



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL INMUNOLÓGICO
DE RATA CIEGA CON LESIÓN EN MÉDULA
ESPINAL**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

VERÓNICA BELÉN BARAJAS LÓPEZ



DIRECTOR DE TESIS:

**MIC.IND. ANA CECILIA RIVAS
CAICEDO**

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 Antonio y Guadalupe, por su infinito amor y comprensión.

A Antonio y Guadalupe, por su paciencia, apoyo y compañía.

A mis profesores y amigos quienes contribuyeron con su orientación y entusiasmo al desarrollo de este trabajo.

A mi tutora Ana Rivas, al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, a Verónica Rodríguez Mata y a mis sinodales, por ser una guía en la realización de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias y a la UNAM

Gracias

“Por mi raza hablará el espíritu.

Se significa en este lema la convicción de que la raza nuestra elaborará una cultura de tendencias nuevas, de esencia espiritual y libérrima”.

Maestro de América

Tabla de contenidos

1. Resumen
2. Introducción
3. Antecedentes
 - 3.1 Médula espinal
 - 3.2 Sistema inmune
 - 3.3 Lesión en médula espinal
 - 3.4 Respuesta inmune y LME
 - 3.5 Respuesta inflamatoria
 - 3.6 Respuesta Th1 y Th2
 - 3.7 Regeneración y neuroprotección del SNC
4. Justificación
5. Pregunta
6. Hipótesis
7. Objetivo
8. Materiales y métodos
9. Resultados
10. Discusión
11. Conclusiones
12. Bibliografía

Resumen

Debido a la limitada capacidad del tejido nervioso para regenerarse tras un daño, las lesiones en médula espinal (LME) no tienen actualmente un tratamiento efectivo¹³, sin embargo, varios trabajos experimentales muestran que después de una lesión en sistema nervioso central (SNC) la regulación en la respuesta inmune inflamatoria puede promover neuroprotección, y bajo ciertas condiciones regeneración. En la LME existe infiltración y acumulación de linfocitos T en el sitio de lesión, que además de ser reactivos, a proteínas derivadas de mielina que se liberan del propio tejido nervioso lesionado, participan en mejorar la preservación del tejido dañado en una lesión posterior. Este potencial para participar en la recuperación del daño depende del tipo de linfocitos T que se diferencien y la producción local de citocinas. En particular los linfocitos “T helper” (Th) son esenciales en regular esta respuesta inmune y de inflamación cuando se diferencian en linfocitos Th1, considerados pro-inflamatorios ó linfocitos Th2 que son anti-inflamatorios. Esta es la base del presente trabajo, donde se determina el perfil inmunológico de ratas con LME que previamente fueron enucleadas. La enucleación es el modo en el cual nosotros iniciamos una exposición temprana a auto-antígenos del SNC por medio de la degeneración del nervio óptico con la idea de generar una población de linfocitos que respondan ante una segunda lesión que también expone antígenos propios. Nuestros resultados muestran que la enucleación al nacimiento modifica la expresión de citocinas 7 días después de una contusión en médula espinal (ME) promoviendo un perfil inmunológico pro-inflamatorio en comparación con animales que no fueron enucleados; sumado a esto, se realizó una tinción Kluver Barrera para determinar el tipo de células predominantes en el sitio de lesión lo cual también está asociado a la expresión de citocinas y la degeneración del tejido nervioso, obteniendo como resultado una acumulación mayor de macrófagos en el tejido de ratas enucleadas que sin enuclear, sin embargo no se presenta una mejoría en la actividad motriz de ratas lesionadas lo que significa que la enucleación si modifica el perfil inmunológico mas no interfiere en la recuperación funcional del tejido nervioso después de la LME.

Introducción

En la LME se origina un proceso de destrucción del tejido a causa de una lesión primaria. Este proceso es conocido como daño secundario, que histopatológicamente es caracterizado por muerte neuronal, infiltración de células que causan inflamación como linfocitos T/macrófagos y desmielinización en el sitio de lesión, estos procesos participan de manera importante en inhibir la regeneración neuronal y la conductividad nerviosa del tejido³⁵.

Estos linfocitos T que se infiltran al sitio de lesión son reactivos a proteínas derivadas de la ruptura de la vaina de mielina como la proteína básica de mielina (PBM) y se encuentran en todos los humanos¹⁰. Normalmente estas células se mantienen en un estado no patogénico o inactivo por mecanismos de tolerancia periférica mientras que en enfermedades como la Esclerosis Múltiple la activación de estas células causa reacciones autoinmunes que exacerban el daño. De igual modo, en una lesión cerebral o de médula espinal también se activan linfocitos T auto-reactivos a proteínas del SNC que son capaces de causar inflamación descontrolada y llevar a una neuropatología crónica^{9,37}, por ello el equipo de Schwartz propuso una hipótesis, sugiriendo que la activación de este tipo de linfocitos T reactivos a PBM es una respuesta fisiológica a una enfermedad o lesión en el SNC. Esta respuesta es requerida para la protección y reparación de la lesión cuando se mantiene bajo control, sin embargo como la frecuencia de estos linfocitos activados es baja para observar una neuroprotección con significado biológico³⁸ se requiere una modulación que se puede obtener mediante una inmunización.

Usando modelos experimentales y clínicos de la contusión en médula espinal se ha mostrado que si los linfocitos T auto-reactivos que se activan después de la lesión son aislados de una rata en los primeros 7 días después de la contusión e inyectados en ratas sin ningún tipo de lesión, estas células causan parálisis media y transitoria así como neuroinflamación⁹, además de este deterioro funcional existe un incremento en la expresión del ARNm de citocinas pro-inflamatorias en el tejido medular, por lo que se diseñaron modelos en donde una lesión en SNC permitiría una exposición previa a antígenos neurales que puede resultar benéfica ante una segunda lesión en un sitio

diferente del SNC. Así, surgió el concepto de “Autorreactividad Protectora” que fue establecida en modelos de ratas Lewis con lesión en nervio óptico (LNO) y médula espinal⁷, donde la proliferación de células T reactivas a PBM por una inmunización activa (inyección de la PBM) o pasiva (inyección de las células T reactivas a PBM) mejora la recuperación funcional y reduce la pérdida de células neuronales ante una segunda lesión²⁰ en SNC.

Por otra parte, la microglia y los astrocitos representan dos poblaciones celulares intra-parenquimales que también son altamente reactivas en el SNC. Al responder a infecciones y estímulos inflamatorios, la microglia, puede madurar en macrófagos que secretan citocinas anti-inflamatorias o pro-inflamatorias y puede adquirir una función de célula presentadora de antígenos y participar en la re-estimulación de células T.

En base a esto, nuestro modelo plantea que una lesión en nervio óptico actuaría como una forma de inmunomodulación que ante una LME posterior daría lugar al inicio de una respuesta inmune caracterizada por un perfil de citocinas que sería útil para limitar el daño medular al regular el proceso inflamatorio y dar lugar a una recuperación motriz. Así mismo analizamos la presencia de macrófagos justo en el lugar de la lesión por estar involucrados en conservar la integridad del tejido nervioso. Determinar este perfil inmunológico es esencial para conocer si la inmunomodulación en forma de enucleación al nacimiento proporciona una regulación benéfica de la respuesta pro-inflamatoria (Th1) y anti-inflamatoria (Th2) después de una lesión en médula espinal.

Antecedentes

3.1 Médula espinal

Anatomía

La médula espinal conecta al cerebro con el Sistema Nervioso Periférico (SNP). Está localizada dentro del canal óseo vertebral, el cual provee protección estructural y se sostiene por las raíces espinales, los ligamentos denticulados y las hebras de la pía madre. Los segmentos vertebrales se agrupan en cuatro niveles: cervical (8 segmentos), torácico (12 segmentos), lumbar (5 segmentos) y sacral (5 segmentos)¹.

La médula espinal y las raíces espinales están cubiertas por tres capas de meninges: la dura, aracnoides y la pía madre además del fluido cerebroespinal que rodea a la médula en el espacio subaracnoideo. La pía madre es delgada y se puede identificar como ligamentos denticulados a lo largo de la médula. Los ligamentos denticulados abarcan el espacio entre la superficie de la médula y la dura madre y su función es la protección mecánica de la médula².

El diámetro de la médula espinal no es uniforme en toda su extensión, en los niveles cervicales y lumbares es amplia por el incremento de conexiones sensoriales-motoras, también el tamaño del canal vertebral cambia en diferentes niveles vertebrales, disminuyendo del nivel cervical-lumbar al torácico y a pesar de no estar segmentada la distribución de la raíz espinal origina una segregación funcional².

Materia gris y blanca

La médula espinal esta dividida en dos regiones: la materia gris, al centro, tiene una forma reminiscente de alas de mariposa y la materia blanca rodea a la primera. La cantidad de cada una varía en diferentes niveles de la médula espinal. La materia gris contiene cuerpos celulares y terminales aferentes de la periferia y se divide en regiones: el asta dorsal, asociada con la percepción sensorial y el asta ventral, asociada a las funciones motrices. En el nivel torácico y sacral, estas dos regiones se separan por una zona intermedia que contiene los cuerpos celulares de las fibras pre-ganglionares simpáticas y parasimpáticas¹.

La cantidad de materia blanca decrece a lo largo de la médula en sentido rostro-caudal, en esta se encuentran esencialmente todos los axones que van al resto del cuerpo, los cuales al estar rodeados de mielina, proporcionan a la médula el color blanquecino².

3.2 Sistema Inmune

El sistema inmune (SI) proporciona dos tipos de defensa: aquella que no es específica a un antígeno en particular conocida como inmunidad innata y la inmunidad adaptativa que muestra especificidad relacionada al reconocimiento antigénico y su respuesta.

Inmunidad innata

La inmunidad innata brinda al huésped la primera línea de defensa contra productos microbianos. Sus mecanismos ya existen antes de producirse la exposición correspondiente, sus componentes son: barreras epiteliales, leucocitos (neutrófilos, macrófagos y linfocitos asesinos naturales "NK", entre otras células), proteínas efectoras circulantes (del complemento y colectinas) y citocinas. En general, los macrófagos y neutrófilos cuentan con funciones que incluyen la destrucción de patógenos y la fagocitosis de desechos celulares. Aparte de los productos microbianos, la inmunidad innata también puede reconocer células agredidas o lesionadas, ya que expresan moléculas que no aparecen en células sanas⁴⁶.

Las moléculas producidas durante las respuestas de la inmunidad innata estimulan la inmunidad adaptativa e influyen sobre la naturaleza de su respuesta. Los macrófagos activados por los antígenos, sintetizan co-estimuladores que favorecen la activación de los linfocitos T mientras que los fragmentos del complemento, generados por una vía alternativa, aportan una segunda señal para la activación de los linfocitos B y la producción de anticuerpos.

Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa presenta especificidad, diversidad, memoria, reconocimiento a antígenos extraños y propios e involucra la regulación de citocinas y quimiocinas con el subsecuente reclutamiento de linfocitos. La inmunidad adaptativa se clasifica en respuesta celular (RC) y humoral (RH); la RH es una línea de defensa mediada por

linfocitos B los cuales liberan anticuerpos. La RC es mediada por linfocitos T ya sean CD8⁺, citotóxicos ó CD4⁺. Las células T CD4⁺ son clasificadas en subgrupos, según las citocinas que secretan al activarse: Th1, Th2, Th3, Th17, foliculares (Tfh) y reguladoras (Treg)³. Las células Th1 y Th2 fueron primeramente clonadas e identificadas en el ratón por Mosmann y Coffman y después en humanos por el laboratorio de Romagnani⁴.

La respuesta inmune ante un antígeno normalmente involucra ambos componentes, alcanzando primero el pico de expresión la RC y después la RH²⁴. Los componentes celulares y humorales de la respuesta inmune son regulados por citocinas.

Citocinas

Las citocinas son proteínas con acción pleiotropica que regulan diversas funciones celulares (proliferación, supervivencia, maduración, quimiotaxis) y son importantes para el desarrollo y funcionamiento del sistema inmune (respuesta inmune innata, adaptativa e inflamación). Son producidas principalmente por células hematopoyéticas, linfocitos-monocitos, macrófagos y por células somáticas⁵, incluyendo células del SNC como neuronas y glía, sin embargo la síntesis en este sitio tanto de citocinas como de sus receptores es en niveles bajos⁶.

Las citocinas se encuentran clasificadas como factores de crecimiento, interferones (IFN), quimiocinas, factor de necrosis tumoral (del inglés tumor necrosis factor, TNF) e interleucinas (IL). En la inmunidad innata, las principales fuentes de citocinas son los macrófagos, los neutrófilos y los linfocitos NK aunque también son producidas por células endoteliales y por algunas células epiteliales; las citocinas de la inmunidad innata como el IFN- α ó el IFN- β pueden controlar infecciones víricas, otras intervienen en la inflamación como el TNF, varias quimiocinas e IL-1 también estimulan la activación/proliferación de linfocitos NK como la IL-15 e IL-2 y el IFN- γ aumenta la actividad de los macrófagos mientras que la IL-10 la restringen además se conoce que la IL-6 puede afectar directamente las funciones electrofisiológicas de las neuronas y la glía al reducir la excitabilidad neuronal inactivando la corriente de Na⁺⁷.

En la inmunidad adaptativa las citocinas producidas por células Th1 como IL-2, IFN- γ , IL-12 e IL-15 promueven el desarrollo de una RC mientras que células Th2 incrementan

predominantemente una RH, al producir citocinas que aumentan la síntesis de anticuerpos, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Las citocinas IL-12 e IFN- γ no solo aumentan una RC sino también suprimen la producción de IL-4 e IL-10 que a su vez regulan positivamente la RH, esto es que la respuesta Th1 y Th2 se regulan negativamente entre ellas como se muestra en la figura 1⁴.

Ratones recién nacidos y humanos menores de 12 meses de edad sanos, presentan disminuida la RC pero poseen una predominante RH y probablemente tienen un estado dominante Th2, sin embargo, en etapas posteriores el estado Th1 comienza a ser dominante y persiste hasta una etapa media o tardía de la vida en ratones y humanos, donde puede surgir de nuevo un perfil de citocinas tipo Th2. Este cambio en el perfil de citocinas del tipo 1 al tipo 2 se observa claramente en ratones durante su segundo año de vida⁴.

En individuos que presentan lesión en el SNC las citocinas aumentan su expresión ya que participan en la respuesta inflamatoria al regular la entrada de las células del sistema inmune al SNC, direccionar las funciones de las células inmunes dentro del tejido así como mediar su efecto directo durante el proceso de la respuesta inmune. Es decir, las citocinas están directamente involucradas en el proceso que se establece después de una lesión en el SNC ya que inducen el aumento del daño o favorecen la recuperación al regular el proceso de inflamación y con ello la viabilidad del tejido⁸.

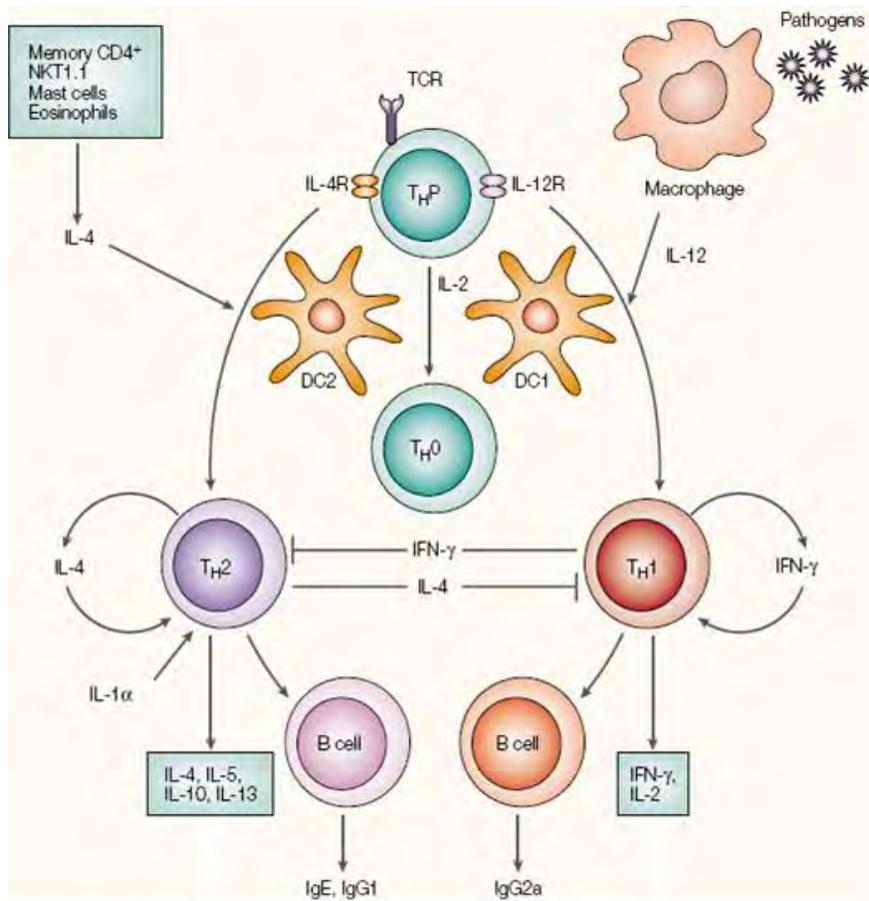


Fig. 1. Esquema que representa la inducción y regulación de las células Th1 y Th2. La misma célula Th-precursora (ThP) puede diferenciarse en células T-helper (Th)1, Th2 o Th0 dependiendo principalmente del micro-ambiente provisto por las citocinas generadas exógenamente o desde las células dendríticas (DC1 o DC2). La IL-12 promueve las células Th1 mientras que la IL-4 genera Th2. Las células Th0 se diferencian bajo condiciones neutrales con IL-2. El IFN- γ e IL-4, producidos por Th1 y Th2, respectivamente, también pueden actuar como factores de crecimiento autocrinos, así como factores inhibidores del sub-grupo opuesto. Las células Th1 promueven la síntesis de IgG2a por las células B a través del IFN- γ , mientras que las células Th2 inducen en las células B la producción de IgE e IgG1 mediante la producción de IL-4. Funcionalmente las células Th1 median la destrucción de patógenos intracelulares y la autoinmunidad en órganos específicos por la activación de las células blanco mediante el IFN- γ . Las células Th2 son anti-helmínticas e incrementan las reacciones alérgicas a través de la IL-4, IL-5 e IgE. Tomado de Liew²⁹.

3.3 Lesión de médula espinal

Las víctimas de una lesión en médula espinal sufren incapacidad a lo largo de la vida debido a que en el presente no hay ningún tratamiento o terapia aceptado para reparar la lesión o estimular la poca capacidad regenerativa del tejido medular¹. Las LME son causadas por accidentes automovilísticos, deportivos, relacionados al trabajo o al hogar, así como enfermedades degenerativas, infecciones, desordenes metabólicos o vasculares y tumores. El mayor porcentaje de lesiones en ME se deben a fracturas o dislocaciones de la columna vertebral que provocan compresión con flexión, comúnmente a nivel torácico e hiper-extensión a nivel cervical⁹.

Las consecuencias de una LME dependen de la severidad y el sitio exacto en que ocurrió la lesión: lesiones a nivel cervical producen cuadraplejía, daño en la función de órganos pélvicos y pérdida de la función sensorial en brazos, cuerpo y piernas, en niveles torácico o lumbar, pueden causar paraplejía y daño limitado en extremidades superiores.

Los modelos animales usados en el estudio de la fisiopatología y la pérdida motriz relacionadas con LME son variables y reflejan solo una parte de los tipos de lesión que son observados en casos clínicos¹⁰. Los modelos experimentales más comunes en roedores son la contusión y la compresión que aunque presentan ligeras diferencias en la cascada de eventos ambos presentan similitudes anatómicas, fisiológicas y funcionales con lo observado en casos clínicos⁹. El modelo de contusión induce deformación mecánica instantánea de la médula espinal al dejar caer un peso con asistencia computarizada y el modelo de compresión induce una lesión, al usar un clip que causa aneurisma en varios grados.

Los eventos de una LME se dividen principalmente en dos: daño primario y daño secundario¹⁰.

Daño primario

El daño primario es la destrucción local del tejido medular por una lesión mecánica directa, esta fuerza mecánica rompe las membranas neuronales y endoteliales,

originando una zona hemorrágica de necrosis que predominantemente se localiza en la materia gris debido a la consistencia suave de esta región y a su naturaleza altamente vascular. La contusión afecta por deformación a las células, esta distorsión produce la ruptura de la vaina de mielina y con ello la desmielinización y el daño axonal¹⁰. La lesión primaria causa una onda progresiva de lesión, conocida como daño secundario, el cual activa mecanismos patofisiológicamente nocivos que exacerban la LME.

Daño secundario

Esta cascada de eventos incluye daño vascular, isquemia/hipoxia, liberación de radicales libres, necrosis, excitotoxicidad, pérdida de la regulación iónica e inflamación, lo cual promueve apoptosis glial y neuronal³⁹ así como “degeneración Walleriana” que describe un proceso que comienza con la separación-fragmentación de las fibras de mielina seguido de la acumulación y fagocitosis de los restos celulares del tracto axonal tanto ascendente como descendente a la lesión primaria.

La degeneración Walleriana ha sido estudiada en felinos usando un modelo de enucleación debido a que la mielina mantiene una estructura y composición química intacta después de la enucleación. La pérdida axonal y desmielinización del nervio óptico en gatos es un proceso lento por que la arteria retinal esta fuera del nervio óptico, así la lesión no causa la invasión de macrófagos en circulación que aceleran la fagocitosis. Esta degeneración también afecta a los oligodendrocitos que dependen de los axones a los que están asociados, aunque se ha mostrado que estas células continúan teniendo un contacto celular con la vaina de mielina hasta 60 días después de la enucleación que es cuando inician con la remoción de su propia mielina, la separación del axon (autofagia) y retracción de su propia membrana celular¹¹.

En la LME el daño secundario también moviliza células a la lesión primaria como los neutrófilos en circulación que liberan sustancias neurotóxicas, la microglia y los astrocitos que al iniciar la respuesta inflamatoria liberan citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas que reclutan a otras células del SI. Al iniciarse esta gliosis reactiva se eliminan desechos celulares y se limita el sitio del daño primario para prevenir que la lesión secundaria se extienda, formando así una “cicatriz glial” cuyos primeros

componentes son desechos de mielina y oligodendrocitos que sobrevivieron a la lesión primaria. Estos componentes son seguidos por la activación y migración de microglia/macrófagos, así como por liberación de moléculas asociadas a mielina, entre ellas: glicoproteínas asociadas a mielina (MAG), Nogo-A, glicoproteína mielina-oligodendrocitos (OMgp), los proteoglicanos de condroitin-sulfato (CSPGs) y la proteína básica de mielina (PBM) que es un componente de la mielina altamente inmunogénico y encefalotigénico en su capacidad para activar la respuesta de las células T y así inducir inflamación en el SNC¹⁰.

En la última etapa de formación la cicatriz existe una invasión y proliferación de astrocitos, los cuales restablecen el microambiente regulando la concentración iónica y la secreción de factores tróficos y citocinas¹⁰. Esta deposición masiva de moléculas y células junto con la estructura rígida de una cicatriz, forman una barrera mecánica y molecular que impide el re-crecimiento axonal y neuronal¹².

La incapacidad de los axones dañados de regenerarse y reconectar con sus blancos contribuye al déficit sensorial y motriz que se observa en casos clínicos y experimentales de LME.

3.4 Respuesta inmune y LME

El SNC y el SI interaccionan durante el desarrollo pero en el SNC maduro su interacción se restringe principalmente a casos de infección, lesión traumática³³ o bien las células T tienden a migrar a áreas del SNC bajo cambios degenerativos⁶ aunque células T específicas a antígenos que no son expresados en el SNC se han encontrado en este tejido, indicando que el reconocimiento antigénico no es esencial para que las células T entren al SNC. Además, se ha observado que los linfocitos activados CD4⁺, cruzan la barrera hematoencefálica intacta, es decir, en ausencia de alguna lesión, reteniendo la capacidad de iniciar una respuesta inmune local o regresar a los órganos linfoides secundarios²¹.

Hay evidencia de que los linfocitos T presentes en bajas cantidades en una LME, progresivamente aumentan su acumulación en el sitio de la lesión, coincidiendo con la activación de la microglia y la migración de macrófagos periféricos al sitio afectado

durante la primera semana después de la lesión²². Esta evidencia apoya la idea de que la ruptura de la vaina de mielina, y los axones lesionados permiten la exposición de las proteínas derivadas de mielina¹² las cuales actúan como antígenos para las células T. Estos antígenos son presentados por la microglia residente o los macrófagos infiltrados, lo cual permite el aumento en la producción de citocinas ya sea del tipo pro-inflamatorio o anti-inflamatorio. La mayoría de las células CD4⁺ ejercen su función como células Th, de estas últimas, en la LME, una gran parte son activadas por macrófagos, mientras que aquellas que no reciben estimulación por el antígeno unido al CPH (del inglés Major Histocompatibility Complex, MHC II) o por las moléculas co-estimuladoras caen en anergia⁵¹.

Esta asociación de células T que responden a antígenos propios durante la LME, se basa en estudios que reportan un incremento en el número de células T reactivas a PBM justo en el lugar de lesión en ratas Lewis con lesión unilateral de nervio óptico, además se observó que al administrarse sistemáticamente células T específicas a su propia PBM o específicas a un antígeno no propio (ovalbumina, OVA), solo las primeras se acumulan en el lado lesionado pero no en el lado control²⁶ (Figura 2).

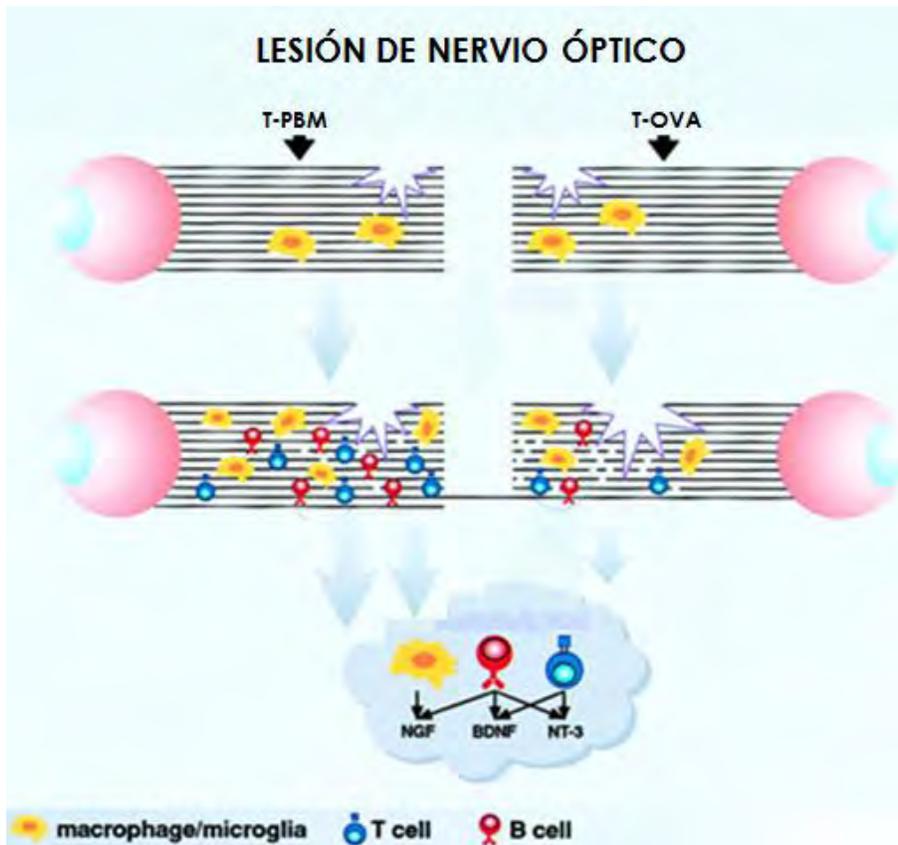


Fig. 2. Secuencia de eventos de la respuesta de las células T autoinmunes después de una lesión en SNC. La respuesta inmune local induce un incremento en el número de células B, células T y macrófagos en el nervio óptico lesionado. Este incremento es mayor cuando se administran células T específicas a PBM (T-PBM) que al administrar células T específicas a otro antígeno (T-OVA). Los efectos neuroprotectivos de las células T son mediados, al menos en parte, por la secreción masiva de neurotrofinas y citocinas en el nervio tratado con PBM; Tomado de Barouch⁴¹.

Por otra parte se plantea que esta respuesta direccionada contra proteínas de la propia mielina evoca autoinmunidad la cual puede ser no benéfica, por ejemplo, en ratas Lewis con altos niveles de células T reactivas a PBM²¹ y en ratones transgénicos con un receptor de células T específico para mielina (PBM TCR-específicos) no se observan resultados positivos en cuanto a la función motriz después de una LME en comparación con ratones normales²², por lo que se cree que las células T auto-

reactivas pueden aumentar el daño axonal y la desmielinización. Sin embargo, ésta respuesta autoinmune parece ser benéfica, en trabajos donde las células T reactivas a PBM son inyectadas sistémicamente en ratas con lesión en nervio óptico ó contusión en médula espinal donde se observa que estas células confieren neuroprotección directamente al liberar neurotrofinas e indirectamente al modular la función de macrófagos y microglia, a pesar de que los animales desarrollan transitoriamente encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)²³, una enfermedad inflamatoria desmielinizante mediada por células T CD4⁺, que sirve de modelo para la esclerosis múltiple ya que permite conocer los mecanismos regulatorios de la respuesta autoinmune en el SNC. En este sentido, trabajos que realizan la transferencia de células T activadas contra PBM, de ratas con LME a ratas sin lesión muestran que solo las que son obtenidas 7 días después de la lesión causan deficiencias neurológicas y cambios histopatológicos similares a EAE lo que sugiere que el repertorio de las células T encefalotigénicas (inductoras de la enfermedad), activadas por la lesión, están bajo estricta regulación ¹⁰. Para mostrar que es posible obtener neuroprotección sin inducir EAE numerosos estudios en ratas con LNO, han evocado intencionalmente una respuesta autoinmune, usando inmunización activa o protocolos de vacunación donde auto-antígenos de mielina con adyuvantes son inyectados en ratas o ratones susceptibles a esta enfermedad, encontrando que sin inducir EAE hay una supervivencia de células retino-ganglionales ²³.

El hecho de que las células T endógenas autoinmunes, en ciertas condiciones no funcionen óptimamente protegiendo a las neuronas del SNC o induciendo regeneración axonal después de una lesión, puede reflejar la variabilidad de la respuesta inmune y del desarrollo de la lesión en cuanto a la formación de la cicatriz glial que no ocurre de forma similar en ratones que en ratas¹²

El grupo de Michael Schwartz en base a sus estudios en ratas con LNO ha propuesto el concepto de “autorreactividad protectora”, donde la lesión actuaría como una señal de estrés que inicia una respuesta autoinmune benéfica debido a que las células T direccionadas contra proteínas del propio SNC actúan de un modo esencialmente no destructivo a nivel histológico²³, sumado a esto se observaron efectos benéficos en el

modelo donde se realiza una contusión en ME previamente a una LNO teniendo como resultado que la LME evoca una respuesta neuroprotectora que se determina por la supervivencia de neuronas en el NO cuando el lapso de tiempo entre las dos cirugías es de 7 a 17 días³⁴.

Esta respuesta espontánea, aunque benéfica es difícilmente regulada por que involucra elementos de la estructura del tejido y del microambiente inflamatorio que se establece en la fase aguda y crónica en una LME.

3.5 Respuesta inflamatoria

Después de una lesión en médula espinal las células residentes del SNC (microglia, neuronas, astrocitos y células endoteliales) y las células del sistema inmune que se infiltran (linfocitos T y macrófagos) a este sitio interactúan por medio de contacto celular y factores solubles, lo que da lugar a la respuesta inflamatoria dentro del SNC que es esencial para limitar daño al tejido y propiciar un ambiente de reparación.

Las células endoteliales de la barrera hematoencefálica secretan citocinas y expresan moléculas de adhesión que facilitan la entrada de linfocitos al sitio de lesión. Para la activación de estos linfocitos CD4⁺ se necesita el reconocimiento de los antígenos, que se da al menos por dos señales distintas proporcionadas por las células presentadoras de antígenos, una es provista por la unión del receptor de la célula T al complejo formado por el péptido (antígeno) y la proteína del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (tomado del inglés major histocompatibility complex, MHC II) mientras que la segunda señal es provista por proteínas co-estimuladoras que son reconocidas por los receptores complementarios que están en la superficie de la célula T³³.

En respuesta a los estímulos inflamatorios la microglia y los astrocitos son dos poblaciones celulares altamente reactivas, que regulan varias moléculas implicadas en este proceso. La microglia activada en el SNC normal esta presente en bajas cantidades pero el IFN- γ secretado por las células Th1 y NK es crucial para que esta población madure en macrófagos que funcionan como células presentadoras de antígenos al expresar la proteína CPH II y moléculas co-estimuladoras pero también en

el curso de lesiones en el SNC presentan actividad fagocítica, endocítica y secretan mediadores anti-inflamatorios (IL-10, TGF- β , prostaglandina E₂) y pro-inflamatorios (IL-1, TNF- α). En casos clínicos la presencia de macrófagos es predominante en el sitio lesionado durante la fase aguda de una LME¹⁰ mientras que en ratas contusionadas estas células no decrecen hasta 7 días después de la lesión⁹.

En la LME la remoción de la mielina y los desechos neuronales del área lesionada se lleva a cabo por la actividad fagocítica de los macrófagos lo que es importante para el inicio de la respuesta autoinmune dentro del SNC ya que estas células presentan el antígeno a las células T. Esta respuesta puede interferir con la función de los circuitos neuronales que sobrevivieron a la lesión primaria, impedir la re-mielinización o inhibir la regeneración axonal además, algunos estudios han mostrado una mejoría en la actividad motriz y una significativa conservación de los axones mielinizados al atenuar la actividad de los macrófagos en modelos de LME por isquemia⁹. Sin embargo los macrófagos también tiene funciones relacionadas con la reparación del tejido y la regeneración neuronal al potenciar la liberación de mediadores como el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor de crecimiento parecido a insulina (IGF-1), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF)²⁵.

Así, los macrófagos dentro del SNC lesionado tienen una función esencial en la remoción de los desechos celulares, en la comunicación celular vía citocinas y de esta forma también regula el desarrollo de las respuestas Th1 y Th2.

3.6 Respuesta Th1 y Th2

El balance sistémico de Th1/Th2 es dependiente de la edad y del fondo genético de los individuos²¹ mientras que la polarización de los linfocitos Th es un complejo proceso controlado por factores como la naturaleza del antígeno, las células presentadoras de antígeno y las citocinas producidas durante la respuesta inflamatoria.

Después de una activación inicial por péptidos inmunogénicos, los linfocitos Th se diferencian en linajes con distintas funciones efectoras de manera irreversible³. Las células Th1 establemente expresa INF- γ aunque también se caracterizan por producir

IL-2, esta respuesta es conocida como pro-inflamatoria, mientras que Th2 expresa IL-4, IL-5 e IL-13 que al inhibir la respuesta Th1 es conocida como respuesta anti-inflamatoria; las células Th17 producen IL-17 e IL-6 y la población Treg secretan altos niveles de IL-10 y TGF- β . Las citocinas que se muestran en la Tabla 1 no son únicamente secretadas por los subtipos de células Th1 y Th2, por ejemplo, el INF- γ también es expresado por células NK y macrófagos mientras que IL-4, IL-5 e IL-13 también son expresados por mastocitos²⁷.

Propiedad	Sub-población Th1	Sub-población Th2
Citocinas sintetizadas		
IL-4	–	+++
IL-5	–	+++
IL-13	–	+++
IL-3	++	++
GM-CSF	++	++
IL-10	–/ +	++
INF- γ	+++	–
IL-2	++	–
IL-12	++	–
Activación de macrófagos	Activación Clásica	Activación alterna

Tabla 1. Propiedades de las sub-poblaciones Th1 y Th2 de linfocitos CD4⁺. Los linfocitos CD4⁺ vírgenes pueden diferenciarse en sub-poblaciones distintas en respuesta a un antígeno, co-estimuladores y citocinas. La tabla enumera diferencias entre la sub-población Th1 y Th2. Tomado de Abbas⁴⁹.

Pocos estudios han caracterizado los subtipos de células T y el perfil de citocinas que muestran efectos benéficos en el contexto de lesión en SNC, estas son algunas de las conclusiones que han planteado:

- Las células Th2 promueven mejor la supervivencia neuronal que las células Th1 *in vitro*³⁰.

- La lesión en SNC induce una inmunosupresión sistémica caracterizada por un cambio hacia Th2 que mejora la respuesta inmune celular¹⁷. Se especula que la regulación negativa de la respuesta Th1 y el cambio a una respuesta Th2 después de la LME es una reacción fisiológica de curación aunque el precio del cambio sistémico es incrementar la susceptibilidad a alguna infección²³. En cuanto a las células Th2 específicas a PBM se ha observado que son más efectivas migrando a través de una barrera hematoencefálica artificial que células Th1 también específicas para PBM³⁰.

- En modelos de vacunación donde se usan adyuvantes como el acetato glatiramero que induce una respuesta Th2 para tratar lesiones en SNC, se previene el desarrollo de EAE^{12, 13} incluso se promueve neuroprotección y/o regeneración axonal²³. En estrategias de inmunización la selección del adyuvante influye en la predominancia del estatus Th1 o Th2, por una parte el adyuvante completo de Freud (CFA) promueve un estatus Th1 mientras que el adyuvante incompleto de Freud (IFA) promueve un estatus Th2. Sin embargo el grupo de Moalem señala que independientemente del adyuvante usado, la sola inmunización tiene un claro efecto benéfico que se ha observado por un grado de supervivencia neuronal ligeramente más alto que en el grupo de IFA/Th2 después de una lesión en nervio óptico²¹.

- Las células Th1 mejoran la recuperación funcional después de LME y la supervivencia de células retino ganglionares después de una LNO en ratas adultas sin producir EAE⁴⁰.

- *In vivo*, el grupo de Schwartz muestra que las inyecciones de células Th1 autoinmunes dan lugar a la neuroprotección comparadas con inyecciones de PBS²⁵.

Además de la caracterización de los subtipos de células T activadas en el sitio de lesión también es fundamental determinar el tipo de citocinas pro o anti-inflamatorias que son liberadas ya que ambos tipos influyen en las funciones del SNC después de la lesión. Existen estudios de Yoles enfocados en las citocinas anti-inflamatorias por que resultan benéficas en restringir la expansión del daño en el primer momento después

de la lesión además de que análisis del ARNm extraído de linfocitos aislados una semana después de LME en ratas, evidenció que existe expresión de IL-10 y no de IFN- γ , lo que lleva a suponer que las células Th acumuladas en el sitio de lesión son Th2 y que probablemente están contribuyendo a la protección observada, pero este fenotipo en las etapas avanzadas de una LME esta en investigación¹⁵ ya que el incremento en la concentración de IL-10 si inhibe la respuesta pro-inflamatoria pero también la capacidad de presentar antígenos por parte de los macrófagos dañando su habilidad para iniciar una respuesta inmune¹⁷. Sumado a esto, las citocinas características de Th2 como la IL-4 que tiene una fuerte expresión en procesos neurodegenerativos e IL-5, un potente activador de eósinofilos, tienen un papel importante en la proliferación de células B las cuales persisten cerca del sitio de lesión hasta por una semana después del daño⁴².

Al contrario, ciertos grupos que apoyan la respuesta Th1 como benéfica, creen que la secreción de IFN- γ por las células T infiltradas al sitio de lesión es la señal inicial para la respuesta inmune e inflamatoria dentro del SNC y al ser secretado por células diferenciadas Th1 contribuye a la recuperación de una lesión axonal debido a sus efectos inmunoregulatorios⁶, incluso se sugiere que las células Th1 no modifican la respuesta para autoantígenos o antígenos no propios promoviendo la protección neural²⁵. Adicional a esto la citocina IL-2 *in vitro* induce la proliferación/diferenciación de oligodendrocitos y el IFN- γ es necesario para preservar la función astrogial que se encuentra comprometida bajo las condiciones de estrés asociadas a la lesión²⁸.

Otro estudio *in vitro* considera que ambas respuestas son esenciales y benéficas ya que al comparar los efectos de células progenitoras neurales (CPN) expuestas a bajos niveles de citocinas características de Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-4) se encontraron efectos distintos en la diferenciación: las CPN activadas con IL-4 muestran un sesgo hacia oligodendrogenesis mientras que las activadas con IFN- γ muestran una tendencia hacia neurogénesis²⁷. Estos resultados conducen a pensar que la neurogénesis y oligodendrogenesis pueden ser inducidas cuando existen niveles controlados de citocinas en tiempo y cantidad además este hecho puede contribuir a la recuperación de lesiones agudas o desordenes degenerativos crónicos en el SNC que se

caracterizan por la falta de estos dos procesos asociados con la inflamación local y citotoxicidad mediada por TNF- α y óxido nítrico.

Un trabajo enfocado a la mielinización del tejido, también sugiere que las células Th1 son las primeras en invadir el tejido ayudando a la neurogénesis mientras que las células Th2 aseguran la mielinización de las neuronas recién formadas²⁵.

3.7 Regeneración y neuroprotección del SNC

Después de una LME, el tratamiento clínico es remover quirúrgicamente los fragmentos de hueso y ligamentos dañados para evitar la continua compresión del tejido mientras se administran altas dosis de esteroides como metilprednisolona y dexametasona ya que son efectivas en preservar la función motriz si la administración inicia en las primeras 8 horas después de la lesión y continúa por 48 horas².

Los métodos moleculares intentan neutralizar los mediadores de toxicidad, competir con receptores de citocinas, incrementar la resistencia de las neuronas al ambiente tóxico, inhibir vías de señalización¹⁵ así como bloquear inhibidores del crecimiento asociados a mielina usando anticuerpos específicos¹⁴, por ejemplo, el uso de anti-Nogo para promover la regeneración axonal y funcional en roedores y primates ha llevado a ensayos clínicos de primera fase en pacientes con LME¹⁶. Varias estrategias para reemplazar el ambiente no permisivo del crecimiento axonal usan injertos de nervios periféricos que contienen células de Schwann o trasplantes que contienen células madre que ayudan a remodelar el circuito local¹⁴ mientras que otros estudios realizan inmunización con homogenados de médula espinal¹² para generar anticuerpos polireactivos que bloquean las propiedades inhibitorias asociadas a mielina o inyecciones de células T reactivas a esta proteína del SNC sin producir una respuesta inflamatoria perjudicial, disminuyendo la degeneración neuronal-axonal y permitiendo la regeneración a larga distancia de las fibras del tracto cortico-espinal en ratones¹⁴.

Entre las alternativas para regular la respuesta inmune dentro del SNC están: inhibir la expresión de CPH en células presentadoras de antígenos por la influencia de prostaglandinas e IL-10, la apoptosis de linfocitos activados por vías de señalización (sistema Fas), factores que bloquean receptores de citocinas o la inyección de

macrófagos activados con la intención de lograr una rápida eliminación de los desechos de mielina permitiendo la regeneración axonal. Además de los macrófagos la inyección de células Th2 activadas promueven la expresión de neurotrofinas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (tomado del inglés brain-derived neurotrophic factor, BDNF) y la neurotrofina-3 (NT-3) que son importantes factores regenerativos y de supervivencia para las neuronas⁴¹.

Estos estudios llevan a pensar que en el contexto de una lesión en médula espinal algunos linfocitos T activados así como las citocinas que liberan pueden ser altamente dañinas mientras otras promueven la recuperación neuronal en particular en modelos de ratas donde se utiliza una previa presentación de antígenos derivados del SNC⁵¹.

Justificación

Después de una lesión la interacción entre las células del SNC, los macrófagos y las células T es diferente de cuando ocurre la lesión en el SNP: la condición inmuno-privilegiada mantiene al SNC bajo una respuesta inmune restringida. Esta condición es una desventaja para proteger y repara los nervios lesionados sin embargo la respuesta inmune adaptativa da lugar a la acumulación en el lugar lesionado de células T autoinmunes, que reconocen a los propios componentes del SNC, reducen la expansión del daño en el tejido y brindan neuroprotección al diferenciarse en células T “helper” (Th) efectoras capaces de secretar citocinas que limitan la inflamación y el daño tisular. La naturaleza de esta “autorreactividad protectora” concierne principalmente a los mediadores expresados por estas células Th después de la lesión cuyo fenotipo aún no ha sido identificado.

Debido a que la enucleación neonatal permite una exposición temprana a antígenos neurales al liberar proteínas asociadas a mielina, por la degeneración del nervio óptico, potencialmente esta lesión generaría células T autoinmunes de memoria específicas a antígenos del SNC. Nuestra teoría plantea que este tipo de inmuno-modulación favorecería la generación de un fenotipo apropiado de células efectoras ante una segunda lesión en otro sitio del SNC, como lo muestran estudios donde los macrófagos y en particular las células T “helper” si son capaces de reducir los daños citológicos y de motricidad causados en ratas después de una lesión en nervio óptico y médula espinal cuando se realizan inmunizaciones activas o lesiones previas.

En nuestro modelo examinamos cual es el perfil inmunológico que desarrollan ratas enucleadas al nacimiento cuando fueron contusionadas en la médula espinal durante la etapa adulta, además si la enucleación favorece el desarrollo de un perfil pro-inflamatorio o anti-inflamatorio y si la secreción de citocinas características del fenotipo Th1 o Th2 inducen neuroprotección, observada como recuperación en la motricidad. Estos resultados nos permitirán identificar el tiempo y el tipo de inmunización que nos acerquen a una nueva estrategia celular que proporcione los beneficios máximos del sistema inmune con desventajas mínimas en lesiones crónicas y agudas de médula espinal en adultos.

Pregunta

Sabiendo que las células T “helper” autorreactivas promueven un efecto neuroprotectivo después de una lesión en SNC, debido a las citocinas que se encuentran en el microambiente de lesión, nos preguntamos si ¿la enucleación modifica el perfil inmunológico de ratas sometidas a lesión en médula espinal y si esto conduce a una recuperación motriz?

Hipótesis

La lesión neonatal en nervio óptico libera antígenos neurales que instruirán al sistema inmune a desarrollar un perfil inmunológico que favorezca la conservación tisular y la recuperación motriz en ratas adultas sometidas a una lesión en médula espinal.

Objetivos generales

1. Determinar el perfil inmunológico de ratas adultas con lesión en médula espinal que fueron enucleadas al nacimiento.
2. Evaluar el efecto de la enucleación neonatal sobre la actividad motriz de ratas adultas sujetas a una lesión en médula espinal.
3. Evaluar la presencia de linfocitos y macrófagos justo en el lugar de la lesión, en ratas adultas después de una contusión en médula espinal que fueron enucleadas al nacimiento.

Objetivos particulares

1. Detectar en el lugar de la lesión la presencia de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias características de la respuesta Th1 y Th2 en ratas enucleadas y no enucleadas al nacimiento que en la etapa adulta han sido sometidas a una sección completa en médula espinal.
2. Detectar en el lugar de la lesión la presencia de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias características de la respuesta Th1 y Th2 en ratas enucleadas y no enucleadas al nacimiento que en la etapa adulta han sido sometidas a una contusión moderada en médula espinal.
3. Evaluar mediante la prueba de motricidad Basso-Beattie-Bresnahan la recuperación motriz de ratas enucleadas y no enucleadas al nacimiento a 7 días después de la sección completa en médula espinal en etapa adulta.
4. Evaluar mediante la prueba de motricidad Basso-Beattie-Bresnahan la recuperación motriz de ratas enucleadas y no enucleadas al nacimiento a 7 y 60 días después de la contusión moderada de médula espinal en etapa adulta.
5. Detectar, mediante la tinción histológica de Kluver-Barrera, la presencia de macrófagos justo en el lugar de la lesión en ratas enucleadas y no enucleadas a 7 días después de la contusión moderada de médula espinal en la etapa adulta.
6. Detectar, mediante la tinción histológica de Kluver-Barrera, la presencia de linfocitos justo en el lugar de la lesión en ratas enucleadas y no enucleadas a 7 días después de la contusión moderada de médula espinal en la etapa adulta.

Materiales y Métodos

Animales de experimentación

Se utilizaron un total de 37 ratas hembras de la cepa Wistar. De este número, diecisiete ratas fueron enucleadas entre las 8-13 horas de nacidas y devueltas a su madre junto con el resto de las ratas no enucleadas hasta los 21 días de edad. Las ratas que no fueron enucleadas sirvieron como grupo control.

Una vez alcanzado el peso de 200-250 gramos las ratas fueron sometidas a la LME, se mantuvieron por pares en jaulas de acrílico con aserrín estéril y con alimento *ad libitum* hasta el día de sacrificio en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) en cuartos con ciclos de luz/obscuridad (12 horas) y temperatura controlados.

Después de llegar a la edad de 8-9 semanas las ratas fueron divididas en tres grupos experimentales:

Grupo 1. Ratas enucleadas (n= 8) y no enucleadas (n= 8) sometidas a sección quirúrgica completa de la médula espinal y sacrificadas 60 días después de cirugía.

Grupo 2. Ratas enucleadas (n= 12) y no enucleadas (n= 12) sometidas a contusión medular moderada y sacrificadas 60 días después de la cirugía.

Grupo 3. Ratas enucleadas (n= 14) y no enucleadas (n= 14) sometidas a contusión medular moderada y sacrificadas 7 días después de la cirugía.

Se utilizaron estos dos modelos de lesión debido a que la evolución de la respuesta inmune en la sección completa, esta direccionada a subsanar el tejido neural porque los axones están seccionados y no hay conducción nerviosa, mientras que en la contusión el daño secundario se extiende hasta afectar en varios grados la función motriz.

Los animales fueron tratados de conformidad con las normas del código ético dispuesto por el Instituto para los animales en experimentación, del mismo modo todos los procedimientos se realizaron bajo protocolos de ética.

Enucleación

Las ratas que fueron sometidas a enucleación constituyen el grupo experimental.

Todos los animales recién nacidos fueron separados de la madre, se tomo solo a las hembras, de las cuales a la mitad se les realizó enucleación bilateral, mientras que el resto de las crías permanecían apartadas de la madre.

Los individuos a enuclear se colocaron en hielo a modo de inducir anestesia, después se realizo una incisión en la línea palpebral para poder introducir la pinza recta y retirar los globos oculares en su totalidad, no se realizo sutura en los párpados.

Enseguida las crías se colocaron bajo una lámpara de luz incandescente a modo de que recuperaran su temperatura normal, así como la coloración de piel y el movimiento de las extremidades para después ser devueltas con su madre hasta el destete cuando fueron colocadas 6 por caja hasta el día de la lesión en médula espinal.

Lesión medular

Sección quirúrgica completa

Las ratas fueron anestesiadas con una combinación de ketamina (80 mg/Kg) y xilazina (8 mg/Kg) intramuscular. En un ambiente estéril y con instrumentos desinfectados la médula espinal de las ratas fue expuesta a través de una laminectomia parcial al nivel de la novena vértebra torácica (T9). Una vez expuesta la médula espinal se seccionó completamente con un corte de navaja de bisturí y deslizó de modo transversal un hilo de ácido poliglicólico 9-0 a través de ella para verificar que se realizo un corte completo. Posteriormente se suturaron meninges y musculo con una sutura quirúrgica sintética absorbible (Atramat 9-0) y la piel con una sutura sintética no absorbible (Atramat 3-0).

Para evitar infecciones los animales recibieron antibiótico (Enrofloxacina) en su bebedero (1ml/500ml) durante 8 días, mientras que para disminuir el dolor recibieron

paracetamol (40µl/300g) cada 12 horas por 5 días. La vejiga fue vaciada manualmente de dos a tres veces al día durante un mes hasta que el reflejo de micción se restaurara.

Contusión

Para llevar a cabo la contusión, las ratas fueron anestesiadas y su médula espinal expuesta como se describió anteriormente. La lesión medular fue causada utilizando el Impactador NYU (dispositivo computarizado de la Universidad de New York que sujeta a la rata por las apófisis vertebrales para dejar caer un peso de 10 gramos de una barra de alturas determinadas, el cual reduce la variabilidad de las lesiones) a una altura de 25 mm; condición que provoca una contusión moderada.

Después del procedimiento todos los animales fueron suturados, en músculo y piel como ya se describió, del mismo modo recibieron el medicamento, la atención para la evacuación y fueron cuidadosamente examinadas para detectar y prevenir infecciones perineales, parásitos y heridas o autofagia en piernas y rodilla.

Evaluación motriz

La repercusión en el movimiento de las extremidades después de una LME se evalúa usando la escala de actividad motriz Basso Beattie Bresnahan (BBB), la cual considera el movimiento de cadera, rodilla, tobillo y posición de las patas traseras así como la coordinación, el balance y el apoyo en los miembros inferiores en el movimiento espontáneo y asigna un número de 0 (parálisis completa) a 21 (movilidad normal)³⁴. La actividad motriz fue evaluada al colocar cada rata durante 5 minutos en un campo abierto. Las pruebas se realizaron a los 7, 30 y 60 días después de la LME.

Obtención y procesamiento del tejido

Una vez cumplidos los 7 y 60 días después de realizada la lesión, las ratas fueron anestesiadas con una inyección intramuscular de pentobarbital (1ml/250g de peso) y

perfundidas intracardialmente con 200ml de PBS 1X seguido de 200 ml de paraformaldehído amortiguado al 4%.

La médula espinal fue entonces removida y post-fijada por 24 horas. Al siguiente día los tejidos fueron transferidos a una solución de sacarosa al 30% por 48 horas. Posteriormente las muestras fueron cortadas en segmentos de 2 cm con el sitio de lesión al centro, se incluyeron en compuesto OCT (óptimo para cortar por congelación Neg-50 Richard-Allan Scientific) y se congelaron en hielo seco para permanecer almacenados a -80°C hasta su corte y tinción.

Inmunohistoquímica

La médula espinal fue cortada de manera serial a lo largo de su plano céfalo-caudal (30 µm). Los cortes se colectaron en portaobjetos gelatinizados, una vez colocados en cámara húmeda, los portaobjetos fueron lavados con PBS al 1X dos veces durante 5 minutos a temperatura ambiente y secados con papel para ponerlos a incubar (13 minutos) con H₂O₂ al 3% que detiene la actividad de la peroxidada endógena. Se aplicaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS al 1X antes de aplicar un suero de bloqueo (PBS-BSA 0.1%-Tween20 al 0.05%) por 20 minutos. Después de quitar y secar el suero de bloqueo, los cortes se incuban con el anticuerpo primario correspondiente (anti-IL2 de Santa Cruz sc-7896, 1:100; anti- IL4 de Santa Cruz sc-53084, 1:300; anti-IL5 de Santa Cruz sc-7887, 1:50 e IFN-γ de Biolegend cat. 507802, 1:100) toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se utilizó PBS al 1X para lavar los cortes escurriendo e incubando por 5 minutos en tres ocasiones, se seco el exceso de la solución para volver a agregar el buffer de bloqueo durante 10 minutos. Seguido de la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado (1:1000 anti-ratón y 1:2000 anti-conejo) por 1 hora a temperatura ambiente se repitieron los lavados con el PBS 1X.

Para visualizar el anticuerpo unido, los cortes se incubaron con el compuesto AB (Vectastain kit ABC) por una hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados se agregó el sustrato DAB (Peroxidase Substrate Kit) para revelar la marca del

anticuerpo. Finalmente los portaobjetos fueron secados con papel y montados con Cytoseal60 de baja viscosidad.

Cuantificación de la presencia de citocinas

De la serie de cortes inmunoteñidos se tomaron al azar fotografías digitales de tres diferentes campos en el sitio de lesión. El microscopio Optiphot de campo claro se utilizó para observar el área de interés y la cámara digital CoolPix (NIKON) para tomar las imágenes digitales, las cuales fueron calibradas con los mismos parámetros y a la misma escala (40X).

Utilizando el programa ImageJ (NIH) se analizaron las imágenes por densitometría, con lo cual se cuantificó el porcentaje de área marcada positivamente con los anticuerpos específicos para las interleucinas de interés.

Una vez obtenidos los datos, la prueba estadística paramétrica que se utilizó fue una prueba de t Student, donde el valor de la probabilidad para mostrar diferencias entre los grupos comparados se consideró con una $p < 0.05$.

Tinción Klüver-Barrera

La médula espinal fue lavada en diferentes concentraciones de alcohol para eliminar el buffer en el que permaneció por 24 horas.

Después de ser embebidos los cortes en parafina, se obtuvieron las secciones longitudinales de 20 μm de grosor, estas secciones fueron tratadas con la tinción de Klüver Barrera.

Para iniciar la tinción el tejido se desparafiniza y se hidrata con alcohol etílico al 95%, estos cortes se dejan en la solución de luxol azul a 56°C toda la noche. Al día siguiente se retira el exceso de la tinción primero usando alcohol etílico al 95% y después con agua destilada, seguido de esto los cortes se colocan en la solución de carbonato de

litio durante 30 segundos. A continuación se agrega alcohol etílico al 70% hasta que la materia gris y la materia blanca se definan claramente verificando al microscopio. Cuando la diferenciación este completa el tejido se coloca en agua destilada continuando con la deshidratación por medio de dos lavados de 2 minutos cada uno con alcohol etílico absoluto, para terminar montando los cortes con resina de baja densidad.

Posterior a este procedimiento, se tomaron tres fotografías digitales en un microscopio de luz a 32X de modo aleatorio en la médula espinal para evaluar histológicamente el área de lesión y la integridad del tejido. Se identifico la mielina de color azul-gris, los núcleos y productos celulares rosa-violeta y dos tipos celulares de acuerdo a su morfología, por una parte los macrófagos presentan un núcleo pequeño con elementos fagocitados en el citoplasma durante su estado activo y los linfocitos como células redondeadas con un denso núcleo.

El número total de macrófagos y linfocitos presentes en el área de lesión se cuantificaron por el número de eventos y al realizar la prueba estadística t Studen se considero una $p < 0.05$ para considerar diferencias significativas entre los grupos de ratas enucleadas y no enucleadas.

Resultados

Evaluación motriz de ratas con LME

Con el fin de evaluar la actividad motriz de ratas sometidas a LME se realizó la prueba BBB, en la cual se valora la calidad de la marcha en un campo abierto con una escala de 21 puntos, donde el 0 representa la ausencia de movimiento y el 21 representa una marcha normal¹⁶. En nuestros resultados se observó que tanto las ratas sometidas a sección completa (Fig. 1A) como las ratas que recibieron una contusión no muestran diferencia significativa entre la condición de enucleación y no enucleación (Fig. 1B).

La prueba realizada 7, 30 y 60 días después de sección completa (Fig. 1A) muestra valores bajos en la escala BBB (entre 0 y 2), sin embargo, las ratas sometidas a contusión (Fig. 1B) obtuvieron puntajes más altos en la escala (valores entre 1.5 y 12) en los mismos días después de la lesión, observándose movilidad débil de tobillo y rodilla a partir de los 7 días después de la lesión. La evaluación motriz de ratas sometidas a contusión medular no muestra ninguna diferencia significativa en ninguno de los tiempos (Fig. 1B), entre la condición de enucleación y no enucleación, sumado a esto, los valores alcanzados a los 30 días por ambos grupos, son los mismos que a los 60 días (calificación de 12 puntos) después de la LME.

Los resultados muestran que la enucleación no incide de manera positiva en la recuperación motriz tanto en ratas contusionadas como en ratas que fueron sometidas a sección completa en médula espinal.

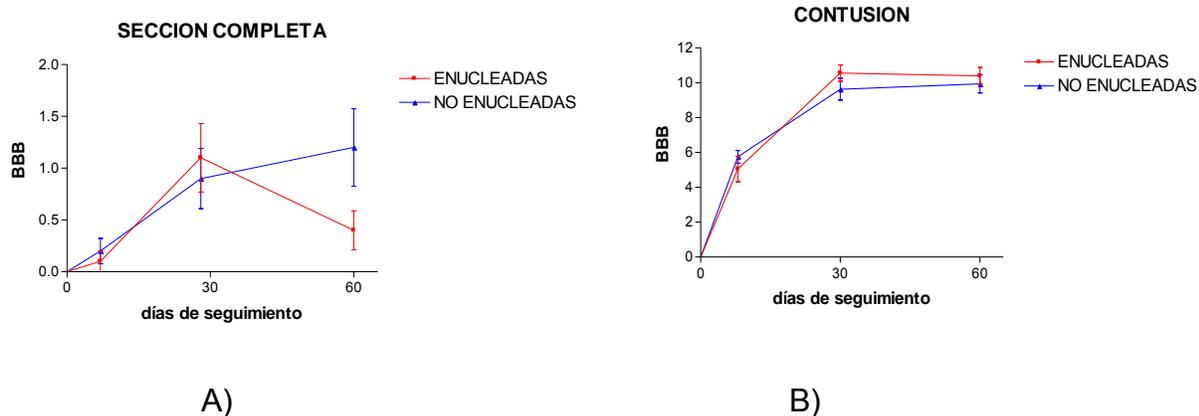


Figura 1. Evaluación de la actividad motriz en ratas enucleadas y no enucleadas con LME, haciendo uso de la escala Basso-Beattie-Bresnahan (BBB). Cada punto es el promedio y la desviación estándar de una $n=8$ para sección completa (A) y una $n=22$ para contusión moderada en médula espinal (B). Mediante la prueba de ANOVA, de medidas repetidas para dos factores, no se encontraron diferencias significativas entre ratas con o sin enucleación ($p \leq 0.05$).

Expresión de citocinas en médula espinal

Para determinar el perfil inmunológico en médula espinal de ratas sometidas a LME, se analizó cuantitativamente la expresión de citocinas presentes en el tejido lesionado, mediante inmunohistoquímica con HRP. La cuantificación fue realizada usando el programa ImageJ, determinando así el porcentaje de área teñida. El tejido utilizado para este análisis fue colectado a los 60 días después de la sección completa en la médula espinal y 7 y 60 días después de la contusión moderada en dicha área, para ambos tipos de lesión se tiene el grupo de ratas enucleadas y no enucleadas que a su vez se compararon con un grupo control el cual no presenta ningún tipo de cirugía.

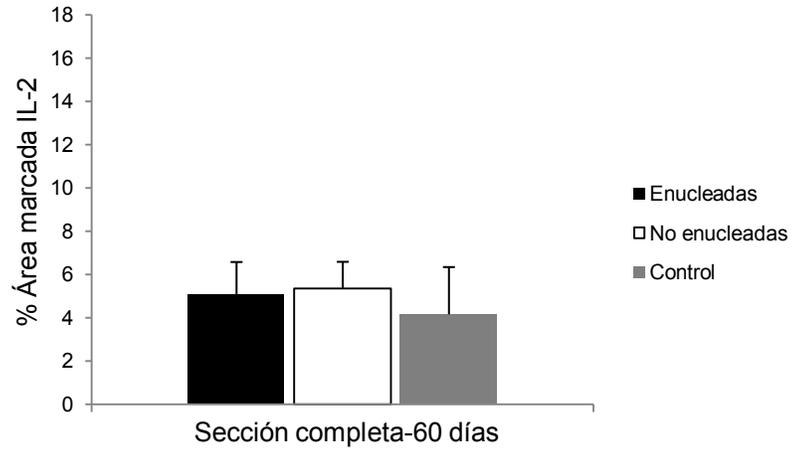
Primero se muestran los resultados en cuanto a las citocinas características de la respuesta Th1, IL-2 (Figuras 2 y 3) e IFN- γ (Figuras 4 y 5), enseguida la cuantificación de las citocinas IL-4 (Figuras 6 y 7) e IL-5 (Figuras 8 y 9) que caracterizan la respuesta anti-inflamatoria Th2.

Interleucina-2 (IL-2)

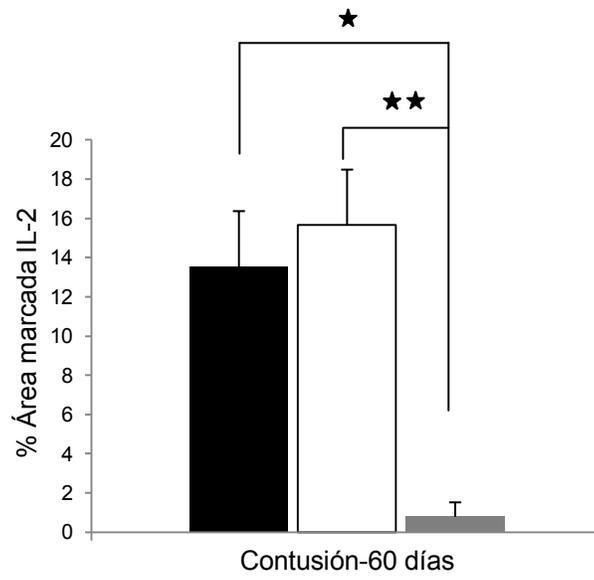
En el grupo de sección completa no hay ninguna diferencia entre la condición de enucleada, no enucleada y control (Fig. 2a). Sesenta días después de sección completa y contusión, las ratas enucleadas y no enucleadas, no muestran diferencia entre ellas, en cuanto a la expresión de esta citocina (Fig. 2a, b) pero en la condición de 7 días después de la contusión, las ratas enucleadas muestran un valor significativamente mayor a la condición de no enucleadas (7.5% vs 4.9% de área marcada, Fig. 2c, $p=0.00069$). Además observamos que la expresión de esta citocina pro-inflamatoria en el tejido de ratas enucleadas y no enucleadas es significativamente mayor que en las ratas sin lesión, 7 y 60 días después de la contusión (Fig. 2b, c).

El porcentaje de área marcada positiva para la IL-2 después de la contusión, indica que la expresión de esta citocina aumentó a los 60 días en comparación con la expresión encontrada a los 7 días de la lesión, así el porcentaje de área marcada positivamente para IL-2 es de 4-7.5 a los 7 días y de 12.5-15.7 a los 60 días después de la LME (Fig. 2b, c).

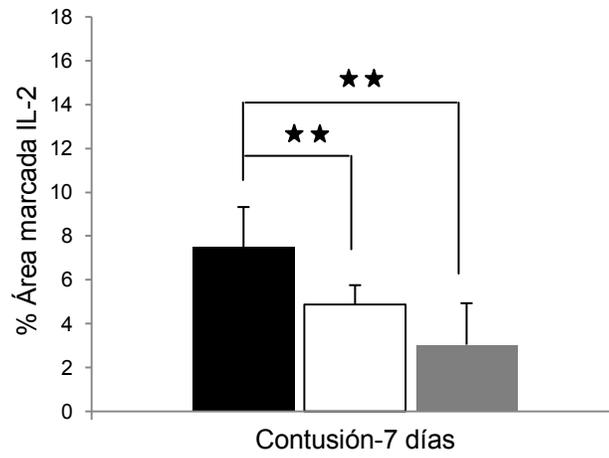
► Figura 2. Expresión de IL-2 en médula espinal de ratas lesionadas evaluada mediante inmunohistoquímica con HRP. Los animales fueron perfundidos y la médula espinal extraída y posfijada, se obtuvieron los cortes de 20 μ m por congelación. Las ratas fueron sacrificadas a) 60 días después de sección completa (n=8), b) 60 días después de contusión (n=12) y c) 7 días después de contusión (n=14). Las barras representan el porcentaje promedio de área marcada y la desviación estándar de tres experimentos. Mediante la prueba t-Student se evidencio diferencias significativas * $p\leq 0.05$ ** $p\leq 0.001$.



(a)



(b)



(c)

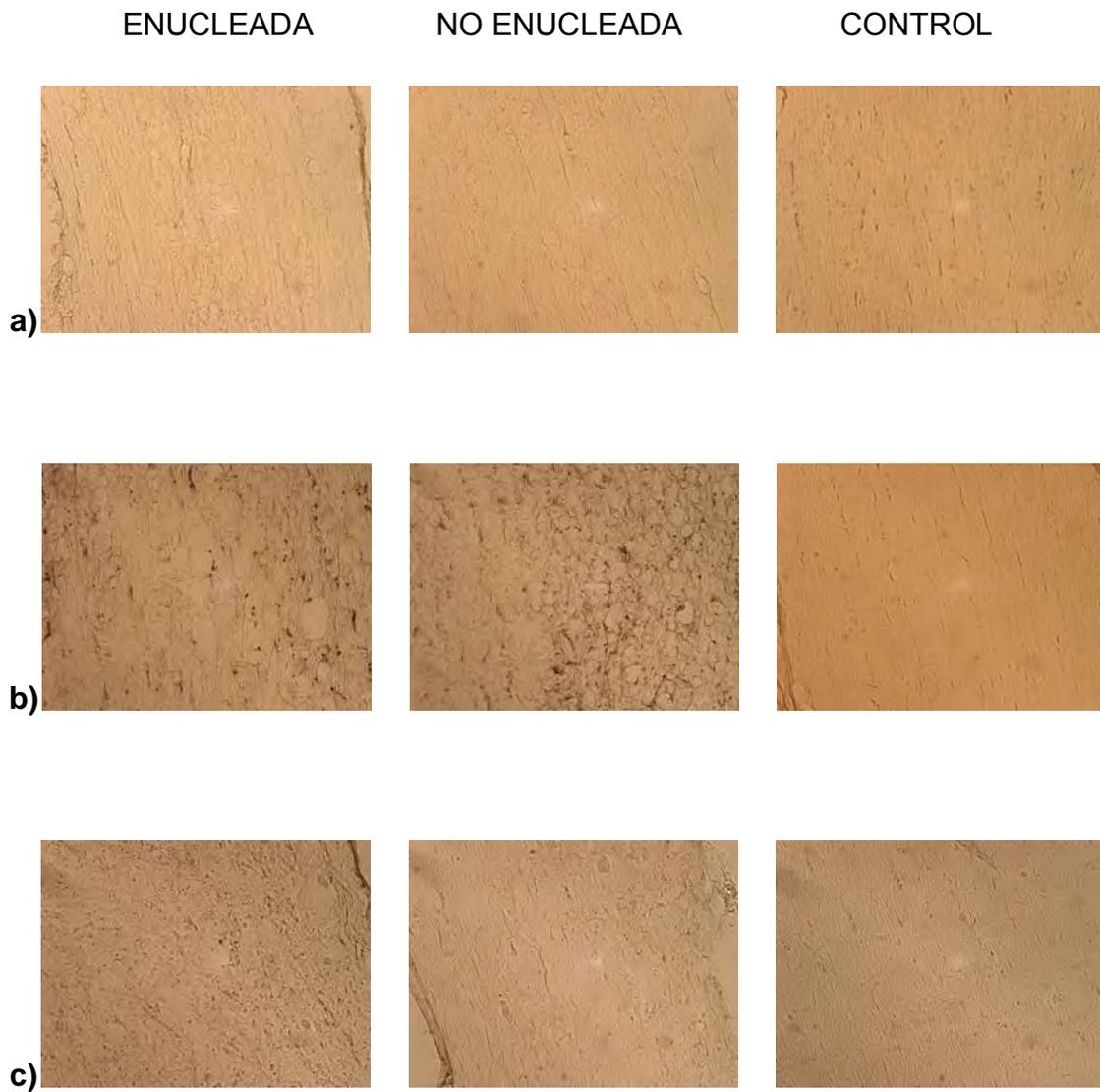


Figura 3

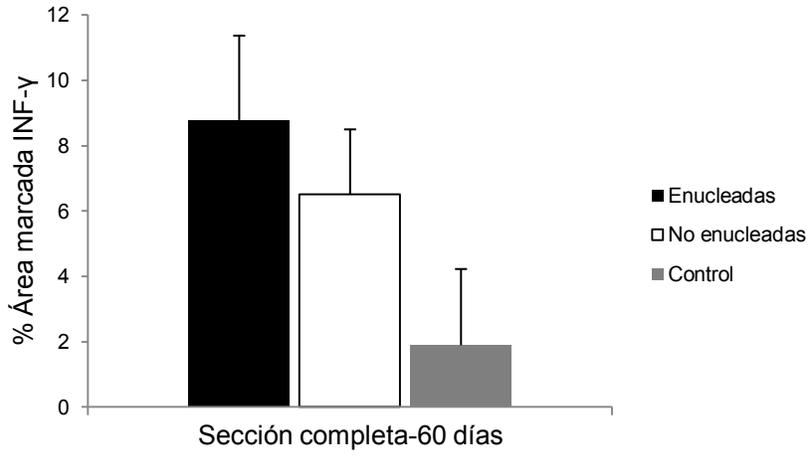
Figura 3. Inmunohistoquímica con anti-IL2 de cortes longitudinales de médula espinal. a) 60 días después de sección completa. b) 60 días después de la contusión medular. c) 7 días después de la contusión medular. Fotografías representativas en objetivo 40X justo en el lugar de la lesión.

Interferon-gama (IFN- γ)

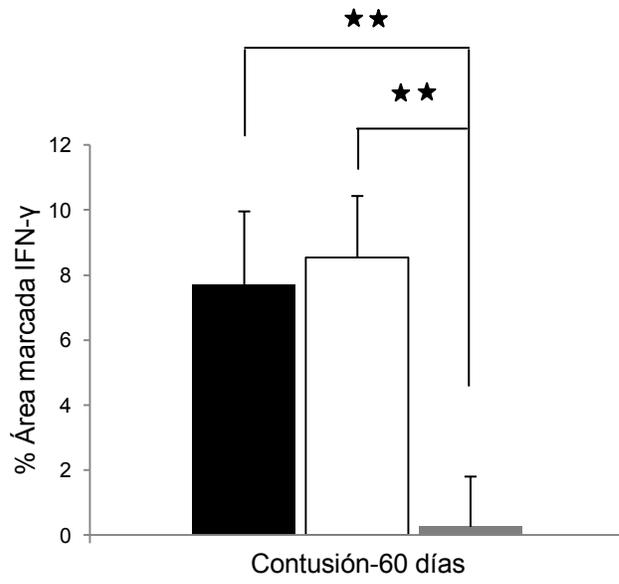
La expresión de IFN- γ 60 días después de sección completa, no presenta diferencias significativas entre animales enucleados y no enucleados, aunque parece haber una tendencia a aumentar en el tejido de ratas enucleadas (Fig. 4a). Siete y 60 días después de la contusión no se observa ninguna diferencia en la expresión de esta citocina, entre ratas enucleadas y no enucleadas (Fig. 4b, c).

En todas las condiciones de lesión, se observa un aumento en la expresión de IFN- γ en el tejido de ratas con lesión, enucleadas y no enucleadas, en comparación con ratas sin lesión, sin embargo, este aumento solo es significativo 60 días después de contusión en médula espinal (Fig. 4b, $p=0.001$).

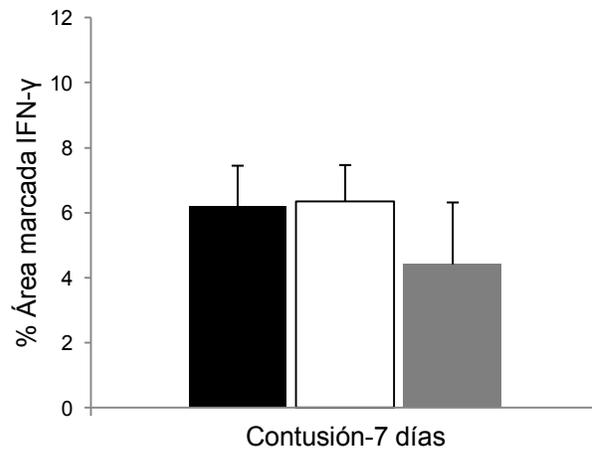
► Figura 4. Expresión de IFN- γ en médula espinal de ratas lesionadas, evaluada mediante inmunohistoquímica con HRP. Las ratas fueron sacrificadas a) 60 días después de sección completa ($n=8$), b) 60 días después de contusión ($n=12$) y c) 7 días después de contusión ($n=14$). Las barras representan el porcentaje promedio de área marcada y la desviación estándar de tres experimentos. Mediante la prueba t-Student se evidencian diferencias significativas $**p\leq 0.001$.



(a)



(b)



(c)



Figura 5

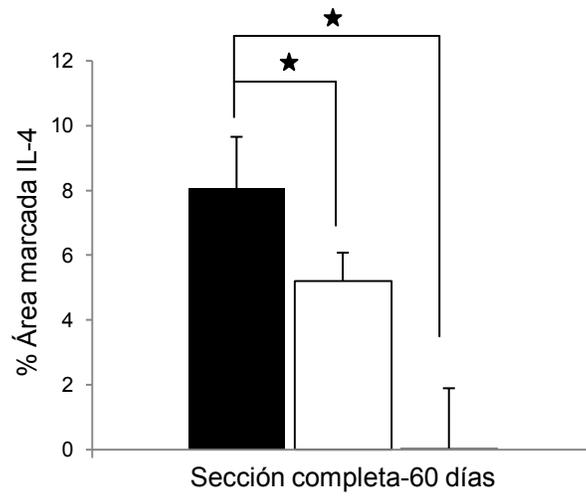
Figura 5. Inmunohistoquímica con anti-IFN γ de cortes longitudinales de médula espinal. a) 60 días después de sección completa. b) 60 días después de la contusión medular. c) 7 días después de la contusión medular. Fotografías representativas en objetivo 40X justo en el lugar de lesión.

Interleucina-4 (IL-4)

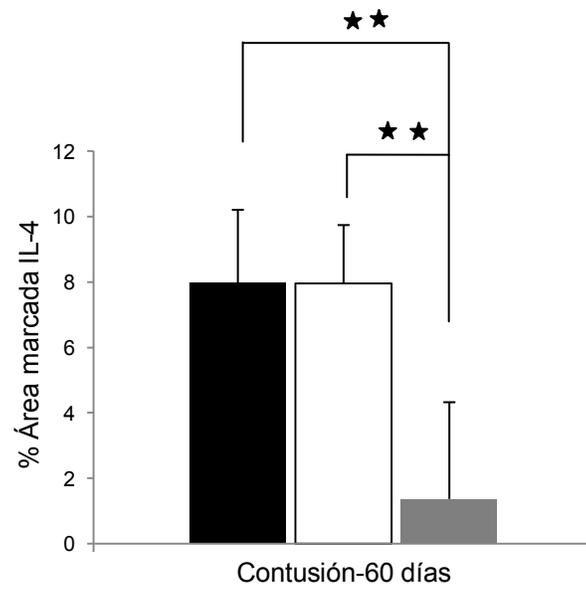
Los resultados indican que la expresión de IL-4 en los animales enucleados es significativamente mayor que en los no enucleados, 60 días después de la sección completa de médula espinal (Fig. 6a, $p=0.0038$); contrario a esto, 7 y 60 días después de la contusión, no existe diferencia en la expresión de esta citocina, entre animales enucleados y no enucleados (Fig. 6b, c) sin embargo, 60 días después de la contusión la expresión de IL-4 aumenta, en comparación con el grupo de 7 días después de esta lesión, del 2% al 8% de área marcada (Fig. 6b, c).

Los tres grupos de ratas enucleadas y no enucleadas mostraron un aumento en la expresión de IL-4 en comparación con ratas que no fueron sometidas a LME de ningún tipo.

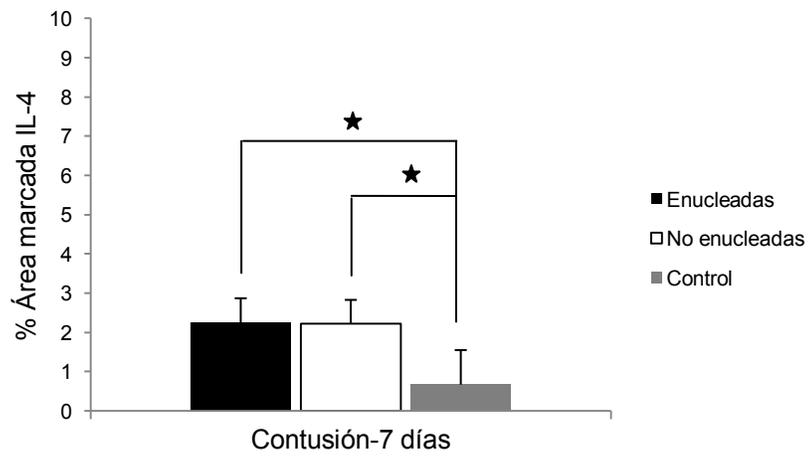
► Figura 6. Expresión de IL-4 en médula espinal de ratas lesionadas, evaluada mediante inmunohistoquímica con HRP. Las ratas fueron sacrificadas a) 60 días después de sección completa ($n=8$), b) 60 días después de contusión ($n=12$) y c) 7 días después de contusión medular ($n=14$). Los animales fueron perfundidos y la médula espinal extraída y posfijada; cortes de $20\mu\text{m}$ por congelación fueron obtenidos. Las barras representan el porcentaje promedio de área marcada y la desviación estándar de tres experimentos. Mediante la prueba de t-Student se evidenció diferencias significativas $*p\leq 0.05$ $**p\leq 0.001$.



(a)



(b)



(c)

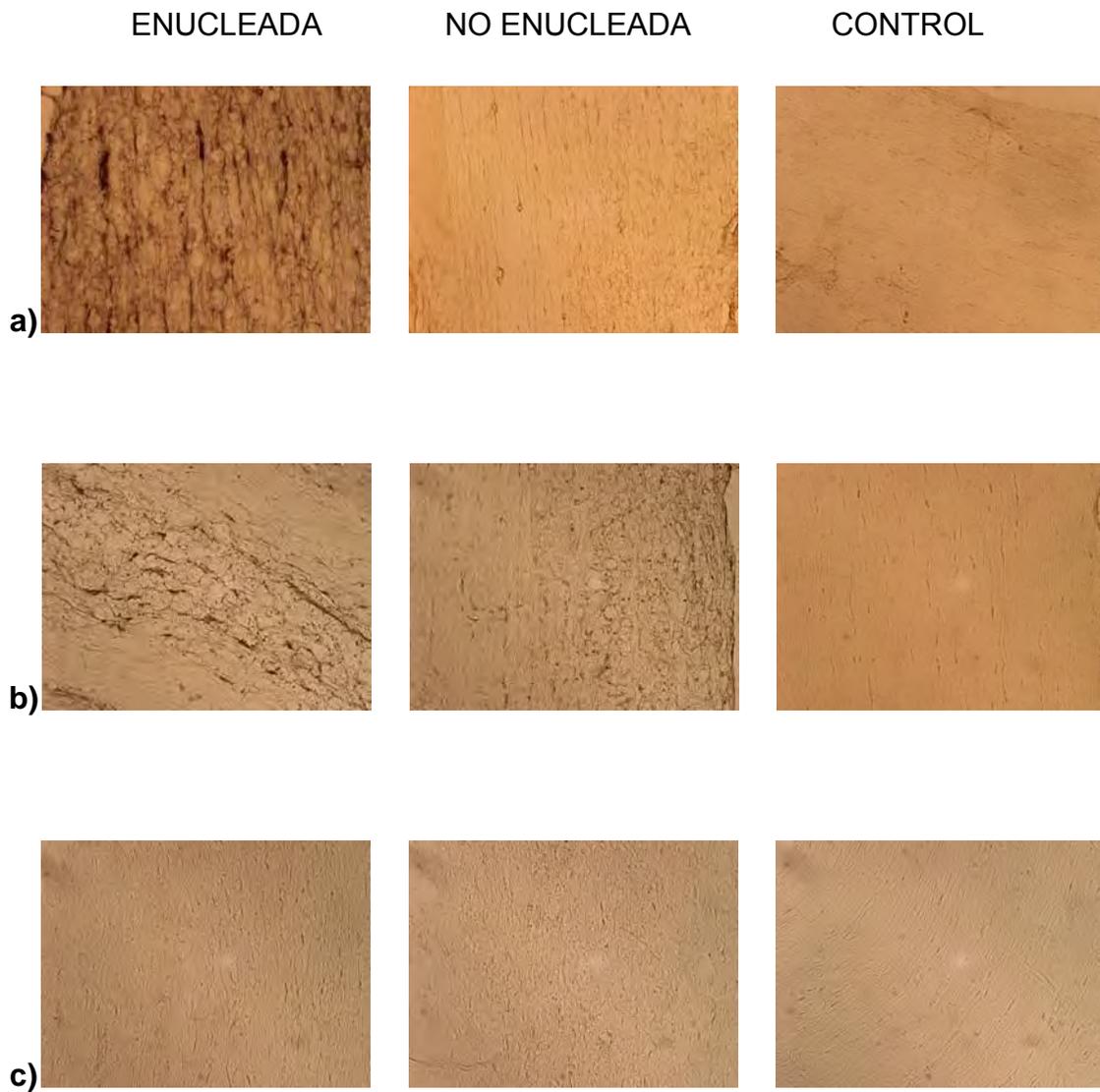


Figura 7

Figura 7. Inmunohistoquímica con anti-IL-4. Cortes longitudinales de médula espinal. a) 60 días después de sección completa. b) 60 días después de la contusión en medular. c) 7 días después de la contusión medular. Fotografías representativas en objetivo 40X justo en el lugar de lesión.

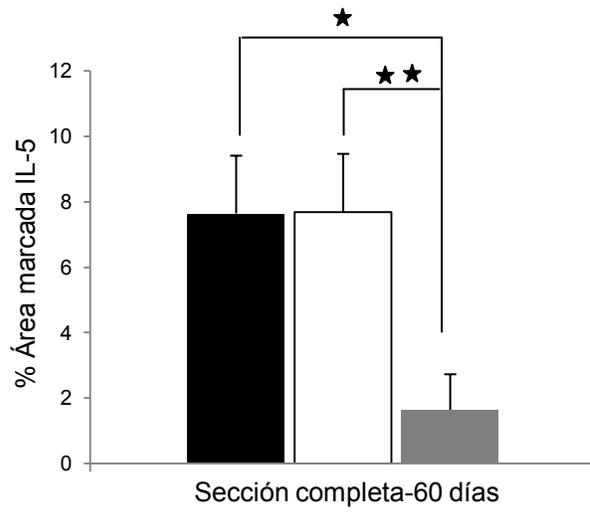
Interleucina-5 (IL-5)

La expresión de IL-5 no presenta diferencias entre animales enucleados y no enucleados 60 días después de la sección completa y contusión (Fig. 8a, b). Sin embargo a los 7 días de la contusión se observa un aumento significativo en la expresión de esta citocina en ratas no enucleadas, en comparación con ratas enucleadas (Fig. 8c, $p=0.023$).

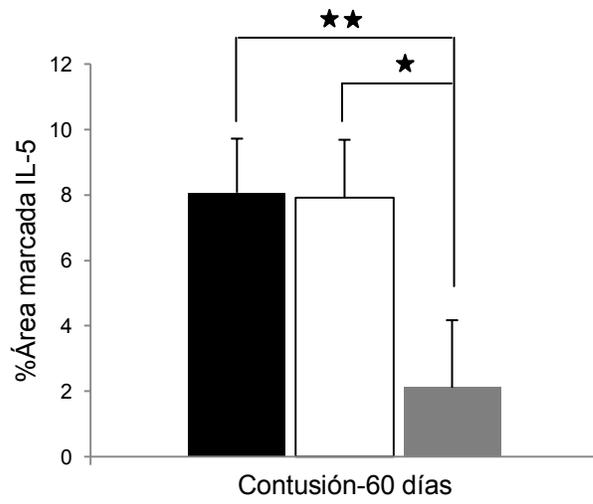
En los animales sin lesión medular la expresión de IL-5 es significativamente menor en comparación con los animales lesionados ya sea enucleados o no en los grupos de 60 días después de sección completa y contusión (Fig. 8a, b).

En cambio, a los 7 días después de la contusión no se observa diferencia en la expresión de IL-5 entre ratas con LME y aquellas sin lesión (Fig. 8c).

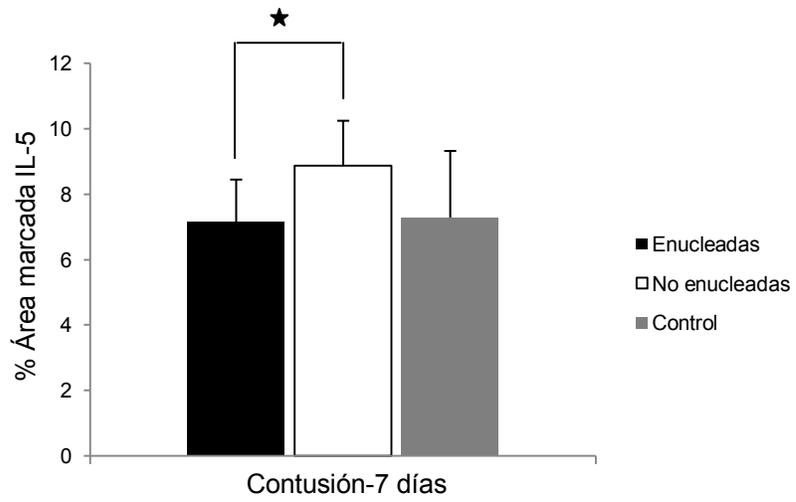
► Figura 8. Expresión de IL-5 en médula espinal de ratas lesionadas evaluada mediante inmunohistoquímica con HRP. Las ratas fueron sacrificadas a) 60 días después de sección completa ($n=8$), b) 60 días después de contusión ($n=12$) y c) 7 días después de contusión medular ($n=14$). Los animales fueron perfundidos y la médula espinal extraída y posfijada; cortes de $20\mu\text{m}$ por congelación fueron obtenidos. Las barras representan el porcentaje promedio de área marcada y la desviación estándar de tres experimentos. Mediante la prueba de t-Student se evidenció diferencias significativas $*p\leq 0.05$ $**p\leq 0.001$.



(a)



(b)



(c)

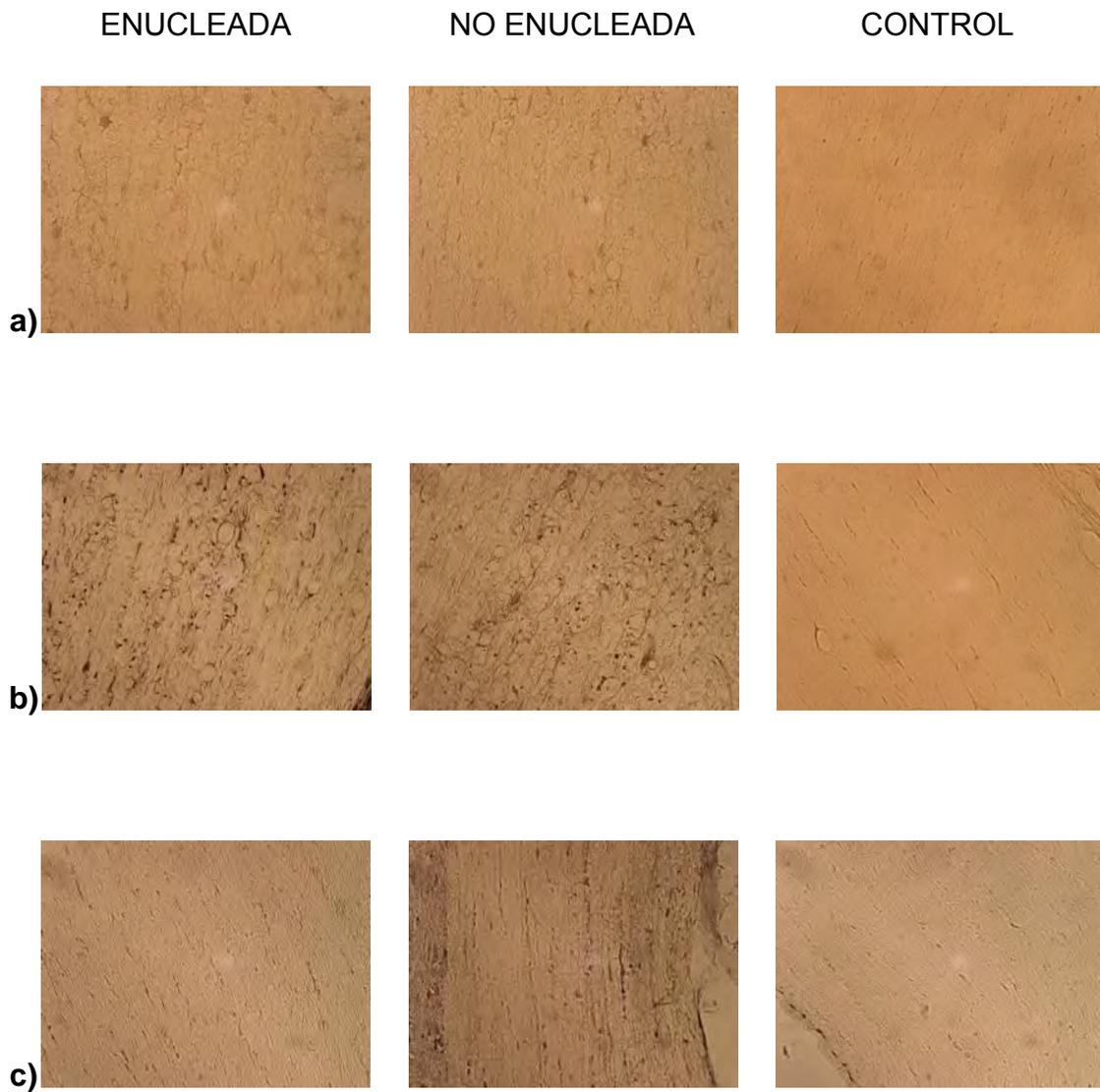


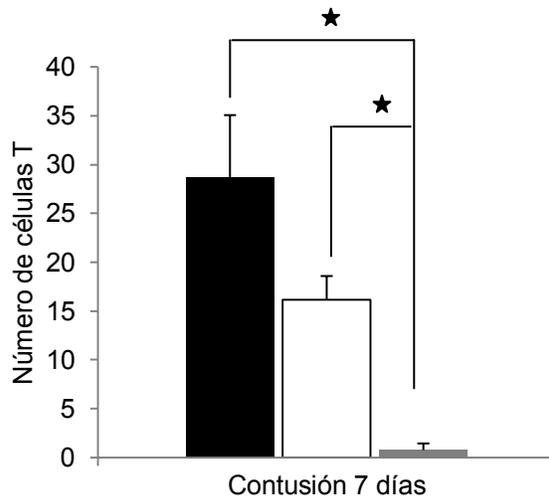
Figura 9

Figura 9. Inmunohistoquímica anti-IL-5. Cortes longitudinales de médula espinal. a) 60 días después de sección completa. b) 60 días después de la contusión medular. c) 7 días después de la contusión medular. Fotografías representativas en objetivo 40X justo en el lugar de lesión.

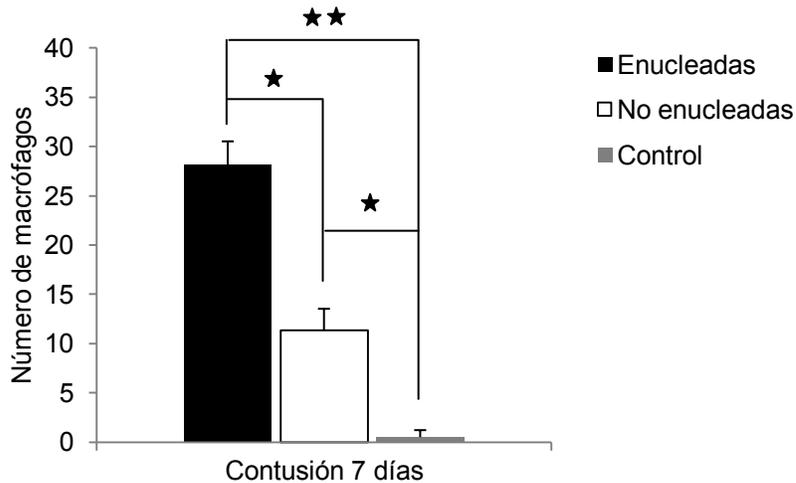
Histología del tejido medular en el área de lesión

Debido a que la diferencia significativa, en la expresión de citocinas, entre los grupos de enucleadas y no enucleadas se observó a los 7 días después de la contusión medular, se eligieron estos cortes para realizar tinciones histológicas con la técnica de Kluver Barrera, la cual evidencia mielina, núcleos celulares y vasos sanguíneos. Para el análisis, todas las imágenes se tomaron a nivel de lesión y por medio de esta tinción se identificaron y cuantificaron dos tipos celulares, por un lado los linfocitos se evaluaron como células con núcleo grande y redondeado y en los macrófagos se observaron restos de mielina en el citoplasma (Fig. 11).

Los resultados muestran una cantidad significativamente aumentada de linfocitos (Fig. 10a, $p=0.020$) y macrófagos (Fig. 10b, $p=0.0001$) en ratas enucleadas y no enucleadas que en ratas sin lesión. De igual forma, la cantidad de linfocitos presentes en el tejido no muestran diferencia significativa entre la condición de ratas enucleada y no enucleada, sin embargo si es mayor la cantidad de macrófagos en el tejido después de la lesión en médula espinal en ratas enucleadas que en ratas sin enuclear (Fig. 10b, $p=0.0023$).



(a)



(b)

Figura 10. Cuantificación celular en el tejido de ratas sacrificadas 7 días después de contusión en ME. A) Número de linfocitos en el tejido de ratas enucleadas (n=7) y no enucleadas (n=8). B) Número de macrófagos en el tejido de ratas enucleadas (n=7) y no enucleadas (n=8). Los animales fueron perfundidos y la médula espinal extraída y posfijada; cortes de 5µm fueron obtenidos por congelación. Las barras representan el promedio de células encontradas justo en el área de lesión. Mediante la prueba t-Student se evidencio diferencias significativas *p<0.05 **p<0.001.

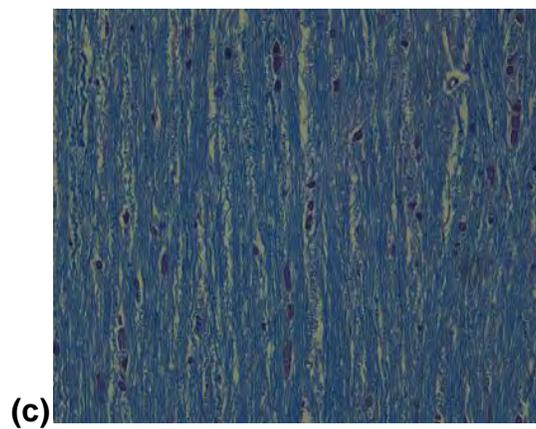
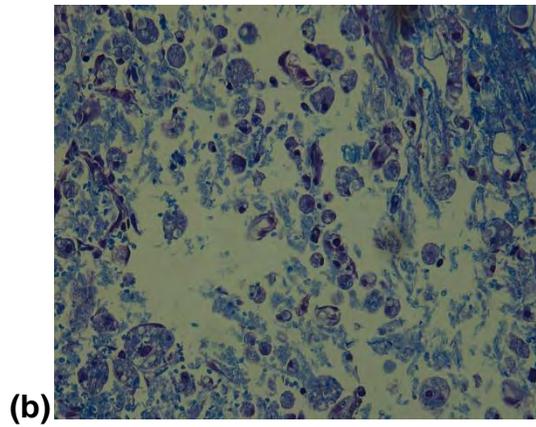
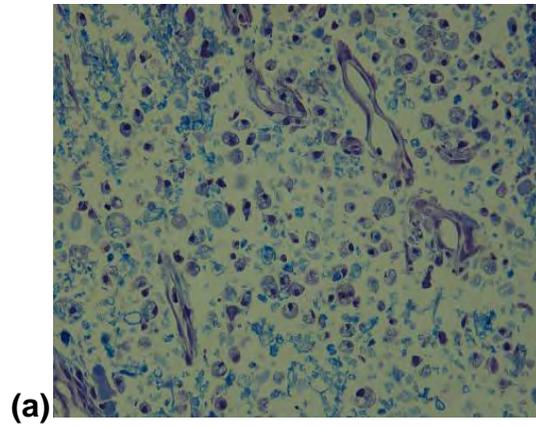


Figura 11. Tinción de Kluver-Barrera en cortes longitudinales de médula espinal 7 días después de contusión. a) Rata enucleada. b) Rata no enucleada. c) Rata sin lesión alguna. Fotografías representativas justo en el lugar de lesión, objetivo 40X.

Discusión

Se realizó este estudio para caracterizar la presencia de citocinas en tejido medular de ratas enucleadas y no enucleadas con LME, además de detectar la presencia de células del SI en dicho tejido, lo cual proporciona información adicional a la hipótesis de que la presencia de las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias cambia después de una LME, cuando esta es precedida por otra lesión en un lugar diferente del SNC, en este caso, el nervio óptico.

Los antecedentes acerca del desarrollo de una lesión en médula espinal dan lugar a estrategias farmacológicas que han tenido efectos variados, sin embargo estudios sobre inmunoterapias argumentan que la diferencia de resultados, se debe al tipo de linfocitos T que se diferencia en el transcurso de la lesión y la expresión alterada de las citocinas pro-inflamatorias.

Un trabajo del equipo de Schwartz en 2001 muestra que la acumulación de linfocitos T en un sitio lesionado del SNC aumenta significativamente tras la inyección de linfocitos T activados con varios antígenos, sin embargo solo los linfocitos T autoinmunes contra componentes del propio SNC protegen a las neuronas de la degeneración secundaria después de la lesión³⁸. Además, el trabajo de Yoles determina que el número de neuronas sobrevivientes después de una lesión en el nervio óptico de ratas es más alto si a esta lesión le precede una contusión en médula espinal¹⁵. Estos resultados sugieren que una lesión en el SNC evoca una respuesta neuroprotectora que proporciona una mejoría en una lesión subsecuente en otro sitio del SNC siendo esta respuesta mediada por linfocitos, citocinas y factores de crecimiento.

En base a las investigaciones que plantean que la inmunización con linfocitos T activados con PBM resultan benéficas histológica y conductualmente en lesiones de SNC³², nosotros suponíamos que la enucleación sería un tipo de inmunización que resultaría benéfica ante una LME posterior. La enucleación inicia la desmielinización del nervio óptico, esto libera proteínas de mielina que al ser removidas por las células dendríticas y los macrófagos son presentadas como antígenos a los linfocitos T, los cuales establecen una respuesta inmune que permite la permanencia de linfocitos de

memoria. Estos linfocitos tras una segunda exposición al mismo tipo de antígenos inician su activación, proliferación y diferenciación. Sin embargo estas características de activación, la expresión de citocinas y el perfil inmunológico que se diferencia aun no se conoce, por ello este estudio pretende determinar el perfil inmunológico de ratas con LME y si este cambia por una enucleación previa que actuaría como inmunización al nacimiento. Desafortunadamente, nuestro modelo promueve el desarrollo de un perfil inmunológico que no responde de manera efectiva para que los animales recuperen la función motriz de las extremidades posteriores, después de la lesión en médula espinal.

Los resultados de nuestro trabajo mostraron que a los 60 días después de la sección completa de ME, solo la expresión de la citocina IL-4 es mayor en ratas que fueron enucleadas al nacimiento que en ratas no enucleadas, lo que puede indicar que la enucleación si promueve una respuesta anti-inflamatoria a largo plazo, que pudiera resultar benéfica en cuanto a la conservación del tejido medular y la neuroprotección que brinda la respuesta Th2, en función de que la IL-4 inhibe la producción de óxido nítrico, la síntesis/secreción de citocinas pro-inflamatorias características de la respuesta Th1 e incrementa la producción del factor de crecimiento nervioso en los astrocitos⁴⁵. Además, un estudio muestra que al inyectar anticuerpos neutralizantes contra IL-4 dentro de la médula espinal después de una contusión en ratas se forma una cavitación más extensa a cuatro semanas después de la lesión, lo que indica que esta citocina también regula la actividad de los macrófagos que participan en la formación de cavidades en el tejido medular⁵⁰, mientras que en otros estudios se administra esta citocina a ratones susceptibles a la enfermedad desmielinizante EAE, que han desarrollado la enfermedad, induciendo una respuesta inmune adaptativa dominada por células Th2, que minimiza la desmielinización y las consecuencia clínicas de la EAE; de igual forma, en condiciones *in vitro* IL-4 inhibe la actividad fagocítica de los macrófagos y Butovsky observa que la microglía de ratones adultos activada con IL-4 muestra una diferenciación hacia oligodendrocitos²⁷.

Esta mayor expresión de IL-4 en ratas enucleadas a los 60 días de la sección completa en médula espinal nos estaría indicando que en estados crónicos de lesión, la

expresión de citocinas cambia a una respuesta anti-inflamatoria debido a la enucleación previa, pero sin promover una mejoría en la actividad motriz. Esto coincide con el trabajo de Martiñon que reporta que la respuesta autoinmune y la respuesta motriz se ven reducidas según aumenta el grado de lesión en la ME⁴⁸ en particular animales con sección completa donde no se ha observado una reconexión funcional de las fibras nerviosas.

Nuestros resultados también revelan que 60 días después de una contusión moderada en la médula espinal la enucleación neonatal no modifica el perfil inmunológico de las ratas después de la lesión medular lo que nos lleva a pensar que en condiciones de lesión moderada crónica se requiere la presencia de ambas células Th1 y Th2 ya que como plantea un estudio *in vivo* con ratones establece que estas dos sub-poblaciones celulares son necesarias al mismo tiempo pero en diferentes etapas de la lesión para observar una renovación celular en contusión de médula espinal⁴⁹, además *in vitro* se ha observado que estos dos grupos celulares de Th en conjunto potencian la regeneración porque las células Th1 podrían ser las primeras en migrar al sitio de lesión y soportar la neurogénesis, mientras que las células Th2 pueden colaborar en la mielinización de las neuronas recién formadas²⁷. De igual forma, podemos suponer que esta expresión se debe a que las sub-poblaciones Th1 y Th2 están en equilibrio debido a la condición crónica o bien, que estas citocinas las producen la microglia y los astrocitos que se encuentran en el sitio de lesión ya que un estudio *in vitro* muestra que el perfil inmunológico de la microglia en estados crónicos (meses o años) después de lesión medular en humanos es pro-inflamatorio³⁹, también se conoce que las citocinas generadas en el área circundante del daño entran por la barrera hematoencefálica al ser permeable mínimo un mes después de la lesión⁹, apoyando esta idea se ha reportado que los linfocitos diferenciados alcanzan un pico de expresión 7 días después de la lesión⁷, entonces a este tiempo la diferenciación de los linfocitos T es mínima y las citocinas que se expresan provienen de otras fuentes celulares. Sin embargo, no hay ningún reporte que muestre la expresión de citocinas pro-inflamatorias 60 días después de una LME *in vivo*.

En los resultados 7 días después de la contusión moderada se observa un perfil inmunológico pro-inflamatorio en las ratas enucleadas en comparación con ratas no enucleadas sin embargo, no hay diferencia entre estas dos condiciones en la evaluación motriz. Los estudios que observan una clara expresión de estas citocinas en estados agudos de lesión indican que la función de IL-2 además de proporcionar la señal esencial para la migración de los linfocitos promueve su diferenciación a células Th1 las cuales mejoran la recuperación motriz después de una lesión en SNC, por ejemplo, la transferencia de células Th1 4 días después de la lesión medular en ratones mejora la actividad motriz, la sensibilidad táctil e induce el re-crecimiento del tracto cortical además determinan que los linfocitos Th1 secretan niveles significativamente más altos de neurotrofina-3 (NT-3) que los linfocitos Th2 lo que proporciona efectos neuroprotectivos³⁶.

Otro aspecto importante de los resultados a los 7 días de la contusión, es la expresión de IL-5 que esta disminuida en ratas enucleadas en comparación con las no enucleadas lo que puede contribuir a una activación disminuida de los basófilos y a su vez una limitación en la expansión del daño tisular, además esto concuerda con el perfil pro-inflamatorio observado en estas ratas.

Estos niveles elevados de citocinas en las ratas con lesión en ME ya sea enucleadas o no en comparación con las ratas que no tienen ningún tipo de lesión, refleja un incremento en la activación de los linfocitos, los macrófagos y la actividad de las citocinas, controlando la comunicación celular entre las células inmunes, las células neurales y la microglia. En el SNC sin lesión, las citocinas se producen en bajos o incluso niveles no detectados, sin embargo después de la lesión las citocinas son reguladas positivamente y secretadas por varios tipos celulares en particular por los linfocitos. De esta forma, la respuesta inmune es modulada por las citocinas que también actúan como factores quimiotácticos para inducir la migración de los macrófagos al sitio de lesión, también la actividad fagocítica es así misma regulada por las citocinas.

Debido a que la microglia puede madurar en macrófagos capaces de secretar citocinas pro-inflamatorias (IL-1, TNF- α), anti-inflamatorias (IL-10, TGF- β), prostaglandina E,

quimiocinas⁴³ y funcionar como células presentadoras de antígenos que activan a las células T, nosotros además realizamos una cuantificación de los linfocitos y los macrófagos presentes justo en el sitio de lesión, para tener indicios de si las citocinas liberadas provienen en mayor medida de un grupo celular en particular y si la enucleación tiene algún efecto en la cantidad de los macrófagos que se observan a 7 días de la contusión en médula espinal. Este tiempo lo elegimos en base a los estudios que muestran que la infiltración de los linfocitos y los macrófagos ocurre entre el tercer y séptimo días después de la lesión⁹.

Nuestros resultados sobre la cuantificación de macrófagos indica que es mayor en ratas enucleadas la nacimiento, lo que concuerda con los resultados observados en la inmunohistoquímica donde solo después de la lesión inicia la activación de los linfocitos y los macrófagos por medio de la expresión de citocinas pro-inflamatorias; además la activación de la microglia por el IFN- γ resulta en un fenotipo citotóxico que se caracteriza por la producción de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α ó la IL-2, enzimas proteolíticas, la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS), quimiocinas, moléculas de adhesión además de cambios morfológicos y la inducción de la actividad fagocítica que durante la desmielinización hace posible la remoción de los desechos de mielina, los oligodendrocitos y las células T apoptóticas que también se considera una respuesta benéfica en cuanto a que facilita la resolución de la respuesta inflamatoria.

La fagocitosis de mielina se potencia por citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ y TNF- α) pero también por citocinas que son consideradas como anti-inflamatorias (IL-10)³⁹; una vez que los macrófagos fagocitan la mielina también atenúan la producción de mediadores citotóxicos, citocinas pro-inflamatorias y reguladores negativos en la diferenciación de oligodendrocitos⁴⁷ por esto se considera a los macrófagos necesarios en la reparación del SNC al contribuir en la regeneración neural mientras que otros grupos consideran predominante su papel en la muerte celular y en la desmielinización al estar presentes en grandes cantidades después de la lesión, persistir en ese sitio indefinidamente y al ser una población quiescente que se activan en varios momentos después de la lesión⁹

El mayor número de macrófagos que se observa en las ratas enucleadas se relaciona con el perfil inmunológico dominado por citocinas pro-inflamatorias en estos mismos animales debido a que los macrófagos proporcionan la señal de activación para los linfocitos mediante la expresión de moléculas de superficie y las citocinas que liberan, también pueden estar mediando los efectos regenerativos de las fibras mielinizadas como lo muestra un estudio que evalúa la respuesta inmune entre el nervio ciático (tejido del SNP) y el nervio óptico (tejido del SNC) lesionado donde se observa que los macrófagos se acumulan en mayor cantidad en el SNP que en el SNC, por esta razón, al menos en parte, es que ocurre la regeneración en los nervios periféricos, sumado a esto observan histológicamente que los macrófagos se encuentran en su mayoría en contacto con la vaina de mielina después de una lesión⁴⁴.

Así, tenemos estudios donde la respuesta inmune desarrollada después de la inmunización con péptidos derivados del SNC es capaz de minimizar la neurotoxicidad y otros mecanismos degenerativos, proporcionando incluso un ambiente permisivo para observar una regeneración axonal que se manifiesta por la recuperación funcional de los animales lesionados, en este trabajo observamos que a pesar de que las ratas enucleadas al nacimiento tienen un perfil inmunológico pro-inflamatorio a los 7 días de la LME, predominando la expresión de la IL-2, citocina que genera la activación y la proliferación de los macrófagos y linfocitos, estos cambios a nivel inmunológico e histológico, no propician una mejoría en el movimiento de las ratas lo que puede ser explicado por el subtipo de linfocitos Th que se diferencia el cual no es capaz, por sí mismo, de regular la respuesta de inflamación que puede persistir de forma variable debido a los efectos pleiotrópicos de las citocinas presentes en el lugar de la lesión así como la secuencia temporal en la que se expresan e incluso por factores genéticos y la edad del organismo.

La integración de las señales de las citocinas determina la naturaleza, la magnitud y la duración de las reacciones inflamatorias y el conocer si estas son pro-inflamatorias o anti-inflamatorias permitirá acercarse a una regulación de las propiedades neurotóxicas o neuroprotectoras de la respuesta inmune.

Conclusiones

Nuestro estudio muestra que la enucleación al nacimiento si induce un perfil inmunológico pro-inflamatorio y la activación de los macrófagos justo en el sitio de lesión en ratas contusionadas en médula espinal en etapas agudas.

Este perfil pro-inflamatorio caracterizado por la presencia de IL-2 no induce una mejoría en la actividad motriz de las ratas enucleadas sometidas a lesión medular.

Bibliografía

1. Bradbury EJ, McMahon SB. (2006) Spinal cord repair strategies: why do they work? Nature Reviews Neuroscience 7(August): 644-653
2. Michael-Titus A, Revest P, Shortland P. (2007) The nervous system. Edinburgh: Churchill Livingstone, Elsevier.
3. Zhou L, Chong MMW, Littman DR. (2009) Plasticity of CD4+T cell lineage differentiation. Immunity 30(May): 646-54
4. Shearer GM. (1997) Th1/Th2 changes in aging. Mechanisms of ageing and development 94: 1-5
5. Ransohoff RM, Benveniste EN. (2006) Cytokines and the CNS. Second edition. CRC Press Taylor and Francis Inc.
6. Sredni-kenigsbuch D. (2002) Th1/Th2 cytokines in the central nervous system. International Journal of Neuroscience 112: 665-703
7. Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. (1999) Autoimmune T cells Project neurons from secondary degeneration alter central nervous system axotomy. Nature medicine 5(1): 49-55
8. Lisak RP, Benjamins JA, Bealmear B, Nedelkoska L, Yao B, Land S, Studzinski D. (2007) Differential effects of Th1, monocyte/macrophage and Th2 cytokine mixtures on early gene expression for glial and neural-related molecules in CNS mixed glial cell cultures: neurotrophins, growth factors and structural proteins. Journal of Neuroinflammation 4(30): 1-20
9. Popovich PG, Stokes BT, Whitacre CC. (1996) Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible role for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. Journal of Neuroscience Research 45: 349-63
10. Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S. (2004) Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. Neurobiology of disease 15: 415-436

11. Chew SH. (2004) Phagocytosis of degenerating myelin in transected feline optic nerve: an immunohistochemical study. *Biotechnic and Histochemistry* 79(5): 177-183
12. Huang DW, McKerracher L, Braun PE, David S. (1999) A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* 24: 639-647
13. 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 alter corticospinal tract lesion in the spinal cord. *Molecular and Cellular Neurosciences* 23: 251-263
14. McKerracher L. (2000) Spinal Cord Repair: strategies to promote axon regeneration. *Neurobiology of Disease* 8: 11-18
15. Yoles E, Hauben E, Palgi O, Agranov E, Gothilf A, Cohen A, Kuchroo V, Cohen IR, Weiner H, Schwartz M. (2001) Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *Journal of Neuroscience* 21(11): 3740-3748
16. Ankeny DP, Popovich PG. (2008) Mechanisms and implications of adaptative immune response alter traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* XX.
17. Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. (2005) Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Neuroscience* 6(10): 775-784
18. Popovich PG, Longbrake EE. (2008) Can the immune system be harnessed to repair the CNS? *Nature Reviews Neuroscience* 9(June): 481-93
19. Jones TB, Basso 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. *Journal of Neuroscience* 22(7): 2690-700
20. Jones TB, Ankeny DP, Guan Z, McGaughy V, Fisher LC, Basso DM, Popovich PG. (2004) Passive or active immunization with MBP impairs neurological function and exacerbates. *Journal of Neuroscience* 24(15): 3752-61

21. Moalem G, Monsonego A, Shani Y, Cohen IR, Schwartz M. (1999) Differential T cell response in central and peripheral nerve injury: connection with immune privilege. The FASEB Journal 13(10): 1207-1218
22. Donnelly DJ, Popovich PG. (2008) Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. Experimental Neurology 209(2): 378-88
23. Hendrix S, Nitsch R. (2007) The role of T helper cells in neuroprotection and regeneration. Journal of Neuroimmunology 184: 100-112
24. Trivedi A, Olivas AD, Noble-Haeusslein LJ. (2006) Inflammation and spinal cord injury: infiltrating leukocytes as determinants of injury and repair processes. Clinic Neuroscience Research 6(5): 283-292
25. Kipnis J, Mizrahi T, Yoles E, Ben-Nun A, Schwartz M. (2002) Myelin specific Th1 cells are necessary for post-traumatic protective autoimmunity. Journal of Neuroimmunology 130(1-2): 78-85
26. Kipnis J, Mizrahi T, Hauben E, Shaked I, Shevach E, Schwartz M. (2002) Neuroprotective autoimmunity: Naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cell suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A. 99(24): 15620-5
27. Butovsky O. (2006) Microglia activated by IL-4 or INF- γ differentially induces neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. Mol. Cell. Neuroscience 31: 149-160
28. Yong VW, Marks S. (2010) The interplay between the immune and central nervous systems in neural injury. Neurology 5(74): 9-16
29. Liew FY. (2002) Th1 and Th2 cell: a historical perspective. Nature Reviews Immunology 2(1): 55-60
30. Wolf SA. (2002) Neuroprotection by T-cell depends on their subtype and activation state. Journal of Neuroimmunology 133: 72-80
31. Koeberle PD, Bahr M. (2003) Growth and guidance cues for regenerating axons: where have they gone? Journal of Neurobiology 59(1): 162-180
32. Hayes KC, Hull TC, Delaney GA, Potter PJ, Sequeira KA, Campbell K, Popovich PG. (2002) Elevated serum titers of proinflammatory cytokines and CNS

autoantibodies in patients with chronic SCI. Journal of Neurotrauma 19(6): 753-761

33. Xiao BG, Link H. (1998) Immune regulation within the central nervous system. Journal of Neurological Science 157: 1-12
34. Sobani ZA, Quadri SA, Enam SA. (2011) Stem cells for spinal cord regeneration: Current status. Surgical Neurology International 1(93):1-15
35. Popovich PG, Jones TB. (2003) Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. TRENDS in Pharmacological Science 24(1): 13-17
36. Moalem G, Gdalyahu A, Shani Y, Otten U, Lazarovici P, Cohen IR, Schwartz M. (2000) Production of Neurotrophins by Activated T cell: Implications for Neuroprotective Autoimmunity. Journal of Autoimmunity July(15): 331-345
37. Kil K, Zang YC, Yang D, Markowski J, Fuoco GS, Vendetti GC, Rivera VM, Zhang JZ. (1999) T cell response to myelin basic protein in patients with spinal cord injury and multiple sclerosis. Journal of Neuroimmunology 98 (2): 201-7
38. Schwartz M. (2001) Protective autoimmunity as a T-cell response to central nervous system trauma:prospects for therapeutic vaccines. Progress in Neurobiology 65(5): 489-96
39. Neumann H, Kotter MR, Franklin RJM. (2009) Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. Brain June(132): 288-295
40. 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. Journal of Neuroscience 20(17): 6421-30
41. Barouch R, Schwartz M. (2002) Autoreactive T cell induce neurotrophin production by immune and neural cells in injured rat optic nerve: implications for protective autoimmunity. FASEB Journal 16(10): 1304-6
42. Davies AL, Hayes KC, Dekaban GA. (2007) Clinical correlates of elevated serum concentrations of cytokines and autoantibodies in patients with spinal cord injury. Archives of physical medicine and rehabilitation 88(11): 1384-93

43. Arumugam TV, Granger DN, Mattson MP. (2005) Stroke and T-cell. Neuromolecular Medicine 7(3): 229-42
44. Zeev-Brann AB, Lazarov-Spiegler O, Brenner T, Schwartz M. (1998) Differential effects of central and peripheral nerves on macrophages and microglia. Glia 23(3): 181-90
45. Aloisi F, Serafini B, Adorini L. (2000) Glia-T cell dialogue. Journal of Neuroimmunology 107(2): 111-7
46. Merson TD, Binder MD, Kilpatrick TJ. (2010) Role of cytokines as mediators and regulators of microglial activity in inflammatory demyelination of the CNS. Neuromolecular Medicine 12(2): 99-132
47. Martiñón S, García E, Gutiérrez-Ospina G, Mestre H, Ibarra A. (2012) Development of protective autoimmunity by immunization with a neural-derived peptide is ineffective in severe spinal cord injury. PLoS One 7(2): 32027
48. Ishii H, Jin X, Ueno M, Tanabe S, Kubo T, Serada S, Naka T, Yamashita T. (2012) Adoptive transfer of Th1-conditioned lymphocytes promotes axonal remodeling and functional recovery after spinal cord injury. Cell Death and Disease 9(3): 363
49. Abbas AK, Lichtman AH. (2007) Cellular and molecular immunology. 6th edition. Saunders an imprint of Elsevier Science.
50. Lee SI, Jeong SR, Kang YM, Han DH, Jin BK, Namgung U, Kim BG. (2010) Endogenous expression of interleukin-4 regulates macrophage activation and confines cavity formation after traumatic spinal cord injury. Journal neuroscience Research 88(11): 2409-19
51. Schwartz M, Moalem G. (2001). Beneficial immune activity after CNS injury: prospects for vaccination. Journal of Neuroimmunology 113(2001): 185-192.