación con péptidos ligados alterados antes o al momento de una lesión de médula espinal, en conjunto con la inyección de células progenitoras neurales adultas genera condiciones que permiten un aumento en la neurogénesis a partir de células progenitoras endógenas, en los márgenes de la lesión y en zonas tradicionalmente neurogénicas, lo que propicia una mejora significativa en las capacidades motrices de ratones²². Por otro lado se han encontrado efectos neuroprotectores en estudios en los que se ha visto que la inyección de LT activados específicos para proteína básica de mielina (PBM), obtenidos de ratas inmunizadas con mielina y CFA, reduce el daño secundario causado por compresión al NO, en éstos experimentos se ha notado que la supervivencia y mantenimiento de los axones se mantiene a las 2 y 4 semanas post-lesión y es mayor que en ratas controles^{23,24}. De la misma forma la inmunización 7 días antes de la lesión con PBM/IFA promueve la recuperación de las capacidades motrices en ratas sujetas a contusión de médula espinal²⁵.

Los LT podrían promover la neuroprotección modificando el ambiente extracelular mediante la secreción de citocinas que se ha visto tienen efectos diversos sobre la neuroprotección y regeneración. Se ha visto que algunas citocinas características de las células Th1 como IL12 y tienen efecto sobre la neuroprotección y regeneración después de una lesión al SNC. Estudios realizados en ratones con lesión de médula espinal han mostrado que la administración de IL12 en el sitio de lesión provocan la activación de microglía, aumento en la expresión de BDNF, sugieren también que aumenta la

neurogénesis, oligodendrogénesis, la mielinización y mejora las capacidades motrices hasta después de 40 días post-lesión²⁶. Así mismo, en modelos de daño cerebral en donde se lesiona corteza de ratones silvestres (Wild Type) se observa un aumento en los brotes neurales del lado contralateral al sitio de lesión, este fenómeno compensatorio desaparece en ratones transgénicos que no expresan el factor de necrosis tumoral TNF α ²⁷. Sin embargo estudios *in vitro* señalan que la administración de TNF α disminuye el crecimiento y ramificación de neuritas²⁸.

Por otro lado las citocinas características que secretan los LTh2 también han mostrado efecto sobre la neuroprotección. Se ha visto que la expresión de IL10 en el ambiente adyacente a una lesión de médula espinal en ratas, aumenta el número de neuronas y mejora las capacidades motrices después de la lesión, mediante la inhibición de cascadas apoptóticas²⁹. Se ha visto también que el tratamiento con TGF- β , que los LTregs secretan, en ratas con lesión de médula espinal genera una disminución del 50% del volumen de la lesión³⁰. Cabe señalar que la participación de la microglia en la comunicación entre LT y neuronas es fundamental. En experimentos *in vitro* se ha visto que la microglia activada con citocinas características de LTh1 como IFN γ provocan la diferenciación de células progenitoras neurales hacia neuronas, mientras que microglía activada con citocinas características de LTh2 como IL4 provocan la diferenciación de células progenitoras neurales hacia oligodendrocitos³¹.

Se ha sugerido que la reducción del daño en lesiones de SNC se puede deber a la secreción incrementada de neurotrofinas por parte de células del sistema inmune y nervioso. Las neurotrofinas son proteínas biológicamente activas que promueven la supervivencia neuronal mediante procesos relacionados con su receptor. Se ha demostrado su participación en el desarrollo del sistema nervioso, mantenimiento y

respuesta a trauma. En modelos de inyección de LT específicos para PBM justo después de lesión de NO, se observa un aumento, con su máxima expresión al día cuatro, en la expresión del factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y neurotrofina 3 (NT3) por parte de linfocitos B, microglia y astrocitos, en comparación con ratas tratadas con PBS³². Por otro lado también se ha reportado que LT activados contra PBM secretan mayores niveles de NGF, NT-3, neurotrofina 4 (NT4/5) y BDNF que aquellos estimulados con antígenos no específicos. El efecto que tuvieran éstas neurotrofinas en NO estaría mediado por sus receptores. El receptor de baja afinidad que se une a todas las neurotrofinas con afinidad similar, p75, y los receptores asociados a tirosina cinasa de alta afinidad TrkA y TrkB, se han localizados en NO intacto y en NO 7 días post- lesión. La mejora significativa en la supervivencia de células de ganglionares de la retina se ve directamente afectada por la secreción de neurotrofinas por parte de los LT como lo demostraron estudios en los que se bloquea la acción de las mismas mediante la aplicación local de K252a y K252b, un inhibidor de la señal de transducción asociado a tirosina-cinasa³³.

También se han documentado efectos nocivos de los LT en lesiones de SNC. Se ha visto que la inyección de LT reactivos a PBM así como la inmunización con PBM disminuye el desempeño motriz en ratas sujetas a contusión severa de médula espinal³⁴. Otros estudios en ratones transgénicos en los que >95% de sus LT son reactivos a PBM se ha visto que su recuperación motriz se ve significativamente disminuida después de una lesión de médula espinal³⁵.

Debe señalarse que el grado de activación de los LT parece ser importante, como lo indican estudios en ratones transgénicos deficientes de RAG1 la transferencia de LT CD4+ vírgenes 24 h antes de una lesión aséptica cerebral no incrementa el daño

cerebral, mientras que cuando se inyectan LT CD4⁺ activados el daño se exagera³⁶.

En el estudio realizado por Kipnis et al 2002, se observa que la inmunización de ratones neonatos con homogenado de médula espinal e IFA deriva en la falta de respuesta de dichos linfocitos, extraídos de ratones adultos, ante PBM *in vitro*; también observa que la administración de LT CD4⁺CD25⁺ en ratones desnudos disminuye las capacidades motrices de ratas sujetas a lesión de médula espinal³⁷.

Sin embargo en modelos experimentales de isquemia cerebral se ha visto que la presencia de LT Regs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)disminuyen el daño cerebral y el deterioro funcional³⁸.También se ha visto que en ratones que carecen de LT CD4⁺ CD25⁺ aumenta la severidad de la encefalitis autoinmune experimental (EAE) inducida por antígenos de SNC, principalmente por el aumento de infiltración de LT y la disminución de IL-10³⁹.

Diferenciación experimental de LT

En el presente estudio el factor de inducción de la diferenciación de los LT es la remoción del globo ocular. El modelo de enucleación se ha utilizado en el laboratorio para evaluar procesos de plasticidad cerebral, y datos no publicados indican que en ratas enucleadas existe una modificación de la respuesta inmune pro-inflamatoria. La remoción del globo ocular se acompaña de una lesión al nervio óptico. El nervio óptico es parte del sistema nervioso central, los axones que conforman al nervio óptico tienen su origen en la capa de células ganglionares de la retina. La lesión de nervio óptico ha sido estudiada principalmente en animales adultos, en los que la primera respuesta inmune que desencadena es la respuesta inmune innata con la entrada y acumulación de células Natural Killers (NK) y células fagocíticas activadas en el sitio de lesión, así como la activación de microglia durante las primeras 24 horas⁴⁰. A nivel tisular se

puede diferenciar la lesión primaria que consiste en el daño provocado directamente por el impacto o corte; y la lesión secundaria que se da a consecuencia del daño directo y afecta células adyacentes que escaparon a la lesión primaria. En la lesión de NO a los 7 días se observa pérdida de axones mielinizados y de la organización fascicular del NO; la lesión secundaria ya se observa a los 7 días. Resultados no publicados del laboratorio han indicado que la degeneración del nervio óptico es notable a los 4 días después de la remoción del globo ocular, y dicha degeneración se puede extender hasta los 28 días cuando se detecta que las estructuras más gruesas del NO continúan deteriorándose y se puede evidenciar la formación de una cicatriz glial en forma de protrusión en el sitio de lesión⁴¹. También se ha registrado infiltración de macrófagos en el segmento en degeneración. Al arribar al sitio de lesión los macrófagos remueven residuos celulares de mielina, facilitando la regeneración y re-mielinización de axones. De forma similar a los macrófagos, la microglia muestra actividad fagocítica y citotóxica con el objeto de mantener la homeostasis del tejido de manera constitutiva y en caso de lesión. La microglia tiene capacidad de presentar antígenos lo cual ha sido comprobado en humanos⁴². En caso de daño al NO se ha observado que la densidad de este tipo celular aumenta significativamente después de seccionar el nervio⁴³. En el primer día de vida se ha documentado la presencia significativa de células dendríticas, que funcionarían como células presentadoras de antígeno⁴⁴, lo que nos permite suponer que en nuestro estudio, al momento de la enucleación existen células presentadoras de antígeno capaces de interactuar con LT.

Una vez que se ha activado la respuesta inmune innata en el sitio de lesión se activa la respuesta inmune adaptativa. Experimentos de lesión de NO adulto han indicado que a los siete días post-lesión se observa un pico en la infiltración de linfocitos T y la inducción de expresión de antígenos acoplados al MHCII, el cual no se observa antes de

la lesión. En los primeros días de vida se puede despertar la respuesta inmune adaptativa, como se ha visto en modelos de hipoxia neonatal que indican infiltración de linfocitos⁴⁵. Por otro lado, se ha visto que la activación de LT efectores en los primeros días de vida es posible, aunque éstos muestren preferentemente un perfil Th2. En los primeros 6 días de vida, la producción limitada de IL2 por parte de un subtipo de células dendríticas así como factores epigenéticos permiten que se dé una desviación hacia una respuesta Th2 mientras que después del sexto día de vida se observa un balance entre la respuesta Th1 y Th2⁴⁶. Cuando la administración del antígeno se da en el primer día de vida la desviación hacia una respuesta Th2 se mantiene hasta la vida adulta, esto quiere decir que si se da una segunda dosis de antígeno cuando el ratón es adulto, se observa una respuesta Th2⁴⁶.

Existen estudios que han mostrado que un daño al SNC incide en la diferenciación de LT, lo que promueve la neuroprotección en daños subsecuentes. En dichos estudios se realizó una lesión de médula espinal a los 7, 11, 14 y 17 días previos a una lesión de NO, y se observó una supervivencia mayor en un 40% de células ganglionares de la retina. Sin embargo al realizar el mismo procedimiento en ratas a las que se les retiró quirúrgicamente el timo al nacimiento, es decir con una deficiencia de LT, no se observa el mismo efecto que en ratas con el timo intacto. Cabe señalar que los LT que se encuentran en la médula espinal a los 7 días post-lesión presentan baja proliferación y expresan IL10⁴⁷.

Por otro lado, Hauben¹⁶ ha evidenciado que la inmunización con homogenado de médula espinal de rata 12 días antes de la contusión en médula espinal, provoca una recuperación significativa en comparación con ratas tratadas con solución salina (PBS)¹⁶.

En modelos de contusión de médula espinal en ratas, se ha visto que la inmunización en el momento de lesión⁴⁸ o 10 días post-lesión²⁵ con LT reactivos a PBM, mejora el desempeño motriz en comparación con ratas tratadas con PBS. A nivel histológico, en ratas tratadas con PBS, la contusión en médula espinal se ve acrecentada, con pérdida de tejido nervioso y estructuras en forma de quiste, mientras que en ratas inmunizadas con LT anti PBM se observa mayor preservación del tejido y disminución en el tamaño y formación de quistes⁴⁸.

En nuestro estudio el daño al SNC que se intenta subsanar con la manipulación del fenotipo de los LT es la lesión de la médula espinal. En México se ha informado que la incidencia anual de traumatismos medulares en el Distrito Federal es de aproximadamente 18.1 casos por millón de habitantes⁴⁹. La mayoría de las lesiones ocurren debido a fractura o dislocación de la columna vertebral lo que da lugar a compresión, flexión o hiperextensión de la misma. A medida que el nivel de la lesión se eleva, también lo hace la severidad de los problemas que se derivan en los pacientes, los cuales van desde incapacidad para respirar por si mismos, hasta tetraplejía, paraplejía, etc.⁵⁰

Las secuelas patológicas posteriores a la lesión de médula espinal (LME), al igual que en lesión de nervio óptico (NO), se pueden dividir en primaria y secundaria. La lesión primaria abarca la destrucción focal del tejido nervioso causado directamente por trauma mecánico. La fuerza mecánica del impacto separa las membranas celulares de neuronas y endotelio, lo que genera hemorragia y necrosis que se localiza predominantemente en la sustancia gris debido a su composición rica en vasos sanguíneos. La lesión secundaria ocasionada por la lesión primaria, se caracteriza por la expansión de la hemorragia y la aparición de edema del primero hasta el octavo día post-lesión. El crecimiento del edema provoca que la sustancia gris y blanca pierdan

definición. A los 21 días post-lesión se observan cavidades en las que se desarrollarán quistes a las 14 semanas post-lesión⁵⁰. La falta de irrigación al tejido a nivel celular provoca daños en los mecanismos de fosforilación oxidativa y la afectación de las vías glucolíticas, que ocasiona una falta de adenosín trifosfato (ATP), alterando el metabolismo celular e induciendo necrosis. La necrosis del tejido ocurre de forma centrípeta y en sentido rostro-caudal alrededor del sitio de lesión primaria. Se puede extender hasta dos vértebras de distancia de la lesión original⁵⁰.

Justificación

La preservación de la organización citológica de la médula espinal en los roedores adultos después de una lesión traumática es muy pobre, lo que se traduce en una recuperación motora en extremo deficiente. Este problema parece ser el resultado de las reacciones inflamatorias mediadas por elementos celulares del sistema inmunológico en contra de antígenos neurales. El hecho de que lesiones nerviosas previas mejoren la viabilidad del tejido neural cuando éste es sometido a daños subsecuentes, sugiere que la modulación del proceso de diferenciación de las células inmunológicas efectoras pudiese mejorar las posibilidades de preservación de la estructura medular, y por tanto su potencial regenerativo traducido como una recuperación motora más eficaz. En este trabajo desarrollamos experimentos preliminares enfocados a evaluar si la exposición postnatal temprana a antígenos neurales pudiese favorecer una respuesta inmunológica que permitiese mejorar la preservación citológica de la médula espinal, cuando esta es sometida a una lesión traumática en la vida adulta. De ser cierta esta premisa, nuestros resultados abrirían la puerta para diseñar esquemas de inmunización temprana con antígenos neurales que pudiesen mejorar las posibilidades de regeneración medular en pacientes adultos que sufran de traumatismos medulares.

Pregunta

Debido a que se ha visto que la presencia de LT autorreactivos es indispensable para recuperación motora, el aumento de supervivencia de células y la neurogénesis después de una lesión al SNC, nos preguntamos si ¿la degeneración del NO que se genera mediante la enucleación induce la activación de LT autorreactivos y por lo tanto una recuperación motora en animales lesionados en médula espinal?

Hipótesis

La liberación de antígenos neurales asociada a la degeneración del nervio óptico causada por la enucleación neonatal, instruirá la generación de LT autorreactivos de reserva que se asociaran con una recuperación motora más adecuada en animales adultos sometidos a una lesión de médula espinal.

Objetivos Generales

1. Evaluar si la enucleación neonatal promueve la proliferación de LT CD4⁺ o la presencia de CD25⁺ ante antígenos derivados del NO antes y después de lesión de la médula espinal
2. Evaluar el efecto de la enucleación neonatal sobre la recuperación motriz en animales adultos sujetos a una lesión traumática de la médula espinal.

Objetivos particulares

1.1 Evaluar, mediante el uso de citofluorometria, la presencia de LT autorreactivos mediante ensayos *in vitro* de proliferación de LT CD4⁺ CD25⁺ o CD25 extraídos de ganglios linfáticos cervicales de ratas adultas control, cuando son expuestos a antígenos derivados de nervio óptico adulto intacto o degenerado.

1.2 Evaluar, mediante el uso de citofluorometria, la presencia de LT autorreactivos mediante ensayos *in vitro* de proliferación de LT CD4⁺ CD25⁺ o CD25 extraídos de

ganglios linfáticos cervicales de ratas adultas enucleadas neonatalmente y expuestos a antígenos derivados de nervio óptico adulto intacto o degenerado.

1.3 Evaluar, mediante el uso de citofluorometría, la presencia de LT autorreactivos mediante *ensayos in vitro* de proliferación de LT CD4⁺ CD25⁺ o CD25 extraídos de ganglios linfáticos cervicales de ratas adultas control y lesionadas en la medula espinal, cuando son expuestos a antígenos derivados de nervio óptico adulto intacto o degenerado

1.4 Evaluar, mediante el uso de citofluorometría, la presencia de LT autorreactivos mediante ensayos de proliferación *in vitro* de LT CD4⁺ CD25⁺ o CD25 extraídos de ganglios linfáticos cervicales de ratas adultas enucleadas neonatalmente y lesionadas en la medula espinal, cuando son expuestos a antígenos derivados de nervio óptico adulto intacto o degenerado,.

1.5 Evaluar la recuperación motora de ratas adultas control y enucleadas neonatalmente después de 30 y 60 días de haber sido sometidas a una lesión traumática de la medula espinal utilizando la escala Basso-Beattie-Bresnahan.

Materiales y métodos

Animales de Experimentación

Todos los experimentos fueron realizados en ratas hembra de la cepa Wistar. Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales. El grupo control se conformo por animales intactos sacrificados en la edad adulta (n=2). El grupo control lesionado fue constituido por ratas que fueron sometidas a lesiones traumáticas medulares en la edad adulta y sacrificadas 7 días post-lesión (n=3). El tercer grupo se constituyo por ratas enucleadas entre las primeras 6 a 12 horas de vida postnatal y sacrificadas en la edad adulta (n=2). El cuarto grupo fue conformado por ratas enucleadas al nacimiento, sometidas a lesión traumática medular y sacrificadas en la vida adulta (n=3). De cada camada, solamente se mantuvieron a las hembras enucleadas o no. El número de animales por camada no fue ajustado una vez removidos los machos. Las crías se mantuvieron con su madre hasta la edad de destete a los 21 días. Posteriormente, los animales con tratamientos similares se alojaron por pares en jaulas de acrílico con aserrín estéril en cuartos con temperatura y humedad controladas (ciclo de 12 h iluminación/ 12 h oscuridad) ubicadas en las instalaciones del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. En todo momento los animales tuvieron acceso libre a agua y alimento. Los procedimientos y protocolos realizados cumplieron con las normas del código ético para el uso de animales de experimentación publicadas por el propio Instituto, y fueron aprobados por el comité de ética local.

Enucleación

La remoción de los globos oculares se llevó a cabo siguiendo los protocolos descritos previamente⁵¹. Brevemente, los animales se enuclearon durante las primeras 6 a 12 h de vida previa anestesia por hipotermia. Se realizó una incisión fina sobre la fisura palpebral de manera que se pudiera remover el tejido ocular en su totalidad con ayuda

de una pinza. Una vez removidos ambos ojos, los animales se colocaron bajo una lámpara de luz incandescente para que una vez que recuperaron su temperatura, color y movimiento fueran devueltos con su madre.

Lesión de médula espinal

Para llevar a cabo la lesión medular, los animales (200-250gr) se anestesiaron con ketamina (80mg/Kg) y xilazina (8mg/Kg) administrada por vía intramuscular. La lesión se realizó en un ambiente estéril y con instrumentos previamente desinfectados. En el primer tiempo de la cirugía, se efectuó una laminectomía a nivel de T-9, procedimiento que descubrió la porción torácica de la médula espinal cubierta por las meninges. En el segundo tiempo quirúrgico, se sujetó a la rata por las apófisis vertebrales cercanas a la laminectomía para producir una contusión con el impactador diseñado en la Universidad de Nueva York. Con este fin se dejó caer un pistón de punta roma (10gr de peso) desde una altura de 25 ± 0.8 mm sobre la médula expuesta. Todo el procedimiento es controlado por computadora. Ejecutada la lesión, se procedió a suturar la musculatura con una sutura de nylon 9-0 y la piel con sutura de nylon 2-0. Para evitar molestias e infecciones los animales recibieron paracetamol (16 mg por kg de peso cada 12 horas por 8 días) y enrofloxacin (32 mg por kg de peso cada 12 horas por 8 días). La herida fue revisada diariamente, así como la limpieza del pelaje, desde el momento de la lesión hasta el momento del sacrificio. Dos veces al día se efectuó la descarga manual de intestino y vejiga urinaria durante las primeras dos semanas y una vez al día hasta el momento del sacrificio.

Evaluación motriz

La evaluación motriz se llevó a cabo mediante una prueba de locomoción en campo abierto utilizando la escala Basso Beattie Bresnahan (BBB). Esta escala asigna puntajes de entre 0 a 21 a los patrones locomotrices en función de su cercanía a la normalidad.

Los movimientos que se valoran son, entre otros, el movimiento de las coyunturas, la coordinación de miembros inferiores, el soporte y balance del peso con los miembros trasero y el apoyo y posición de las patas traseras. La evaluación se llevó a cabo a los 5, 30 y 60 días post-lesión durante 5 minutos. En este tiempo se les permitió a los animales caminar libremente.

Ensayos de proliferación

Los animales fueron sacrificados con una dosis letal de ketamina (40mg por kg de peso) y sus ganglios cervicales y bazos se extrajeron rápidamente, colectaron y maceraron a 4°C en medio de cultivo RPMI suplementado con 10ml/L de suero fetal bovino; 4µl/L de mercaptoetanol; 10ml/L HEPES; 1.5g/L bicarbonato de sodio; 10ml/L antibiótico-antimicótico (GiBCO 15240). Únicamente los bazos fueron re-suspendidos en 1ml de solución hemolisante de 0.83% de cloruro de Amonio en PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄ y 1.47 mM KH₂PO₄ ajustado a un pH final de 7.4) durante 5 minutos. La separación de los componentes celulares se realizó utilizando una malla de nylon estéril reticulada a 12 x 24 µm. Una vez disgregadas, se estimó la viabilidad celular en ambos órganos mediante una tinción con azul tripano (4%). Posteriormente, las células de bazo fueron incubadas durante 24hrs con lipopolisacárido (LPS; 10µg/ml). Las células fueron entonces transferidas a placas de cultivo de 96 pozos y se incubaron con 5000ng de proteína del homogenado del nervio óptico entero o con 5000ng de proteína del homogenado del nervio óptico después de 96 horas de enucleación, por 1hr a 37°C y CO₂ al 5%. Posteriormente, se agregaron 4X10⁵ células de ganglio teñidas con 50µl diéster amida carboxifluoresceína CFSE (Molecular Probes) (5µl/ml) durante 10 minutos, la incorporación del CFSE se detuvo agregando 200µl de suero fetal bovino y 1ml de medio de cultivo. Las células en los pozos control no se expusieron a antígeno alguno. Por cada rata sacrificada se realizaron las

condiciones mencionadas anteriormente, por cada condición se sembraron de tres a cinco pozos.

Homogenado de nervio óptico

Para obtener el homogenado de nervio óptico intacto, se sacrificó a los animales con una dosis letal de ketamina, y se retiraron ambos globos oculares y sus respectivos nervios ópticos; mismos que fueron incluidos en un coctel de inhibidores de proteasas Complete (Roche) en baño de hielo y fue sujeto a la acción del sonicador por 4 pulsos de 30 segundos de duración espaciados 1 minuto, a una frecuencia de 30 Hertz.

Para obtener el homogenado de nervio óptico en degeneración se anestesió a los animales con un peso de 200-2200gr. con una mezcla de ketamina 80mg/Kg y xilazina 8mg/Kg, la aplicación se hizo de manera intramuscular en el bíceps femoral; se retiraron los globos oculares completos y se suturaron los párpados, después de 4 días se sacrificó a las ratas con una dosis letal de ketamina para retirar los remanentes del nervio óptico, el cual fue incluido en un coctel de inhibidores de proteasas Complete (Roche) en baño de hielo y fue sujeto a la acción del sonicador por 4 pulsos de 30 segundos de duración espaciados 1 minuto, a una frecuencia de 30 Hertz.

Se llevó a cabo una cuantificación de proteínas totales mediante la técnica de Bradford.

Citofluorometria

Las células fueron cultivadas 72 horas a 37°C y CO₂ al 5% en completa oscuridad, para evitar que se disipara la fluorescencia del CFSE. Las células se incubaron durante 20 min a 4°C con 20µl de anticuerpo monoclonal de ratón anti CD4 de rata conjugado con ficoeritrina Cy5 (Pe-Cy5) a una concentración de 3.3 µl/ml de PBS o 20µl de anticuerpo monoclonal de raton anti CD25 de rata conjugado con ficoeritrina (Pe) a una concentración de 10µl/ml de PBS. A continuación, se hicieron dos lavados con un buffer de fosfatos adicionado con 3% de suero fetal bovino y 0.1% de azida de sodio

(buffer Facs BD) para posteriormente resuspender en 200µl de PBS y trasladados a tubos para citómetro. La adquisición de muestras se realizó en el citómetro Facscalibur BD que pertenece a la unidad de citofluorometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Cada muestra se diluyó en aproximadamente 1ml de buffer Facs BD y se adquirió la muestra hasta coleccionar 10 000 células con tamaño y granularidad correspondiente con la propia de los Linfocitos T, o se coleccionó en su totalidad la suspensión de células. La región en la que se encuentran representados los linfocitos en el programa de análisis BD Cell Quest Pro se estableció experimentalmente con la gráfica de tamaño contra granularidad de las células examinadas. Se realizaron los ajustes de compensación el día de inicio del cultivo para establecer las zonas de inmunofluorescencia máxima e inespecífica.

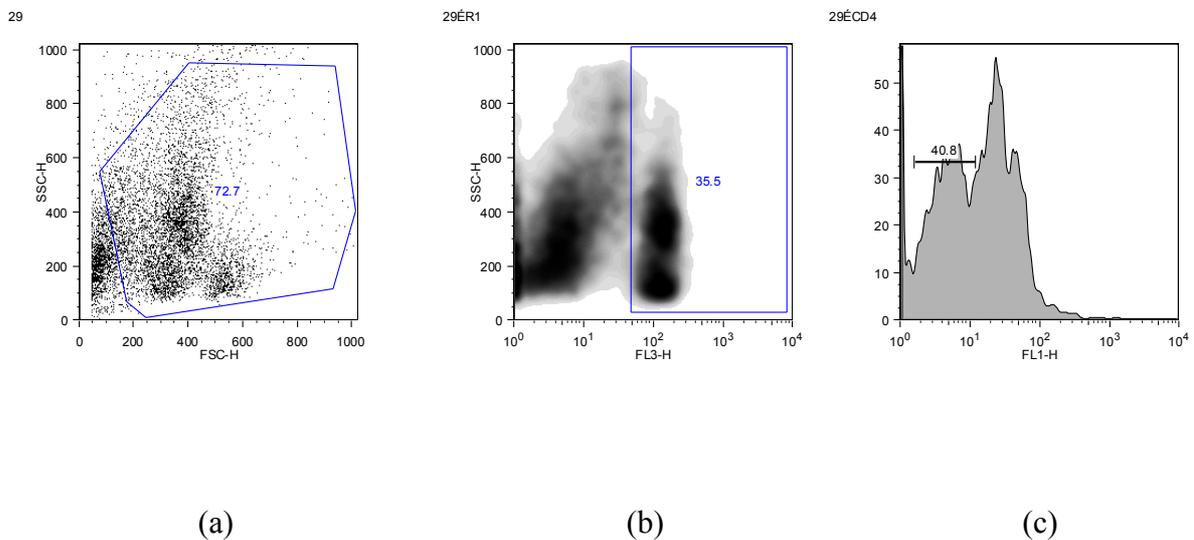


Fig. 1. Procedimiento de cuantificación de células CD4⁺ en el programa FlowJo. (a) Gráfico de tamaño vs granularidad en la que se observa la región característica referente a células vivas. (b) Gráfico de tamaño vs intensidad de fluorescencia de CD4⁺ acoplado a PeCy5, en la que se ve la región seleccionada de células positivas. (c) Gráfico de

cuentas vs intensidad de fluorescencia de CFSE, en la que se observa un patrón característico de proliferación.

Con el objeto de cuantificar las células $CD4^+$ y $CD25^+$ y su proliferación, se realizaron gráficos de dispersión de la granularidad en función del tamaño; a partir de dichos gráficos se determinaron las regiones que abarcaran poblaciones homogéneas Fig.1 (A). Mediante gráficos de granularidad en función de la intensidad de fluorescencia de Pe-Cy5, se determinó la región que contempla a la población de LT $CD4^+$ Fig. 1 (B). De dicha región se hizo el análisis de la intensidad de fluorescencia de CFSE, compuesto que se utiliza como indicador de proliferación. Este es un compuesto que ingresa a la célula por difusión pasiva; en caso de mitosis es transferido a las células hijas en las que se diluye por lo que presenta una menor intensidad de fluorescencia. Se realizó una gráfica que representa el número de eventos en función de la intensidad de fluorescencia de CFSE. En base a estos gráficos se determinó el porcentaje del total de células $CD4^+$ que han proliferado como se muestra en la Fig.1 (C). Para estimar el porcentaje de células $CD4^+CD25^+$ se seleccionó el área correspondiente a los linfocitos en el gráfico de dispersión de la granularidad en función del tamaño Fig.2 (A) a partir de la cual se realizó un gráficos de intensidad de fluorescencia de Pe en función de la intensidad de fluorescencia de Pe-Cy5, con base en este gráfico se definieron cuadrantes que indicaran células $CD25^+CD4^-$ (cuadrante superior izquierdo), $CD25^+CD4^+$ (cuadrante superior derecho), $CD25^-CD4^+$ (cuadrante inferior derecho), $CD25^-CD4^-$ (cuadrante inferior izquierdo) y se seleccionaron los eventos dobles positivos .

Análisis estadístico

Los resultados están reportados como promedios de porcentajes de las condiciones arriba mencionadas realizadas por quintuplicado. Los análisis estadísticos se hicieron mediante la prueba estadística Kruskal-Wallis.

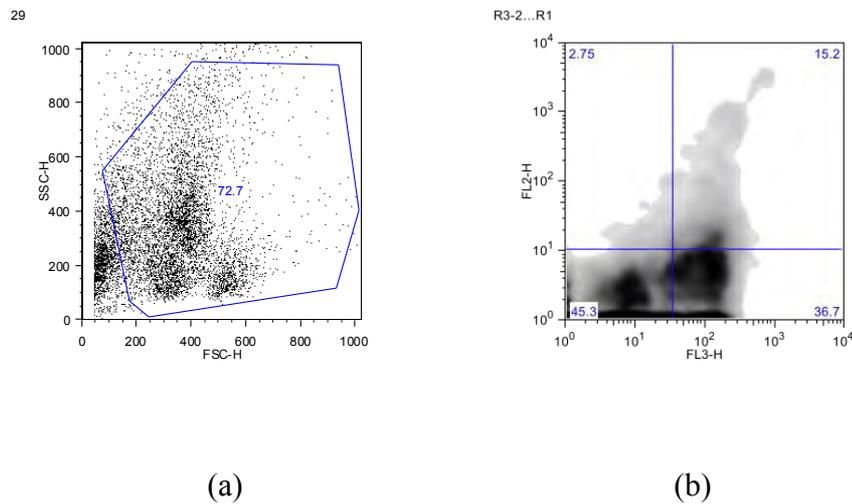


Fig. 2. Procedimiento de cuantificación de células CD4⁺ CD25⁺ en el programa FlowJo.(a) Gráfico de tamaño vs granularidad en la que se observa la región que la literatura señala⁵² como células vivas.(b) Gráfico de intensidad de fluorescencia de CD25 acoplado a PE vs intensidad de fluorescencia de CD4⁺ acoplado a PeCy5 en el que se observan las células dobles positivas en el cuadrante superior derecho.

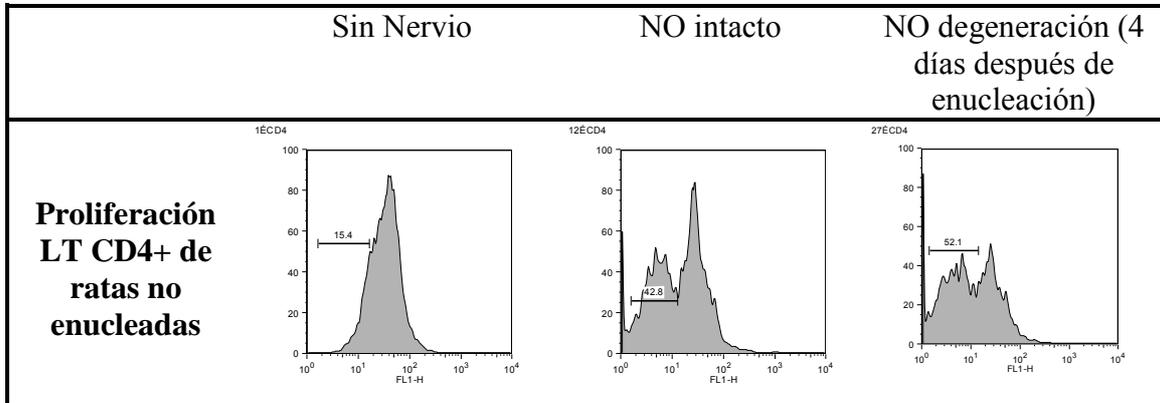
Resultados

Incremento en la proliferación de LT ante antígenos de NO

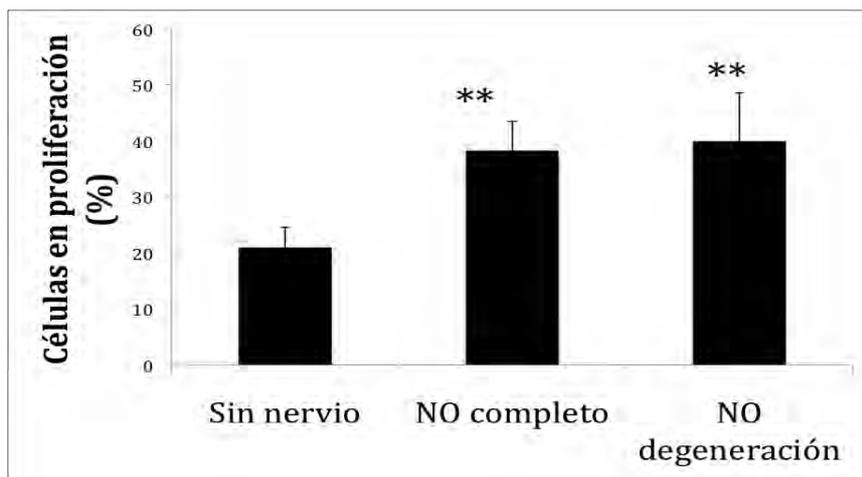
La respuesta proliferativa *in vitro* de LT extraídos de ratas sin lesiones a SNC ante antígenos de nervio óptico íntegro o lesionado no se conoce. Por esta razón se extrajeron ganglios cervicales de ratas Wistar hembras adultas, los cuales fueron marcados con CFSE y posteriormente cultivados con células autólogas de bazo previamente estimuladas con lipopolisacárido (LPS) y con diferentes concentraciones (50, 500, 2000 y 5000 ng/ml) de homogenado de NO obtenido de ratas adultas no enucleadas (NO intacto) o con 4 días de enucleación (NO en degeneración). Por citometría de flujo se determinó que únicamente las células CD4⁺ (las cuales corresponden a los LT) cultivadas con homogenado a una concentración de 5000 ng/ml evidenciaron proliferación (datos no mostrados), por lo cual los siguientes experimentos se realizaron utilizando esta concentración.

Para evaluar si existe algún tipo de respuesta proliferativa de los LT extraídos de ratas sin enuclear cultivados con homogenado de NO intacto y NO en degeneración, los LT extraídos se cultivaron en conjunto con células de bazo previamente estimuladas con LPS, y 5000 ng/ml de homogenado de NO intacto y NO en degeneración.

Al evaluar los promedios del porcentaje de células en proliferación mediante la prueba Kruskal-Wallis se observa que, en comparación al control negativo (células cultivadas sin NO), existe un aumento estadísticamente significativo en la proliferación de los LT CD4⁺ al presentarse compuestos de NO intacto ($p < 0.01$) y en degeneración ($p < 0.01$) (Fig. 1a y 1b); sin embargo al comparar entre la proliferación de LT cultivados con NO intacto y NO en degeneración no se evidenciaron diferencias significativas.



(a)



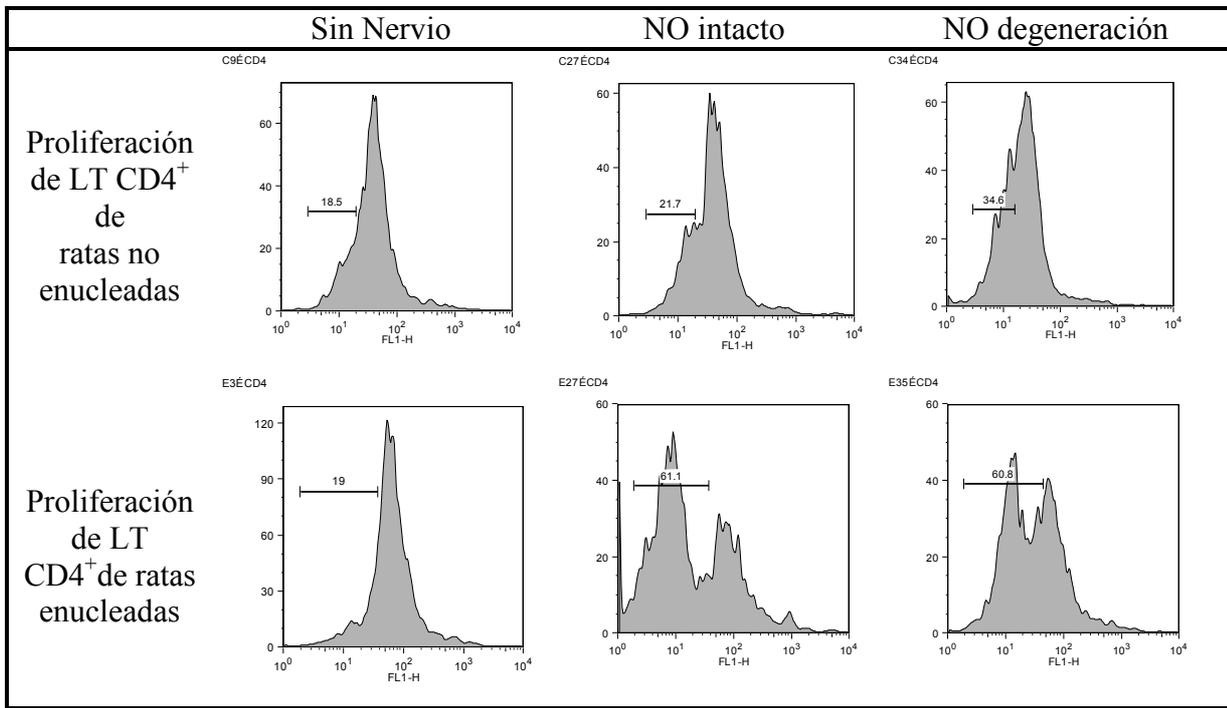
(b)

Figura 1. Proliferación de LTCD4 en presencia de homogenado de NO. 4×10^5 células de ganglios linfáticos cervicales fueron cultivadas con 3×10^5 células de bazo expuestas previamente a 5000 ng/ml de homogenado de NO + LPS, 3 días después las muestras

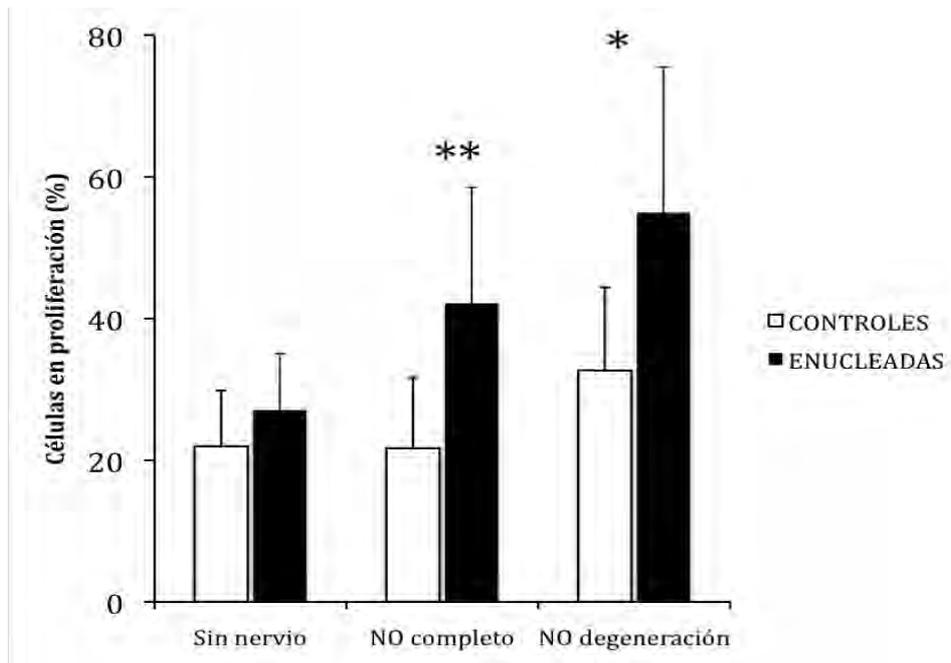
fueron analizadas en el citómetro (Facs Calibur BD). (a) Histogramas Representativos: En el eje de abscisas se muestra la intensidad de fluorescencia de la carboxifluoresceína; en el eje de ordenadas el número de eventos. (b) Porcentajes promedio de proliferación, las barras representan la desviación estándar de quintuplicados de una $n = 2$. Mediante la prueba Kruskal Wallis se evidenciaron diferencias significativas ** $p < 0.01$

Incremento en la proliferación de LT de ratas enucleadas ante NO

La enucleación es un procedimiento que presumiblemente expone antígenos del SNC al sistema inmune modificando la respuesta de los LT a un reto posterior con dichos antígenos. Para comprobar esta hipótesis se evaluó la proliferación de LT CD4⁺ provenientes de ratas enucleadas frente a homogenado de NO intacto y en degeneración. Utilizando la prueba Kruskal-Wallis se evidenció un aumento significativo en la proliferación de LT CD4⁺ de ratas enucleadas y no enucleadas expuestas a NO intacto ($p < 0.01$) y en degeneración ($p < 0.05$) expresadas como porcentaje, promedio del quintuplicado, de células en proliferación, como se observa en la Figura 2.



(a)



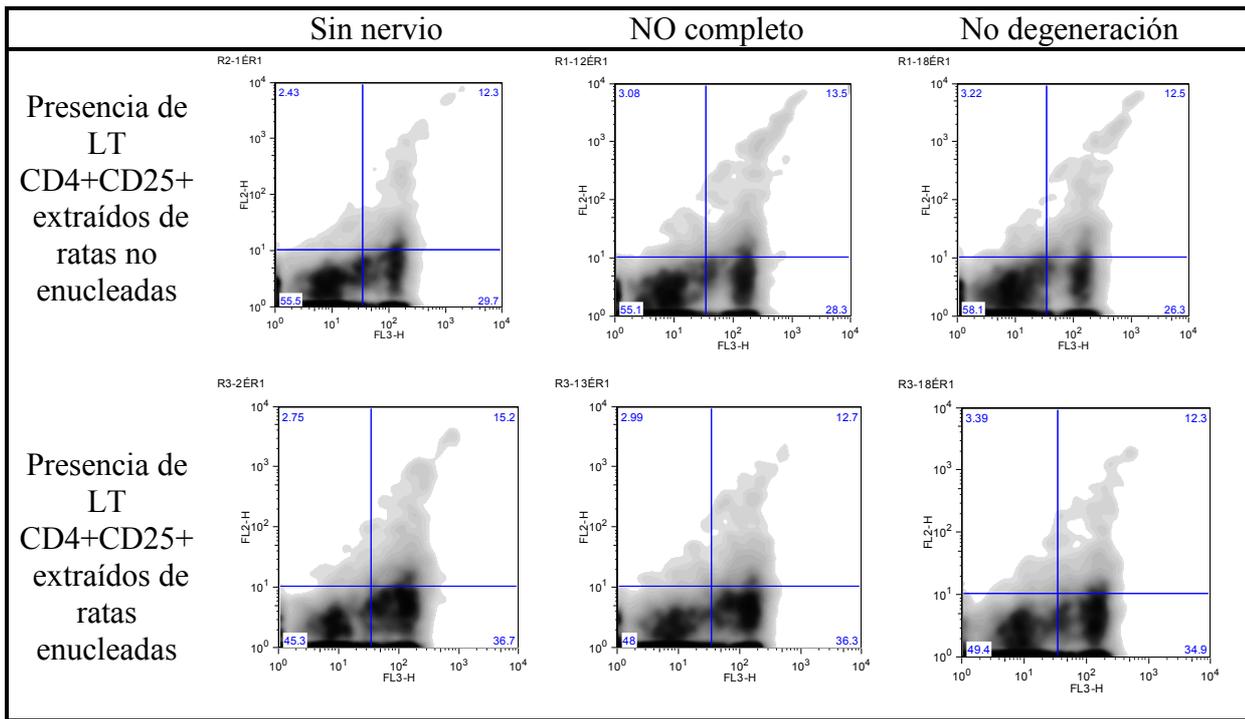
(b)

Figura 2. Proliferación de LTCD4 en presencia de homogenado de NO intacto y en degeneración. 4×10^5 células de ganglios linfáticos cervicales fueron cultivadas con 3×10^5 células de bazo expuestas previamente a 5000ng/ml de homogenado de NO + LPS, 3 días después las muestras fueron analizadas en el citómetro (Facs Calibur BD). (a) Histogramas Representativos de las proliferaciones vistas al citómetro: En el eje de abscisas se muestra la intensidad de fluorescencia de la carboxifluoresceína; en el eje de ordenadas el número de eventos. (b) Porcentajes promedio de proliferación, las barras representan la desviación estándar de quintuplicados de una $n=2$. Mediante la prueba Kruskal Wallis se evidenciaron diferencias significativas * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

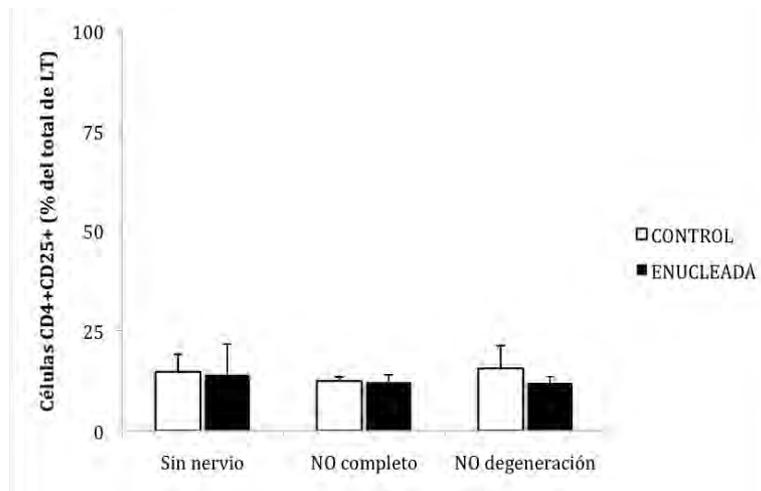
El porcentaje de LT CD4⁺CD25⁺ en ganglios de ratas enucleadas y no enucleadas no presenta diferencias

Con el fin de dar un primer paso en la identificación del fenotipo regulador o efector, de los LT CD4⁺ provenientes de ratas enucleadas, que anteriormente mostraron mayor proliferación frente a homogenado de NO, se analizó la expresión de CD25 como un primer paso en la identificación de LT reguladores.

Se evaluó la presencia de células dobles positivas para CD4⁺CD25⁺ utilizando un gráfico de intensidad de fluorescencia de PE acoplado a anti-CD25 en función de PeCy5 acoplado a anti-CD4. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺ entre enucleadas no enucleadas ante NO completo o en degeneración Figura 3.



(a)



(b)

Fig 3. Porcentaje de LT CD4⁺CD25⁺ del total de LT contabilizados, extraídos de ratas enucleadas y no enucleadas, cultivados en presencia de homogenado de NO intacto y en degeneración. 4x10⁵ células de ganglios linfáticos cervicales fueron cultivadas con 3x10⁵ células de bazo expuestas previamente a 5000ng/ml de homogenado de NO +

LPS, 3 días después las muestras fueron analizadas en el citómetro (Facs Calibur BD).

(a) Gráficos de densidad de LT, en el eje de abscisas se muestra la intensidad de fluorescencia de anticuerpo anti-CD4 unido a PeCy5; en el eje de ordenadas se muestra la intensidad de fluorescencia del anticuerpo anti-CD25 unido a PE. (b) Porcentaje promedio del total de LT de células $CD4^+CD25^+$, las barras representan la desviación estándar de los quintuplicado de una $n=2$. No se evidenciaron diferencias significativas mediante la prueba Kruskall Wallis.

Incremento en la proliferación de LT de ratas sometidas a lesión de médula espinal ante NO

La lesión de médula espinal, al igual que la enucleación, podría ser una fuente de antígenos para el sistema inmune. Con el objetivo de revelar la respuesta proliferativa que presentan los LT de ratas enucleadas ante una segunda exposición ante antígenos de SNC, se llevó a cabo lesión de médula espinal por compresión a la altura de T9 en ratas enucleadas y no enucleadas. A los 7 días post-lesión se analizó en un principio, el porcentaje de células $CD4^+$ del total de eventos registrados y se observó un aumento generalizado en la proporción de éstas células después de una lesión de médula espinal Figura 4a.

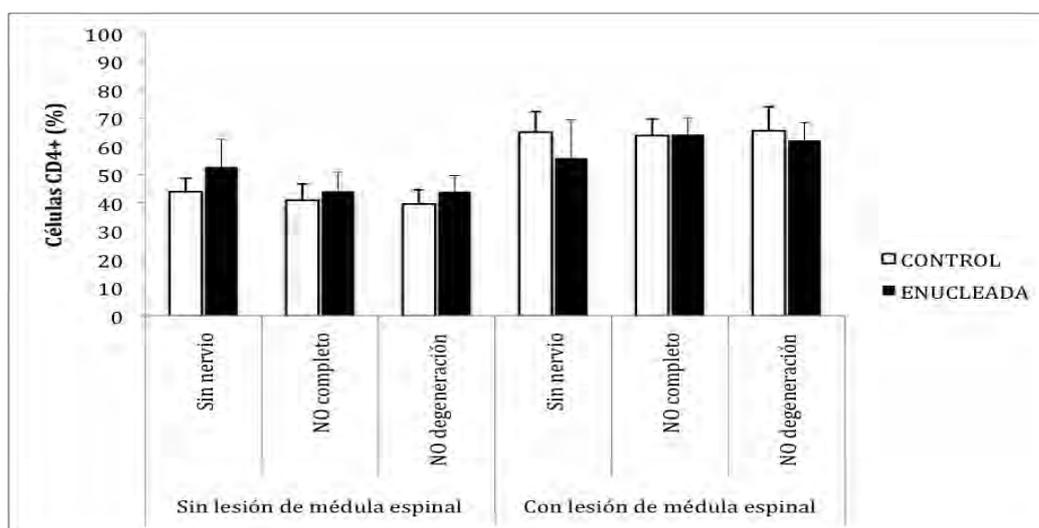
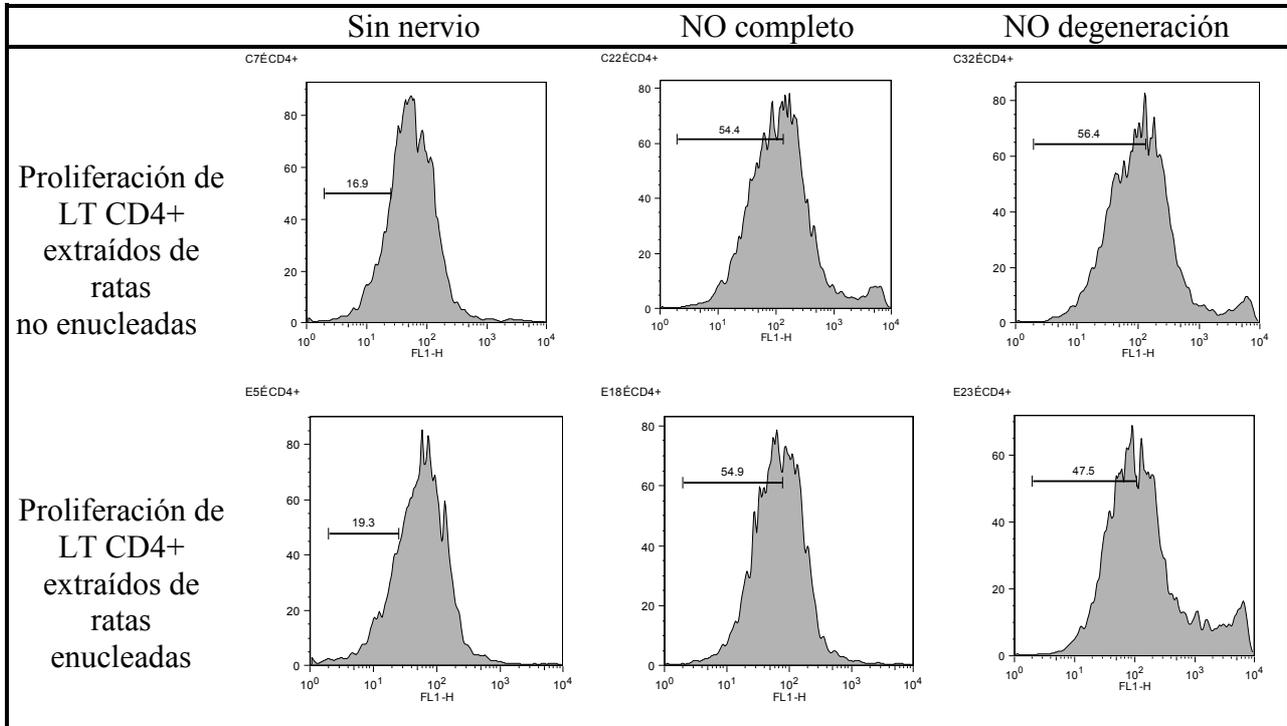


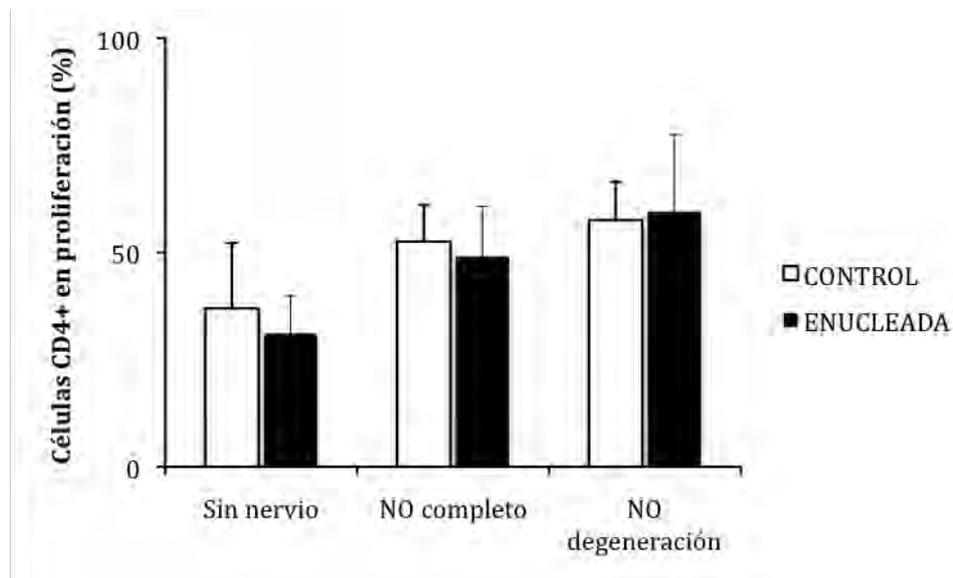
Fig. 4a. . Proliferación de LTCD4 en presencia de homogenado de NO intacto y en degeneración. 4×10^5 células de ganglios linfáticos cervicales fueron cultivadas con 3×10^5 células de bazo expuestas previamente a 5000ng/ml de homogenado de NO + LPS, 3 días después las muestras fueron analizadas en el citómetro (Facs Calibur BD). Se observa el porcentaje promedio del total de eventos identificadas como células $CD4^+$, las barras representan la desviación estándar de quintuplicados de una $n=2$ en las ratas sin lesión de médula espinal y $n=3$ en las ratas con lesión medular.

Al evaluar la proliferación, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de células $CD4^+$ en proliferación obtenidas de ratas enucleadas y no enucleadas cultivadas con homogenado de NO intacto o en degeneración. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba Kruskal-

Wallis entre LT extraídos de ratas enucleadas y no enucleadas ante NO completo y en degeneración. figura 4c.



(b)



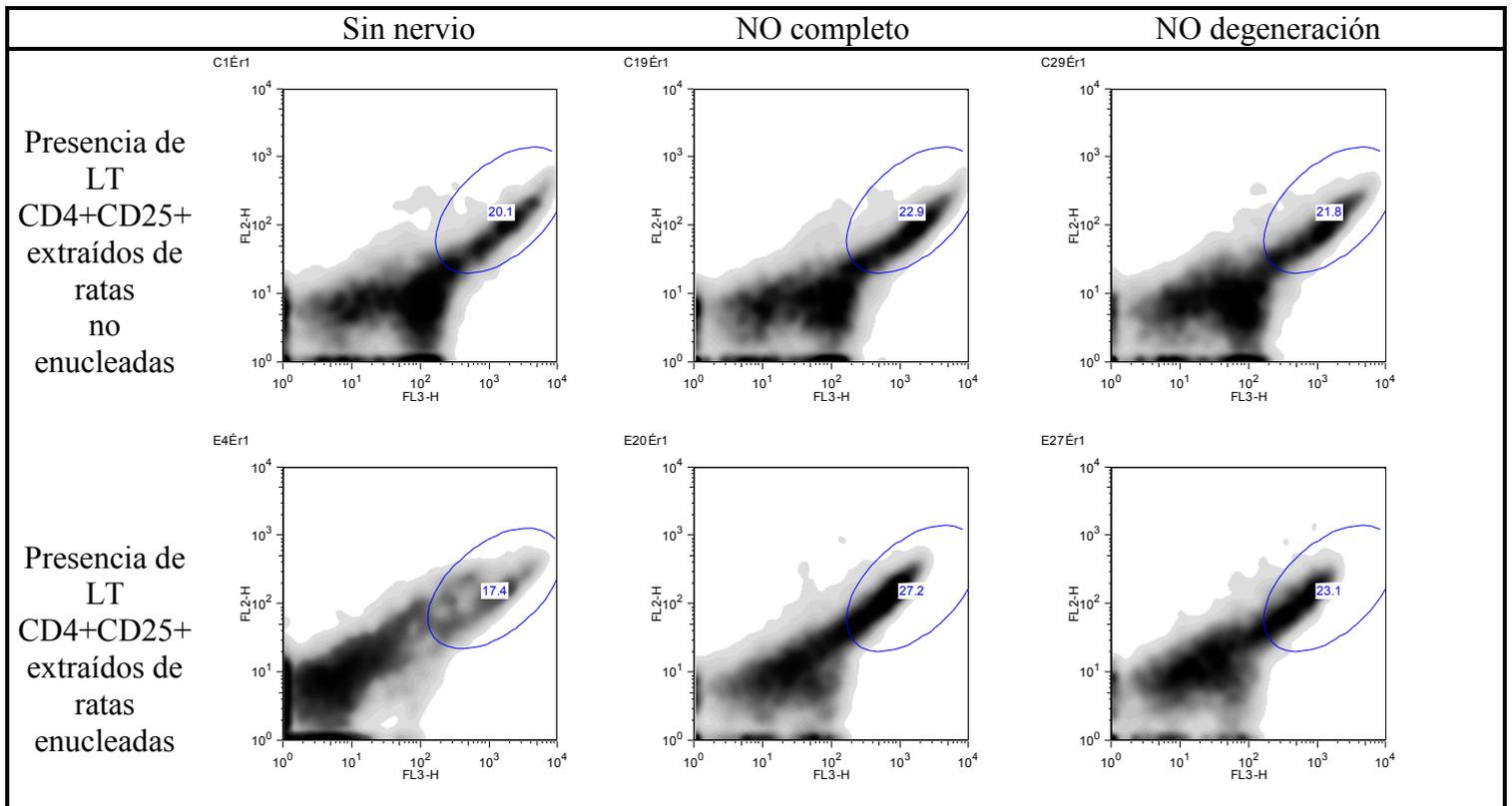
(c)

Figura 4. Proliferación de LTCD4, extraídos de ratas enucleadas y no enucleadas sometidas a lesión de médula espinal. Dichas células fueron cultivadas en presencia de

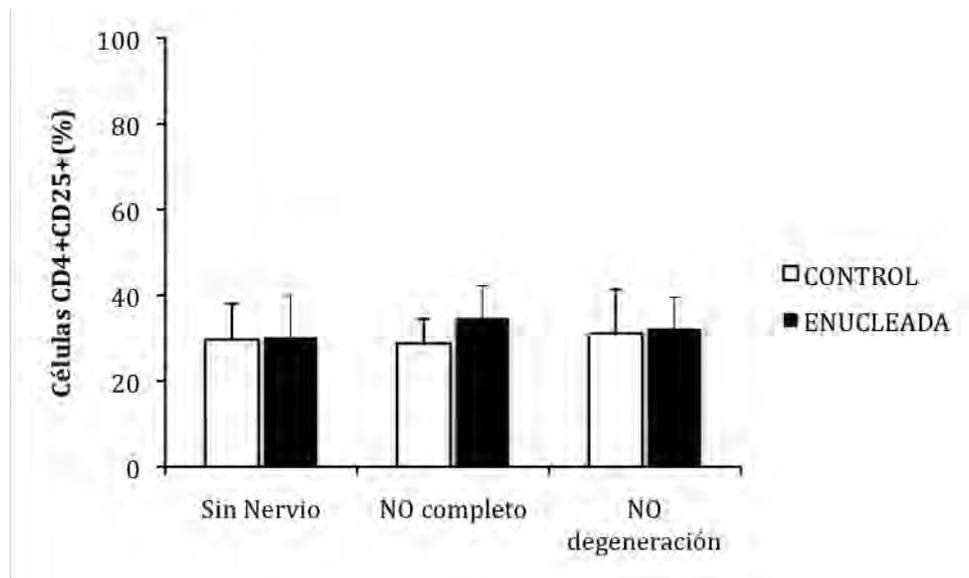
homogenado de NO intacto y en degeneración. 4×10^5 células de ganglios linfáticos cervicales fueron cultivadas con 3×10^5 células de bazo expuestas previamente a 5000ng/ml de homogenado de NO + LPS, 3 días después las muestras fueron analizadas en el citómetro (Facs Calibur BD). (a) Histogramas Representativos de las proliferaciones vistas al citómetro: En el eje de abscisas se muestra la intensidad de fluorescencia de la carboxifluoresceína; en el eje de ordenadas el número de eventos. (b) Porcentajes promedio de proliferación, las barras representan la desviación estándar de quintuplicados de una n de 3. No se evidenciaron diferencias significativas mediante la prueba Kruskall Wallis.

La exposición reiterada del antígeno no afecta la presencia de LT CD4+CD25+

Con el fin de determinar si los LT de ratas sometidas a lesión de médula espinal adquirieron un fenotipo regulador debido a una reiterada exposición a antígenos propios de SNC, se realizó un marcaje con CD25 encontrándose que tanto LT de ratas enucleadas y no enucleadas muestran porcentajes equivalentes de células CD4+CD25+
Figura 5.



(a)



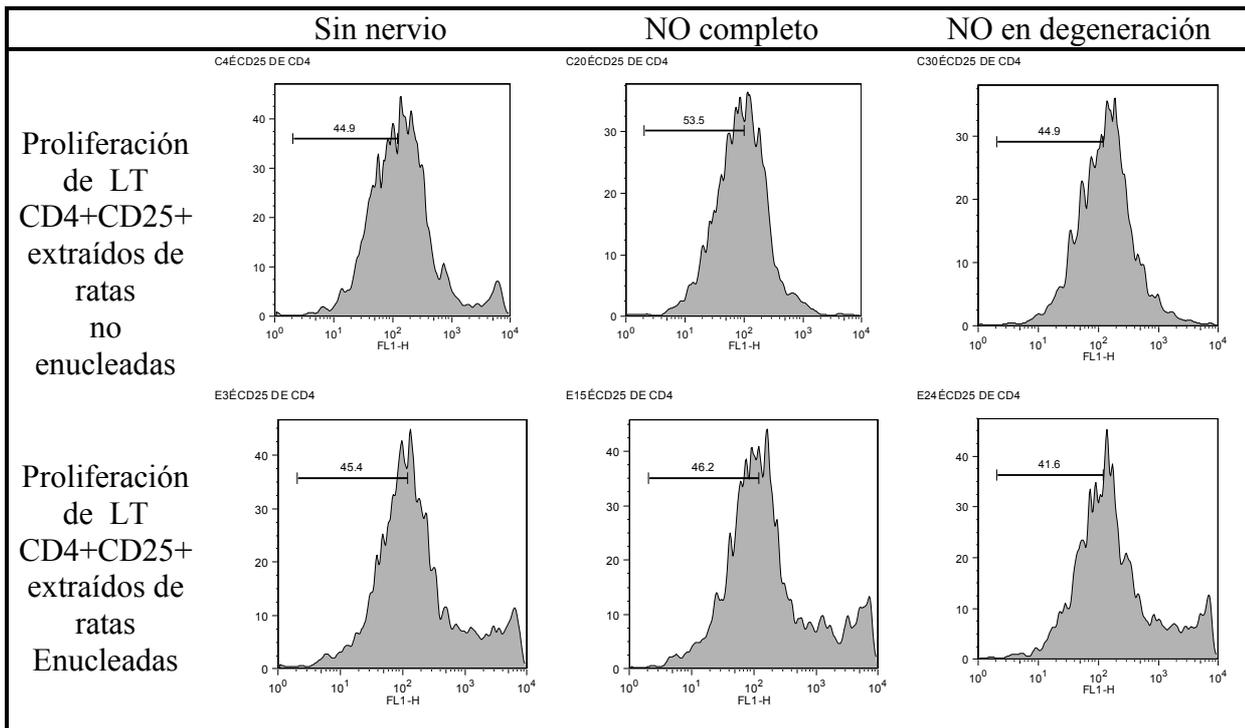
(b)

Fig 5. Proliferación de LTCD4⁺CD25⁺, extraídos de ratas enucleadas y no enucleadas sometidas a lesión de médula espinal. Dichas células fueron cultivadas en presencia de

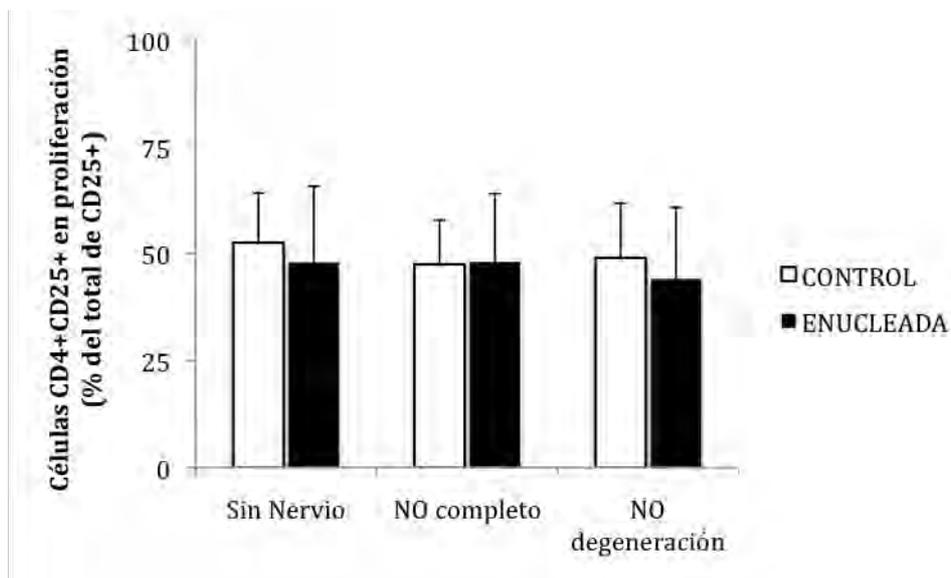
homogenado de NO intacto y en degeneración. 4×10^5 células de ganglios linfáticos cervicales fueron cultivadas con 3×10^5 células de bazo expuestas previamente a 5000ng/ml de homogenado de NO + LPS, 3 días después las muestras fueron analizadas en el citómetro (Facs Calibur BD). (a) Gráficos de densidad de LT representativos de cada una de las condiciones de cultivo. En los gráficos de densidad el eje de abscisas se muestra la intensidad de fluorescencia de anticuerpo anti-CD4 unido a PeCy5; en el eje de ordenadas se muestra la intensidad de fluorescencia del anticuerpo anti-CD25 unido a ficoeritrina (PE). Se observa el área seleccionada en donde se encuentran los LT dobles positivos. (b)) Porcentajes promedio de proliferación, las barras representan la desviación estándar de los quintuplicados de una n de 3. No se evidenciaron diferencias significativas mediante la prueba Kruskal Wallis.

La exposición reiterada de antígeno no tiene efecto sobre la proliferación de LT CD4+CD25+

El no encontrar diferencias en la proporción de LT CD4+CD25+ del total de LT, no significa necesariamente que estas células tengan una respuesta similar de proliferación frente al antígeno, puesto que pueden estar llevando a cabo más procesos de proliferación y apoptosis que no se vean reflejados al contabilizar los LTCD4⁺CD25⁺; por ello, se determinó si esta respuesta de proliferación mostraba algún cambio ante una segunda y tercera exposición al antígeno. Así, se evaluó la proliferación, de los LT cultivados con homogenado de NO intacto y en degeneración, de los LT CD4⁺ CD25⁺ de ratas enucleadas y sometidas a lesión de médula espinal en estado adulto. Encontramos que la proliferación de LT CD4+CD25+ es similar entre ratas enucleadas y no enucleadas ante homogenado de NO intacto y en degeneración. Figura 6.



(a)



(b)

Figura 6. Proliferación de $LTCD4^+CD25^+$, extraídos de ratas enucleadas y no enucleadas sometidas a lesión de médula espinal. Dichas células fueron cultivadas en presencia de homogenado de NO intacto y en degeneración. 4×10^5 células de ganglios linfáticos cervicales fueron cultivadas con 3×10^5 células de bazo expuestas previamente

a 5000ng/ml de homogenado de NO + LPS, 3 días después las muestras fueron analizadas en el citómetro (Facs Calibur BD). (a) Histogramas representativos de las proliferaciones vistas al citómetro, los LT que se observan en estos gráficos se derivan del área seleccionada (como se ejemplifica en la Fig. 5(a)) que corresponde a los LT dobles positivos ($CD4^+CD25^+$). En el eje de abscisas se muestra la intensidad de fluorescencia de la carboxifluoresceína; en el eje de ordenadas el número de eventos. (b) Porcentajes promedio de proliferación, las barras representan la desviación estándar de los quintuplicados de una $n=3$. No se evidenciaron diferencias significativas mediante la prueba Kruskal Wallis.

La enucleación no modifica la recuperación motriz

La enucleación no tiene ningún efecto significativo sobre la recuperación de capacidades motrices después de una lesión de médula espinal. Figura 7.

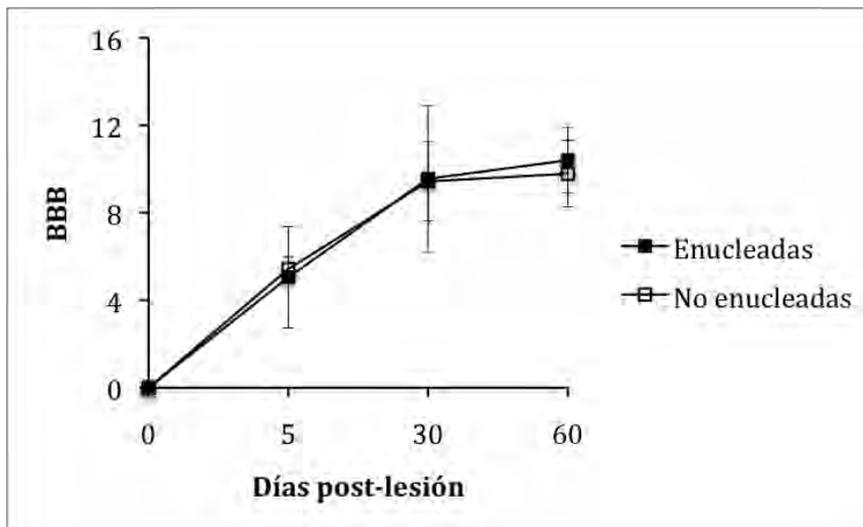


Fig. 7 Desempeño motriz, de ratas enucleadas y no enucleadas sometidas a lesión de médula espinal, evaluado mediante la prueba conductual Basso-Beattie-Bresnahan(BBB). Cada serie de puntos representa el promedio y desviación estándar de $n=10$ ratas enucleadas y $n=6$ controles. No se encontraron diferencias significativas mediante la prueba de ANOVA.

Discusión

Investigaciones que se vienen realizando desde hace 10 años han mostrado que los LT activados contra PBM son necesarios para disminuir el daño histológico tras una lesión al SNC^{23, 24, 37}. Sin embargo, el fenotipo de estas células así como sus características de activación aun son controversiales. Por otra parte, la lesión en nervio óptico ha mostrado servir como modelo de daño primario y secundario en donde se ha visto que al sitio de lesión arriban células dendríticas y macrófagos, que actúan como células fagocíticas que remueven restos celulares, los procesan en su interior para colocarlos en la superficie membranal y fungir como células presentadoras de antígenos⁵³. En nuestro estudio se supone que péptidos característicos del SNC son presentados como antígenos en un contexto inflamatorio por lo que pueden provocar que LT que reconozcan estos antígenos sean activados. En este trabajo analizamos la activación, medida como proliferación, de linfocitos expuestos a antígenos de nervio óptico y de médula espinal.

Nuestro estudio muestra que LT extraídos de ratas Wistar sin lesiones a SNC muestran una respuesta proliferativa ante homogenado de NO autólogo. Estos resultados concuerdan con estudios en los que se observa la presencia de LT reactivos a mielina en humanos sanos similares a las de individuos con esclerosis múltiple en etapas de remisión⁵⁴. Es decir, es posible encontrar LT autorreactivos que posiblemente han escapado a la selección negativa en el timo durante el desarrollo. En este estudio no podemos saber hacia que antígenos están reaccionando los LT, sin embargo podemos considerar algunas de las proteínas más abundantes en el SNC y que se ha visto que son inmunogénicas. Algunas de ellas son la glicoproteína de mielina de oligodendrocito (MOG) y ciertos epítomos de proteína proteolípida (PLP), las cuales no se expresan en el

timo⁵⁵. Si dichos péptidos no se expresan en el timo, los LT autorreactivos no serán seleccionados negativamente durante el desarrollo, saldrán hacia circulación sanguínea y serán capaces de identificar a sus péptidos específicos en cuanto las barreras anatómicas se rompan, como es el caso de una lesión de médula espinal. Aunque podría ocurrir *muerte por negligencia* – que sucede en timo cuando los timocitos entran en un proceso de apoptosis cuando su TCR es incapaz de unirse a los MHC acoplados al antígeno- estos linfocitos podrían ser seleccionados positivamente ya que son capaces de reconocer el MHC unido a un péptido que considerarían extraño.

La PBM, es una proteína abundante en el SNC y SNP, sin embargo se ha visto expresada por células del timo de ratones⁵⁶, por lo que sería más difícil que LT autorreactivos sean seleccionados positivamente durante el desarrollo en timo, aunque existe reportes de LT reactivos a PBM en ratas⁵⁷. Esto puede ser posible, debido a que al degradarse el tejido nervioso ocurre un procesamiento de las proteínas que al ser presentadas por las células presentadoras de antígenos muestren epítomos diferentes a los mostrados en timo y sean reconocidos por LT. Nuestros resultados concuerdan con estudios que se han realizado desde la década de los 80 en donde se observa que animales intactos poseen linfocitos que de manera *natural* reconocen autoantígenos⁵⁷, aunque debe señalarse que no ha habido reportes hasta el momento de LT reactivos hacia un tejido como el de nervio óptico autólogo.

Por otra parte observamos que la enucleación al nacimiento aumenta la respuesta proliferativa de los LT CD4⁺, pero no modifica la presencia de LT CD4⁺CD25⁺, extraídos de ratas adultas enucleadas, cuando éstos son expuestos a extracto de NO adulto *in vitro*. El incremento en la proliferación de LT puede deberse a que la enucleación en las primeras horas de vida despierta una respuesta inmune innata. Ésta

respuesta ha sido explorada en animales adultos y se caracteriza por la entrada y acumulación de células asesinas naturales y células fagocíticas activadas en el sitio de lesión⁴⁰, aunque la respuesta inmune hacia una lesión en SNC no se ha documentado en ratas neonatas, en ratones si se ha documentado la presencia significativa de células dendríticas en el primer día de vida, que funcionarían como células presentadoras de antígeno⁴⁴. En los primeros días de vida se puede despertar la respuesta inmune adaptativa, como se ha visto en modelos de hipoxia neonatal que indican infiltración de linfocitos⁴⁵. Por otro lado la producción limitada de IL2 por parte de un subtipo de células dendríticas en los primeros 6 días de vida, así como factores epigenéticos permiten que se dé una desviación hacia una respuesta Th2 mientras que después del sexto día de vida se observa un balance entre la respuesta Th1 y Th2⁴⁶. Cuando la administración del antígeno se da en el primer día de vida la desviación hacia una respuesta Th2 se mantiene hasta la vida adulta, esto quiere decir que si se da una segunda dosis de antígeno cuando el ratón es adulto, se observa una respuesta Th2⁴⁶. La inmunización al nacimiento genera una memoria inmunológica que favorece la proliferación de clonas específicas, y con un perfil de secreción de citocinas característico, en un segundo encuentro con el antígeno en edad adulta. En nuestro modelo, los antígenos que se liberan únicamente en los primeros seis días podrían generar una respuesta desviada hacia Th2 en un segundo encuentro. Sin embargo la degeneración del nervio óptico adulto puede ocurrir hasta los 28 días post-lesión⁴¹, y los antígenos liberados y presentados a los LT después del sexto día de vida podrían despertar una respuesta Th1 y/o Th2 dependiendo de la forma en que presenten el antígeno las células dendríticas o macrófagos.

Existen estudios que indican que la inmunización con homogenado de médula espinal disminuye su recuperación motriz, evaluada mediante la escala BBB, en caso de lesión

de médula espinal; los autores sugieren que los LT reguladores, generados gracias a la inmunización al nacer con homogenado de médula espinal, inhiben la activación de LT-PBM que mejorarían la recuperación motriz³⁷, por ello resultó fundamental determinar qué tipo de LT se activan en nuestro modelo. Nuestros resultados muestran que la proporción de LT CD4⁺ CD25⁺ extraídos de ratas enucleadas que observamos *in vitro*, es equivalente a la proporción que encontramos en las ratas controles, esto podría indicar que la enucleación al nacimiento no aumenta la cantidad de LT reguladores específicos para antígenos de nervio óptico. En el estudio arriba citado de Kipnis *et al* 2002³⁷ se evalúa la presencia de LT CD25⁺ en ratas sujetas a lesión de nervio óptico, inmunizadas con homogenado de médula espinal/IFA al nacimiento y no observan cambios en la presencia de dichas células en comparación con los controles. Nuestros resultados corresponden con los mostrados en el estudio de Kipnis 2002³⁷, aunque ellos consideran al CD25 como un marcador de activación, por lo que afirma que al inmunizar con homogenado de médula espinal se generan LT reguladores que impiden la regeneración de tejido de SNC, disminuyendo la actividad de LT autorreactivos, mientras que nosotros consideramos al CD25 como un marcador de LT reguladores, sugiriendo a la enucleación como un factor que promueve la autorreactividad en los LT sin aumentar la frecuencia de LT reguladores. Debe señalarse que el marcaje con la cadena α del receptor para IL-2 (CD25) es insuficiente para identificar LT reguladores, para estudios futuros se sugiere la identificación mediante al marcaje intracelular con Foxp3.

La nula inducción de LT reguladores en nuestro modelo podría deberse a que la enucleación desata una respuesta inmune en la que la presentación de antígenos por parte de microglia activada se da en conjunto con el coestimulador B7⁵⁸ lo cual inhibiría el desarrollo de LT reguladores y generaría LT autorreactivos potencialmente dañinos⁵⁹,

aunque en nuestro estudio no se observaron signos de autoinmunidad.

Se ha visto que LT reguladores generados por la administración de dosis bajas de antígeno tienen una reducida capacidad proliferativa en presencia del antígeno y capacidad supresora sobre LT CD4⁺ efectores^{14,15} la enucleación hubiese generado LT reguladores, la acción de éstos hubiera disminuido la proliferación de LT CD4⁺, lo cual no se observó en nuestros resultados.

Con el objeto de definir si los LT autorreactivos generados por la enucleación al nacimiento, mantienen su capacidad de respuesta proliferativa después de una segunda presentación del antígeno, como ocurre en una lesión de médula espinal, se evaluó la proliferación de LT CD4⁺ y CD4⁺CD25⁺ extraídos 7 días después de someter a una lesión de médula espinal a ratas adultas que habían sido enucleadas al nacimiento.

Nuestros resultados no reflejan diferencias significativas entre la proliferación de LT CD4⁺ o CD4⁺CD25⁺ extraídos de ratas enucleadas y los extraídos de ratas no enucleadas. La proliferación de los LT requiere de la unión de IL-2 secretada ya sea por CD o por otros LT. La señalización de IL-2 requiere la unión de la misma con las cadenas α o CD25, β y γ de su receptor. Mientras la cadena α estabiliza la unión de la interleucina, la cadena β y γ transmiten la señal hacia el medio intracelular⁶⁰.

Es posible que no nuestros niveles de CD25 no se vean aumentados puesto que la cadena α está formando un complejo con las cadenas β y γ del receptor y con la IL-2, aunque aun no esta claro si el receptor para IL-2 se expresa en la superficie celular como un heterotrímero ya ensamblado o si se necesita la unión de IL-2 con CD25 para facilitar la unión con las cadenas β y γ del receptor⁶¹.

Lo que se observa en nuestro estudio, también puede deberse a que al momento del sacrificio (7 días post-lesión) el proceso inflamatorio generado por la LME se encuentra en un estado agudo en el que existe un aumento en la producción de IL-1, IL-6 y TNF α .

por parte de microglia alcanzando su pico mas alto 12 horas después de la lesión. La unión de $TNF\alpha$ e IL1 a sus receptores inducen una respuesta inflamatoria mediante la señalización del factor nuclear κB (NF κB) el cual persiste por al menos 72h. La activación del NF κB estimula la producción de especies reactivas de oxígeno, sintasa inducible de oxido nitrico (iNOS), prostaglandinas y citocinas⁵⁰, lo que deriva en la activación de los LT que se ve reflejado en un pico en la infiltración de los mismos al 7mo día²³; todo lo anterior nos indica que los LT extraídos de ratas enucleadas y no enucleadas al 7mo día post-lesión se encuentran activados por la LME por lo que aumenta su proliferación al ser cultivados ante NO *in vitro*; y si existiera algún factor atenuante o agravante de la proliferación en las ratas enucleadas, éste se ve rebasado por la respuesta a la LME.

Los resultados que observamos en la prueba motriz de ratas enucleadas no presentan diferencias significativas entre ratas enucleadas y no enucleadas a los 30 o 60 días post-lesión de médula espinal. La recuperación de las capacidades motrices depende de muchos factores, entre ellos la secreción de neurotrofinas y citocinas en el sitio de lesión como lo indican estudios en los que se observa que después de la inyección de LT específicos para PBM un aumento en NGF, BDNF, NT3 en el tejido³² y se ha visto que dichos LT secretan más NGF, BDNF, NT3 y NT4/5 que aquellos no específicos³³. Los resultados anteriores concuerdan con resultados no publicados del laboratorio en los que se ve aumentada la producción de, NT4, BDNF y el factor de crecimiento GAP43 en tejido de ratas enucleadas sometidas a lesión de médula espinal en comparación con las controles, esto nos puede indicar que en ratas enucleadas al nacimiento, el aumento en la secreción de neurotrofinas mejora la preservación del tejido nervioso, que no se ve

reflejado en el desempeño motriz, aunque también el tipo de receptor al que se unan las neurotrofinas y su grado de maduración podría llevar a muerte o supervivencia celular⁶². Se ha visto que citocinas secretadas por LTh1 como IL12 al ser inyectadas en el sitio de lesión de médula espinal, mejoran las capacidades motrices²⁶, por el contrario, se ha visto que el TNF- α inhibe el crecimiento y ramificación de neuritas *in vitro*²⁸. se ha visto que las citocinas secretadas por LTh2 como la IL10 mejoran las capacidades motrices después de una lesión de médula espinal²⁹ mientras que el tratamiento con TGF- β , disminuye el volumen de la lesión³⁰. En nuestro estudio no vemos diferencias significativas entre ratas enucleadas y no enucleadas, sin embargo el tejido de médula espinal podría estar mejor preservado en ratas enucleadas o podría presentar regeneración sin que se vea reflejado en una mejora motriz, esto puede ocurrir porque la supervivencia de neuronas y glía en la médula espinal es un fenómeno que está influenciado por un ambiente extracelular complejo que depende de citocinas, neurotrofinas, de otras moléculas repulsoras y atrayentes que secretan oligodendrocitos y de la interacción entre células dendríticas, macrófagos microglía y los LT autorreactivos que genera la enucleación también responden a la dosis y tipo de presentación del antígeno. Cabe mencionar que la presencia conjunta, que probablemente está ocurriendo en nuestro modelo, de LT CD4⁺ y LT CD25⁺ ha mostrado ser nociva para la recuperación de lesión de médula espinal³⁷. Se ha evidenciado que la inmunización con homogenado de médula espinal de rata 12 días antes de la contusión en médula espinal, provoca una recuperación significativa en comparación con ratas control¹⁶, lo que no concuerda con nuestros resultados debido a que la administración del homogenado de médula espinal se acompaña del adyuvante CFA, por lo que despierta una respuesta inmune que los mismos autores señalan como un delicado equilibrio que depende de la concentración del adyuvante, al añadido de

que la inmunización 12 días antes de la lesión de médula espinal genera LT activados y en cantidades disponibles para responder a la lesión mientras que en nuestro estudio los LT generados por la enucleación probablemente se encuentran como LT de memoria. Los estudios de Hauben et al 2000¹⁶ muestran que al inyectar LT-PBM justo después de la lesión se ve una mejora en la recuperación motriz; asimismo, el estudio de Moalem 1999²³ muestra un aumento en la supervivencia de células ganglionares de retina al inyectar LT-PBM justo después de la lesión, nuestros resultados no son similares a los reportados por estos autores porque ellos inyectan LT activados, obtenidos de ratas adultas inmunizadas con PBM/CFA, que tendrían un perfil diferente a los generados en nuestro modelo; la aplicación de los LT en los estudios citados es inmediata mientras que en nuestro modelo se debe llevar a cabo un procesamiento del antígeno después de la lesión de médula espinal, lo que y el traslado de las células presentadoras de antígeno a los ganglios linfáticos para activar a los LT, lo cual puede llevar mas tiempo. Por otro lado en nuestro estudio no evaluamos la supervivencia de neuronas después de una lesión de médula espinal, sin embargo podría darse sin verse reflejado en una mejora funcional.

Nuestros resultados tampoco concuerdan con los de estudios en los que se ha mostrado en ratones que la inmunización con 50µg de mielina bovina purificada, 2 veces por semana durante las 3 semanas previas a hemisección de médula espinal, induce un aumento significativo en la regeneración de axones a larga distancia y en brotes del tracto corticoespinal, en comparación con otras proteínas de SNC y con los controles¹⁸, debo señalar que la inmunización del estudio citado es constante y repetida en las semanas previas a la lesión mientras que en nuestro estudio se trata de una inmunización al nacimiento, la inmunización constante del estudio citado podría generar LT reguladores, cuyo papel aun es controversial en lesiones de SNC, los autores

especulan que este tipo de inmunización se hizo como una manera de prevenir la aparición de EAE mediante la inducción de anergia, respuesta disminuida al antígeno, células supresoras o un cambio de fenotipo de Th1 a Th2. Por otro lado el tipo de lesión que utilizan, hemisección de médula espinal, consiste en un corte limpio mientras que la lesión por contusión utilizada en nuestro estudio genera una mayor área de impacto y en consecuencia una mayor área de degeneración.

Estudios de Yoles⁴⁷ mostraron que un daño al SNC provoca una respuesta inmune dependiente de LT, que disminuye la pérdida neuronal en daños subsecuentes. En dichos estudios se realizó una lesión de médula espinal a los 7, 11, 14 y 17 días previos a una lesión de NO, y se observó una supervivencia mayor que las controles en un 40% de células ganglionares de la retina. Cabe señalar que los LT que ellos encuentran en la médula espinal a los 7 días post-lesión presentan baja proliferación y expresan IL10 y GATA3 un inductor de LTh2⁴⁷, cabe señalar que en nuestro estudio no se observa una mejora significativa en la recuperación motriz, sin embargo la preservación del tejido nervioso podría estar ocurriendo aunque no se vea reflejada en el aspecto funcional, por otro lado la primera lesión que hacen en el estudio citado es llevada a cabo en los días previos a la segunda lesión por lo que los LT activados por la primera lesión están en un pico de activación y de infiltración por lo que su respuesta se da más rápidamente que en nuestro modelo. Cabe mencionar que a los 7 días post-lesión se da paralelamente a la infiltración de LT un pico expresión de TGF- β ⁵⁰, un factor capaz de contrarrestar los efectos de citocinas pro-inflamatorias, lo que permite que los LT entren a NO con el efecto anti-inflamatorio del TGF- β .

Por otro lado el tipo de lesión utilizado en los modelos afecta la recuperación motriz. nuestro estudio coincide con el acercamiento que Jones et al 2004³⁴ hacen en un modelo de contusión moderada con inyección 1h post-lesión de LT-PBM sin encontrar

diferencias significativas con los controles en la recuperación motriz; sin embargo si la contusión de médula espinal es severa, la inyección de LT-PBM disminuye la recuperación³⁴, los autores afirman que la patogenicidad de los LT que inyectaron aumenta con la severidad de la lesión de médula espinal que se leve a cabo, cabe mencionar que los LT-PBM fueron generados por la inmunización de ratas Lewis con PBM en conjunto con el adyuvante CFA. Otro estudio hecho en el mismo año por Hauben et al 2000²⁵ muestra que el mismo protocolo de inmunización pasiva con LT-PBM mejora el desempeño motriz en caso de contusión severa mientras que no hay diferencias significativas con los controles en caso de sección completa de médula espinal, al respecto los autores opinan que el papel de los LT implica el “rescate” de neuronas en el caso de contusión por lo que en caso de sección completa no se ve una mejora motriz puesto que no hay neuronas que rescatar²⁵.

Existen estudios en los que se ha visto que la inmunización con PBM administrado con adyuvante completo de Freund (CFA) 7 días antes de una lesión al nervio facial disminuye en un $\approx 75\%$ la supervivencia de neuronas motoras del nervio facial, sin embargo al realizar la lesión 21 días post-inmunización la supervivencia de neuronas motoras aumenta en los inmunizados con PBM⁶³, aunque el estudio citado se lleva a cabo en un modelo de daño al sistema nervioso periférico, cuyas características de regeneración son diferentes a las del SNC, podemos ver que la supervivencia de las neuronas depende de la disponibilidad y grado de activación de los LT activados con PBM que disminuye a medida que se distancia la inmunización y la lesión.

Conclusión

Nuestro estudio indica que la enucleación al nacimiento incrementa la reactividad de los LT ante homogenado de nervio óptico *in vitro*, lo que podría sugerir que se generan poblaciones de LT CD4⁺ CD25⁻ autorreactivos en dichas ratas y que éstas poblaciones adquieren un perfil activado al unirse a su antígeno específico.

La lesión de médula espinal en etapas agudas anula el efecto de la enucleación sobre la proliferación de los LT ante antígenos de SNC, lo que se puede deber a que la lesión medular despierta una respuesta inmune intensa que afecta la activación de los LT a nivel sistémico. La enucleación no incide positiva o negativamente sobre la lesión de médula espinal.

Bibliografía

- 1 Abbas AK, Lichtman AH. (2007) Cellular and molecular immunology. 6th Edition. Saunders an imprint of Elsevier science.
- 2 Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Kuby Immunology. 4th Edition. WH Freeman and Company New York.
- 3 Takahama Y. (2006) Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol.* 6(2):127-35
- 4 Hogquist KA, Baldwin A, Jameson SC. (2005) Central Tolerance: Learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol.* 5, 772-82
- 5 Anderton SM, Wraith DC. (2002) Selection and fine-tuning of the autoimmune Tcell repertoire. *Nat Rev Immunol.* 2, 487-98
- 6 Ohashi PS.(2002) T-cell signalling and autoimmunity: molecular mechanisms of disease. *Nat Rev Immunol* 14, 744-59
- 7 Sell S and Max EE. Immunology, immunopathology, and immunity. 6th Edition.2001.
- 8 Kaiko GE, Horvat JC, Beagle KW, Hansbro PM. (2007) Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?. *Immunology.* 123, 326-338
- 9 Weaver, CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavielli M y Murphy K. (2006) Th17: An effector CD4 Tcell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 24, 677-688
- 10 Walker LS, Chodos A, Eggena M, Dooms H, Abbas HK. (2003) Antigen-dependent proliferation of CD4 CD25 regulatory T cells in vivo. *J. Exp. Med.* 198, 249–258
- 11 Sakaguchi S. (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6, 345-352
- 12 Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. (2005) Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol.* 6, 1219-27
- 13 Vignali DA, Collison LW and Workman CJ. (2008) How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 8, 523-533
- 14 Apostolou I, von Boehmer H. (2004) In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells.*J Exp Med.*199,1401-8.
- 15 Pape KA, Merica R, Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK.(1998) Direct evidence that functionally impaired CD4⁺ T cells persist in vivo following induction of peripheral tolerance. *J Immunol.*160, 4719-29
- 16 Hauben E, Agranov E, Gothilf A, Nevo U, Cohen A, Smirnov I, Steinman L, Schwartz M. (2001) Posttraumatic therapeutic vaccination with modified myelin self-antigen prevents complete paralysis while avoiding autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* 108:591-599
- 17 Martiñón S, García E, Flores N, Gonzalez I, Ortega T, Buenrostro M, Reyes R, Fernandez –Presas AM, Guizar-Sahagún G, Correa D, Ibarra A. (2007) Vaccination with a neural –derived peptide plus administration of glutathione improves the performance of paraplegic rats. *Eur J Neurosci.* 26 (2) 403-412
- 18 Sicotte M, Tsatas O, Jeong SY, Cai CQ, He Z, David S. (2003) Immunization with myelin or recombinant Nogo-66/MAG in alum promotes axon regeneration and sprouting after corticospinal tract lesions in the spinal cord. *Mol Cell Neurosci.* 23(2):251-63

- 19 Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. (2006) Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci.* 9, 268-275
- 20 Wolf SA, Steiner B, Akpinarli A, Kammertoens T, Nassenstein C, Braun A, Blankenstein T, Kempermann G. (2009) CD4-positive T lymphocytes provide a neuroimmunological link in the control of adult hippocampal neurogenesis. *J Immunol.* 182, 3979-84
- 21 Shechter R, Ziv Y, Schwartz M. (2007) New GABAergic interneurons supported by myelin-specific T cells are formed in intact adult spinal cord. *Stem Cells* 25, 2277-2282
- 22 Ziv Y, Avidan H, Pluchino S, Martino G, Schwartz M. (2006) Synergy between immune cells and adult neural stem/progenitor cells promotes functional recovery from spinal cord injury. *PNAS.* 103, 13174-9
- 23 Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen I.R., Schwartz M., (1999) Autoimmune T-cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med.* 5, 49-55
- 24 Moalem G, Yoles E, Leibowitz-Amit R, Muller-Gilgor S, Mor F, Cohen I R, Schwartz M. (2000) Autoimmune T cells retard the loss of function in injured rat optic nerves. *J Neuroimmunol* 106:189 -197
- 25 Hauben E, Butovsky O, Nevo U, Yoles E, Moalem G, Agranov E, Mor F, Leibowitz-Amit R, Pevsner E, Akselrod S, Neeman M, Cohen IR, Schwartz M. (2000) Passive or active immunization with Myelin Basic Protein Promotes recovery from spinal cord contusion. *Jour Neurosci.* 20, 6421-6430
- 26 Yaguchi M, Ohta S, Toyama Y, Kawakami Y, Toda M. (2008) Functional recovery after spinal cord injury in mice through activation of microglia and dendritic cells after IL-12 administration. *Jour Neurosci Res.* 86, 1972-1980
- 27 Oshima T, Lee S, Sato A, Oda S, Hirasawa H, Yamashita T. (2009) TNF- α contributes to axonal sprouting and functional recovery following traumatic brain injury. *Brain Res.* 1290, 102-110
- 28 Neumann H, Schwigreiter R, Yamashita T, Rosenkranz K, Wekerle H, Barde YA. (2002) Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a Rho-dependent mechanism. *Jour Neurosci* 22, 854-862
- 29 Zhou Z, Peng X, Insolera R, Fink DJ, Mata M. (2009) IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury. *Exp Neurol* 220, 183-190
- 30 Tyor WR, Avgeropoulos N, Ohlandt G, Hogan EL. (2002) Treatment of spinal cord impact injury in the rat with transforming growth factor-beta. *J Neurol Sci.* 200, 33-41
- 31 Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M. (2006) Microglia activated by IL-4 or IFN γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci.* 31, 149-160
- 32 Barouch R, Schwartz M. Autoreactive T cells induce neurotrophin production by immune and neural cells in injured rat optic nerve: implications for protective autoimmunity. (2002) *FASEB J.* 16, 1304-6.
- 33 Moalem G, Gdalyahu A, Shani Y, Otten U, Lazarovici P, Cohen IR and Schwartz M. (2000) Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 15, 331-345
- 34 Jones TB, Ankeny DP, Guan Z, McGaughy V, Fisher LC, Basso DM, Popovich PG. (2004) Passive or active immunization with Myelin Basic Protein impairs

- neurological function and exacerbates neuropathology after spinal cord injury in rats. *The Jour Neurosci.* 24,3752-61
- 35 Jones BT, Baso DM, Sodhi A, Pan JZ, Hart RP, MacCallum RC, Lee S, Whitacre CC, Popovich PG. (2002) Pathological CNS autoimmune disease triggered by traumatic spinal cord injury: implications for autoimmune vaccine therapy. *Jour Neurosci* 22, 2690-2700
- 36 Fee D, Crumbaugh A, Jacques T, Herdrich B, Sewell D, Auerbach D, Piaskowski S, Hart MN, Sandor M, Fabry Z. (2003) Activated/effector CD4⁺⁺ T cells exacerbate acute damage in the central nervous system following traumatic injury. *J Neuroimmunol.* 136, 54-66
- 37 Kipnis J, Mizrahi T, Haube E, Shaked I, Shevach E, Schwartz M. (2002) Neuroprotective autoimmunity: Naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *PNAS* 99, 15620-15625
- 38 Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S, Giese T, Veltkamp R. (2009) Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med.* 15, 192-9
- 39 Akirav EM, Bergman C, Hill M, Ruddle NH. (2009) Depletion of CD4(+)CD25(+) T cells exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis induced by mouse, but not rat, antigens. *J Neurosci Res.* 87, 3511-19
- 40 Shaked I, Porat I, Gersner I, Kipnis I, Schwartz M. (2004) Early activation of microglia as antigen-presenting cells correlates with T cell-mediated protection and repair of the injured central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 146, 84-93.
- 41 Fitzgerald M, Bartlett CA, Evill L, Rodger J, Harvey AR, Dunlop SA. (2009) Secondary degeneration of the optic nerve following partial transection: the benefits of lomerizine. *Exp Neurol.* 216(1):219-30.
- 42 Ulvestad E, Williams K, Bjerkvig R, Tiekotter K, Antel J, Matre R. (1994) Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol.* 56, 732-40
- 43 Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. (2007) Rat retinal microglial cells under normal conditions, after optic nerve section, and after optic nerve section and intravitreal injection of trophic factors or macrophage inhibitory factor. *J Comp Neurol.* 501, 866-78
- 44 Lee HH, Hoeman CM, Hardaway JC, Guloglu FB, Ellis JS, Jain R, Divekar R, Tartar DM, Haymaker CL, Zaghoulani H. (2008) Delayed maturation of an IL-12-producing dendritic cell subset explain the early Th2 bias in neonatal immunity. *J Exp Med* 205, 2269-2280
- 45 Pimentel VC, Bellé LP, Pinheiro FV, De Bona KS, Da Luz SC, Moretto MB. (2009) Adenosine deaminase activity, lipid peroxidation and astrocyte responses in the cerebral cortex of rats after neonatal hypoxia ischemia. *Int J Dev Neurosci.* 27, 87-62
- 46 Zaghoulani H, Hoemann CM, Adkins B. (2009) Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trend. Immunol.* 30, 585-591
- 47 Yoles E, Hauben E, Palgi O, Agranov E, Gotilf A, Cohen A, Kuchroo V, Cohen IR, Weiner H, Schwartz M. (2001) Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *Jour Neurosci.* 21 (11): 3740-3748
- 48 Hauben E, Nevo U, Yoles E, Moalem G, Agranov E, Mor F, Akselrod S, Neeman M, Cohen IR, Schwartz M. (2000) Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury. *The Lancet.* 354, 286-287
- 49 Pardini CM. (1998) Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal. Tesis doctoral Secretaría de Salubridad y Asistencia, México.

- 50 Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S. (2004) Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis.* 15(3):415-36
- 51 Bronchti G, Schonenberger N, Welker E, Van der Loos H. (1992) Barrelied expansion after neonatal eye removal in mice. *Neuroreport.* 3, 489-92.
- 52 Manual de Becton Dickinson
<http://www.bdbiosciences.com/instruments/facscalibur/index.jsp>
- 53 Dezawa M, Adachi-Usami E. (2000) Role of Schwann cells in retinal ganglion cell axon regeneration. *Prog Retin Eye Res* 19, 171-204
- 54 Tejada-Simon MV, Zang YC, Yang D, Hong J, Li S, Singh RA, Van den Berg-Loonen E, Killian JM, Rivera VM, Zhang JZ. (2000) Aberrant T cell response to myelin antigens during clinical exacerbation in patients with multiple sclerosis. *Int Immunol.* 12, 1641-50
- 55 Bruno R, Sabater L, Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Escudero D, Martínez-Cáceres E, Pujol-Borrel R. (2002) Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus. *Eur. J. Immunol.* 32, 2737-2747
- 56 Fritz RB, Zhao ML. (1996) Thymic expression of myelin basic protein (MBP). Activation of MBP-specific T cells by thymic cells in the absence of exogenous MBP. *J Immunol.* 157, 5249-53
- 57 Schluesener HJ, Wekerle H. (1985) Autoaggressive T lymphocyte lines recognizing the encephalitogenic region of myelin basic protein : in vitro selection from unprimed rat T lymphocytes populations. *J Immunol.* 135, 3128-3133
- 58 Bohatschek M, Kloss CU, Pfeffer K, Bluethmann H, Raivich G. (2004) B7.2 on activated and phagocytic microglia in the facial axotomy model: regulation by interleukin-1 receptor type 1, tumor necrosis factor receptor 1 and 2 and endotoxin. *J Neuroimmunol.* 156, 132-145
- 59 Zhentner SP, Brisebois M, Tran E, Owens T, Fournier S. (2003) Constitutive expression of a costimulatory ligand on antigen-presenting cells in the nervous system drives demyelinating disease. *FASEB J.* 17, 1910-2
- 60 Burchill MA, Yang J, Van KB, Farrar MA. (2007) Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunol Lett.* 114, 1-8
- 61 Bodnar A, Nizsaloczki E, Mocsar G, Szaloki N, Waldmann TA, Damjanovich S, Vamosi G. (2008) A biophysical approach to IL.2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions. *Immunol Lett.* 116, 117-125
- 62 Lu B, Pang PT, Woo NH. (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 6, 603-14.
- 63 Ankeny DP, Popovich PG. (2007) Central nervous system and non-central nervous system antigen vaccines exacerbate neuropathology caused by nerve injury. *Eur Jour Neuroscience.* 25, 2053-2064