



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN

PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

CAMBIOS EN LA PRODUCCIÓN DE OXIDO NÍTRICO INDUCIDOS
POR LINFOCITOS T ACTIVADOS CON PÉPTIDOS NEURALES
MODIFICADOS EN CÉLULAS DE LA GLÍA: ANÁLISIS *In vitro*

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

HORTENSIA NAYELI FLORES MORÁN

TUTOR:

JOSE JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS

COMITÉ TUTORAL:

EMMA S. CALDERÓN ARANDA

SARA CABALLERO CHACÓN

MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la division de estudios de posgrado e investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autonoma de México, para que la tesis este disponible para cualquier tipo de reproducción o intercambio bibliográfico.

Hortensia Nayeli Flores Morán

DEDICATORIAS

A ti Dios que me diste la oportunidad de vivir, llenando mi vida de dicha, bendiciones y salud, además de regalarme una familia maravillosa.

A mis padres, Reibid y Neque a quienes agradezco de todo corazón su amor incondicional, confianza, apoyo y comprensión, en la realización de mis sueños además de enseñarme que los retos se ganan.

A mi hermano Ivanchu que a pesar de estar lejos, se que cuento con el.

A mis Aguelos López y anguelito negro a quienes agradezco su cariño, amistad, apoyo, consejos para realizar esta meta, la cual constituye una herencia. Abues gracias por hacerme reír y ser un ejemplo de vida lleno de amor.

A mis increíbles amigos: Elisa, Chabela, Vinni ósea todas las del club, Kako, por su confianza, apoyo y lealtad con quienes he compartido muchas aventuras y experiencias que siempre llevo en mi corazón, que enriquecen y alegran mi vida.

A mis amores Yusuke, Corazón Coraza, Mimpi, Chisai, Blacky, Alvara que han sido mi soporte y compañía durante todo este periodo, incluso en los momentos de angustia y desesperación. Gracias por mostrarme que la vida es para disfrutarla y ser feliz.

A mi director de Tesis Dr. Ibarra (Doki), de manera especial por las valiosas aportaciones, aliento, perseverancia y fortaleza.

Agradezco infinitamente el apoyo incondicional, confianza, consejos y paciencia que deposito en mí la Dra. Emma a la cual le tengo cariño, admiración y respeto.

A mis maestros por su disposición y por compartir conmigo sus conocimientos y su amor por la ciencia.

A Josecho (Cuyo), Daniela, Pati, Don-fide, Raúl y Lauc que me brindaron apoyo, amistad y animo sin ningún interés, sin poner nunca peros o darme negativas, sino todo lo contrario.

A mis amigos de cuatro patas que ni saben leer esto, pero que siempre les estaré agradecida ya que sin ellos no seria posible la ciencia.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización (compañeros de generación) de esta tesis al haberme brindado apoyo, colaboración, ánimo y amistad.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no se habría podido realizar sin la generosa colaboración de instituciones y personas prestaron su tiempo, conocimientos y experiencias con el fin de ayudar.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mi tesis.

A mis miembros de mi comité tutorial: Dra. Emma Calderón y Dra. Sara Caballero

A mis miembros de mi jurado: Dr. Carlos Gerardo García Tovar y Dr. Carlos Santoscoy Mejía por su apoyo y disposición.

Al Instituto Camina, por permitirme el uso de sus animales e instalaciones para este trabajo.

A personas muy especiales que me ayudaron mucho del Instituto Mexicano del Seguro Social como la Dra. Sandra Orozco, Dr. Pepe Moreno, Dr. Grijalva, Dr. Guizar y al mismo Instituto, por el uso de sus instalaciones.

RESUMEN

Diversas alteraciones del SNC que involucran procesos inflamatorios y mecanismos autodestructivos se asocian a la activación glial. Dicha activación induce en algunas de éstas células características inmunes propias de un macrófago que pueden exacerbar procesos destructivos, como la liberación de altas concentraciones de óxido nítrico (NO•). Las altas concentraciones de NO• permiten e incrementan la acción de diversos fenómenos como: estrés oxidativo y lipoperoxidación entre otros, que promueven daño al tejido neural. Por ello existen estrategias dirigidas para neutralizar dichos fenómenos. Entre éstas podemos mencionar a la inmunización con el copolímero-1 que ha demostrado reducir el daño neural, y se ha sugerido que su efecto es por medio de la modulación de una respuesta autorreactiva, denominada “autorreactividad protectora”. Actualmente no se conocen los mecanismos mediadores del efecto protector de dicha respuesta. De acuerdo a reportes recientes uno de los probables mecanismos es la disminución de la producción de NO• por la glía.

En este estudio se analizó la producción de NO• a las 48 horas por medio del método de Griess's en cocultivos de dos diferentes proporciones celulares 1:10 y 1:100 de células T de nodulos linfáticos y bazo procedentes de animales sensibilizados por Cop-1 y ovoalbúmina (OVA) con células de la glía respectivamente, que fueron activados *in vitro*, con sus correspondientes antígenos. Los resultados obtenidos con estos experimentos demostraron que los linfocitos T contra Cop-1 son capaces de disminuir en forma significativa las concentraciones del NO•. Los linfocitos T contra OVA disminuyeron en forma similar las concentraciones de esta especie reactiva. Deberán diseñarse nuevos experimentos para dilucidar el efecto real de la OVA sobre la producción de NO• por parte de las células gliales.

Palabras Claves: NO•, glía, Cop-1, neuroprotección, autorreactividad protectora

ABSTRACT

Diverse alterations of the central nervous system (CNS) that involve inflammatory processes and self-destructing mechanisms are associated to glial activation. Once activated, some of these cells acquire immunological features that can exacerbate neural damage. One of these harmful events is the abundant release of nitric oxide (NO•). This free radical is essential for the function of diverse processes, however; when the amount of this compound goes beyond of its physiological concentrations, NO• contributes to promote oxidative stress and, thus; lipid peroxidation. That is why, several strategies are directed to inhibit or diminish the release of NO• in different pathologies. Immunization with Cop-1 has demonstrated to reduce neural damage after CNS injury, and it has been suggested that its effect is through the modulation of an autoreactive response against neural constituents, the now called “protective autoimmunity” (PA). At the moment, there is not substantial evidence as to explain the way as PA is exerting its beneficial actions. According to recent reports, one of the probable protective mechanisms could be the inhibition of NO• release by glial cells.

In the present study, the production of NO• in the supernatant of cultured glial cells, was evaluated 48 h after lipopolisaccharide-induced activation. The final nitrite products of NO• were determined by means of the Griess’s method. After activation, glial cells were co-cultured with a pull of lymphatic node and spleen cells (LNSC) obtained either from Cop-1(LNSC-C) or ovalbumine (LNSC-O)-immunized animals. The activation of LNSC-C with Cop-1 induced a significant decrease in the release of NO• by glial cells. Nevertheless, LNSC-O apparently also induced a decrease in NO• production. This study suggests that, inhibition of NO• releasing could be one of the mechanisms exerted by PA to promote neuroprotection. Aside from this, the present work encourage to the design of new experiments in order to elucidate the real effect of LNSC-O on the production of NO•.

Key words: NO•, glía, Cop-1, neuroprotection, auto reactivity protector

ÍNDICE.

1. INTRODUCCIÓN	9
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1. Sistema Inmune.....	10
2.1.1. Inmunidad inespecífica o innata.....	11
2.1.2. Inmunidad específica o adquirida.....	16
2.1.2.1. Inmunidad celular.....	17
2.1.3. Inmunidad.....	18
2.1.3.1. Inmunidad pasiva.....	18
2.1.3.2. Inmunidad activa.....	18
2.2. Sistema Nervioso Central.....	19
2.2.1. Células gliales.....	19
2.2.1.1. Epéndimo.....	20
2.2.1.2. Oligodendrocitos.....	20
2.2.1.3. Astrocitos y Microglía.....	20
2.2.1.3.1. Astrocitos.....	21
2.2.1.3.2. Microglía.....	22
2.3. Fisiopatología de Lesión en Sistema Nervioso Central.....	27
2.4. Autorreactividad y Autorreactividad Protectora.....	31
2.5. Mecanismos Inmunoreguladores Originados Por Cop-1.....	34
3. JUSTIFICACIÓN	38
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
5. HIPÓTESIS	38
6. OBJETIVO GENERAL	38
7. OBJETIVOS PARTICULARES	38
8. MATERIAL Y MÉTODOS	39
8.1. Diseño experimental.....	39
8.1.1. Técnicas.....	41
8.1.1.1. Obtención de células gliales.....	41
8.1.2. Métodos de Evaluación.....	41
8.1.2.1. Proliferación celular.....	41
8.1.2.2. Determinación de NO•.....	42
8.1.3. Método estadístico.....	43
8.1.4. Consideraciones éticas.....	43
9. RESULTADOS	43
9.1. Proliferación celular.....	43
Proliferación celular de animales inmunizados con OVA.....	43
Proliferación celular de animales inmunizados con Cop-1.....	45
9.2. Evaluación de la producción de NO• en cocultivos.....	47
Cocultivos de animales inmunizados con OVA.....	47
Cocultivos de animales inmunizados con Cop-1.....	50
10. DISCUSIÓN	53
11. CONCLUSIONES	58
12. PERSPECTIVAS	59
13. ANEXOS	59
ANEXO 1. Obtención de células gliales.....	59
ANEXO 2. Obtención de células anti-OVA y anti-Cop-1.....	60
ANEXO 3. Proliferación celular.....	61

ANEXO 4. Determinación de Oxido Nítrico (NO•)	62
14. REFERENCIAS	62

LISTA DE CUADROS

Tabla 1. Proporciones celulares utilizadas en los cocultivos.....	39
Tabla 2. Dosis utilizadas para la sensibilización y activación de células anti-OVA y anti-Cop-1.....	40
Tabla 4. Condiciones para los cocultivos para Cop-1.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Propuesta de inmunomodulación inducida por Cop-1.....	37
Figura 2. Proliferación celular de animales inmunizados con OVA.....	44
Figura 3. Proliferación celular de animales inmunizados con Cop-1.....	45
Figura 4. Cocultivos de animales inmunizados con OVA 1:10.....	48
Figura 5. Cocultivos de animales inmunizados con OVA 1:100.....	49
Figura 6. Cocultivos de animales inmunizados con Cop-1 1:10.....	51
Figura 7. Cocultivos de animales inmunizados con Cop-1 1:100.....	52

1. INTRODUCCIÓN.

Los padecimientos neurodegenerativos son un problema de salud que aqueja a un gran número de individuos (Forman et al., 2004; Fridkis-Hareli et al., 1999). Por su forma de presentación y desarrollo se pueden clasificar en agudos y crónicos; los agudos incluyen todo aquel padecimiento neurológico de presentación súbita como la isquemia cerebral, trauma craneoencefálico, trauma medular (Liu and Martin, 2004; Nel and Slaughter, 2002). De tipo crónico están representados por patologías en las que el deterioro neurológico se presenta en forma progresiva y terminal como es el caso de la enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, Esclerosis Múltiple, Esclerosis Lateral Amiotrofica, enfermedad de Alzheimer, demencia por VIH, entre otras (Braak and Del, 2004; Fu et al., 2004; Gaitatzis et al., 2004; Johansen, 2004; Margolis et al., 2004; Pezzoli et al., 2004 ; Waring et al., 2004). En estos tipos de padecimientos se inducen procesos inflamatorios que incrementan la permeabilidad vascular o el rompimiento de la barrera hematoencefálica (BHE), permitiendo la salida de antígenos (Ag) neurales, moléculas y mediadores solubles, así como la activación inmunológica de células gliales y activación, migración e infiltración de linfocitos al sitio del daño. Esto permite la interacción de las células del sistema nervioso central (SNC) con las sistema inmune (SI); que puede resultar en la exacerbación del daño o en la protección y regeneración del tejido nervioso (Liao and Chen, 2001; Milner et al., 2005). La determinación de estas decisiones opuestas, no se conoce bien aun, pero se ha visto que puede estar dada por las diferentes formas de activación glial y ello determina la expresión, producción y liberación de citocinas, factores neurotróficos, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno como el NO•), así como el efecto de Ag y linfocitos autoreactivos; entre otros factores (Aschner, 1998; Enomoto et al., 2004). Por ello, se han realizado esfuerzos para encontrar tratamientos que disminuyan o eviten el daño y que además provean de elementos necesarios para la restauración del tejido, sin embargo las estrategias terapéuticas que existen hasta hoy para este tipo de padecimientos neurológicos no son lo suficientemente satisfactorias y sus resultados son muy limitados (Blesch and Tuszynski, 2004; Bloch et al., 2004; Brinton, 2004; Forman et al., 2004; Hoane, 2004; Maiese and Chong, 2004; Norflus et al., 2004; Poulter et al., 2004). Este tipo de tratamientos desde el punto de vista médico tiene un elevado costo por la implicación de recursos tecnológicos y posteriormente, por las

limitaciones para poder reintegrar a los pacientes a sus actividades productivas previas (Bedbrook, 1987; Stover and Fine, 1987). Actualmente, diversos grupos de investigadores han reportado que la modulación del escenario inflamatorio por medio de péptidos neurales modificados (PNM) puede promover neuroprotección, pero aun no se conocen los mecanismos exactos por los cuales se favorece la protección al tejido neural.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1. Sistema Inmune

Los seres vivos están defendiendo constantemente su integridad biológica por medio de un sistema de mantenimiento de la homeostasis, a través de la identificación de sustancias propias y detección de extrañas es decir antígenos (Ag) que tienen la capacidad de estimular al sistema inmune, este ha evolucionado mecanismos flexibles y dinámicos capaces de enfrentar y eliminar Ags específicos; para que esta defensa se lleve a cabo, dispone de un arsenal de elementos especiales, y para su estudio se ha clasificado en **inmunidad inespecífica y específica**, se sabe que hay una regulación integrada, coordinada y complementaria entre estas respuestas, generalmente suelen depender una de la otra para generar efectos máximos, formando redes de mutuo control, por medio de contacto físico o a través de factores solubles que ejercen funciones en células con receptores específicos (Abbas et al., 2000; Roitt et al., 1996).

Las células que constituyen el sistema inmune se organizan en tejidos y órganos, reciben el nombre genérico de sistema linfoide. El tejido linfoide es la base histológica del SI y está distribuido por todo el organismo con excepción del SNC. Los nódulos linfáticos y el bazo corresponden al tejido linfoide encapsulado que se interpone en el trayecto de la circulación linfática y sanguínea, respectivamente (Roitt et al., 1996).

Para que la respuesta inmune inicie, el organismo pone en marcha mecanismos que se activan y operan desde la primera vez, esto se conoce como inmunidad inespecífica y no requieren sensibilización previa con el Ag, ni se modifica significativamente con exposiciones repetidas durante la vida del individuo. (Abbas et al., 2000; Roitt et al., 1996).

2.1.1. Inmunidad inespecífica o innata

El sistema inmune está compuesto por una gran diversidad de células morfológica y funcionalmente diferentes, se diferencian a partir de células primordiales pluripotenciales, que bajo condiciones apropiadas pueden dar origen a todo tipo de células en la médula ósea mediante un proceso llamado hematopoyesis, de la cual derivan dos líneas de diferenciación. Las células que descienden de un progenitor del linaje linfoide y linaje mieloides, del último se origina gran parte de las células que intervienen en la inmunidad innata como mastocitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células dendríticas, monocitos y solamente las células asesinas naturales (NK) del inglés Natural Killer, que también forma parte de la inmunidad innata, derivan de la estirpe linfoide (Goldsby and Kindt, 2002).

Los monocitos tienen la capacidad de responder rápido, migrar, fagocitar y presentar el antígeno en vastas cantidades ante un estímulo. Para que las células puedan reclutarse a un sitio de lesión, deben extravasarse primero de los vasos sanguíneos a los tejidos en donde se favorece la permeabilidad de las monocapas endoteliales de arterias, capilares y vénulas. Para ello se desencadenan mecanismos de atracción celular, en donde intervienen tres fenómenos: motilidad (capacidad de moverse), locomoción (desplazamiento) y quimiotaxis (movimiento unidireccional siguiendo un gradiente de atracción creciente); se ha descrito, que productos del complemento (C3a y C5a) funcionan como sustancias quimiotácticas, así como factores producidos por linfocitos (factor activador de macrófagos, MAF) y leucotrienos (C4, D4 y E4) (Goldsby and Kindt, 2002; Roitt et al., 1996).

Los monocitos son células mononucleares grandes, miden de 12 a 20 μm de diámetro y casi todos los tejidos albergan una población de estos, en condiciones normales poseen rasgos morfológicamente distintos y se les conoce con nombres específicos dependiendo de su residencia, como: macrófagos (tejido conectivo), macrófagos alveolares (alrededor de membranas basales de vasos y pulmones), células de Langerhans (piel), células de Kuffer (hígado), osteoclastos (hueso), células mesangiales (glomérulos) y microglía (encéfalo), entre otros. Sin importar la localización o aspecto estas células son activadas por diversos estímulos; para ello, cuentan con un arsenal de receptores que incluyen a receptores para manosa (MR); receptores para manosas e integrinas (DEC-205), receptores para lipopolisacáridos (TLR) del

inglés Toll-like receptor), receptores para la proteína fijadora de manosa (MBPR) del inglés Mannose-Binding protein Receptor. También es reconocida por el receptor para C1q, receptores para inmunoglobulinas IgG (FcγR), receptores para complemento C3b (CR1) y C3bi (CR3); y tienen una familia de receptores llamados “basurero”, que por lo general reconocen ligandos de carga negativa como la fosfatidilserina localizada en células apoptóticas, lectinas, que se unen a carbohidratos y los marcan para su reconocimiento y posterior acción de la cascada del complemento; esto promueve el reclutamiento de macrófagos, NK y neutrófilos (Parslow et al., 2001).

Cuando estas células son activadas por medio de lipopolisacáridos (LPS), este se enlaza a TLR4 en una reacción facilitada por el CD14 y con ello se promueven el reclutamiento de proteínas adaptadoras MyD88 con su receptor. Este complejo recluta a su vez a algunas cinasas asociadas al receptor de IL-1 (IRAK1/IRAK4), durante la formación de este complejo IRAK4 se activa ocasionando la hiperfosforilación IRAK1, lo cual promueve la asociación de TRAF6 del inglés TNF-receptor associated factor 6 con el complejo, y ello causa cambios conformacionales en uno o más de estos factores, ocasionando su separación del complejo IRAK1/TRAF6 del receptor y su traslocación a la membrana donde interacciona con otro complejo preformado, compuesto por TAK1 (Tan et al., 1999), TAB1 (TAK1-binding protein-1) y TAB2. Esta interacción induce la fosforilación de TAB2 y TAK1, los cuales se traslocan al citosol, junto con TRAF6 y TAB1. El TAK1 es subsecuentemente activado en el citoplasma para activar a su vez al inhibidor de κB (IKB). El IKB inactivo secuestra al NF-κB en el citoplasma y su activación induce su fosforilación y degradación con la consecuente liberación de NF-κB. El NF-κB liberado se trasloca al núcleo donde se asocia a promotores de genes codificantes de citocinas como IL-1, IL-6, IL-12 (Abbas et al., 2004).

Poco después de la internalización de algún Ag, los macrófagos elevan rápidamente su índice metabólico, motilidad, actividad fagocítica y capacidad de presentar al Ag, para que esto se lleve a cabo, primero se desencadena la activación de la membrana y a medida que los receptores adyacentes se van adheriendo al ligando del Ag, se activa el sistema contractil de actina-miosina, generando la emisión de pseudópodos alrededor del Ag en donde se requiere la participación de microfilamentos, para el posterior englobamiento del Ag y la formación del

fagosoma, con ello se activa el ciclo de las hexosas monofosfato, generando nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato reducido (NADPH); los electrones pasan del NADPH a una flavoproteína de membrana que contiene flavina-adenina-dinucleótido (FAD) y de allí a un citocromo de membrana plasmática (cyt b₅₅₈, mV), lo que le permite reducir el oxígeno molecular directamente a anión superóxido (Abbas et al., 2002; Roitt et al., 2000). El anión superóxido se convierte en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por la acción de la superóxido dismutasa y luego en radicales hidroxilo (Woerly et al., 1999) todos ellos productos altamente reactivos. Además la combinación de peróxido, mieloperoxidasa e iones haluro constituye un poderoso sistema halogenador con capacidad de despolarizar colágena, oxidar lípidos y lesionar DNA. Aunque el H₂O₂ y los compuestos halogenados no son tan activos como los radicales libres, se difunden lejos y se pueden combinar, provocando efectos tóxicos lejanos (Roitt et al., 2000).

Simultáneamente, otro mecanismo que se genera es la liberación de un gas llamado óxido nítrico (NO●) del inglés Nitric Oxide, que tiene una vida media relativamente corta (5-10 s) y la máxima concentración esta en rango micromolar. Es un intermediario del metabolismo de L-arginina a L-citrulina en donde las sintasas del oxido nítrico (NOS) catalizan la oxidación de uno de los dos nitrógenos guanidínicos equivalentes a L-arginina aminoácido semi esencial, para producir NO● y L-citrulina (Schmidt et al., 1988). Otros sustratos requeridos son el oxígeno molecular (Dickey et al., 2004) y el NADPH. La formación de NO● resulta en dos pasos, y consiste en la oxidación de cinco electrones de L-arginina, dos electrones son provistos por el NADPH para producir N_G-hidroxi-L-arginina, seguida de una oxidación de tres electrones del nitrógeno hidroxilado para formar NO● (Brown, 1997).

Hasta el momento, han sido identificadas tres isoformas de NOS, constituidas por subunidades homodiméricas con pesos moleculares entre 125 y 155 Kda (Knowles and Moncada, 1994). La NOS I en neuronas (Kim et al., 2000), la NOS II- inducible (iNOS), presente en células que participan en la respuesta inflamatoria como monocitos y NOS III (eNOS), descubiertas principalmente en células endoteliales. Las isoformas neuronal y endotelial son activadas por calcio, pero la isoforma inducible es regulada a nivel transcriptional y es independiente a los

niveles de calcio intracelular. El NO sintetizado por la eNOS es responsable del mantenimiento del tono vascular y prevención de la adhesión de leucocitos y plaquetas a la pared vascular. El NO actúa como un modulador o neuromediador en algunas neuronas centrales y en terminaciones nerviosas periféricas no-adrenérgicas o no-acetilcolinérgicas (Guzik et al., 2003).

La magnitud y la duración de la síntesis de NO• por las células inmunes determinan que su acción sea fisiológica o patológica. Las acciones fisiológicas son mediadas por pulsos de pequeñas cantidades de NO•, que aumentan los niveles de cGMP a través de la nitrosilación del hemo de la guanilato ciclasa, produciendo la dilatación de vasos sanguíneos, la desagregación plaquetaria y la apertura o cierre de algunos canales iónicos (West et al., 2001). Las actividades patológicas son el resultado de la producción sostenida de altos niveles de NO• que pueden inactivar enzimas dependientes de hierro, involucradas en la respiración mitocondrial, producción de energía y replicación celular (Ignarro, 2002).

El NO•, debido a su bajo peso molecular (30 Da) y naturaleza lipofílica es altamente difundible a través de membranas lipídicas y al tener un electrón desapareado, se comporta como un radical libre y en consecuencia es muy reactivo; debido a esto, tiene una vida media de segundos, y es capaz de combinarse rápidamente con otros radicales libres como el superóxido para producir inicialmente el peroxinitrito, este anión es altamente oxidativo, capaz de oxidar tioles y bases de DNA, además de iniciar la peroxidación de lípidos independiente de la presencia de metales, también el NO• liberado, se puede descomponer para producir dos metabolitos estables, los radicales nitrito y nitrato, en una reacción que puede ser catalizada por metales de transición, incluyendo al hierro (Nicoitera et al., 1999).

No solo los eventos oxidativos participan en la degradación del Ag, ya que cuando se lleva a cabo la fusión de lisosomas con el fagosoma, el cual posee un pH 4.5, se activan enzimas que entran al fagosoma. La caída del pH se debe a la participación de un sistema enzimático de origen endosomal que funciona como una bomba de protones llamado sistema de proton-ATPasa. Los lisosomas son ricos en gránulos preformados, enzimas hidrolíticas,

proteasas, amilasas, ribonucleasas, desoxiribonucleasas, proteínas catiónicas y defensinas que son ricas en arginina, se insertan en el Ag para formar canales iónicos desestabilizantes, regulados por voltaje (Goldsby and Kindt, 2002). Así mismo, las membranas son lesionadas por acción de una proteinasa neutra, catepsina G y BP1 que aumenta la permeabilidad (Roitt et al., 1996). Finalmente los residuos del Ag digerido son arrojados al exterior de la célula y otros presentados a la célula T (Roitt et al., 2000).

Al mismo tiempo, la célula fagocítica produce cadenas proteicas y polimórficas necesarias para formar el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC clase-II), además de sus moléculas nodrizas, las calnexinas, que asisten a las enzimas y a la cadena invariable que funciona como un protector para el sitio de unión al Ag mientras es transportado por el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y la vesícula en donde el fagosoma se une a la vesícula que alberga al MHC II. La catepsina afecta también a la cadena invariable, degradándola y dejando sólo un residuo de 10 a 34 aminoácidos de longitud aproximadamente en el sitio de unión del Ag llamado péptido invariable ligado a MHC (CLIP) del inglés class II-associated invariant chain peptide (Goldsby, 2000). Este péptido será desplazado gracias a la ayuda del HLA-DM permitiendo finalmente la integración del péptido antigénico al sitio de unión. Una vez unido el complejo Ag--MHC clase-II, se desplaza la vesícula hacia la superficie de la membrana, con la cual se fusiona, dando así lugar a la presentación del Ag, el cual podrá ser reconocido por el linfocito CD4+ a través de su TCR. Subsecuentemente, se incorpora la expresión de moléculas coestimuladoras y de adherencia como CD22, CD72, CD86, CD80, CD40, ICAM-1, ICAM-2, LFA-3 en la célula presentadora del Ag (CPA) (Roitt et al., 1996) y CD45, CD5, CD3, CD28, CTLA-4, CD4, CD40L, LFA-1 LFA-2 del T CD4+ específicas. Ello permite una mejor interacción con los linfocitos T y activación de vías de señalización que inducen la expresión de una gran variedad de genes que intervienen en la producción de interleucinas y de algunos receptores para estas, que incluyen IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-2, TNF- α , además de interferones (INF- α , INF- β), quimiocinas, metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas, leucotrienos), factores estimulantes de colonias (GM-CSF) del inglés granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; (M-CSF) del inglés mononuclear phagocyte colony-stimulating factor; (G-CSF) del inglés granulocyte colony-stimulating factor, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor activador de plaquetas (PAF) del inglés

platelet-activating factor, factor β transformador de crecimiento (Yamagiwa et al., 2001), factores de angiogenesis, C1 a C9, properdina, factor B, D, I y H, así como síntesis de diversas enzimas como las NOS (Abbas et al., 2002; Goldsby and Kindt, 2002). Evidentemente, en el caso de activación, proliferación y diferenciación, se genera paralelamente una subpoblación de linfocitos de memoria (Abbas et al., 2002; Roitt et al., 1996)

Todos estos factores tienen un impacto en la respuesta inflamatoria, ya sea en la iniciación, en su mantenimiento o en la exacerbación, (Allen et al., 1999) Pero si tales señales no interactúan al tiempo en que se está produciendo la interacción específica TCR-péptido-MHC, se induce un estado de incapacidad de respuesta inmune que se denomina anergia, y se manifiesta en tolerancia inmunológica hacia el estímulo antigénico (Abbas et al., 2002).

2.1.2. Inmunidad específica o adquirida

En la respuesta específica participan linfocitos, anticuerpos y citocinas. Especialmente, de linaje linfóide derivan los linfocitos B y T (tanto cooperadores T_h , como citotóxicos T_c), excepto los linfocitos NK, que son de linaje linfóide, pero tienen actividades mayoritariamente inespecíficas.

La inmunidad específica se divide en dos subtipos: la inmunidad humoral y la inmunidad celular, trabajan en conjunto, permitiendo así una respuesta coordinada.

- **Inmunidad Humoral:** Mediada por anticuerpos y células B, es orientada al control de Ags extracelulares y toxinas.
- **Inmunidad Celular:** Mediada por células T, al sensibilizarse producen citotoxicidad, por un lado y citocinas por otro, induciendo un sistema macrofágico encaminado al control de Ags intracelulares (Rojas et al., 2007).

Los **linfocitos T y B vírgenes** miden unas 6 μm de diámetro, en ausencia del Ag específico, tienen vida corta (de unos días a pocas semanas) y son programados para apoptosis; en cambio, si entran en contacto con el Ag, salen de la fase G_0 y entran al ciclo celular (G_0 - G_1 -S- G_2 -M). En la fase G_2 corresponden a linfoblastos (Teitelbaum et al., 1974), proliferan y finalmente se diferencian en dos subpoblaciones: **células efectoras:** de vida corta y **células de**

memoria: que se mantienen en G_0 , con una vida larga y algunas duran toda la vida del individuo (Abbas et al., 2002; Roitt et al., 1996; Rojas et al., 2007).

2.1.2.1. Inmunidad celular

Las células T son las orquestadoras del sistema inmune, la restricción de estas por el haplotipo propio del MHC hace que sólo puedan reconocer al Ag cuando se presenta como péptidos, de manera lineal por MHC propio de una célula (de clase II para los linfocitos $CD4^+$, y de clase I para los linfocitos $CD8^+$). Los Ag exógenos se procesan por la ruta endocítica y los Ag endógenos se procesan por la ruta citosólica, que se unirán a moléculas MHC de clase II y a moléculas de MHC de clase I respectivamente (Roitt et al., 2000).

La activación de las células T $CD4^+$ inducen la transducción de señales por medio de una serie de proteína-quinasas y proteínas fosfatasa, que culminan con la activación y expresión de diversos genes, entre los que se encuentran el gen IL-2 y su receptor. La secreción autocrina de IL-2 por los linfocitos Th hace que salgan de la fase G_0 y entren progresivamente al ciclo celular, provocando con ello, la proliferación y diferenciación de los linfocitos T en dos subpoblaciones: una de células efectoras (Th) y Th de memoria (Goldsby and Kindt, 2002).

Se ha acumulado evidencia, que las células T $CD4^+$ presentan dos subpoblaciones, una llamada Th1, clásicamente denominada "inflamatoria" y Th2 "antiinflamatorias", además las citocinas producidas por el subtipo Th1 inhiben a el subtipo Th2 y viceversa. Dichas subpoblaciones se desarrollan a través de una ruta que se bifurca y adquieren las siguientes características:

- Las células Th1 producen $IFN-\gamma$, $TNF-\beta$ y IL-2 que activan a los macrófagos, la producción de IgG2 que es opsonizante, anticuerpos de fijación de complemento y anticuerpos involucrados en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (Mosmann et al., 1986). La diferenciación de este fenotipo es inducido por IL-12, $INF-\gamma$, IL-18 e $INF-\alpha$ (Abbas et al., 2002).

- Las células Th2 tienden a incrementar la producción de mastocitos y eosinófilos, además mejoran la producción de inmunoglobulinas incluyendo la IgE. Las células Th2 responden bien al Ag presentado por los linfocitos B y producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13 y con ello la inhiben varias funciones del macrófago (Abbas et al., 2002; Goldsby, 2000).

Las células Th1 y Th2 no solo producen distintos juegos de citocinas, que son discrepantes y resultan en distintas propiedades funcionales, sino que también expresan preferencia por algunos marcadores de activación, por ejemplo, el CD30 (Del et al., 1995) que se expresa mayormente en las células Th2 *in vitro* e *in vivo*. Mientras el gen de activación de linfocitos (LAG-3), miembro de la súper familia de las inmunoglobulinas, se asocia preferentemente a las células de clase Th1 (Romagnani, 1997).

2.1.3. Inmunidad

El término inmunidad comprende a todas aquellas propiedades del animal que le confieren resistencia a un Ag, la inmunidad puede ser pasiva o activa.

2.1.3.1. Inmunidad pasiva

La inmunidad pasiva es una forma de inmunidad adquirida a través de anticuerpos transferidos de forma natural a través de la placenta (transmisión congénita) o calostro y artificialmente es por medio de la transferencia de anticuerpos preformados, por medio de una inmunización que no activa el sistema inmunitario, no genera memoria y la protección que ofrece es transitoria.

2.1.3.2. Inmunidad activa

Consiste en conferir inmunidad protectora prolongada con memoria de manera natural como consecuencia de episodios infecciosos previos y se adquiere a lo largo de la vida o artificialmente mediante la inmunización, que desencadena una reacción inmunitaria intensificada, donde se genera la proliferación de células T y B reactivas contra el Ag (Abbas et al., 2002).

Existen múltiples evidencias de la importante comunicación y regulación que comparte el SI con otros sistemas como el SNC. Aunque el SNC está protegido por fuertes barreras anatómicas, existe una fuerte interacción entre el SNC y el SI (Roitt et al., 2000).

2.2. Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso es el rector y coordinador de todas las funciones, conscientes e inconscientes del organismo. El SNC comprende la porción cerebroespinal, integrada por una región central formada por dos segmentos principales: uno superior, el encéfalo, contenido en la cavidad craneana y otro inferior la médula espinal, albergada en el conducto vertebral (Gayton, 1994). Es un órgano relativamente impermeable, y esta característica esta dada por la barrera hematoencefálica (BHE), la cual regula y limita la entrada de células del SI periférico, además preserva la homeostasis del microambiente protegiendo al sistema de fluctuaciones de la composición del plasma, como iones, hormonas, entre otras. Sin embargo, esta característica no solo esta dada por la BHE sino también por células gliales, como los astrocitos quienes suprimen y anergizan las células T que irrumpen al SNC, limitando de esta manera la interacción entre el SI-SNC. Para compensar esta limitación hay células del SNC, cumplen funciones inmunológicas como la glía entre las cuales destaca la microglía y los astrocitos. No obstante las célula T activadas son capaces de penetrar la BHE (Wekerle et al., 1987; Hickey, 1991). Una evidencia de esto es que los Ags del SNC pueden ir en dirección opuesta (Cserr and Knopf, 1992), se ha comprobado en condiciones no patológicas la presencia de células T activadas pero solo permanecen las células capaces de reaccionar con Ags del SNC, de no ser así regresan a la circulación (Hickey et al., 1991).

Células gliales

Las primeras descripciones de estas células comenzaron a finales del siglo pasado, se estructuraron a principios del siglo XX y se atribuyeron al Español Pio Del Rio Hortega quien en 1919 desarrolló una técnica histológica a base de carbonato de plata, que permitió diferenciar la microglía de las neuronas en el cerebro de mamífero (Colton, 1995; Streit et al., 2004). Su número es variado, se encuentran entre 10 a 50 veces más células gliales que neuronas las cuales tienen interacciones entre si. Actualmente, el tejido glial se agrupa en:

- **Epéndimo:** Incluye todas las células endimarias: tanicitos, endimocitos y células de los plexos coroideos.
- **Macroglía:** Comprende los oligodendrocitos y astrocitos.
- **Microglía :** Las células microgliales propiamente dichas.

2.2.1.1. Epéndimo. Tapiza las cavidades del encéfalo y conducto central de médula espinal. Sus células poseen microvellosidades y cilios móviles que contribuyen al flujo de líquido cefalorraquídeo (LCR). Las células del epéndimo se pueden dividir en tres grupos:

1. **Ependimocitos:** Constituyen la mayoría de las células endimarias, revisten a los ventrículos encefálicos y el conducto central de la médula espinal. En el sistema ventricular se hallan en contacto con el LCR y pueden intercambiar de forma libre moléculas de diversos tamaños entre el LCR y el tejido nervioso adyacente.
2. **Tanicitos:** Se encuentran en el tercer ventrículo por encima de la eminencia media del hipotálamo. Tienen largas prolongaciones basales que pasan entre las células de la eminencia media y sitúan sus pies terminales en los capilares sanguíneos. Transportan moléculas desde el LCR hacia el sistema porta hipofisiario.
3. **Células epiteliales coroideas:** Cubren las superficies de los plexos coroideos, intervienen en la producción y secreción de LCR por estos e impiden su filtración hacia tejidos subyacentes

2.2.1.2. Oligodendrocitos: Se localizan generalmente a lo largo de fibras nerviosas y alrededor de los cuerpos neuronales, se clasifican en dos tipos:

1. **Los oligodendrocitos interfasciculares:** Son responsables de la producción y mantenimiento de las vainas mielínicas en los axones, cada uno puede formar varios segmentos internodales de mielina en el mismo axón o en axones diferentes, la vaina se alarga por la adición de lipoproteína que difunde en dirección lateral dentro del plasmalema y con rapidez se incorpora al resto de la superficie de la célula (Hiernan, 1998; Snell, 1994).
2. **Los oligodendrocitos satélites:** Circundan a las neuronas y proporcionan un soporte metabólico (Snell, 1994).

2.2.1.3. Los **astrocitos** y **microglía** se activan por mediadores de la inflamación en un gran rango de patologías del SNC ya que son muy sensibles a los cambios de microambiente que incluyen inflamación cerebral, trauma, isquemia, lesiones infecciones como meningitis,

infección por VIH (Minagar et al., 2002), malaria, así como de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson (Mena et al., 2002), Huntington, Esclerosis Múltiple (Dekeyser et al., 1999) y cáncer (Eddleston et al., 1993; Kreutzberg, 1996; Mucke and Eddleston, 1993). Esta activación glial tiene capacidad protectora, ya que puede destruir patógenos, remover detritus y promover reparación del tejido, sin embargo, el exceso en la activación puede ser deletérea (Banati et al., 1996; Bolanos et al., 1997; Bolanos and Almeida, 1999) ya que puede promover la muerte de neuronas en cocultivo (Hu et al., 1997; Asakura et al., 1999; Parker and Kingham, 1997; Sheng et al., 1998). Se ha sugerido que uno de los mecanismos incluye la liberación de NO•; (Bolanos and Almeida, 1999; DeNicola et al., 2000; Hu et al., 1997; Hu et al., 1998), otras especies reactivas de oxígeno (Beckman et al., 1994; Xu et al., 2001; Chao y cols., 1995; Lei y cols., 1997; Wei y cols., 2000), liberación de glutamato (Barger and Basile, 2001), TNF- α , IL-1 β (Chao et al., 1998; Viani et al., 1998), entre otras.

2.2.1.3.1. Los **astrocitos** son células con múltiples procesos finos, la cantidad de estos con respecto a las neuronas es de 10:1 y ocupan del 25 al 50% del volumen (Kimelberg et al., 1989; O'Kusky and Colonnier, 1982). Los astrocitos se clasifican en dos tipos, dependiendo de su localización:

1. **Astrocitos protoplasmáticos o tipo I:** Se encuentran principalmente en la sustancia gris, tienen muchas prolongaciones ramificadas que suelen extenderse hasta las paredes de los vasos sanguíneos en forma de pedicelos. De esta manera, participan en la regulación de uniones estrechas de células endoteliales de los capilares y vénulas que conforman la BHE, siendo potentes reguladoras en la microcirculación por medio del vasodilatador NO•.
2. **Astrocitos fibrosos o tipo II:** Predominan en la sustancia blanca y emiten prolongaciones que toman contacto con la superficie axonal en los nodos de Ranvier de axones miélinicos y suelen encapsular sinapsis químicas (Goldstein and Betz, 1986).

Los astrocitos interactúan de manera cooperativa con las neuronas y con otra glía, brindando soporte estructural; aportando nutrientes, ya que toman glucosa desde la circulación y la internalizan al parénquima cerebral además participan en el mantenimiento de ambiente

iónico, pues toman el exceso extracelular de K⁺ excretado por las neuronas activadas en condiciones normales y patológicas (Reichenbach, 1989), debido a que su potencial de membrana es más negativo que el de las neuronas. Expresan canales de K⁺ sensibles al voltaje, que se abren con potenciales de membrana más negativos (-80mV); también tienen participación en la regulación del pH; cuentan con numerosos receptores que se encuentran en el borde de la membrana que permiten la comunicación con diversas células y canales iónicos que han sido detectados tanto en astrocitos como en neuronas, asimismo recaptan neurotransmisores como glutamato y aspartato, de esta manera, evitan la excitotoxicosis (Bisceglia et al., 1998; Bonecchi et al., 1998). Tienen una función primordial en la preservación de la BHE (Tsacopoulos et al., 1997). Por otro lado, juegan un importante papel en infecciones y enfermedades autoinmunes ya que son parte de la BHE y contribuyen al paso limitado de células y moléculas, así como su participación durante la regeneración axonal y la formación de nuevas sinapsis. Por otro lado, se ha reportado que los astrocitos tienen una función dual ya que se puede ver involucrada en la recuperación o el desarrollo de complicaciones. Los astrocitos son células que tienen la habilidad de iniciar y amplificar la respuesta inmune (Dong and Benveniste, 2001; Pekny and Nilsson, 2005), es decir pueden participar en la respuesta innata y adaptativa están involucrados en las reacciones inflamatorias que se encuentran en el parénquima del SNC, así como en el reclutamiento y la activación de células inmunes periféricas (Belmadani et al., 2006; Benveniste et al., 2001; Dong and Benveniste, 2001; Felsner et al., 1992; Nguyen and Benveniste, 2000; Ogata et al., 1993; Ringheim and Conant, 2004). Se ha reportado que en condiciones patológicas secretan citocinas, NO•, además de tener la capacidad de presentar el Ag por medio de MHC clase II y expresar receptores tipo Toll-like como TLR2, TLR3 y TLR4 TLR5 y TLR9 que son esenciales en la inmunidad innata (Farina et al., 2007; Poltorak et al., 1998).

2.2.1.3.2. La **microglía** es parte del sistema inmune innato del SNC y fue definida como un macrófago residente, constituye el 12% de las células totales de este sistema (Del Rio-Hortega, 1932). Recientemente se ha establecido que la microglía se origina tanto del neuroepitelio, como de la médula ósea. Algunas células de la médula ósea adulta pueden ingresar al cerebro y aunque la mayor parte de ellas se diferencian a microglía, un pequeño porcentaje puede transformarse en astrocitos, evento desconocido en humanos (Bjorklund et al., 1987; Bjorklund and Stenevi, 1984). Se han

identificado tres estadios en la microglía : **1) microglía en reposo**, esta se encuentra en condiciones normales y se encuentra en estado de reposo inmunológico en donde adquiere una morfología caracterizada por estar ramificada con dos o más procesos (Banati et al., 1996), expresa marcadores CD11b, CD45^{low} y exhibe un bajo nivel de expresión de moléculas MHC clase II y moléculas coestimuladoras como CD86 y CD40. En este estadio, esta célula cumple funciones que contribuyen a la homeostasis del microambiente (Aloisi et al., 2000; Ruuls et al., 2001; Sedgwick et al., 1991). Por otro lado, la microglía neonatal *in vitro* es funcionalmente diferente a la adulta, ya que la neonatal no exhibe la morfología ramificada, pero si la ameboide (Dijkstra et al., 1992). La microglía frente a una respuesta inflamatoria, degradación neuronal, lesión o presencia de un Ag, adquiere propiedades fenotípicas y funcionales típicas de una macrófago tisular (Dylke et al., 2007; Streit, 2002) ; **2) microglía activadas** no fagocíticas, expresan bajo nivel de MHC clase II y moléculas coestimuladoras CD86 y CD40 y estas se han encontrado en áreas de inflamación (Kreutzberg, 1996) y **3) microglía reactiva**, microglía fagocítica con morfología ameboide y se han encontrado en áreas de traumas e infecciones, adquiere la capacidad de procesar y presentar el Ag a células T CD4⁺ (Olson et al., 2001). Se ha visto que la microglía puede estimular la diferenciación de células efectoras Th1 (Byram et al., 2004) y la proliferación de T CD8⁺ (Havenith et al., 1998) así como expresar altos niveles de moléculas MHC-I y MHC-II, receptores Fc (I-III), receptores del complemento (CR1, CR2, CR4), β -2 integrinas, ICAM-1 del inglés intercellular adhesion molecular-1, LFA-1 del inglés leukocyte function antigen-1 y moléculas coestimuladoras como CD40, CD54, CD80/CD86. Expresa diferentes TLR como: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 y TLR9 (Farina et al., 2007), liberan citocinas como IL-1- α , IL-6 y TNF- α que promueve la apoptosis en los oligodendrocitos (Alessandri et al., 2002; Ford et al., 1996; Ford et al., 1996). Liberan eucosanoides; componentes de la cascada del complemento, que incrementan la permeabilidad de la membrana, son quimiotácticas y provocan lisis de antígeno por medio del ataque a la membrana, liberan aminoácidos excitatorios como glutamato y aspartato, además de radicales libres de oxígeno y nitrógeno (Almeida et al., 2005; Banati et al., 1996; Benveniste et al., 1995; Kondo et al., 1995; Panek and Benveniste, 1995; Ranson et al., 1963; Rosenman et al., 1995). La microglía puede tener una acción dual después de una lesión, ya que activada en forma clásica (a través de sustancias químicas) produce una gran cantidad de compuestos tóxicos y contribuye al daño tisular y activa la respuesta adaptativa. Es

capaz de amortiguar las concentraciones de glutamato extracelular y producir factores neurotróficos como NGF y NT 4/5, factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) del inglés glial cell-line derived neurotrophic factor, factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) del inglés brain derived neurotrophic factor y factor de crecimiento nervioso (NGF) del inglés nerve growth factor, entre otros (Shaked et al., 2005; Shaked et al., 2004). Popovich (1997 y 2003) reporta que la microglía reactiva, se puede encontrar en ratas hasta dos a cuatro semanas, después de la lesión (Popovich et al., 1996; Popovich and Jones, 2003).

La microglía es más efectiva en el procesamiento y presentación del Ag que los astrocitos. En cocultivo de microglía con células T específicas contra proteína básica de la mielina (PBM,) resulta en cambios morfológicos así como una alta expresión de moléculas MHC clase II (Eugene y cols., 2005). Algunos experimentos comprueban la interacción, así como amplificación y regulación entre microglía-Th1 (Aloisi et al., 2000). También, estudios recientes demuestran la interacción de la microglía en reposo con células Th1, induciendo la expresión de MHC clase II, moléculas de coestimulación y adhesión. Por ello se ha sugerido que la infiltración de células Th1 periféricas estimula la maduración de microglía, la expresión de IL-12 y PGE2 en condiciones de cultivo; por otro lado, el INF- γ que es secretado por células Th1 induce la expresión de MHC clase II, CD86 y CD40 (Fischer and Reichmann, 2001) en microglía neonatal *in vitro* y *ex vivo* e induce la expresión de moléculas coestimuladoras y adhesión en microglía de ratón y humano (Aloisi et al., 1998; De et al., 1998; Shrikant et al., 1995; Shrikant and Benveniste, 1996). Por otra parte, la microglía aumenta fuertemente su habilidad para reestimar células Th1 y/o Th2 (Aloisi et al., 1998) y la activación de células T vírgenes (Cash and Rott, 1994). La activación de Th2 se da solo si hay previa activación de la microglía por medio de INF- γ sugiriendo que primero hay una infiltración de células periféricas Th1 al CNS, que inducen la maduración de la microglía y promueven en ellas la capacidad de CPA y así responder a células T CD4+ (Friedmann et al., 2001; Kipnis et al., 2002; Schwartz and Kipnis, 2002).

La función potencial de la microglía y los astrocitos no esta limitada a la presentación del Ag, ya que recientes estudios sugieren que están involucrados en la regulación de la inflamación, neuroprotección, remodelación tisular, y plasticidad, entre otras (Aarum et al., 2003;

Angelov et al., 2003; Lundin et al., 2003; Shaked et al., 2005). Se han asociado con demencia VIH, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, isquemia y lesión en medula espinal, entre otras (Aarum et al., 2003; Shapiro et al., 2005; Stoll et al., 1998; Wang et al., 2006) un ejemplo de ello es, que en cultivos de astrocitos y microglía se han identificado diversas moléculas con funciones trópicas como NGF, GDGF, factor neurotrófico ciliar (CNTF) del inglés ciliary neurotrophic factor, factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1) del inglés insulin-like growth factor 1 así como el factor M-CSF que está implicado en la proliferación y desarrollo de microglía, (Aloisi et al., 1999; Fischer and Reichmann, 2001; Illes et al., 2004; Liao and Chen, 2001; Santambrogio et al., 2001). También hay diversas evidencias en donde los astrocitos y microglía tienen la capacidad de expresar cNOS, iNOS y por lo tanto, liberación de NO• (Stefano et al., 2004). Como ya se había mencionado, el NO• juega un papel clave en la respuesta inmune. Bajas concentraciones el NO• es producido de manera constitutiva y neural; inhibe la expresión de moléculas de adhesión, síntesis de citocinas y quimiosinas, además tiene un papel en la neurotransmisión así como en la vasodilatación. Sin embargo, en grandes cantidades de NO•, generado principalmente por iNOS, puede ser proinflamatorio. El tema de la función de NO• es controversial, ya que se ha visto que este aporta beneficio así como prejuicios en el SNC (Penkowa et al., 2000; Sziraki et al., 1999). El NO• fisiológicamente está involucrado en la relajación de músculo liso, es neurotransmisor, juega un papel en la agregación y adhesión plaquetaria, además en la inflamación e inmunidad inespecífica; entre otras funciones. El NO• juega un papel en el SNC en la vasodilatación; puede contribuir con la transducción de señales; plasticidad sináptica ya que éste puede viajar desde la membrana postsináptica a la presináptica, participando en el fenómeno de potenciación de la actividad neuronal a largo plazo (LTP) por ejemplo en los casos de plasticidad neuronal asociada con el aprendizaje y la memoria (Dawson and Dawson, 1998; Knowles and Moncada, 1994; Lowenstein et al., 1993).

En contraste, diversos hallazgos revelan que grandes cantidades de NO• son liberadas por la glía y contribuyen a la degradación de los oligodendrocitos en enfermedades desmielizantes y en la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas (Galea et al., 1992; Jaffrey and Snyder, 1995; Koprowski et al., 1993; Lewitus et al., 2001; Mitrasinovic et al., 2005; Mitrovic et al., 1994). Hay diversos factores que inducen que la glía libere NO•; 1 ng/ml de LPS normalmente

es usado para desencadenar la inducción de la actividad enzimática de iNOs *in vitro* y algunas citocinas como IL-1 β e INF- γ , TNF en células de ratón así como de humanos (Heba et al., 2001). La expresión es regulada a nivel transcripcional y factores de transcripción que se unen a la región promotora del gen iNOs como NF-kB, STAT-1 e IRT-1 (Lowenstein et al., 1993; Xie et al., 1993).

El NO• en grandes concentraciones promueve mecanismos neurotóxicos, y se han postulado la activación de poly (ADP ribosa) polimerasa seguido por NAD⁺ y depleción de ATP y como consecuencia la activación de glicólisis y aumento de los niveles de lactato y por lo tanto la acidificación del ambiente celular con ello la inducción de apoptosis (Tamatani et al., 1998; Uehara et al., 1999). También modulan la liberación de glutamato por medio de sinaptosomas, causados por la inhibición de citocromo c (McNaught and Brown, 1998; Schuman et al., 1994; Trabace and Kendrick, 2000) y exitotoxicidad (Bogdan et al., 2000; Hewett et al., 1994) así como la inhibición de la respiración mitocondrial que puede gradualmente incrementar la sensibilidad de las neuronas a la toxicidad del glutamato (por la despolarización y remodelación de receptores NMDA) (Coyle et al., 1991). En este proceso NO• compite reversiblemente con el oxígeno por citocromo c oxidasa (Brown and Cooper, 1994). Además de la inhibición de mecanismos energéticos para la supervivencia neuronal (Bolanos et al., 1997; Brorson et al., 1999; Pauwels et al., 1985), en cultivos gliales de cerebelo, el NO• inhibe la mitogénesis y la proliferación celular mediante inhibición de la actividad mitocondrial, además puede actuar sobre la misma célula que la produce o cualquier célula proxima, regulando la expresión de algunas citocinas como el INF- γ . (Radi et al., 1991). Estudios en animales knockout para iNOS revelaron un papel importante de esta molécula en la inhibición de la producción de citocinas Th1 por los linfocitos T cooperadores (Taylor-Robinson et al., 1994).

Por otro lado, el NO• puede causar degeneración oxidativa, vía la formación de peroxinitrito cuando reacciona con iones superóxido (Aloisi et al., 1999; Carrizo et al., 1998; Dickey et al., 2004; Iadecola et al., 1997). Este puede ser considerado un marcador de estrés oxidativo e involucra la oxidación de lípidos, DNA y proteínas particularmente aminoácidos como cisterna, metionina, fenilalanina y tirosina así como, nitratar la tirosinasa previniendo la

fosforilación (Castegna et al., 2003) y con ello la muerte neuronal y puede causar modificación oxidativa. El peroxinitrito afecta el estatus de energía celular por la inactivación de enzimas mitocondriales, y promueve la liberación de calcio intracelular de la mitocondria e inhibe la actividad de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPasa}$ en la membrana y canales de potasio activados por calcio (Muriel and Sandoval, 2000). El cerebro es particularmente vulnerable a estrés oxidativo por que tiene una alta tasa metabólica, alto nivel de ácidos grasos poliinsaturados y un bajo nivel de antioxidantes. El NO y ONOO en grandes concentraciones, pueden actuar directamente sobre diferentes moléculas que intervienen en los procesos de señalización de las citocinas tales como: JAK, STAT, NFkB/IkB, MAPK, algunas proteínas G y otros factores de transcripción. Esto lo pueden hacer a través de la nitración de cisteínas en estas proteínas lo cual puede originar su activación o inactivación (Guzik et al., 2003).

2.3. Fisiopatología de Lesión en Sistema Nerviosos Central

En el momento de un traumatismo, se produce una lesión mecánica (lesión primaria) en donde se genera una pérdida de neuronas y glía que es ocasionada por el mismo trauma. El mecanismo de muerte celular prevaeciente es necrosis, es atribuido a una marcada disminución de aporte de energía, en especial de ATP circulante, debido a la hemorragia que se genera (Martins et al., 1975; Sandler and Tator, 1976). Ello lleva glucólisis anaeróbica e induce producción de lactato y la disminución del pH celular (Lemke et al., 1987; Young and Koreh, 1986), y la consecuente alteración en el intercambio de iones (Wyllie et al., 1980). La pérdida del tejido neural depende del grado de severidad y tipo de lesión, así mismo, la glía que sobrevive ante la lesión, experimenta déficit de glucólisis y de fosforilación oxidativa causando necrosis. En las regiones cercanas pero no impactadas, migran células gliales que limpian los detritus celulares, además se ha identificado que existe dominio de citocinas proinflamatorias liberadas por la microglía y astrocitos, como el TNF- α , IL-1 y IL-6 (Allan and Rothwell, 2001). Después de 15 minutos de la lesión los niveles de mRNA de TNF- α e IL-6 aumentan (Xu et al., 2001) y TNF- α e IL-1 son capaces de coestimular su producción (Pan et al., 2002) alcanzando picos máximos varias horas después y detectables a las 24 horas. Los niveles de TNF- α continúan incrementándose despues la primera semana posterior a la lesión (Tyor et al., 2002) y como consecuencia ocurre una intensa infiltración leucocitaria (Popovich and Jones, 2003). El TNF- α e

IL-1 β incrementan la respuesta inflamatoria por la vía del factor nuclear κ B (NF κ B) (Allan and Rothwell, 2001) que se activa en neuronas, microglía, astrocitos y células endoteliales (Bethea et al., 1998) y NF κ B estimula la producción de citocinas, especies reactivas de oxígeno y NOS (Allan et al., 2001; Bethea et al., 1998; Kim et al., 2000) en la primera hora después de la lesión (Dusart and Schwab, 1994). Con ello se altera la función de la BHE y así contribuye a la primer vía de desmielinización no específica, dañando las vainas de mielina, axones así como promoviendo directamente la muerte de los oligodendrocitos (Parkinson et al., 1997). La vía del NF κ B resulta en altas concentraciones de ATP extracelular que, vía un mecanismo calcio dependiente, aumenta la sobre producción de la proteína microglial AIF-1 (del inglés allograft inflammatory factor 1), que activa a más células de la microglía (Schwab et al., 2001; Tanaka and Koike, 2002). Esta activación se puede dar en sitios distantes a la lesión primaria (Katayama et al., 1995), es decir promueve la migración de estas al epicentro de la lesión.

Subsecuentemente, se desencadenan una serie de mecanismos autodestructivos (lesión secundaria) que pueden expandirse y originar mayor destrucción en el parénquima y pérdida neuronal con secuelas a largo plazo (Balentine, 1978; Goodkin and Campbell, 1969; Lemke et al., 1987). El primer mecanismo que aparece después de la lesión primaria, es la pérdida de la regulación iónica, incrementándose la concentración de los iones de Na⁺ y Ca²⁺ intracelulares y disminuyendo los iones de K⁺ y magnesio (Mg); esto lleva a una despolarización en la membrana neuronal y además se produce daño de la bomba Na + K⁺ ATPasa, lo cual provoca inestabilidad iónica extracelular (Astrup y cols, 1981), es decir ingreso de Na⁺ y agua al citoplasma causando edema y lisis celular (Hewett et al., 1994).

El exceso de Ca²⁺ libre intracelular activa las proteasas neutras que promueven la degradación de membranas, producción de radicales libres, desacople de la fosforilación oxidativa (Brott and Bogousslavsky, 2000), además estas enzimas destruyen los neurofilamentos, parte fundamental del citoesqueleto axonal, observándose en las primeras horas o días poslesión un colapso y fragmentación axonales (Siegel et al., 2005). Con ello se produce un aumento de las demandas funcionales que tiene una gran repercusión en la integridad axonal. Además, el Ca²⁺ libre también activa a fosfolipasas que actúan sobre la mielina destruyéndola

(Balentine, 1988). Así mismo se observa liberación de glutamato y aspartato en grandes cantidades, como resultado de la entrada masiva de Ca^{2+} , provocando excitación intensa en neuronas viables, efecto tóxico que se conoce como excitotoxicidad (Faden and Simon, 1988). En estas condiciones las células gliales interaccionan de manera cooperativa con las neuronas, especialmente astrocitos que participan en el ciclo glutamato-glutamina. (Balazs et al., 1970; Wu et al., 1991), los astrocitos toman el exceso de glutamato extracelular por medio de transportadores para glutamato (EAAT, GLAST, GLT), y su gradiente químico es de 3Na^+ , 1H^+ dentro y 1K^+ fuera, por cada glutamato tomado (Anderson and Swanson, 2000; Westergaard et al., 1995) resultando en un incremento en Na^+ (Anderson and Swanson, 2000; Sonnewald et al., 1995). El glutamato internalizado es convertido a glutamina por medio de la glutamina sintetasa, dependiente de ATP, enzima localizada exclusivamente en los procesos astrocíticos (Kimmelberg and Norenberg, 1989). Posteriormente la glutamina es liberada y tomada por la neurona, en la terminal presináptica, la glutamina es convertida a glutamato por medio de la glutaminasa, una enzima fosfato dependiente preferentemente localizada en el sinaptosoma mitocondrial (Yudkoff et al., 1989). El nuevo glutamato sintetizado es empaquetado dentro de vesículas y posteriormente liberado (Schaad et al., 1990; Akaoka et al., 2001; Gras et al., 2003; Kondo et al., 1995; Liao y Chen, 2001; Lopez-Redondo et al., 2000; Pitt et al., 2003; Rodriguez-Kern et al., 2003; Swanson et al., 1997; Landeghem et al., 2001; Zelenia et al., 2000), sin embargo los transportadores o el ATP no son suficientes para disminuir las concentraciones dañinas de los neurotransmisores, desencadena entonces la excitotoxicidad neuronal y oligodendroglial. Estos últimos son muy susceptibles ya que carecen de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y los receptores que tiene son muy permeables Ca^{2+} (Puchalski et al., 1994). Otro mecanismo de la lesión secundaria es la neurotoxicidad causada por el ataque de los radicales libres (RL) al tejido nervioso atacando a lípidos causando lipoperoxidación, oxidación de proteínas, el DNA y el RNA y provocando mutaciones o daños irreversibles que llevan a la muerte celular (de Zwart et al., 1999). Otra molécula que es producida por diferentes tipos celulares después de una alteración y que puede dañar el parénquima es el $\text{NO}\bullet$ (Hamada et al., 1996; Hamada et al., 1996). El Ca^{2+} a su vez activa a la oxido nítrico sintasa constitutiva (cNOS, del inglés constitutive nitric oxide sintase), a través de la activación de los receptores del tipo receptor NMDA por acción del glutamato y se abren canales de Ca^{2+} acoplados al receptor, así como canales sensibles a voltaje, aumentando la concentración de Ca^{2+} intracelular que incrementa la actividad de la isoforma nNOS

postsinápticamente, originando un incremento en síntesis de NO•. Existen evidencias indirectas de que este mecanismo es dependiente de glutamato, el cual tras ser liberado en el espacio intersináptico actúa sobre sus receptores del subtipo del NMDA (Canh et al., 2006; DeBoy et al., 2006).

Después de una lesión, el NO• incrementa sus concentraciones por la actividad de la iNOS; a diferencia de las sintetas constitutivas, la iNOS es regulada principalmente a nivel transcripcional y Ca²⁺ independiente, además produce NO• en mayores cantidades y por tiempo más prolongado (Guzik et al., 2003). Es por ello que el NO• generado por iNOS, ha sido relacionado de manera más importante con procesos inflamatorios y neurotóxicos. La fuente principal de NO• es la microglía, macrófagos y astrocitos. La inducción de iNOS y la presencia de L-arginina son suficientes para iniciar la generación de NO•. Esta inducción de iNOS puede ser iniciada por citocinas inflamatorias como IFN-γ, TNF-α o IL-1-β (Heba et al., 2001), pero cabe mencionar que uno de sus mejores inductores es el LPS e inhibida por glucocorticoides y algunas citocinas, como TGF-β, IL4 o IL10, (Guzik et al., 2003). Como se mencionó anteriormente, el NO• reacciona con el anión superóxido para formar peroxinitrito (O₂⁻ + NO• → ONOO⁻). A pH fisiológico el peroxinitrito reacciona con proteínas, fosfolípidos, o bien se descompone en productos citotóxicos como ion nitronio (NO₂⁺), bióxido de nitrógeno (NO₂) y radical ·OH. Así parte de la toxicidad del NO• puede deberse a su interacción con O₂⁻ (Packer and Murphy, 1994). Adicionalmente, se sabe que el NO• desacopla la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, produciendo aun más radicales libres (Siegel et al., 2005). Además el NO• tiene un efecto directo sobre aquellas enzimas en cuyos centros catalíticos existe hierro/sulfuro, como son la ribonucleótido-reductasa, en la síntesis del ADN y tres enzimas mitocondriales contenidas en el ciclo de Krebs, además de la NADPH-ubiquinona oxido reductasa, así como la succinato-ubiquinona oxido reductasa en la cadena transportadora de electrones y como consecuencia de esto se presenta reducción de ATPasa Na⁺/K⁺ y alteración de los transportadores para glutamato dependientes de Na⁺ (Schweizer and Richter, 1994). Por otro lado, el NO• juega un papel importante en la respuesta

inflamatoria, por estimulación de la ciclooxigenasa y aumentando la producción de prostaglandinas (Vladutiu, 1995).

Posteriormente, continúan disturbios en la organización de las fibras como la fragmentación axonal, desmielinización, degeneración Waleriana, apoptosis de oligodendrocitos y la formación de una cicatriz glial que limita las funciones de ingreso glial al epicentro de la lesión (Taoka et al., 1998). Como podemos darnos cuenta después de un daño se desencadenan una serie de mecanismos autodestructores que incrementan el daño al sitio de lesión. Es por ello que diferentes estudios han dirigido su atención a desarrollar estrategias neuroprotectoras que disminuyan en lo posible los efectos deletéreos de dichos mecanismos (Kaptanoglu et al., 2005; Kaptanoglu et al., 2005; Kipnis et al., 2004; Kiziltepe et al., 2004; Kulkarni et al., 2004; Leist et al., 2004; Lu et al., 2005; Maier, 2005; Nakashima et al., 2004).

Actualmente, una estrategia que destaca por sus principios innovadores es la que propone estimular una respuesta autoinmune contra constituyentes neurales para de esta forma, modular la respuesta inflamatoria y con ello promover protección y restauración del tejido neural (Moalem et al., 1999). En esta línea, varios estudios han demostrado que la estimulación de la respuesta mediante inmunización activa o pasiva con auto-antígenos neurales como la proteína básica de la mielina (MBP, del inglés myelin basic protein), reduce el daño neuronal después de una lesión incompleta de médula espinal (Hauben et al., 2000). De esta forma la propuesta sugiere la existencia de una respuesta autoinmune con características muy especiales que se encarga de proteger en este caso el tejido neural.

2.4. Autoreactividad y Auto-reactividad Protectora

El SI lleva a cabo la identificación de sustancias propias y detección de extrañas. Para realizar dicha función, durante la ontogenia las células inmunes desarrollan en forma aleatoria la capacidad para responder a cualquier Ag; esta “generación de diversidad antigénica” origina la existencia de clonas capaces de reconocer auto-antígenos (Roitt et al., 1996). A pesar de que existen mecanismos por medio de los cuales estas células auto-reactivas son eliminadas después de su generación o inactivadas en la periferia, para prevenir así una enfermedad autoinmune, estos son insuficientes y por ello prácticamente en todos los individuos sanos se encuentran

estas células (Abbas et al., 2002). En cuanto a los autoanticuerpos, en individuos sanos se dirigen contra Ag comunes con baja afinidad, habitualmente ocultos o intracelulares. Estos autoanticuerpos se conocen como “naturales” y se dice que cumplen funciones fisiológicas en el organismo (Moreno, 1996).

Por otro lado, se ha postulado la presencia de linfocitos T autorreactivos en individuos sanos por a la falta de exposición al Ag y/o dosis insuficiente de éste, por la regulación de células T reguladoras que suprimen a células auto-reactivas (Barouch and Schwartz, 2002; Kipnis et al., 2004; Schwartz and Yoles, 2005; Picca and Caton, 2005) o por falta de interacción con la CPA que expresa dichos Ag. Es decir estos linfocitos persisten “ignorantes” de la existencia del Ag y no son activados *in vivo*, por lo que su presencia no resulta en enfermedad. Sin embargo, cuando se rompe la tolerancia antigénica, se observa una abundante producción de auto-anticuerpos de alta afinidad y cambio de isótopo a IgG, producto de la presentación de auto-Ag por CPAs a linfocitos T, por lo que al reconocer nuevamente estos epítomos, aumenta el riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune (Moreno, 1996). La autoreactividad es parte de una respuesta inmune normal que puede ser originada durante algunas enfermedades infecciosas e inflamatorias, sin embargo cuando es excesiva, ocasiona un estado patológico que resulta en una enfermedad autoinmune (Carroll and Holers, 2005; Grimaldi et al., 2005; Milner et al., 2005; Subudhi et al., 2005). De acuerdo con observaciones clínicas y epidemiológicas son más comunes en mujeres que en hombres, mas del 75% de personas que padecen enfermedades autoinmunes son mujeres y son mas frecuentes en edades reproductivas, por ello se sugiere que las hormonas son factores clave para determinar estas diferencias (Cooper and Stroehla, 2003).

Existen diversas enfermedades consideradas como autoinmunes como la enfermedad de Graves, miastenia gravis y esclerosis múltiple (EM) entre otras. La EM es una afección inflamatoria desmielinizante del SNC en la que se ha reportado que el principal Ag es la MBP (Revesz et al., 1994). La encéfalomiелitis autoinmune experimental (EAE) del inglés experimental autoimmune encephalomyelitis es uno de los modelos experimentales de la EM en ratas y ratones que puede ser inducida, sensibilizando al SI con proteínas encefalitogénicas como la MBP, en adyuvante completo de Freund (ACF) (Fuller et al., 2004; Pal and Tabira, 2002; Rao and Segal, 2004).

Después del rompimiento de la integridad en el SNC, las células T migran hacia el sitio dañado y ahí se acumulan en cantidades mayores a las observadas en el SNC no lesionado (Schwartz et al., 1999). Esto hace pensar que dichas células participan de alguna forma en los procesos desarrollados después de la lesión. Algunos estudios han demostrado que la transferencia pasiva de células T específicas para el auto-antígeno MBP reduce el daño neuronal después de lesión medular en roedores (Hauben et al., 2000). A este tipo de respuesta se ha denominado respuesta “auto-reactividad protectora” (Berczi et al., 1998; Rothwell and Hopkins, 1995). Esto representa un riesgo ya que se puede generar una enfermedad autoinmune, por ello se realizaron ensayos en donde por medio de la inmunización activa con diversos péptidos no encefalitogénicos asociados a la mielina con modificaciones en la secuencia de aminoácidos, como copolímero-1 [Cop-1; polímero sintético compuesto por: L-alanina, L-lisina, L-ácido glutámico y L-tirosina (6:2:5:1)] (Kipnis et al., 2003; Kipnis and Schwartz, 2002; Schori et al., 2002). Se ha planteado que esto puede reducir la degeneración secundaria de neuronas y promover una mejor recuperación motora en animales con lesión medular (Hauben et al., 2000; Moalem et al., 1999), es decir promueve un efecto inmunoprotector (Hauben et al., 2001). Este hecho es evidente después de una lesión en el SNC ya que, estudios recientes han demostrado el importante papel que desempeña la auto-reactividad protectora en la recuperación (Moalem et al., 1999), mantenimiento, angiogénesis, cicatrización, regeneración (Schwartz et al., 1999) y reparación del tejido neural lesionado (Lazarov-Spiegler et al., 1996; Rapalino et al., 1998). Más aún, estudios recientes han demostrado que esta auto-reactividad protectora es un fenómeno fisiológico (Yoles et al., 2001) y que está codificado y controlado genéticamente (Hauben et al., 2000; Kipnis et al., 2001). La inmunización activa con péptidos no-encefalitogénicos ha originado resultados muy alentadores en animales (Hauben et al., 2001), sin embargo hasta la fecha no se conocen en forma exacta los mecanismos por medio de los cuales la respuesta inducida por dichos péptidos promueve protección al tejido. De acuerdo a algunos estudios (Shaked et al., 2004), las células de la glía pueden estar importantemente implicadas en esta labor de protección. Se cree que la respuesta auto-reactiva protectora ejerce su efecto al capacitar a la microglía para movilizar mayores cantidades de glutamato del espacio intersináptico, una tarea que le corresponde a los astrocitos pero disminuye su población en el epicentro de lesión, lo que genera citotoxicidad (Shaked et al., 2005).

2.5. Mecanismos inmunoreguladores originados por Cop-1

La activación de los linfocitos T CD4+ depende en gran parte del conjunto de señales de transducción originadas por diferentes moléculas estimuladoras y co-estimuladoras encontradas en la membrana celular. Entre ellas podemos mencionar a CD28, CD4, CD3, CTLA-4 y el mismo TCR entre otros. Todas estas moléculas originan un conjunto de señales que pueden o no culminar en la activación del linfocito T. De todas estas señales, la emitida por el TCR es una reacción importante ya que de acuerdo a algunos estudios, los cambios sutiles en la estructura del ligando del TCR resultan en efectos distintos sobre la activación del linfocito T (Nel and Slaughter, 2002). La presencia de aminoácidos diferentes en la región reconocida por el TCR o bien la presencia de secuencias repetidas formando copolímeros, sin que se modifique la capacidad de unión al MHC, puede resultar en un cambio en el fenotipo, anergia o ausencia del reconocimiento (Abbas et al., 2002). En el caso de los ligando peptídicos alterados (APLs, del inglés altered peptidic ligands), una pequeña variación en la secuencia primaria peptídica puede ejercer un efecto importante en su capacidad para interactuar ya sea con el MHC o con el mismo TCR convirtiendo de esta forma a un péptido agonista en uno parcialmente agonista o incluso antagonista (Moreno, 1996). Los péptidos agonistas llevan a cabo interacciones de gran afinidad con el TCR y originan una fuerte respuesta de los linfocitos T, mientras que los parcialmente agonistas o antagonistas llevan al cabo interacciones de baja afinidad que originan alteración o incluso inhibición de la respuesta (Hall et al., 2003; Huang and Anderson, 2003; Jameson and Bevan, 1995; Kersh and Allen, 1996). El PNM originado de la modificación en la secuencia altamente inmunogénica 82-100 de la PBM (Aharoni et al., 1999), se ha demostrado que no es encefalitogénico y se ha sugerido que inhibe en forma importante la EAE en modelos murinos y en humanos y disminuye la severidad de la EM (Teitelbaum et al., 1997).

Cop-1 es un copolímero que consiste de sales acetato de polipéptidos formados de la polimerización controlada de cuatro aminoácidos: ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina (en rangos de fracción molar de 0.129-0.153, 0.392-0.462, 0.086-0.100 y 0.300-0.374, respectivamente), repetidos de manera aleatoria, es decir los monómeros pueden seguir cualquier orden. Los mecanismos por los cuales el Cop-1 ejerce su acción no están completamente dilucidados, sin embargo por medio de observaciones *in vitro* se ha sugerido

que Cop-1 compete por los sitios de unión de PBM en las moléculas de MHC o HLA (DR) y el receptor de las células T (Aharoni et al., 1999; Farina et al., 2001; Farina et al., 2001; Neuhaus et al., 2001) en donde, Cop-1 tiene una rápida y eficiente unión a varios MHC clase-II con alta afinidad y de manera promiscua a células presentadoras de antígeno sin necesidad de ser procesado (Fridkis-Hareli et al., 1999). Se ha visto que el tamaño del copolímero es crucial para esta unión (Fridkis-Hareli et al., 1997; Fridkis-Hareli et al., 1999; Fridkis-Hareli et al., 1999) comprobándose esto en modelo murino y en humano, (Fridkis-Hareli et al., 1994; Fridkis-Hareli et al., 1994; Fridkis-Hareli et al., 1997). Esta unión resulta en una activación diferente con el epítipo inmunodominante 82-100 de la PBM (Aharoni et al., 1999) y se ha sugerido que Cop-1 actúa como un antagonista de este epítipo en líneas celulares de ratón y humano, bloqueado el MHC clase-II (Arnon et al., 1996; Aharoni et al., 1999) es decir Cop-1 tiene una reacción cruzada con el auto-antígeno, PBM (Duda et al., 2000; Miller et al., 1998; Miller and Karpus, 1994) ya que inhibe la proliferación de las células T específicas contra PBM (Gran et al., 2000; Martin et al., 2001; Teitelbaum et al., 1992; Teitelbaum et al., 1999). Por otro lado, Wiesemann et al., 2001 reportó que Cop-1 puede actuar como un agonista parcial-débil del TCR en la activación de células T vírgenes. Sin embargo también se ha reportado que Cop-1 es degradado a nivel periferia y posiblemente no llegue al cerebro y por lo tanto no compita con los antígenos de mielina *in situ*. (Aharoni et al., 1999), Sin embargo se ha demostrado la viabilidad de células T Cop-1-específicas inducidas en periferia por medio de una inyección o por tratamiento oral con Cop-1 (Aharoni et al., 2000; Arnon and Aharoni, 2004; Wiesemann, 2001; Wiesemann et al., 2001)

Otro de los mecanismos de acción propuesto para Cop-1 es la inhibición en la proliferación de células Th1 reactivas a mielina e inducción de Th2 o Th3 reguladoras CD4+CD25+high, es decir inhibiendo la activación de manera selectiva (Aharoni et al., 2000; Farina et al., 2000; Gran and Rostami, 2001; Miller et al., 1996) con elevada producción de IL-10, IL-4, IL-5, IL-6, TGF- β (Aharoni et al., 1997; Aharoni et al., 1998; Dabbert et al., 2000; Miller et al., 1998; Miller and Karpus, 1994; Wiesemann et al., 2001) y BDNF, NT-3, NT-4, que juegan un papel en la regulación del desarrollo neuronal, supervivencia neuronal, crecimiento de dendritas y regulación de la plasticidad (Douhou et al., 2001; Simon et al., 2001). Se ha visto que se suprime la producción de TNF- α e IFN- γ (Dogan et al., 2003; Miller and Karpus, 1994; Neuhaus et al., 2001; Neuhaus, 2000) y el receptor soluble de IL-2 (Putheti et al., 2003). Esto ha sido demostrado en circulación, bazo y

nódulos linfáticos pero no en órganos en donde ocurren los procesos patológicos de la EAE o EM (Arnon and Aharoni, 2004). Por otra parte, en monocitos de pacientes con EM, tratados con Cop-1 se ha observado una significativa reducción de IL-12 y una elevada producción de IL-10, en los astrocitos se ha visto la expresión de BDNF, IL-10 pero no IFN- γ tratados con células T Cop-1 específicas; en células dendríticas promueve la producción de IL-10, (Arnon and Aharoni, 2004) y suprime la expresión de CD1a que participa en la presentación de Ags glucolípidos (Hussien et al., 2001) que abundan en SNC.

De esta forma se plantea que Cop-1 tiene un efecto benéfico sobre el desarrollo de la EAE y que está asociado a una regulación negativa de los linfocitos T anti-MBP (Th1) y que es mediado por la acción de linfocitos Th2 reguladores (Teitelbaum et al., 1999). Así, la acción básica de Cop-1 es modular la liberación de citocinas pro-inflamatorias y con ello el efecto dañino de los linfocitos T contra MBP (Aharoni et al., 2000).

Después de una lesión al SNC se ha observado que se desencadena una respuesta contra la MBP misma que de acuerdo a algunos estudios es predominantemente Th1 (Jones et al., 2002) y es capaz de originar una gran destrucción al tejido nervioso si no es modulada (Jones et al., 2004; Jones et al., 2002). Otros autores han demostrado que la presencia de dicho fenotipo no es solo importante sino esencial para que la autoinmunidad protectora ejerza su efecto benéfico (Kipnis et al., 2002) ya que son estas células las que liberan el IFN- γ , que estimula la expresión del MHC clase II (moléculas indispensables para la comunicación y modulación de las células de la microglía y astrocitos por parte de los Th1). Aunque pareciera paradójico, la presencia de las células Th1 y de células inflamatorias parecen ser pieza clave para el funcionamiento óptimo de la autoinmunidad protectora después de una lesión al SNC (Schwartz et al., 2003). La modulación de dichos elementos a través de la inmunización con Cop-1 puede ser una valiosa alternativa terapéutica en lesiones, ya que al permitir solo la acción necesaria y no exagerada de dichas células (Th1 y células inflamatorias) permitiría obtener los beneficios que puede proveer el sistema inmunológico: factores de crecimiento y neuroprotectores, amortiguación de grandes cantidades de iones y excitotóxicas como NO• y glutamato (Barouch and Schwartz, 2002; Schwartz et al., 2003).

La respuesta de linfocitos T inducida por la inmunización con Cop-1 es una respuesta con fenotipo predominante Th2, de tal forma que el perfil de citocinas (prácticamente anti-inflamatorias) podría tener un efecto sobre la expresión de iNOS, que al disminuir la liberación de citocinas como TNF- α e IFN- γ (proinflamatorias), su expresión se mantendría baja. Así mismo, con el predominio de un perfil Th2, la IL-10 e IL-4 se libera disminuyendo la expresión de iNOS. Esto podría traer consecuencias muy importantes, ya que tanto la expresión como la actividad de esta enzima se han relacionado importantemente con la sobreproducción de NO \bullet , que tiene un papel muy importante en la citotoxicidad y destrucción tisular. Además, iNOS se ha vinculado importantemente con la modulación de la respuesta inflamatoria (Guzik et al., 2003) y las respuestas autoinmunitarias (Ahn et al., 2001; Ding et al., 1998; Fenyk-Melody et al., 1998; Isaksson et al., 2004; Kim et al., 2000; Okuda et al., 1995; Shi et al., 2001) de tal forma que su modulación podría ser uno de los mecanismos por medio de los se promueve la protección al tejido neural (Figura 1.)

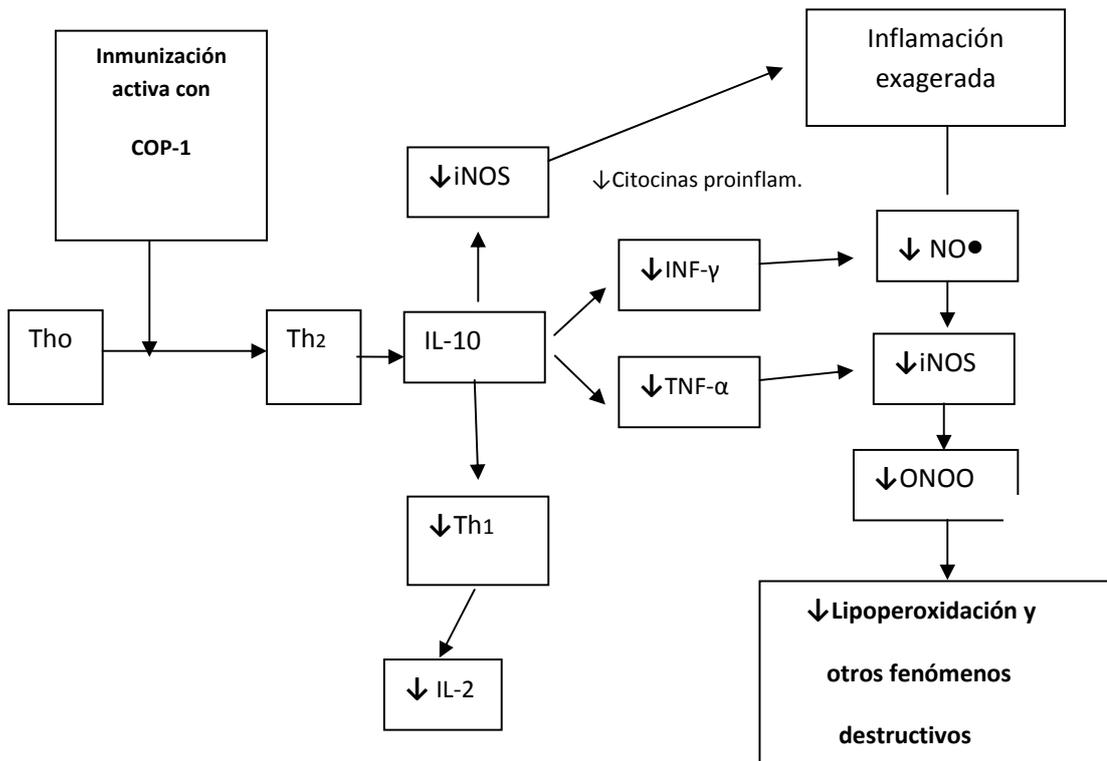


Figura 1. Propuesta de inmunomodulación inducida por Cop-1. Probable explicación del efecto benéfico de la inmunización con estos péptidos sobre algunos de los eventos autodestructivos en SNC.

3. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento no se han descrito los mecanismos exactos por medio de los cuales la inmunización con este copolímero no encefalitogénico estimule la autoreactividad protectora promoviendo la protección al tejido neural. De acuerdo a los mecanismos inmunoreguladores inducidos por estos péptidos innovadores y al papel importante que al parecer las células de la glía desempeñan durante este proceso, algunas de las probables vías de protección podrían ser la disminución en la producción de NO•. Actualmente no existen estudios que evalúen el efecto de la autoreactividad protectora sobre la producción de NO• en la glía.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Los linfocitos T activados con el péptido Cop-1 inducirán una disminución en la producción de NO• en las células de la glía *in vitro* ?

5. HIPÓTESIS

Los mecanismos inmunomoduladores inducidos por linfocitos T activados con Cop-1 son capaces de disminuir la producción de NO• en la glía *in vitro*.

6. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la inmunización con el péptido Cop-1 sobre la producción de NO• en la glía *in vitro*.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

Identificar la mejor concentración que desarrolle respuesta inmune contra los antígenos: ovalbúmina (OVA) y Cop-1.

Estudiar el efecto de la activación de linfocitos T con el péptido COP-1, sobre la producción de NO• en la glía *in vitro*.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en cocultivos con células que se obtuvieron de ratones de la cepa BALB/c considerados resistentes a la EAE (Kigerl et al., 2006) y se ha reportado que desarrollan de manera más eficiente la autoreactividad protectora (Schori et al., 2001). Las células T antígeno específicas se obtuvieron de órganos linfoides de ratones (de 6-8 semanas de edad), hembra e inmunocompetentes, inmunizados con los péptidos OVA o Cop-1 y las células gliales de ratones recién nacidos (1 a 3 días de edad).

8.1. Diseño experimental

En cada experimento se evaluó el efecto de linfocitos T cocultivados con glía, en donde se probaron dos diferentes proporciones celulares: 1:10 y 1:100 de glía con linfocitos T anti-Ags respectivamente. Las células anti-Ag fueron obtenidas de nódulos linfáticos y bazo de animales inmunizados con OVA o Cop-1 y la glía de cerebelos de animales recién nacidos. Estos cocultivos fueron mantenidos durante 48h para su posterior evaluación de NO•. En la Tabla 1 ilustra la cantidad de células para las proporciones celulares que se usaron en los cocultivos.

Tabla 1. Proporciones celulares utilizadas en los cocultivos

Proporciones	Células anti-Ag	Glía
1:10	5×10^4	4.5×10^5
1:100	5×10^3	4.9×10^5

Para la obtención de células anti-OVA y Cop-1, los ratones fueron inmunizados subcutáneamente en la porción cervical con OVA o Cop-1, emulsificados en un volumen igual al del adyuvante completo de Freund (ACF) conteniendo 1mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*; doce días posteriores a la inmunización, fueron colectados los nódulos linfáticos y bazo, realizando un mezcla de estos, para la posterior activación con el Ag homólogo o con el Ag

control en los cocultivos como se menciona más adelante. En la Tabla 2. se muestra la dosis *in vivo* e *in vitro* que se utilizó para cada antígeno.

Tabla 2. Dosis utilizadas para la sensibilización y activación de células anti-OVA (α -OVA) y anti-Cop-1 (α -Cop-1).

Antígenos	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
OVA	200 μ g/ml.	20 μ g/ml.
Cop-1	200 μ g/ml.	20 μ g/ml.

Con lo que respecta a los cultivos de glía, fueron mantenidos trece días posteriores a su obtención, después la glía fue despegada, contada y sembrada, 48 horas después se realizó el cocultivo con células anti-Ag. Como control positivo de activación de la glía, se utilizaron 100ng/ml de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*. Como control negativo la glía no fue activada. Adicionalmente, en cocultivos de Cop-1, se utilizó como control de activación específica un péptido irrelevante (PI) llamado SP10-27 de 18 aminoácidos, que corresponde a la secuencia parcial de una toxina del alacrán *Centruroides noxius* (Calderon-Aranda, 1999), este se ocupó en la misma concentración utilizada para Cop-1. Las condiciones que se cumplieron para cada cocultivo por antígeno se representan en las siguientes tablas: OVA (Tabla 3) y Cop-1 (Tabla 4).

Tabla 3. Cocultivo para OVA

	Glía	Células anti-OVA	LPS*	OVA
Condición 1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Condición 2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Condición 3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Condición 4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

*lipopolisacárido (Boucher B.A. and Phelps S.J., 1997)

Tabla 4. Cocultivo para Cop-1

	Glía	Células anti-Cop-1	LPS*	Cop-1	PI**
Condición 1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Condición 2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Condición 3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Condición 4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Condición 5	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Condición 6	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

*lipopolisacárido (Boucher B.A. and Phelps S.J., 1997) y **péptido irrelevante (Calderon-Aranda, 1999).

Cada cocultivo se realizó por triplicado de manera independiente.

8.1.1. TÉCNICAS

8.1.1.1. Obtención de células gliales

Las células gliales fueron obtenidas de cerebelo de ratones BALB/c recién nacidos (1 a 3 días de edad) por medio de decapitación y extracción de cerebelos. Estos fueron depositados en una caja de Petri con medio de cultivo Hank's (HBSS) suplementado con estreptomicina/penicilina a 4 °C, en donde fueron cortados y tratados químicamente con tripsina al 2.5% y de DNAsa para posteriormente homogenizarlos y disociarlos de manera mecánica, todo ello en condiciones de esterilidad. Subsecuentemente el tejido ya disociado fue resuspendido en medio DMEM de inglés Dulbecco's modified Eagle's médium suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina (1mM), estreptomicina/penicilina (100 U/ml) y piruvato de sodio (1 mM), para su posterior determinación de densidad celular. Las células fueron sembradas en fcos de cultivo con poly-D-lisina y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ haciendo cambios diarios de medio de cultivo durante trece días. (Anexo 1.)

8.1.2. MÉTODOS DE EVALUACIÓN

8.1.2.1. Proliferación celular

Para comprobar la respuesta inmune contra OVA y Cop-1 se verificó, la respuesta en concentración y tiempo, así como control de activación de los antígenos en cada cocultivo. Para ello se realizaron estudios de proliferación celular empleando dos animales previamente

inmunizados con el péptido en cuestión; se obtuvieron los nódulos linfáticos cervicales y bazo, de estos órganos se hizo una mezcla por antígeno (Azoulay et al., 2005). Una vez extraídos dichos órganos linfoides se colocaron en RPMI para posteriormente ser separados por medio de la técnica de ficol, obteniendo células mononucleadas, se colocaron 300,000 células/pozo con RPMI suplementado y el péptido OVA o Cop-1; se utilizó concanavalina-A (ConA), como control positivo, dado que es un activador celular inespecífico. Como control negativo solo se agregó medio de cultivo. Se incubaron las placas durante 72 h a 37° C en 5% de CO₂. La proliferación celular se evaluó a través de la técnica de incorporación de Timidina tritiada y para ello los cultivos celulares fueron pulsados por un periodo de 18h con 1 µCi de [6-³H] timidina por pozo; posteriormente se cosecharon estas células en donde los núcleos celulares fueron retenidos por filtración en papel de fibra de vidrio, la timidina radioactiva incorporada al DNA fue cuantificada por medio un contador de radioactividad beta, (Beckman L5 6000) para determinar la incorporación de [6-³H] timidina expresada en cuentas por minuto (CPM). Los resultados fueron expresados del promedio de quintuplicados. En el anexo 2 y 3 se hace la descripción de esta técnica de manera detallada.

Determinación de NO•

El NO• fue determinado mediante el método de Griess's (Green et al., 1982), 48h posteriores al tratamiento, se tomó el sobrenadante de los cocultivos en alícuotas de 500µl y fueron congelados a -20 C°. Posteriormente se alicuotaron en 100µl, se les agregó 100µl del reactivo de Griess's, después de un periodo de 10 min. de incubación, fue cuantificada la cantidad de nitritos en el espectrofotómetro a una longitud de onda 550nm. Las lecturas obtenidas, fueron interpretadas en una curva de calibración preparada con KNO₃ de concentraciones conocidas y las concentraciones de NO• fueron calculadas a partir de esta. Las concentraciones de NO• se expresaron en µM de NO•/µg. Todos los resultados están expresados como promedio de los quintuplicados en unidades micromolar de NO₂ ± desviación estándar.(Anexo 4.)

8.1.3. Método estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de todos los grupos. Todos los datos son expresados \pm desviación estándar y fueron comparados por medio de la prueba estadística paramétrica de análisis de varianza ANOVA de una vía, con la prueba de comparación múltiple Tukey–Kramer, (software PRISM, versión 4.03 para Windows, GraphPad) ya que los datos tuvieron una distribución normal. Los valores fueron considerados estadísticamente significativos con $p < 0.05$.

Consideraciones éticas.

Para la realización del presente proyecto, se tomaron en cuenta los lineamientos establecidos por el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud (Título séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación) (Ley general de Salud, 1990)

9. RESULTADOS

9.1. Proliferación celular

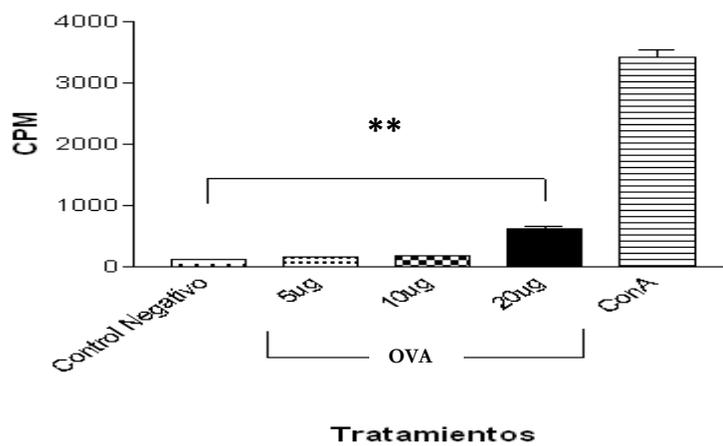
Con el fin de encontrar la dosis *in vivo* e *in vitro* requeridas para obtener una respuesta inmune adecuada para cada antígeno en cuestión, se inmunizaron tres diferentes concentraciones del péptido de interés, y se realizaron estudios de proliferación, que fueron evaluados a las 72h. Cada barra representa el promedio \pm desviación estándar de las cuentas por minuto (CPM) de cinco pozos. Cada figura es la representación gráfica de uno de tres experimentos independientes.

Proliferación celular de animales inmunizados con OVA

En la Figura 2 se presentan los resultados de la proliferación celular inducida al inmunizar con 100, 150 y 200 μ g/ml de OVA y al activar a las células anti-OVA con 5, 10 y 20 μ g/ml en los ensayos de proliferación con esta misma proteína. La mejor respuesta se obtuvo cuando se inmunizó a los animales con 200 μ g/ml y cuando se activaron las células con 20 μ g/ml (ver

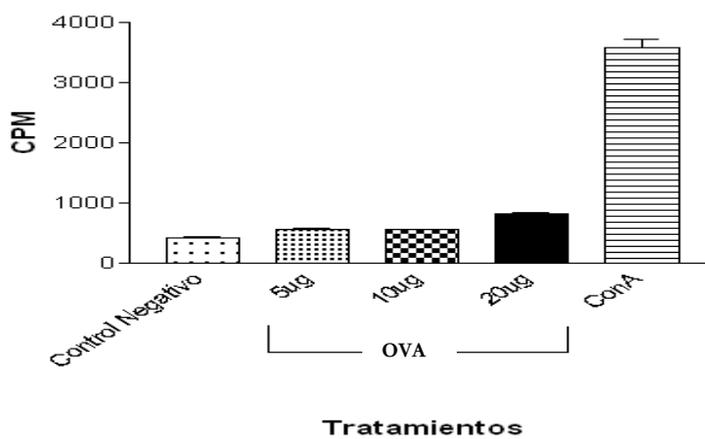
figura 2c) $p < 0.001$. La diferencia observada fue estadísticamente significativa comparado con el control negativo que no recibió estimulación antigénica (proliferación basal).

a)



b)

Incorporación de timidina [6-3H] timidina



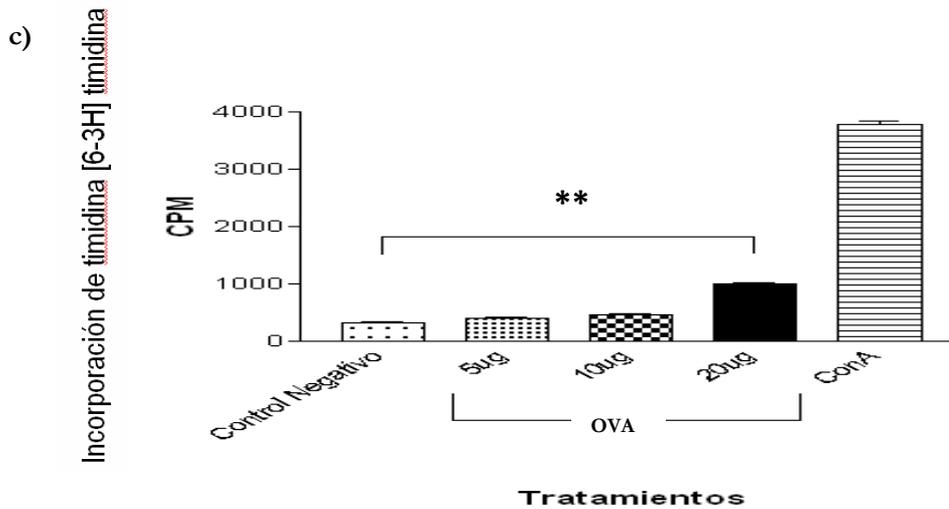
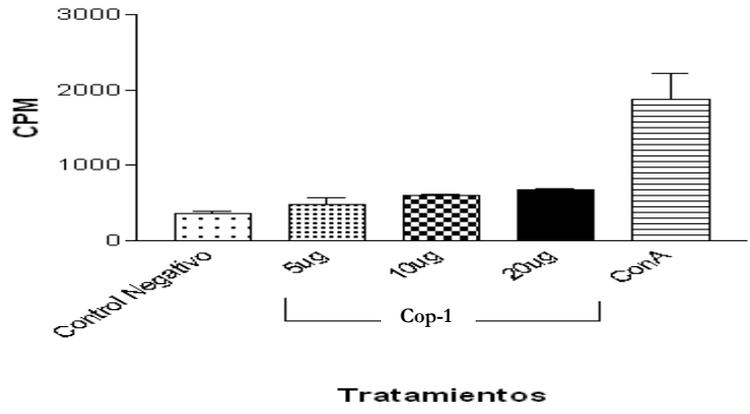


Figura 2. Evaluación de la proliferación de células T sensibilizadas contra OVA. Los animales fueron inmunizados con: **a)** 100µg/ml, **b)** 150µg/ml o **c)** 200µg/ml de OVA y las células T activadas *in vitro* con 5, 10, ó 20µg/ml con la misma proteína. Representación gráfica de uno de tres experimentos independientes realizado por quintuplicado. Las barras representan el promedio de los quintuplicados \pm desviación estándar. El eje de la Y representa las cuentas por minuto (CPM) y en el eje de la X las diferentes concentraciones que se ocuparon para la activación celular. ******Diferente a los demás grupos, ($p < 0.001$) por ANOVA de una vía.

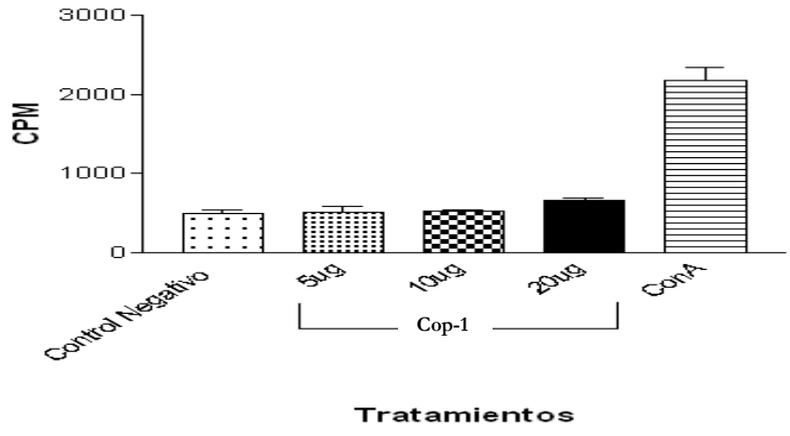
Proliferación celular de animales inmunizados con Cop-1

En lo referente a los estudios de proliferación con el copolímero-1 (Figura 3), se observó que al inmunizar también con 200µg/ml y activar con 20µg/ml con Cop-1, las células T presentaron un incremento significativo ($p < 0.05$, ANOVA de una vía) en su respuesta a este antígeno (Figura 3c) en comparación con la proliferación basal.

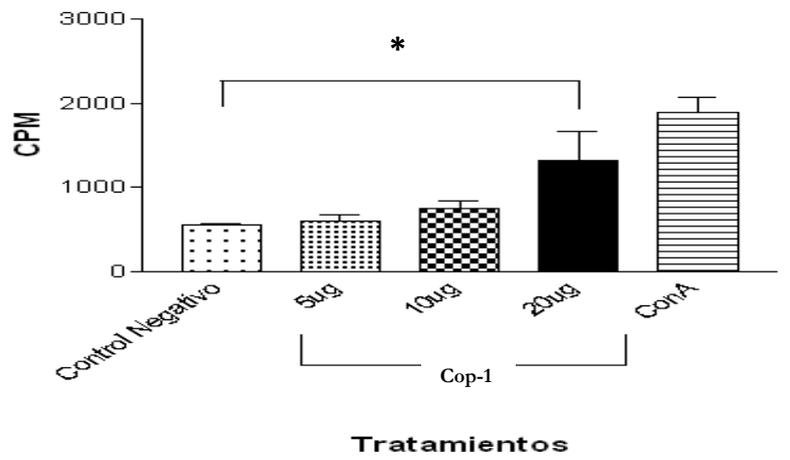
a)



b)



c)



Incorporación de timidina [6-3H] timidina

Figura 3. Evaluación de la proliferación de células T sensibilizadas contra Cop-1. Los animales fueron inmunizados con: **a)** 100µg/ml, **b)** 150µg/ml o **c)** 200µg/ml de Cop-1 y las células T activadas *in vitro* con 5, 10, ó 20µg/ml con la mismo copolímero. Representación gráfica de uno de tres experimentos independientes realizado por quintuplicado. Las barras representan el promedio de los quintuplicados \pm desviación estándar. El eje de la Y representa las cuentas por minuto (CPM) y en el eje de la X las diferentes concentraciones que se ocuparon para la activación celular. * Diferente a los demás grupos, ($p < 0.05$) por ANOVA de una vía.

Evaluación de la producción de NO• en cocultivos

Con la finalidad de conocer el efecto de las células T activadas *in vivo* con Cop-1 sobre la producción de NO• por parte de las células gliales, se realizaron cocultivos de éstas últimas con células anti-Ag de nódulos linfáticos y bazo de animales inmunizados con OVA o Cop-1. En ambos casos se evaluó la producción de metabolitos de NO• en los sobrenadantes de los cocultivos mediante el método de Griess.

Cocultivos de animales inmunizados con OVA

La Figura 4, muestra la producción de NO• cuando las células T anti-OVA obtenidas de animales inmunizados con OVA y activadas *in vitro* con su antígeno homólogo, fueron cocultivadas con glía en una proporción de 1:10 (células Anti-OVA: glía). Como se puede observar, la activación de la glía con el LPS (Glía+LPS) incrementa en forma significativa los productos de NO• en comparación a la glía no activada ($p < 0.001$). Sin embargo cuando la glía es activada y cocultivada con las células anti-OVA en presencia de OVA (Glía+LPS+células anti-OVA +OVA), se presenta una disminución significativa ($p < 0.001$) en la producción de NO•. En el caso de los cocultivos que no fueron activados con LPS (Glía+células anti-OVA+OVA) también se observó una disminución significativa ($p < 0.001$) de la producción de

NO• con respecto a la producción basal de NO• en glía (Glía). En el inserto se observa que la inmunización con OVA provocó una adecuada proliferación celular contra dicho péptido.

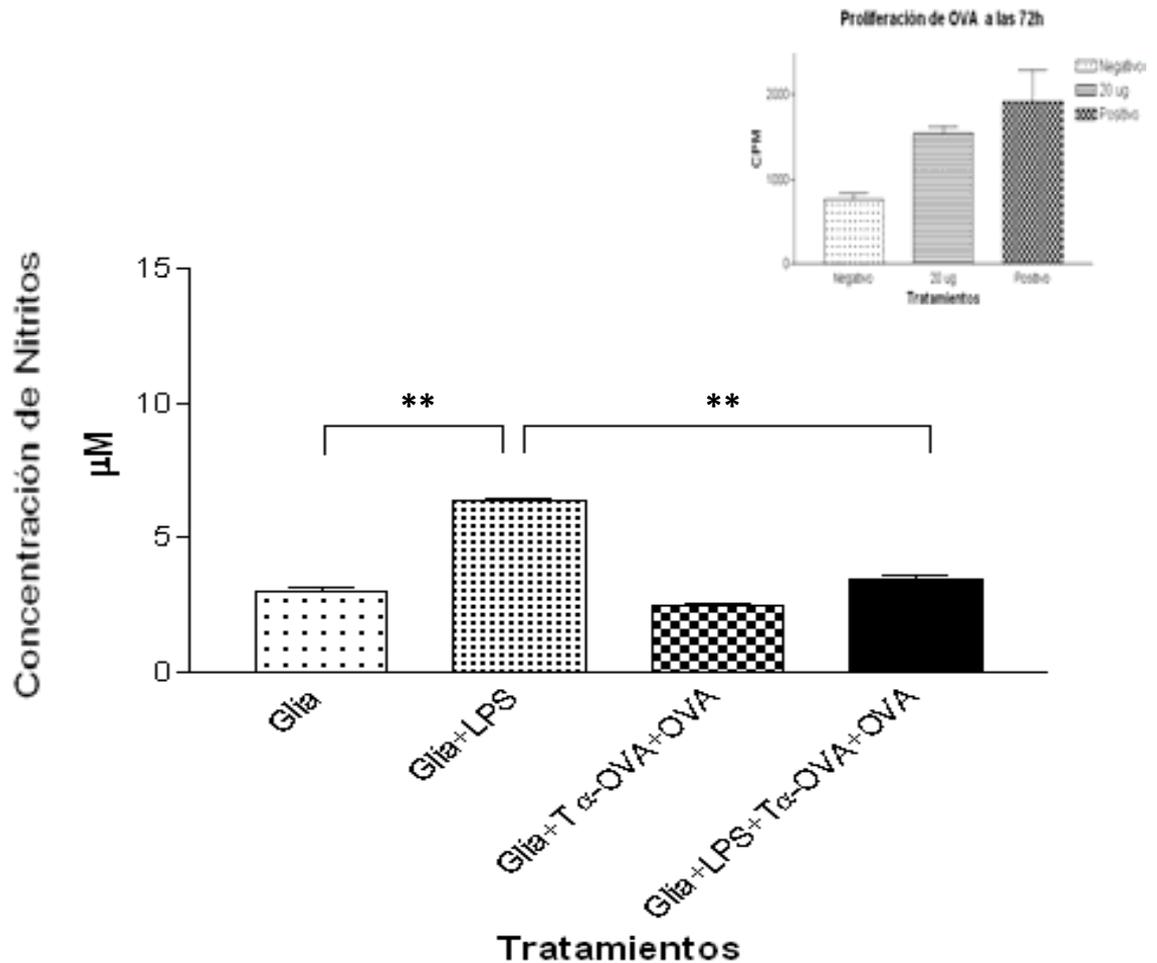


Figura 4. Evaluación de la producción de NO• en sobrenadantes de cocultivos de células anti-OVA y glía a razón de 1:10 respectivamente. Representación gráfica de la evaluación de uno de tres experimentos independientes. Las barras representan el promedio de los quintuplicados \pm desviación estándar. El eje de la Y representa la concentración de nitritos expresado en micromolar (μM) y en el eje de la X las diferentes condiciones a las que se sometió la glía expresado como tratamientos. En el inserto se incluye el control de la proliferación de las células T activadas con OVA. ** Diferente a los demás grupos, ($p < 0.001$) por ANOVA de una vía.

Cuando se evaluó la producción de NO• en cocultivos donde la relación de células anti-OVA y glía fue de 1:100 (Figura 5), se observó nuevamente una disminución significativa de la producción de NO• en relación con la glía que sólo fue activada con LPS (Glía+LPS). Por otro lado, la glía que no fue activada con LPS (Glía+células anti-OVA+OVA) ($p < 0.001$) también presentó reducción significativa en la producción de NO• en relación con la glía no activada con LPS. En los insertos se comprueba la proliferación de células T contra OVA.

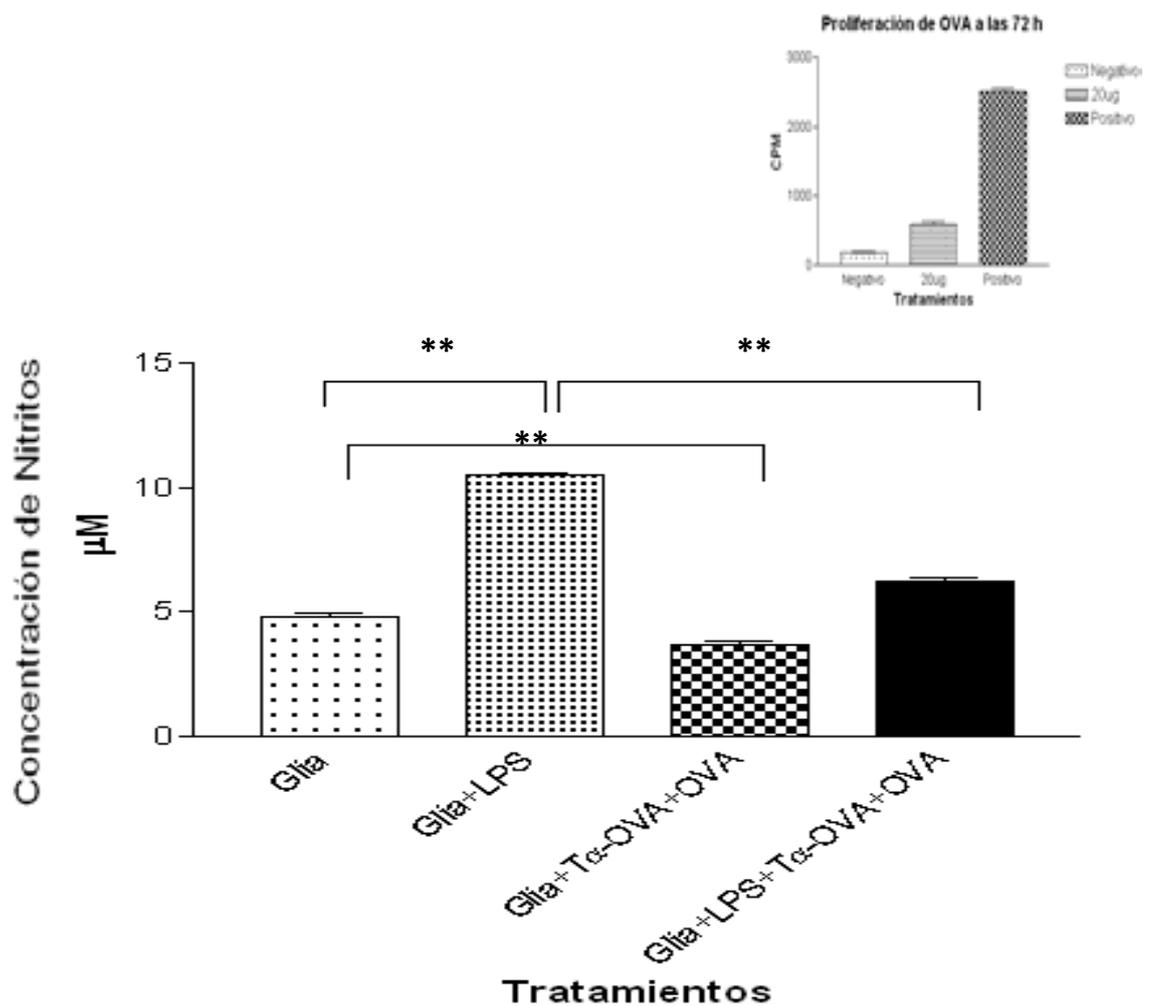


Figura 5. Evaluación de la producción de NO• en sobrenadantes de cocultivos de células anti-OVA y glía a razón de 1:100 respectivamente. Representación gráfica de la evaluación de uno de tres experimentos independientes. Las barras representan el promedio de los quintuplicados \pm desviación

estándar. El eje de la Y representa la concentración de nitritos expresado en micromolas (μM) y en el eje de la X las diferentes condiciones a las que se sometió la glía expresado como tratamientos. En el inserto se incluye el control de la proliferación de las células T activadas con OVA. ** Diferente a los demás grupos, ($p < 0.001$) por ANOVA de una vía.

Cocultivos de animales inmunizados con Cop-1

Como se puede ver en la Figura 6 las células T activadas con Cop-1 disminuyeron en forma significativa la producción de $\text{NO}\bullet$ de las células gliales. En este estudio, la glía activada con LPS también incrementó significativamente su producción de $\text{NO}\bullet$ en comparación con la glía no activada ($p < 0.001$). Cuando las células gliales activadas se cocultivaron con células anti-Cop-1 en presencia de Cop-1 (razón de 1:10; células anti-Cop-1 y glía respectivamente), se disminuyó significativamente ($p < 0.001$) la producción de $\text{NO}\bullet$. Cuando la glía fue sometida a las condiciones anteriores pero fue activada *in vitro* con un péptido irrelevante (PI) (Glía+LPS+células anti-Cop-1+PI), se observó un aumento en los productos del $\text{NO}\bullet$ con respecto a la glía activada con LPS. Por otro lado, la glía que no fue activada con LPS, pero si expuesta a células anti-Cop-1 y su antígeno homólogo (Glía+células anti-Cop-1+Cop-1) ($P < 0.05$), presentó una reducción significativa en la producción de $\text{NO}\bullet$ con respecto a la glía no activada. En los cocultivos a los que solo se les agregaron células anti-Cop-1 y el péptido irrelevante aumentó significativamente ($P < 0.001$) la producción de $\text{NO}\bullet$ con respecto a la glía no activada. En los insertos se comprueba la proliferación celular contra Cop-1.

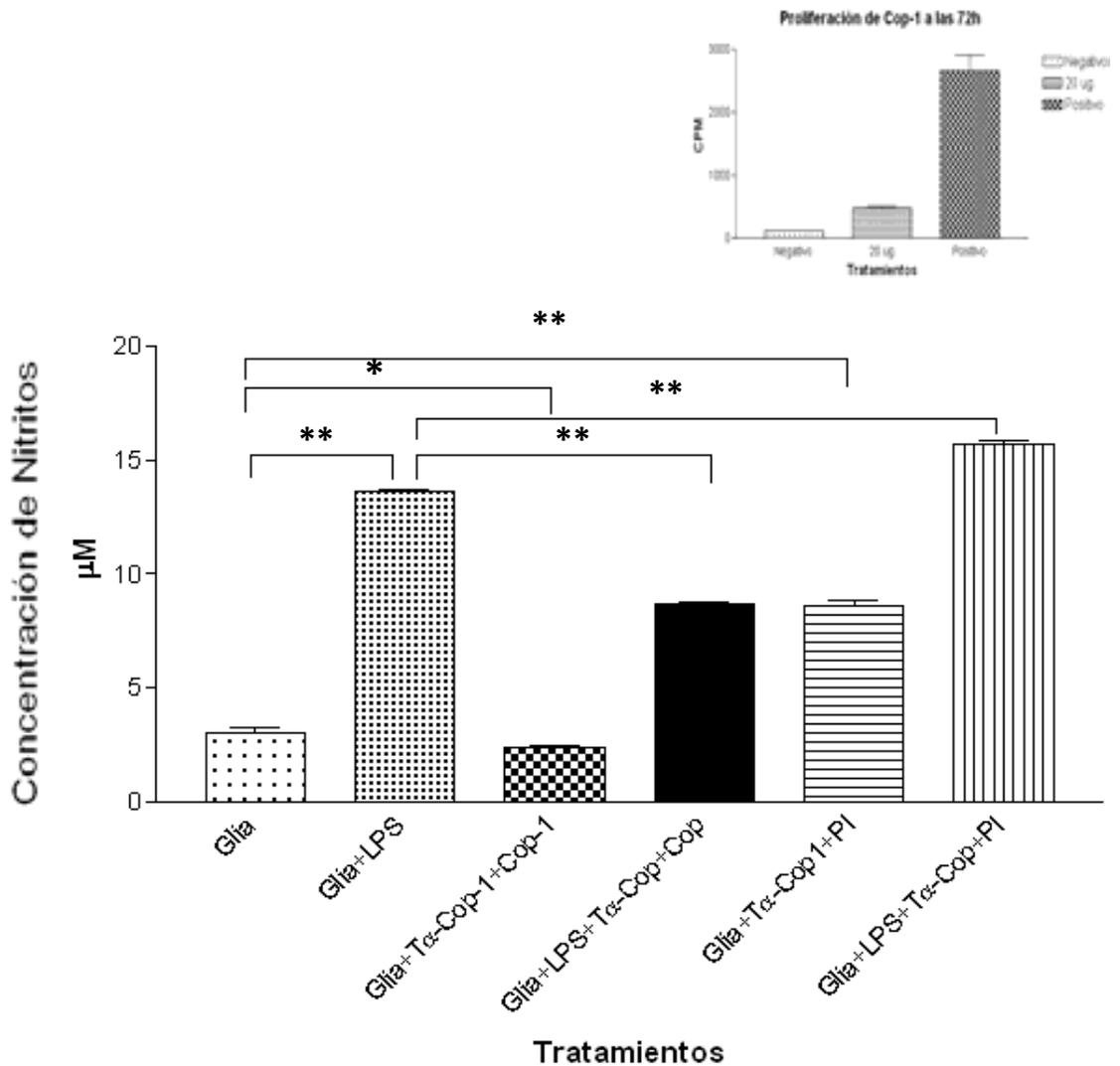


Figura 6. Evaluación de producción de NO^\bullet en sobrenadantes de cocultivos de células anti-Cop-1 y glía a razón de 1:10 respectivamente. Representación gráfica de la evaluación de uno de tres experimentos independientes. Las barras representan el promedio de los quintuplicados \pm desviación estándar. El eje de la Y representa micromolas (μM) de nitritos y en el eje de la X las diferentes condiciones a las que se sometió la glía expresado como tratamientos. En el inserto se incluye el control de proliferación de células T activadas con Cop-1. ** Diferente a los demás grupos, ($p < 0.001$) y * diferente a los demás grupos, ($p < 0.05$) ANOVA de una vía.

La Figura 7, representa los resultados de la evaluación de la producción de NO• en los cocultivos de células anti-Cop-1 con glía a una razón de 1:100. Se reitera el aumento significativo de la producción de NO• en glía activada con LPS comparada con la glía sin activar ($p < 0.001$). Cuando la glía se activo con LPS y se cocultivó con células anti-Cop-1 en presencia de Cop-1 (Glía+LPS+ células anti-Cop-1 +Cop-1) ($p < 0.001$) disminuyó la producción de NO• significativamente con respecto a la glía activada con LPS. Cuando la glía fue sometida a las mismas condiciones pero activada con un péptido irrelevante, (Glía+LPS+ células anti-Cop-1+PI) no se observó efecto en la producción NO•. Por otra parte, la glía que no fue activada con LPS, pero si expuesta a células anti-Cop-1 en presencia de Cop-1 o bien de un péptido irrelevante tampoco se observó algún efecto sobre la producción de NO• en relación a la glía sin activar. En los insertos se comprueba la proliferación celular contra Cop-1.

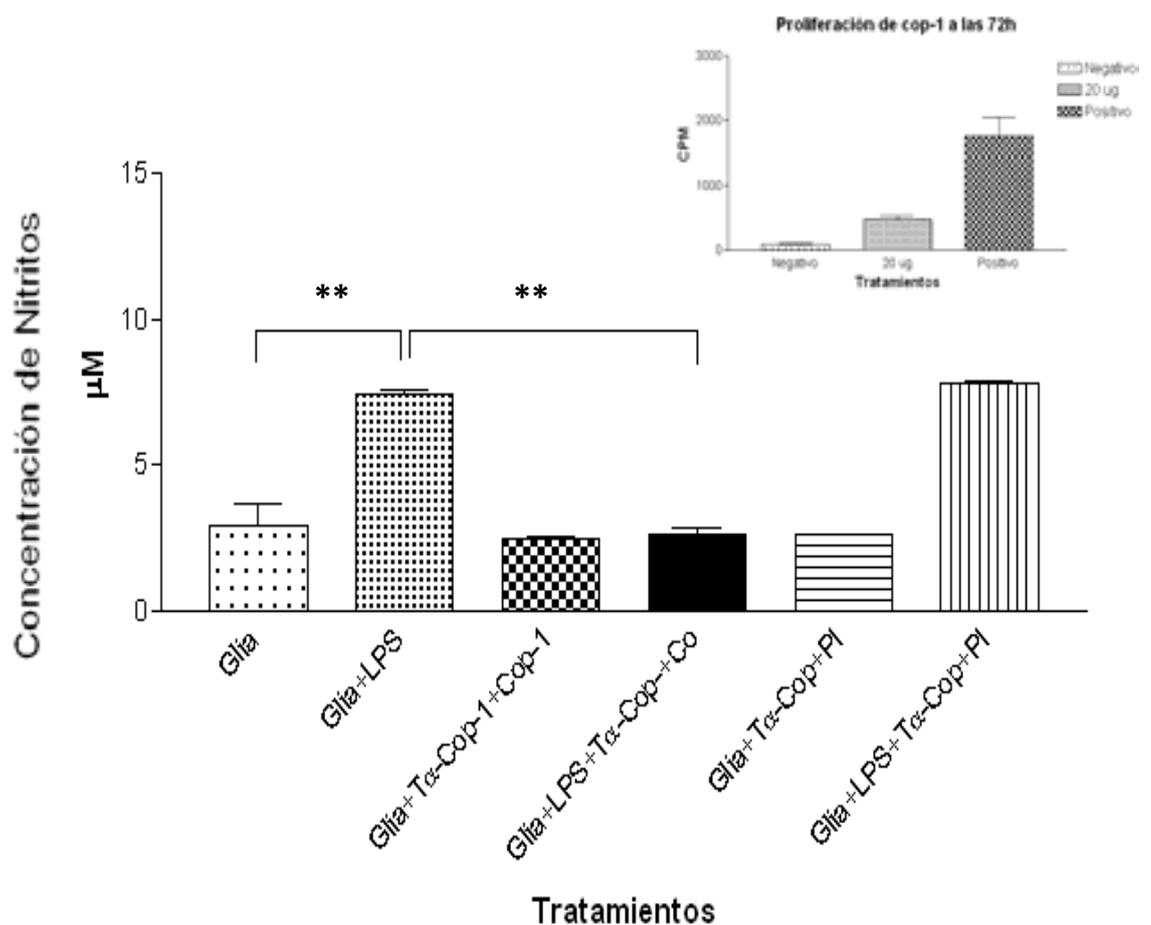


Figura 7. Evaluación de producción de NO• en sobrenadantes de cocultivos de células anti-Cop-1 y glía a razón de 1:100 respectivamente. Representación gráfica de la evaluación de uno de tres experimentos independientes. Las barras representan el promedio de los quintuplicados \pm desviación estándar. El eje de la Y representa micromolas (μM) de nitritos y en el eje de la X las diferentes condiciones a las que se sometió la glía expresado como tratamientos. En el inserto se incluye el control de proliferación de células T contra Cop-1. ** Diferente a los demás grupos, ($p < 0.001$) por ANOVA de una vía.

10. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó una estrategia innovadora, que consiste en la estimulación del sistema inmune mediante un copolímero, llamado Cop-1, para generar una respuesta conocida como “autorreactividad protectora”, pues los linfocitos T responden de una manera especial ofreciendo neuroprotección al tejido. Al momento no existe información exacta en relación a los mecanismos por medio de los cuales dicha respuesta protege al tejido neural después de una lesión. Una posibilidad importante podría estar representada por la acción de la respuesta autorreactiva sobre las células gliales, específicamente sobre la producción de NO• de estas células. Es bien conocido el efecto dañino del NO• cuando éste se encuentra en muy elevadas concentraciones como ocurre en gran parte de las enfermedades neurodegenerativas producidas por un mecanismo de lesión agudo. Dada la complejidad que supone estudiar los mecanismos moleculares implicados en la activación glial *in vivo*, se han desarrollado distintos modelos experimentales de activación glial *in vitro*, como es la estimulación por medio de LPS que induce la actividad de iNOS y con ello de NO•.

Este estudio fue propuesto para evaluar el efecto de Cop-1 en la producción de NO• de células gliales, y los resultados encontrados indican que Cop-1 disminuye significativamente la producción de NO•. Dicho efecto fue observado en las dos diferentes proporciones celulares estudiadas (1:10 y 1:100, células anti-Cop-1 y glía respectivamente), cuando la glía fue activada

con 100ng/ml de LPS y cocultivada con células anti-Cop-1 de órganos linfoides, previamente sensibilizadas con Cop-1 y activadas con el mismo.

La inmunización con Cop-1, a diferencia de la llevada a cabo con la proteína básica de la mielina y otras proteínas asociadas a la mielina, no induce EAE. De hecho, de acuerdo a estudios recientes, este copolímero actúa como un agonista parcial débil de la PBM y la respuesta originada de esta interacción, puede evitar o incluso inhibir el desarrollo de dicha patología (Teitelbaum, 2003). Además se ha demostrado que puede afectar la secreción de NO• por medio del bloqueo de NF-κB o por la inducción de citocinas antiinflamatorias que disminuyen la liberación de NO• (Hua et al., 2002).

Cop-1 es inductor del fenotipo Th2, (Arnon et al., 1996; Arnon and Sela, 2003; Sela and Teitelbaum, 2001) células consideradas como reguladoras o antiinflamatorias (Yamagiwa et al., 2001). Los linfocitos T anti-Cop1 se caracterizan por liberar IL-10, IL-4 y TGF-β (Aharoni et al., 2002), citocinas que juegan un papel importante en la supresión de la respuesta inmune proinflamatoria (Aharoni et al., 1998; Sugawara et al., 1999) y pueden representar un importante mecanismo para prevenir enfermedades autoinmunes por medio de la modulación de células T efectoras debido a la producción de IL-4 e IL-10 que inhiben los efectos de IL-12 e IFN-γ. Adicionalmente, la expresión del gen que codifica para iNOS (enzima involucrada en el daño al tejido neural) depende de la actividad del factor de transcripción NF-κB (Hua et al., 2002). La expresión de este factor se ve importantemente inhibida por la acción de citocinas como IL-4 e IL-10. El incremento de IL-10 inhibe la vía p38 MAPK bloqueando NF-κB, además interfiere con la estabilidad del mRNA a nivel postranscripcional (Narayan et al., 1998), e inhibe genes para la expresión de INF-γ e IL-1β, suprimiendo la fosforilación de la tirosina de STAT-1 (Alzeer et al., 1999; Ito et al., 1999; Villinger et al., 1999). La IL-10 es capaz de modular directamente la respuesta glial ya que inhibe la expresión de moléculas del MHC clase-II, NO•, quimiocinas, citocinas como: IL-1β, la IL-6, la IL-8, y el TNF-α citocinas que tiene una participación elemental en la producción de NO•.

En cuanto a la IL-4, aumenta la expresión de moléculas del MHC de clase II, CD23 y CD4 pero bloquea la producción de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α en células fagocíticas (Banchereau et al, 1994). En lo referente a los linfocitos T, inhibe la producción de IFN- γ cuando éstos se encuentran activados (Banchereau et al., 1994) La IL-4 puede inhibir también la producción de NO \bullet , promoviendo la expresión de la arginasa (Munder et al., 1999) que cataliza la hidrólisis de arginina a ornitina y por ello compite con NOS por sus sustrato, la L-arginina (Vercelli, 2003). Otra citocina que forma parte también del perfil de citocinas liberadas por el fenotipo Th2 y que tiene efecto sobre la supresión de NO \bullet es la IL-13. Esta molécula regula la inducción de arginasa en macrófagos, incrementándose los niveles de ésta e involucrándose así con la inhibición del NO \bullet (Gordon, 2003; Narayan et al., 1998). Como se puede observar, son muy diversos los mecanismos por medio de los cuales la respuesta anti-Cop1 (autorreactividad protectora) puede disminuir las concentraciones de NO \bullet . Actualmente existe importante evidencia en relación al efecto benéfico proporcionado por las células inmunes sobre el tejido nervioso lesionado. Con base en esto, se han desarrollado diferentes estrategias cuyo objetivo principal es modular la activación de las células gliales a través de su interacción con las células T. Esta interacción de alguna manera favorece la opsonización, fagocitosis y presentación antigénica en células como la microglía (Kipnis and Schwartz, 2002). Además, en dichas células, promueve la actividad removedora de detritus (Shaked et al., 2005; Shaked et al., 2004), la expresión de neurotrofinas, transportadores para glutamato (Nakajima et al., 2001; Rimaniol et al., 2000) y de moléculas que le permiten una mejor interacción con las células T (moléculas del MHC clase-II, CD40, B7.1, B7.2). La influencia de estas últimas provoca también en las células gliales la liberación de citocinas que disminuyen la producción de NO \bullet , como: IL-13, TGF- β , IL-4, IL-10 (Doyle et al., 1994; Munoz-Fernandez et al., 1994), sugiriendo esto que el fenotipo que adquiere la glía expuesta a la activación local con células T es protector y puede tener importante participación en la restauración de tejido neural.

Diferentes estudios han demostrado que el efecto benéfico originado por la autoreactividad protectora (representada en este trabajo por la respuesta anti-Cop-1) en modelos de lesión al SNC (Aharoni et al., 1998, Aharoni, et al., 2002); es el resultado de una respuesta dirigida específicamente contra antígenos neurales. Para comprobar si la inhibición

en la producción de NO• era promovida específicamente por los linfocitos activados contra Cop-1, en el presente trabajo se utilizaron como controles, células anti-Cop-1 obtenidas de animales inmunizados con Cop-1 pero en presencia de un péptido irrelevante en el cocultivo; o bien, células anti-Cop-1 activadas con ovalbúmina en presencia de ésta misma proteína. Cuando se usó el péptido irrelevante, la producción de NO• no se disminuyó; más bien en algunos casos, ésta se incrementó. Cuando la relación de células anti-Cop-1--glía en los cocultivos fue de 1:10, con y sin activación de la glía con el LPS, se observó un incremento significativo del NO•. Esto pudo deberse a que el reconocimiento del péptido provocó la activación de células fagocíticas y con ello la liberación de especies reactivas de nitrógeno y citocinas proinflamatorias como INF- γ TNF- α , IL-1- β , que pudieron incrementar aún más la producción de NO• (Schwentker et al., 2002; Schwentker and Billiar, 2002).

Cuando se realizaron los cocultivos con células anti-OVA obtenidas de animales inmunizados con OVA, en las mismas proporciones y condiciones que se usaron para Cop-1, se observó una disminución significativa en la producción de NO•, con y sin activación de LPS. Este fue un hallazgo inesperado ya que de acuerdo a reportes anteriores, la protección al tejido neural es brindada por una respuesta inmune específica contra antígenos neurales (Avidan et al., 2004). La OVA no es un antígeno propio, esto origina el primer conflicto en relación a lo establecido en el concepto de autorreactividad protectora. Además la OVA genera una respuesta de células Th1 (Wolf et al., 2001) y un microambiente clásicamente denominado proinflamatorio, debido a la liberación de citocinas como INF- γ , TNF- α , IL-1- β , IL-2 y TNF- β . Varios estudios han demostrado que la existencia de una respuesta Th1 predominante después de una lesión al SNC incrementa el daño al tejido (Jones et al., 2004). Por lo tanto, resulta muy difícil explicar en la presente tesis, como la respuesta que genera OVA, puede provocar la disminución de de NO•, ya que entre otras cosas, INF- γ estimula la expresión del gen para iNOs (Narayan et al., 1998) lo que resultaría en una mayor producción de NO• y no en una reducción. Una posible explicación de la disminución de NO• en los cocultivos de OVA, es que al predominar las células Th1 y con ello una alta producción de IL-2 e INF- γ (Wolf et al., 2001), este último promueve la apoptosis de las células gliales, específicamente de la microglía y

con esto como consecuencia un menor número de células, reflejándose esto en un descenso de la producción de NO•. El INF- γ incrementa de manera importante la expresión de Fas (Narayan et al., 1998) y FasL en la microglía, promoviendo con ello la apoptosis de éstas células (Badie et al., 2000; Frigerio et al., 2000). Por otra parte, también IL-1 y TNF- α incrementan la expresión y transcripción de Fas (Spanaus et al., 1998), mecanismo regulatorio que puede estar activado por la expresión y activación de NF-kB (Osborn et al., 1989; Spanaus et al., 1998) mismo que se une al sitio de reconocimiento en el gen FasL (Takahashi et al., 1994) aumentando con esto, la posibilidad de muerte en la microglía y otras células vecinas. Adicionalmente se ha reportado que el TNF- α e INF- γ potencian la muerte de microglía por medio de la disminución de moléculas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL (Spanaus et al., 1998). Por otro lado, los astrocitos expresan también altos niveles de Fas en forma constitutiva (Sun et al., 1998; Thilenius et al., 1999), sin embargo dicha expresión se incrementa por la acción de varias citocinas como IL-1 β , IL-6, IFN- γ , and TNF- α (Choi et al., 1999) aunque algunos autores reportan que su muerte no está dada por este ligando normalmente (Becher et al., 1998). Otros han reportado que los astrocitos son sensibles a la apoptosis por esta vía en presencia de altas concentraciones de IFN- γ (Saas et al., 1999).

Todo lo anterior sustenta la posibilidad de que las células gliales estén siendo eliminadas como consecuencia de su interacción con el microambiente Th1 predominante. Más aún, estudios realizados en modelos animales han demostrado que la inmunización con OVA incrementa el daño a las células neurales (Ankeny and Popovich, 2007).

Existe también la posibilidad de que la respuesta inmune contra OVA pudiera ser protectora; sin embargo, la evidencia de diferentes trabajos relacionados con el tópico no sustentan esta posibilidad (Ankeny and Popovich, 2007; Hauben et al., 2000; Hauben et al., 2001; Shaked et al., 2004). En dichos estudios, se ha utilizado también la inmunización con OVA como un testigo negativo para evaluar otros parámetros y en ninguno de los casos se observó un efecto protector. Con los resultados de la presente tesis no podemos llegar a una conclusión sólida al respecto. Es necesario diseñar nuevos experimentos dirigidos especialmente a dilucidar la causa real de la disminución del NO• en los cocultivos con células anti-OVA.

Los resultados de esta tesis indican que la respuesta autorreactiva contra Cop-1 disminuye en forma significativa las concentraciones de NO• lo cual sugiere que éste podría ser uno de los mecanismos a través del cual la autorreactividad protectora lleva a cabo su efecto benéfico sobre el tejido neural después de una lesión.

Deberán planearse experimentos en el futuro para explorar en otros péptidos neurales modificados el efecto obtenido con Cop-1. Además deberá investigarse el efecto de la inmunización con Cop-1 sobre las concentraciones de otras especies reactivas y sobre el mismo fenómeno de lipoperoxidación, factor importante en la destrucción del tejido neural después de una lesión.

11. CONCLUSIONES

1. Las células T anti-Cop-1 con su antígeno homólogo promueven una disminución significativa en la producción de NO• en cocultivos con células gliales pero no con un antígeno heterólogo en las proporciones 1:10 y 1:100 .
2. Las células T anti-OVA con su antígeno homólogo promueven una disminución significativa en la producción de NO• en cocultivos con células gliales en las proporciones 1:10 y 1:100
3. El efecto de células T anti-Cop-1 depende de su activación *in vitro* con su antígeno homólogo.

12. PERSPECTIVAS

- ❖ Determinar el perfil de citocinas predominantes en la activación de linfocitos T contra Cop-1 cocultivados con la glía.
- ❖ Analizar el efecto de la activación de linfocitos T con Cop-1, sobre la expresión de iNOS en la glía *in vitro*.
- ❖ Explorar el efecto de los linfocitos T contra ovalbúmina, sobre las células gliales y su producción de óxido nítrico.
- ❖ Determinar la expresión de Fas y FasL en la glía y células anti-OVA *in vitro* después de la estimulación con su antígeno homólogo.

13. ANEXOS

DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS

ANEXO 1. Obtención de células gliales

La extracción de las células gliales fueron obtenidas de animales recién nacidos (1 a 3 días de edad) en condiciones de asepsia.

- ✦ Decapitar y extraer los cerebros de las ratones recién nacidos y depositarlos en una caja Petri con 7 ml medio de cultivo Hank's (HBSS) suplementado con estreptomycin y penicilina (100 U/ml) manteniendo la caja a 4°C.
- ✦ Agregar 7 ml de HBSS, 3 ml de tripsina al 2.5 % y 3 µl de DNAsa, este debe estar a temperatura ambiente
- ✦ Dejar incubar 15 minutos dando movimientos gentiles
- ✦ Transferir a un tubo de 50 ml.
- ✦ Dejar reposar 5 min.
- ✦ Remover el sobrenadante.
- ✦ Añadir 10ml de HBSS con 5 µl de DNAsa
- ✦ Homogenización del tejido con una pipeta de 10 y 5 ml.
- ✦ Centrifugar a 300 g por 5 minutos a 4°C.

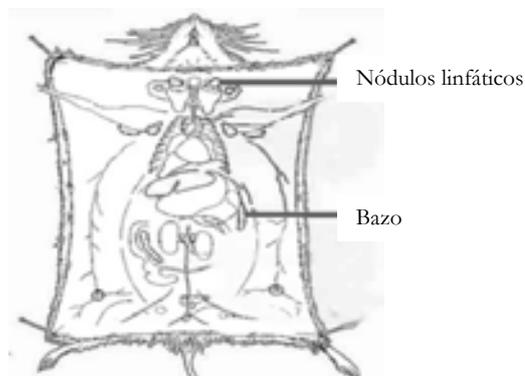
- ✦ Decantar el sobrenadante
- ✦ Resuspender la pastilla con 10 ml de HBSS y 3µl de DNAsa
- ✦ Dejar reposar de 30 a 45 segundos
- ✦ Tomar la suspensión celular y transferirla a otro tubo
- ✦ Centrifugar a 700g, 5 minutos a 4°C.
- ✦ Decantar el sobrenadante
- ✦ Resuspender en 5ml de medio DMEM del inglés Dulbecco' s modified eagle's medium suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina (1mM), estreptomocina/penicilina (100 U/ml) y piruvato de sodio (1 mM), posteriormente homogenizar
- ✦ Determinar la densidad celular y ajustar para cada fiasco con poly-D- lisina, (PDL, 10ug/ml) de acuerdo con el área de siembra.
- ✦ Incubar 37°C, 5% CO₂ haciendo cambios diarios de medio de cultivo durante 6 días.

ANEXO 2. Obtención de células anti-OVA y anti-Cop-1

Una vez extraídos órganos linfoides (nódulos linfáticos cervicales y bazo), se colocaron en RPMI para posteriormente ser macerados por separado con el émbolo de una jeringa estéril. Mediante la técnica de ficol se obtuvieron las células mononucleadas.

La extracción de células se hace de ratones hembra de 4-6 semanas de edad, inmunocompetentes e inmunizadas vía subcutánea con el péptido correspondiente 9 a 12 días después de la inmunización.

- ✦ Los ratones fueron anestesiados y en condiciones de asepsia fueron procesados
- ✦ Colocar al animal en posición decúbito sobre la tabla de disección
- ✦ Localizar y extraer los nódulos linfáticos cervicales y el bazo, como se ilustra en la siguiente figura:



- ✦ Macerar gentilmente dichos órganos linfoides en una taza de disociación que contiene RPMI suplementado con L-glutamina (1mM), estreptomycin /penicilina (100 U/ml)
- ✦ Transferir a un tubo y dejar reposar por 3 minutos
- ✦ Recuperar el sobrenadante.
- ✦ Centrifugar a 300 g por 5 minutos a 4°C.
- ✦ Resuspender la pastilla en 5 ml de DMEM
- ✦ Transferir a un tubo con 3 ml de con ficol a temperatura ambiente
- ✦ Centrifugar a 700 g por 25 minutos a temperatura ambiente
- ✦ Lavar 3 veces con PBS y medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina (1mM), aminoácidos no esenciales (1mM), estreptomycin/penicilina (100 U/ml) y piruvato de sodio (1 mM)
- ✦ Cuantificar en una cámara de Neubauer para iniciar el proceso de siembra y estimulación.

ANEXO 3. Proliferación celular

Después de la obtención de células anti-OVA Y anti-Cop-1, se contaron y se prepararon para la proliferación celular que se evaluó a través de la técnica de incorporación de $[6-^3\text{H}]$ Timidina, ya que en proceso de replicación la timidina (en este caso, marcada con un isótopo radiactivo: tritio) es tomada del ambiente extracelular e incorporada a solo una de las cromátidas de cada cromosoma pues la replicación del DNA es semiconservativa. Para ello se colocaron 300,000 células/pozo, en placas de 96 pozos con RPMI suplementado, es decir con suero fetal bovino (SFB) al 10%, estreptomycin/penicilina (100 U/ml), L-glutamina, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y el péptido Cop-1 o OVA y Concanavalina-A en una concentración de 2.5ug/ml (ConA, como control positivo, el cual es un activador celular inespecífico). Se incubaron durante 72 horas a 37° C en presencia de 5% de CO₂, 18 horas antes de la hora 72 se agregó a cada pozo 1 μCi de $[6-^3\text{H}]$ timidina (actividad específica 999 GBq/mmol, 27 Ci/mmol, Amersham), posteriormente por medio de un cosechador se lisaron las células para la obtención de DNA, agrandoles líquido de centelleo para ser leídas en un contador de radioactividad beta, Beckman L5 6000 a TA. Los valores obtenidos fueron expresados en cuentas por minuto (cpm).

ANEXO 4. Determinación de Óxido Nítrico (NO•)

Para la determinación de NO, fue por medio de un método colorimétrico basado en la reacción de Griess que identifica la presencia de metabolitos de NO como el nitrito.

- ✦ Tomar 100 ml del sobrenadante de los cocultivos y homogenizarlo con 100 ml del reactivo de Griess (1:1 (v/v) de 0.1% naptiletil-nediamina (NED) in H₂O con 1% sulfanilamida en 5% H₃PO₄)
- ✦ Incubar 10 minutos
- ✦ Leer a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro.

14. REFERENCIAS

1. (1990) Ley general de Salud. Título Séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. pp 430-431. Editorial porrua 6ª. De México, D.F.
2. Aarum J, Sandberg K, Haeberlein SL, Persson MA (2003) Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15983-15988.
3. Abbas A.K., Linchtman H, Pober I. (2002) *Inmunología Celular y Molecular*. España: McGraw-Hill.
4. Abbas KA.A et al. (2000) *Cellular and Molecular Immunology*. Phyladelphia. USA:W.B. Saunders Company.
5. Abbas AK, Lohr J, Knoechel B, Nagabhushanam V (2004) T cell tolerance and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 3:471-475.
6. Aharoni R, Meshorer A, Sela M, Arnon R (2002) Oral treatment of mice with copolymer 1 (glatiramer acetate) results in the accumulation of specific Th2 cells in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 126:58-68.
7. Aharoni R, Schlegel PG, Teitelbaum D, Roikhel-Karpov O, Chen Y, Arnon R, Sela M, Chao NJ (1997) Studies on the mechanism and specificity of the effect of the synthetic random copolymer GLAT on graft-versus-host disease. *Immunol Lett* 58:79-87.
8. Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M (1999) Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:634-639.

9. Aharoni R, Teitelbaum D, Leitner O, Meshorer A, Sela M, Arnon R (2000a) Specific Th2 cells accumulate in the central nervous system of mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis by copolymer 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11472-11477.
10. Aharoni R, Teitelbaum D, Sela M, Arnon R (1998) Bystander suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cell lines and clones of the Th2 type induced by copolymer 1. *J Neuroimmunol* 91:135-146.
11. Ahn M, Kang J, Lee Y, Riu K, Kim Y, Jee Y, Matsumoto Y, Shin T (2001) Pertussis toxin-induced hyperacute autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats is correlated with increased expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor alpha. *Neurosci Lett* 308:41-44.
12. Akaoka H, Szymocha R, Beurton-Marduel P, Bernard A, Belin MF, Giraudon P (2001) Functional changes in astrocytes by human T-lymphotropic virus type-1 T-lymphocytes. *Virus Res* 78:57-66.
13. Alessandri B, Rice AC, Levasseur J, DeFord M, Hamm RJ, Bullock MR (2002) Cyclosporin A improves brain tissue oxygen consumption and learning/memory performance after lateral fluid percussion injury in rats. *J Neurotrauma* 19:829-841.
14. Allan SM, Harrison DC, Read S, Collins B, Parsons AA, Philpott K, Rothwell NJ (2001) Selective increases in cytokine expression in the rat brain in response to striatal injection of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate and interleukin-1. *Brain Res Mol Brain Res* 93:180-189.
15. Allan SM, Rothwell NJ (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2:734-744.
16. Allen PM, Murphy KM, Schreiber RD, Unanue ER (1999) *Immunology*. *Immunity* 11:649-651.
17. Almeida ARM, Rocha B, Freitas AA, Tanchot C (2005) Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. *Seminars in Immunology* 17:239-249.
18. Aloisi F, Penna G, Polazzi E, Minghetti L, Adorini L (1999) CD40-CD154 interaction and IFN-gamma are required for IL-12 but not prostaglandin E2 secretion by microglia during antigen presentation to Th1 cells. *J Immunol* 162:1384-1391.
19. Aloisi F, Ria F, Adorini L (2000) Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today* 21:141-147.
20. Aloisi F, Ria F, Penna G, Adorini L (1998) Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J Immunol* 160:4671-4680.

21. Alzeer AH, Al-Arifi A, Warsy AS, Ansari Z, Zhang H, Vincent JL (1999) Nitric oxide production is enhanced in patients with heat stroke. *Intensive Care Med* 25:58-62.
22. Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32:1-14.
23. Angelov DN, Waibel S, Guntinas-Lichius O, Lenzen M, Neiss WF, Tomov TL, Yoles E, Kipnis J, Schori H, Reuter A, Ludolph A, Schwartz M (2003) Therapeutic vaccine for acute and chronic motor neuron diseases: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *PNAS* 100:4790-4795.
24. Ankeny DP, Popovich PG (2007) Central nervous system and non-central nervous system antigen vaccines exacerbate neuropathology caused by nerve injury. *Eur J Neurosci* 25:2053-2064.
25. Arnon R, Aharoni R (2004) Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 Suppl 2:14593-14598.
26. Arnon R, Sela M (2003) Immunomodulation by the copolymer glatiramer acetate. *J Mol Recognit* 16:412-421.
27. Arnon R, Sela M, Teitelbaum D (1996) New insights into the mechanism of action of copolymer 1 in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neurol* 243:S8-13.
28. Asakura E, Tojo N, Tanabe T (1999) Monocyte proliferation induced by modified serum is associated with endogenous M-CSF production: evidence for involvement of a signalling pathway via scavenger receptors. *Cell Prolif* 32:185-194.
29. Avidan H, Kipnis J, Butovsky O, Caspi RR, Schwartz M (2004) Vaccination with autoantigen protects against aggregated beta-amyloid and glutamate toxicity by controlling microglia: effect of CD4+CD25+ T cells. *Eur J Immunol* 34:3434-3445.
30. Azoulay D, Vachapova V, Shihman B, Miler A, Karni A (2005) Lower brain-derived neurotrophic factor in serum of relapsing remitting MS: Reversal by glatiramer acetate. *Journal of Neuroimmunology* 167:215-218.
31. Badie B, Schartner J, Vorpahl J, Preston K (2000) Interferon-gamma induces apoptosis and augments the expression of Fas and Fas ligand by microglia in vitro. *Exp Neurol* 162:290-296.
32. Balazs R, Machiyama Y, Hammond BJ, Julian T, Richter D (1970) The operation of the gamma-aminobutyrate bypath of the tricarboxylic acid cycle in brain tissue in vitro. *Biochem J* 116:445-461.
33. Balentine JD (1978) Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest* 39:236-253.
34. Balentine JD (1988) Spinal cord trauma: in search of the meaning of granular axoplasm and vesicular myelin. *J Neuropathol Exp Neurol* 47:77-92.

35. Banati RB, Gehrman J, Kreutzberg GW (1996) Early glial reactions in ischemic lesions. *Adv Neurol* 71:329-336.
36. Banchereau J, Briere F, Galizzi JP, Miossec P, Rousset F (1994) Human interleukin 4. *J Lipid Mediat Cell Signal* 9:43-53.
37. Barger SW, Basile AS (2001) Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function. *J Neurochem* 76:846-854.
38. Barouch R, Schwartz M (2002) Autoreactive T cells induce neurotrophin production by immune and neural cells in injured rat optic nerve: implications for protective autoimmunity. *FASEB J* 16:1304-1306.
39. Becher B, D'Souza SD, Troutt AB, Antel JP (1998) Fas expression on human fetal astrocytes without susceptibility to fas-mediated cytotoxicity. *Neuroscience* 84:627-634.
40. Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP (1994) Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol* 233:229-240.
41. Bedbrook GM (1987) The development and care of spinal cord paralysis (1918 to 1986). *Paraplegia* 25:172-184.
42. Belmadani A, Tran PB, Ren D, Miller RJ (2006) Chemokines Regulate the Migration of Neural Progenitors to Sites of Neuroinflammation. *J Neurosci* 26:3182-3191.
43. Benveniste EN, Huneycutt BS, Shrikant P, Ballestas ME (1995) Second messenger systems in the regulation of cytokines and adhesion molecules in the central nervous system. *Brain Behav Immun* 9:304-314.
44. Benveniste O, Cherin P, Maisonobe T, Merat R, Chosidow O, Mouthon L, Guillevin L, Flahault A, Burland MC, Klatzmann D, Herson S, Boyer O (2001) Severe perturbations of the blood T cell repertoire in polymyositis, but not dermatomyositis patients. *J Immunol* 167:3521-3529.
45. Berczi I, Chow DA, Sabbadini ER (1998) Neuroimmunoregulation and natural immunity. *Domest Anim Endocrinol* 15:273-281.
46. Bethea JR, Castro M, Keane RW, Lee TT, Dietrich WD, Yeziarski RP (1998) Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation. *J Neurosci* 18:3251-3260.
47. Bisceglia L, D'Ambrosio L, Piemontese MR, Carella M, Amati P, Bonneau D, Pilia G, Gasparini P, Zelante L (1998) Cellular Retinol Binding Protein 1 (RBP1): a frequent polymorphism, refined map position and exclusion as the Blepharophimosis Ptosis Epicanthus inversus Syndrome gene. *Mol Cell Probes* 12:255-258.

48. Bjorklund A, Lindvall O, Brundin P, Wictorin K, Strcker RE, Clarke DJ, Dunnet SB. (1987) Mechanisms of action of intracerebral neural implants: Studies on nigral and striatal grafts to the lesioned striatum. *TNIS* 10:506-509.
49. Bjorklund A, Stenevi U (1984) Intracerebral neural implants: neuronal replacement and reconstruction of damaged circuitries. *Annu Rev Neurosci* 7:279-308.
50. Blesch A, Tuszynski MH (2004) Gene therapy and cell transplantation for Alzheimer's disease and spinal cord injury. *Yonsei Med J* 45 Suppl: 28-31.
51. Bloch J, Bachoud-Levi AC, Deglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Palfi S, Nguyen JP, Bourdet C, Gaura V, Remy P, Brugieres P, Boisse MF, Baudic S, Cesaro P, Hantraye P, Aebischer P, Peschanski M (2004) Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther* 15:968-975.
52. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A (2000) The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 173:17-26.
53. Bolanos JP, Almeida A (1999) Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1411:415-436.
54. Bolanos JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB, Heales SJ (1997) Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 68:2227-2240.
55. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F (1998) Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187:129-134.
56. Boucher B.A., Phelps S.J. (1997) Acute management of the head injury patient. In: *Pharmacotherapy* (Dipiro J.T. TRLYGC, ed), pp 1229-1242. A Pathophysiological Approach. Stamford: Appleton Lange.
57. Braak H, Del TK (2004) Poor and protracted myelination as a contributory factor to neurodegenerative disorders. *Neurobiol Aging* 25:19-23.
58. Brinton RD (2004) Requirements of a brain selective estrogen: Advances and remaining challenges for developing a NeuroSERM. *J Alzheimers Dis* 6:S27-S35.
59. Brorson JR, Zhang Z, Vandenberghe W (1999) Ca(2+) permeation of AMPA receptors in cerebellar neurons expressing glu receptor 2. *J Neurosci* 19:9149-9159.
60. Brott T, Bogousslavsky J (2000) Treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 343:710-722.

61. Brown GC (1997) Nitric oxide inhibition of cytochrome oxidase and mitochondrial respiration: implications for inflammatory, neurodegenerative and ischaemic pathologies. *Mol Cell Biochem* 174:189-192.
62. Brown GC, Cooper CE (1994) Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 356:295-298.
63. Byram SC, Carson MJ, DeBoy CA, Serpe CJ, Sanders VM, Jones KJ (2004) CD4-positive T cell-mediated neuroprotection requires dual compartment antigen presentation. *J Neurosci* 24:4333-4339.
64. Calderon-Aranda ES., Selisko B., York EJ., Gurrola GB., Stewart JM., Possani LD (1999) Mapping of an epitope recognized by a neutralizing monoclonal antibody specific to toxin Cn2 from the scorpion *Centruroides noxius*, using discontinuous synthetic peptides *Eur. Journal Biochem.* 264: 746-755
65. Canh MY, Serpe CJ, Sanders V, Jones KJ (2006) CD4+ T cell-mediated facial motoneuron survival after injury: Distribution pattern of cell death and rescue throughout the extent of the facial motor nucleus. *Journal of Neuroimmunology* 181:93-99.
66. Carrizo PH, Dubin M, Stoppani AO (1998) [Physiopathologic effects of nitric oxide and their relationship with oxidative stress]. *Medicina (B Aires)* 58:367-373.
67. Carroll MC, Holers VM (2005) Innate autoimmunity. *Adv Immunol* 86:137-157.
68. Cash E, Rott O (1994) Microglial cells qualify as the stimulators of unprimed CD4+ and CD8+ T lymphocytes in the central nervous system. *Clin Exp Immunol* 98:313-318.
69. Castegna A, Thongboonkerd V, Klein JB, Lynn B, Markesbery WR, Butterfield DA (2003) Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 85:1394-1401.
70. Chao M, Casaccia-Bonnel P, Carter B, Chittka A, Kong H, Yoon SO (1998) Neurotrophin receptors: mediators of life and death. *Brain Res Brain Res Rev* 26:295-301.
71. Chinchilla M, Guerrero OM, Solano E (1982) Lack of multiplication of *Toxoplasma* in macrophages of rats in vitro. *J Parasitol* 68:952-955.
72. Choi C, Kwon D, Min K, Chae C (1999) In-situ hybridization for the detection of inflammatory cytokines (IL-1, TNF-alpha and IL-6) in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Comp Pathol* 121:349-356.
73. Colton CA (1995) Induction of nitric oxide in cultured microglia: evidence for a cytoprotective role. *Adv Neuroimmunol* 5:491-503.
74. Cooper GS, Stroehla BC (2003) The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2:119-125.

75. Coyle JT, Murphy TH, Puttfarcken PS, Lyons EW, Vornov JJ (1991) The non-excitatory mechanisms of glutamate induced neurotoxicity. *Epilepsy Res* 10:41-48.
76. Cserr HF, Knopf PM (1992) Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today* 13:507-512.
77. Dabbert D, Rosner S, Kramer M, Scholl U, Tumani H, Mader M, Weber F (2000) Glatiramer acetate (copolymer-1)-specific, human T cell lines: cytokine profile and suppression of T cell lines reactive against myelin basic protein. *Neurosci Lett* 289:205-208.
78. Dawson VL, Dawson TM (1998) Nitric oxide in neurodegeneration. *Prog Brain Res* 118:215-229.
79. De Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 26:202-226.
80. De SR, Levi G, Aloisi F (1998) Interferon gamma gene expression in rat central nervous system glial cells. *Cytokine* 10:418-422.
81. DeBoy CA, Xin J, Byram SC, Serpe CJ, Sanders VM, Jones KJ (2006) Immune-mediated neuroprotection of axotomized mouse facial motoneurons is dependent on the IL-4/STAT6 signaling pathway in CD4+ T cells. *Experimental Neurology* 201:212-224.
82. Dekeyser, Sulter G., Luiten P.G. (1999) Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischemic stroke are we doing te right thing. *Trends Neurosci* 22:535-540.
83. Del PG, De CM, Lammel RM, D'Elis MM, Daniel KC, Giusti B, Abbate R, Romagnani S (1995) Th1 and Th2 T-helper cells exert opposite regulatory effects on procoagulant activity and tissue factor production by human monocytes. *Blood* 86:250-257.
84. DeNicola LR, Kisson N, Duckworth LJ, Blake KV, Murphy SP, Silkoff PE (2000) Exhaled nitric oxide as an indicator of severity of asthmatic inflammation. *Pediatr Emerg Care* 16:290-295.
85. Dickey CA, De Mesquita DD, Morgan D, Pennypacker KR (2004) Induction of memory-associated immediate early genes by nerve growth factor in rat primary cortical neurons and differentiated mouse Neuro2A cells. *Neurosci Lett* 366:10-14.
86. Dijkstra CD, De Groot CJ, Huitinga I (1992) The role of macrophages in demyelination. *J Neuroimmunol* 40:183-188.
87. Ding M, Zhang M, Wong JL, Rogers NE, Ignarro LJ, Voskuhl RR (1998) Antisense knockdown of inducible nitric oxide synthase inhibits induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *J Immunol* 160:2560-2564.

88. Dogan RN, Vasu C, Holterman MJ, Prabhakar BS (2003) Absence of IL-4, and not suppression of the Th2 response, prevents development of experimental autoimmune Graves disease. *J Immunol* 170:2195-2204.
89. Dong Y, Benveniste EN (2001) Immune function of astrocytes. *Glia* 36:180-190.
90. Douhou A, Troadec JD, Ruberg M, Raisman-Vozari R, Michel PP (2001) Survival promotion of mesencephalic dopaminergic neurons by depolarizing concentrations of K⁺ requires concurrent inactivation of NMDA or AMPA/kainate receptors. *J Neurochem* 78:163-174.
91. Doyle AG, Herbein G, Montaner LJ, Minty AJ, Caput D, Ferrara P, Gordon S (1994) Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur J Immunol* 24:1441-1445.
92. Duda PW, Krieger JI, Schmied MC, Balentine C, Hafler DA (2000) Human and murine CD4 T cell reactivity to a complex antigen: recognition of the synthetic random polypeptide glatiramer acetate. *J Immunol* 165:7300-7307.
93. Dusart I, Schwab ME (1994) Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 6:712-724.
94. Dylke J, Lopes J, ng-Lawson M, Machtaler S, Matsuuchi L (2007) Role of the extracellular and transmembrane domain of Ig-[alpha]/[beta] in assembly of the B cell antigen receptor (BCR). *Immunology Letters* 112:47-57.
95. Eddleston M, de la Torre JC, Oldstone MB, Loskutoff DJ, Edgington TS, Mackman N (1993) Astrocytes are the primary source of tissue factor in the murine central nervous system. A role for astrocytes in cerebral hemostasis. *J Clin Invest* 92:349-358.
96. Faden AI, Simon RP (1988) A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol* 23:623-626.
97. Farina C, Aloisi F, Meinl E (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28:138-145.
98. Farina C, Then BF, Albrecht H, Meinl E, Yassouridis A, Neuhaus O, Hohlfeld R (2001) Treatment of multiple sclerosis with Copaxone (COP): Elispot assay detects COP-induced interleukin-4 and interferon-gamma response in blood cells. *Brain* 124:705-719.
99. Felsner P, Hofer D, Rinner I, Mangge H, Gruber M, Korsatko W, Schauenstein K (1992) Continuous in vivo treatment with catecholamines suppresses in vitro reactivity of rat peripheral blood T-lymphocytes via alpha-mediated mechanisms. *J Neuroimmunol* 37:47-57.

100. Fenyk-Melody JE, Garrison AE, Brunnert SR, Weidner JR, Shen F, Shelton BA, Mudgett JS (1998) Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated in mice lacking the NOS2 gene. *J Immunol* 160:2940-2946.
101. Fischer HG, Reichmann G (2001) Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol* 166:2717-2726.
102. Ford AL, Foulcher E, Lemckert FA, Sedgwick JD (1996) Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death. *J Exp Med* 184:1737-1745.
103. Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM (2004) Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med* 10:1055-1063.
104. Fridkis-Hareli M, Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M, Strominger JL (1999) Binding of random copolymers of three amino acids to class II MHC molecules. *Int Immunol* 11:635-641.
105. Fridkis-Hareli M, Mehr R, Abel L, Globerson A (1994) Developmental interactions of CD4 T cells and thymocytes: age-related differential effects. *Mech Ageing Dev* 73:169-178.
106. Fridkis-Hareli M, Teitelbaum D, Gurevich E, Pecht I, Brautbar C, Kwon OJ, Brenner T, Arnon R, Sela M (1994) Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells--specificity and promiscuity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4872-4876.
107. Fridkis-Hareli M, Teitelbaum D, Pecht I, Arnon R, Sela M (1997) Binding of copolymer 1 and myelin basic protein leads to clustering of class II MHC molecules on antigen-presenting cells. *Int Immunol* 9:925-934.
108. Friedmann I, Hauben E, Yoles E, Kardash L, Schwartz M (2001) T cell-mediated neuroprotection involves antithrombin activity. *J Neuroimmunol* 121:12-21.
109. Frigerio S, Silei V, Ciusani E, Massa G, Lauro GM, Salmaggi A (2000) Modulation of fas-ligand (Fas-L) on human microglial cells: an in vitro study. *J Neuroimmunol* 105:109-114.
110. Fu C, Chute DJ, Farag ES, Garakian J, Cummings JL, Vinters HV (2004) Comorbidity in dementia: an autopsy study. *Arch Pathol Lab Med* 128:32-38.
111. Fuller KG, Olson JK, Howard LM, Croxford JL, Miller SD (2004) Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Methods Mol Med* 102:339-361.
112. Gaitatzis A, Carroll K, Majeed A, Sander W (2004) The epidemiology of the comorbidity of epilepsy in the general population. *Epilepsia* 45:1613-1622.
113. Galea E, Feinstein DL, Reis DJ (1992) Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10945-10949.

114. Gayton Arthuer C. (1994) *Anatomía y Fisiología del Sistema Nervioso*. (Panamericana Médica, ed), pp 472. Madrid. España.
115. Goldsby, Kindt (2002) *Inmunología*. Ed Mc Graw Hill.
116. Goldsby Richard A. (2000) *Kuby Immunology*. (W.H.Freeman and Company., ed), pp 670. New York. USA.
117. Goldstein GW, Betz AL (1986) The blood-brain barrier. *Sci Am* 255:74-83.
118. Goodkin R, Campbell JB (1969) Sequential pathologic changes in spinal cord injury: a preliminary report. *Surg Forum* 20:430-432.
119. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3:23-35.
120. Gran B, Rostami A (2001) T cells, cytokines, and autoantigens in multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 1:263-270.
121. Gras G, Chretien F, Vallat-Decouvelaere AV, Le PG, Porcheray F, Bossuet C, Leone C, Mialocq P, reudde-Bosquet N, Clayette P, Le GR, Creminon C, Dormont D, Rimaniol AC, Gray F (2003) Regulated expression of sodium-dependent glutamate transporters and synthetase: a neuroprotective role for activated microglia and macrophages in HIV infection? *Brain Pathol* 13:211-222.
122. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138.
123. Grimaldi CM, Hicks R, Diamond B (2005) B cell selection and susceptibility to autoimmunity. *J Immunol* 174:1775-1781.
124. Guzik TJ, Korbut R, mek-Guzik T (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54:469-487.
125. Hall FC, Visconti KC, Ahmad RC, Parry SL, Miltenburg AM, McConnell HM, Mellins ED, Sonderstrup G (2003) Cytokines elicited by T cell epitopes from a synovial autoantigen: altered peptide ligands can reduce interferon-gamma and interleukin-10 production. *Arthritis Rheum* 48:2375-2385.
126. Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Tsuchiya K, Niwa M, Tsutsumishita Y, Fukuzawa K (1996) Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord. *Free Radic Biol Med* 20:1-9.
127. Hauben E, Agranov E, Gothilf A, Nevo U, Cohen A, Smirnov I, Steinman L, Schwartz M (2001) Posttraumatic therapeutic vaccination with modified myelin self-antigen prevents complete paralysis while avoiding autoimmune disease. *J Clin Invest* 108:591-599.
128. 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. *J Neurosci* 20:6421-6430.

129. Hauben E, Nevo U, Yoles E, Moalem G, Agranov E, Mor F, Akselrod S, Neeman M, Cohen IR, Schwartz M (2000) Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury. *Lancet* 355:286-287.
130. Havenith CE, Askew D, Walker WS (1998) Mouse resident microglia: isolation and characterization of immunoregulatory properties with naive CD4+ and CD8+ T-cells. *Glia* 22:348-359.
131. Heba G, Krzeminski T, Porc M, Grzyb J, mbinska-Kiec A (2001) Relation between expression of TNF alpha, iNOS, VEGF mRNA and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats. *J Physiol Pharmacol* 52:39-52.
132. Hewett SJ, Csernansky CA, Choi DW (1994) Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron* 13:487-494.
133. Hickey WF (1991) Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1:97-105.
134. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H (1991) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28:254-260.
135. Hiernan M.B. (1998) *El Sistema Nervioso Humano*. Ed. Mc Graw- Hill. Interamericana. México.
136. Hoane MR (2004) Magnesium therapy and recovery of function in experimental models of brain injury and neurodegenerative disease. *Clin Calcium* 14:65-70.
137. Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ (1997a) S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem* 69:2294-2301.
138. Hu S, Peterson PK, Chao CC (1998) Kappa-opioid modulation of human microglial cell superoxide anion generation. *Biochem Pharmacol* 56:285-288.
139. Hua LL, Kim MO, Brosnan CF, Lee SC (2002) Modulation of astrocyte inducible nitric oxide synthase and cytokine expression by interferon beta is associated with induction and inhibition of interferon gamma-activated sequence binding activity. *J Neurochem* 83:1120-1128.
140. Huang Y, Anderson R (2003) A single amino acid substitution in a recombinant G protein vaccine drastically curtails protective immunity against respiratory syncytial virus (RSV). *Vaccine* 21:2500-2505.
141. Hussien Y, Sanna A, Soderstrom M, Link H, Huang YM (2001) Glatiramer acetate and IFN-beta act on dendritic cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 121:102-110.
142. Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME (1997) Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci* 17:9157-9164.

143. Ignarro LJ (2002) Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 53:503-514.
144. Illes Z, Stern JN, Reddy J, Waldner H, Mycko MP, Brosnan CF, Ellmerich S, Altmann DM, Santambrogio L, Strominger JL, Kuchroo VK (2004) Modified amino acid copolymers suppress myelin basic protein 85-99-induced encephalomyelitis in humanized mice through different effects on T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11749-11754.
145. Isaksson J, Farooque M, Olsson Y (2004) Improved functional outcome after spinal cord injury in iNOS-deficient mice. *Spinal Cord*.
146. Ito S, Ansari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly RP, Lerner AC, Finbloom DS (1999) Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood* 93:1456-1463.
147. Jaffrey SR, Snyder SH (1995) Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:417-440.
148. Jameson SC, Bevan MJ (1995) T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity* 2:1-11.
149. Johansen C (2004) Electromagnetic fields and health effects--epidemiologic studies of cancer, diseases of the central nervous system and arrhythmia-related heart disease 22. *Scand J Work Environ Health* 30 Suppl 1:1-30.
150. Jones TB, Ankeny DP, Guan Z, McGaughy V, Fisher LC, Basso DM, Popovich PG (2004) Passive or active immunization with myelin basic protein impairs neurological function and exacerbates neuropathology after spinal cord injury in rats. *J Neurosci* 24:3752-3761.
151. 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. *J Neurosci* 22:2690-2700.
152. Kaptanoglu E, Solaroglu I, Surucu HS, Akbiyik F, Beskonakli E (2005) Blockade of sodium channels by phenytoin protects ultrastructure and attenuates lipid peroxidation in experimental spinal cord injury. *Acta Neurochir (Wien)*.
153. Katayama Y, Maeda T, Koshinaga M, Kawamata T, Tsubokawa T (1995) Role of excitatory amino acid-mediated ionic fluxes in traumatic brain injury. *Brain Pathol* 5:427-435.
154. Kersh GJ, Allen PM (1996) Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. *Nature* 380:495-498.
155. Kigerl MA, Mc Gauhay VM, Popovich PG. (2006) Comparative analysis of lesion development and intraspinal inflammation in four strains of mice following spinal contusion injury. *J Comp Neurol*;494578-94.

156. Kim S, Moon C, Wie MB, Kim H, Tanuma N, Matsumoto Y, Shin T (2000) Enhanced expression of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in autoimmune encephalomyelitis. *J Vet Sci* 1:11-17.
157. Kimelberg HK, Norenberg MD (1989) Astrocytes. *Sci Am* 260:66-72, 74, 76.
158. Kimelberg HK, Rose JW, Barron KD, Waniewski RA, Cragoe EJ (1989) Astrocytic swelling in traumatic-hypoxic brain injury. Beneficial effects of an inhibitor of anion exchange transport and glutamate uptake in glial cells. *Mol Chem Neuropathol* 11:1-31.
159. Kipnis J, Avidan H, Markovich Y, Mizrahi T, Hauben E, Prigozhina TB, Slavin S, Schwartz M (2004) Low-dose gamma-irradiation promotes survival of injured neurons in the central nervous system via homeostasis-driven proliferation of T cells. *Eur J Neurosci* 19:1191-1198.
160. Kipnis J, Cardon M, Avidan H, Lewitus GM, Mordechai S, Rolls A, Shani Y, Schwartz M (2004) Dopamine, through the extracellular signal-regulated kinase pathway, downregulates CD4+CD25+ regulatory T-cell activity: implications for neurodegeneration. *J Neurosci* 24:6133-6143.
161. Kipnis J, Mizrahi T, Hauben E, Shaked I, Shevach E, Schwartz M (2002) Neuroprotective autoimmunity: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15620-15625.
162. Kipnis J, Mizrahi T, Yoles E, Ben-Nun A, Schwartz M (2002) Myelin specific Th1 cells are necessary for post-traumatic protective autoimmunity. *J Neuroimmunol* 130:78-85.
163. Kipnis J, Nevo U, Panikashvili D, Alexandrovich A, Yoles E, Akselrod S, Shohami E, Schwartz M (2003) Therapeutic vaccination for closed head injury. *J Neurotrauma* 20:559-569.
164. Kipnis J, Schwartz M (2002) Dual action of glatiramer acetate (Cop-1) in the treatment of CNS autoimmune and neurodegenerative disorders. *Trends Mol Med* 8:319-323.
165. Kipnis J, Yoles E, Schori H, Hauben E, Shaked I, Schwartz M (2001) Neuronal survival after CNS insult is determined by a genetically encoded autoimmune response. *J Neurosci* 21:4564-4571.
166. Kiziltepe U, Turan NN, Han U, Ulus AT, Akar F (2004) Resveratrol, a red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg* 40:138-145.
167. Knowles RG, Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298 (Pt 2):249-258.
168. Kondo K, Hashimoto H, Kitanaka J, Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T, Baba A (1995) Expression of glutamate transporters in cultured glial cells. *Neurosci Lett* 188:140-142.
169. Koprowski H, Zheng YM, Heber-Katz E, Fraser N, Rorke L, Fu ZF, Hanlon C, Dietzschold B (1993) In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3024-3027.

170. Kreutzberg GW (1996) Principles of neuronal regeneration. *Acta Neurochir Suppl* 66:103-106.
171. Kulkarni AP, Kellaway LA, Lahiri DK, Kotwal GJ (2004) Neuroprotection from complement-mediated inflammatory damage. *Ann N Y Acad Sci* 1035:147-164.
172. Lazarov-Spiegler O, Solomon AS, Zeev-Brann AB, Hirschberg DL, Lavie V, Schwartz M (1996) Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. *FASEB J* 10:1296-1302.
173. Leist M, et al. (2004) Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 305:239-242.
174. Lemke M, Demediuk P, McIntosh TK, Vink R, Faden AI (1987) Alterations in tissue Mg⁺⁺, Na⁺ and spinal cord edema following impact trauma in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 147:1170-1175.
175. Lewitus GM, Kipnis J, Avidan H, Ben-Nun A, Schwartz M (2001) Neuroprotection induced by mucosal tolerance is epitope-dependent: Conflicting effects in different strains. *Journal of Neuroimmunology* In Press, Corrected Proof.
176. Liao SL, Chen CJ (2001) Differential effects of cytokines and redox potential on glutamate uptake in rat cortical glial cultures. *Neurosci Lett* 299:113-116.
177. Liu Z, Martin LJ (2004) Pluripotent fates and tissue regenerative potential of adult olfactory bulb neural stem and progenitor cells. *J Neurotrauma* 21:1479-1499.
178. Lopez-Redondo F, Nakajima K, Honda S, Kohsaka S (2000) Glutamate transporter GLT-1 is highly expressed in activated microglia following facial nerve axotomy. *Brain Res Mol Brain Res* 76:429-435.
179. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9730-9734.
180. Lu P, Jones LL, Tuszynski MH (2005) BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Exp Neurol* 191:344-360.
181. Lundin K, Aarum J, Appelsved L, Johansson-Borg A, von GE, Dypbukt J, Sandberg K, Persson MA (2003) Generation of microglia specific reagents from phage displayed peptide libraries. *J Immunol Methods* 278:235-247.
182. M.Aschner (1998) Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes . *Toxicology Letters* 102:283-287.
183. M.Schwartz, E Yoles (2005) Macrophages and dendritic cells treatment of spinal cord injury: from the bench to the clinic. *Acta Neurochir [Suppl]* 93:147-150.

184. Maier D (2005) [Heterotopic ossification after acute spinal cord injury: early diagnosis and therapy.]. Orthopade.
185. Maiese K, Chong ZZ (2004) Insights into oxidative stress and potential novel therapeutic targets for Alzheimer disease. *Restor Neurol Neurosci* 22:87-104.
186. Margolis RL, et al. (2004) Huntington's Disease-like 2 (HDL2) in North America and Japan. *Ann Neurol* 56:670-674.
187. Martin R, Gran B, Zhao Y, Markovic-Plese S, Bielekova B, Marques A, Sung MH, Hemmer B, Simon R, McFarland HF, Pinilla C (2001) Molecular mimicry and antigen-specific T cell responses in multiple sclerosis and chronic CNS Lyme disease. *J Autoimmun* 16:187-192.
188. Martins AN, Doyle TF, Newby N, Kobrine AI, Ramirez A (1975) The effect of a simulated subarachnoid hemorrhage on cerebral blood flow in the monkey. *Stroke* 6:664-672.
189. McNaught KS, Brown GC (1998) Nitric oxide causes glutamate release from brain synaptosomes. *J Neurochem* 70:1541-1546.
190. Mena MA, de BS, Casarejos MJ, Canals S, Rodriguez-Martin E (2002) The role of astroglia on the survival of dopamine neurons. *Mol Neurobiol* 25:245-263.
191. Miller A, Lanir N, Shapiro S, Revel M, Honigman S, Kinarty A, Lahat N (1996) Immunoregulatory effects of interferon-beta and interacting cytokines on human vascular endothelial cells. Implications for multiple sclerosis autoimmune diseases. *J Neuroimmunol* 64:151-161.
192. Miller A, Shapiro S, Gershtein R, Kinarty A, Rawashdeh H, Honigman S, Lahat N (1998) Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. *J Neuroimmunol* 92:113-121.
193. Miller SD, Karpus WJ (1994) The immunopathogenesis and regulation of T-cell-mediated demyelinating diseases. *Immunol Today* 15:356-361.
194. Milner EC, Anolik J, Cappione A, Sanz I (2005) Human innate B cells: a link between host defense and autoimmunity? Springer Semin Immunopathol.
195. Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C (2002) The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 202:13-23.
196. Mitrasinovic OM, Grattan A, Robinson CC, Lapustea NB, Poon C, Ryan H, Phong C, Murphy GM, Jr. (2005) Microglia Overexpressing the Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor Are Neuroprotective in a Microglial-Hippocampal Organotypic Coculture System. *J Neurosci* 25:4442-4451.

197. Mitrovic B, St Pierre BA, Kenzie-Graham AJ, Merrill JE (1994) The role of nitric oxide in glial pathology. *Ann N Y Acad Sci* 738:436-446.
198. Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M (1999) Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 5:49-55.
199. Moreno J (1996) Mecanismos de autoinmunidad. In: *Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad*. (Limusa SAdCV, ed), México D.F.
200. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357.
201. Mucke L, Eddleston M (1993) Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system. *FASEB J* 7:1226-1232.
202. Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, Modolell M (1999) Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 163:3771-3777.
203. Munoz-Fernandez MA, Cano E, O'Donnell CA, Doyle J, Liew FY, Fresno M (1994) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interferon-gamma, and interleukin-6 but not TNF-beta induce differentiation of neuroblastoma cells: the role of nitric oxide. *J Neurochem* 62:1330-1336.
204. Muriel P, Sandoval G (2000) Nitric oxide and peroxynitrite anion modulate liver plasma membrane fluidity and Na(+)/K(+)-ATPase activity. *Nitric Oxide* 4:333-342.
205. Nakajima K, Tohyama Y, Kohsaka S, Kurihara T (2001) Ability of rat microglia to uptake extracellular glutamate. *Neurosci Lett* 307:171-174.
206. Nakashima S, Matsuyama Y, Yu Y, Kiuchi K, Ishiguro N (2004) Suppression of GDNF production by MPSS treatment following spinal cord injury in the rat. *Neuroreport* 15:2337-2340.
207. Narayan R.Bhat, Peisheng Zhang, John C.Lee, Edward L.Hogan (1998) Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Subgroups of Mitogen-Activated Protein Kinases Regulate Inducible Nitric Oxide Synthase and Tumor Necrosis Factor-alpha Gene Expression in Endotoxin-Stimulated Primary Glial Cultures. *The Journal of Neuroscience* 18:1633-1641.
208. Nel AE, Slaughter N (2002) T-cell activation through the antigen receptor. Part 2: role of signaling cascades in T-cell differentiation, anergy, immune senescence, and development of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 109:901-915.
209. Neuhaus O, Farina C, Wekerle H, Hohlfeld R (2001) Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology* 56:702-708.

210. Nguyen VT, Benveniste EN (2000) IL-4-activated STAT-6 inhibits IFN-gamma-induced CD40 gene expression in macrophages/microglia. *J Immunol* 165:6235-6243.
211. Nicotera P, Bernassola F, Melino G (1999) Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul. *Cell Death Differ* 6:931-933.
212. Norflus F, Nanje A, Gutekunst CA, Shi G, Cohen J, Bejarano M, Fox J, Ferrante RJ, Hersch SM (2004) Anti-inflammatory treatment with acetylsalicylate or rofecoxib is not neuroprotective in Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis* 17:319-325.
213. O'Kusky J, Colonnier M (1982) Postnatal changes in the number of astrocytes, oligodendrocytes, and microglia in the visual cortex (area 17) of the macaque monkey: a stereological analysis in normal and monocularly deprived animals. *J Comp Neurol* 210:307-315.
214. Ogata T, Nakamura Y, Tsuji K, Shibata T, Kataoka K (1993) Steroid hormones protect spinal cord neurons from glutamate toxicity. *Neuroscience* 55:445-449.
215. Okuda Y, Nakatsuji Y, Fujimura H, Esumi H, Ogura T, Yanagihara T, Sakoda S (1995) Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the central nervous system of mice correlates with the severity of actively induced experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 62:103-112.
216. Olson JK, Girvin AM, Miller SD (2001) Direct activation of innate and antigen-presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus. *J Virol* 75:9780-9789.
217. Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ (1989) Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2336-2340.
218. Packer MA, Murphy MP (1994) Peroxynitrite causes calcium efflux from mitochondria which is prevented by Cyclosporin A. *FEBS Lett* 345:237-240.
219. Pal E, Tabira T (2002) Autonomic regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: the role of interferon-gamma. *Neuroimmunomodulation* 10:80-84.
220. Pan JZ, Ni L, Sodhi A, Aguanno A, Young W, Hart RP (2002) Cytokine activity contributes to induction of inflammatory cytokine mRNAs in spinal cord following contusion. *J Neurosci Res* 68:315-322.
221. Panek RB, Benveniste EN (1995) Class II MHC gene expression in microglia. Regulation by the cytokines IFN-gamma, TNF-alpha, and TGF-beta. *J Immunol* 154:2846-2854.
222. Parker DR, Kingham JG (1997) Type I autoimmune hepatitis is primarily a disease of later life. *QJM* 90:289-296.

223. Parkinson JF, Mitrovic B, Merrill JE (1997) The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *J Mol Med* 75:174-186.
224. Parslow G.T, Stites P.D., Terr I.A., Imboden B.J (2001) *Inmunología básica y clínica. Manual Moderno.*
225. Pauwels PJ, Opperdoes FR, Trouet A (1985) Effects of antimycin, glucose deprivation, and serum on cultures of neurons, astrocytes, and neuroblastoma cells. *J Neurochem* 44:143-148.
226. Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50:427-434.
227. Penkowa M, Giralt M, Carrasco J, Hadberg H, Hidalgo J (2000) Impaired inflammatory response and increased oxidative stress and neurodegeneration after brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia* 32:271-285.
228. Pezzoli G, Canesi M, Galli C (2004) An overview of parkinsonian syndromes: data from the literature and from an Italian data-base. *Sleep Med* 5:181-187.
229. Picca CC, Caton AJ (2005) The role of self-peptides in the development of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Current Opinion in Immunology* 17:131-136.
230. Pitt D, Nagelmeier IE, Wilson HC, Raine CS (2003) Glutamate uptake by oligodendrocytes: Implications for excitotoxicity in multiple sclerosis. *Neurology* 61:1113-1120.
231. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van HC, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
232. Popovich PG, Jones TB (2003) Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. *Trends Pharmacol Sci* 24:13-17.
233. Popovich PG, Stokes BT, Whitacre CC (1996) Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. *J Neurosci Res* 45:349-363.
234. Poulter MO, Payne KB, Steiner JP (2004) Neuroimmunophilins: a novel drug therapy for the reversal of neurodegenerative disease? *Neuroscience* 128:1-6.
235. Puchalski RB, Louis JC, Brose N, Traynelis SF, Egebjerg J, Kukekov V, Wenthold RJ, Rogers SW, Lin F, Moran T, . (1994) Selective RNA editing and subunit assembly of native glutamate receptors. *Neuron* 13:131-147.
236. Putheti P, Soderstrom M, Link H, Huang YM (2003) Effect of glatiramer acetate (Copaxone) on CD4+CD25^{high} T regulatory cells and their IL-10 production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 144:125-131.

237. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288:481-487.
238. Ranson, Stephen, Walter (1963) *Anatomía del Sistema Nervioso*. México: Interamericana. McGraw-Hill.
239. Rao P, Segal BM (2004) Experimental autoimmune encephalomyelitis. *Methods Mol Med* 102:363-375.
240. Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M (1998) Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 4:814-821.
241. Reichenbach A (1989) Attempt to classify glial cells by means of their process specialization using the rabbit retinal Muller cell as an example of cytotopographic specialization of glial cells. *Glia* 2:250-259.
242. Revesz T, Kidd D, Thompson AJ, Barnard RO, McDonald WI (1994) A comparison of the pathology of primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Brain* 117 (Pt 4):759-765.
243. Rimaniol AC, Haik S, Martin M, Le GR, Boussin FD, reুদ্ধre-Bosquet N, Gras G, Dormont D (2000) Na⁺-dependent high-affinity glutamate transport in macrophages. *J Immunol* 164:5430-5438.
244. Ringheim GE, Conant K (2004) Neurodegenerative disease and the neuroimmune axis (Alzheimer's and Parkinson's disease, and viral infections). *J Neuroimmunol* 147:43-49.
245. Rodriguez-Kern A, Gegelashvili M, Schousboe A, Zhang J, Sung L, Gegelashvili G (2003) Beta-amyloid and brain-derived neurotrophic factor, BDNF, up-regulate the expression of glutamate transporter GLT-1/EAAT2 via different signaling pathways utilizing transcription factor NF-kappaB. *Neurochem Int* 43:363-370.
246. Roitt I, Brostoff J, Male D. (1996) *Immunology. Development of the immune system*. pp 13.1-13.7.
247. Roitt I, Delves M., y Peter J. (2003) *Fundamentos de Inmunología*. México: Ed. Médica Panamericana.
248. Roitt I., Brostoff J., Male D. (2000) *Inmunología* . México: Ed. Harcourt Brace.
249. Roitt I, Brostoff J, Male D (1996) T cell Receptors and MHC molecules. In: *Immunology* (Mosby, ed), Barcelona, Spain.
250. Rojas, Juan Manuel Anaya, Beatriz Aristizábal, Luz Elena Cano, Luis Miguel Gómez, Damaris Lopera (2007) *Inmunología*.
251. Romagnani S (1997) The Th1/Th2 paradigm *Immunol Today* 18:263-266.

252. Rosenman SJ, Shrikant P, Dubb L, Benveniste EN, Ransohoff RM (1995) Cytokine-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by astrocytes and astrocytoma cell lines. *J Immunol* 154:1888-1899.
253. Rothwell NJ, Hopkins SJ (1995) Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 18:130-136.
254. Ruuls SR, Hoek RM, Ngo VN, McNeil T, Lucian LA, Janatpour MJ, Korner H, Scheerens H, Hessel EM, Cyster JG, McEvoy LM, Sedgwick JD (2001) Membrane-bound TNF supports secondary lymphoid organ structure but is subservient to secreted TNF in driving autoimmune inflammation. *Immunity* 15:533-543.
255. Saas P, Boucraut J, Quiquerez AL, Schnuriger V, Perrin G, Splat-Jego S, Bernard D, Walker PR, Dietrich PY (1999) CD95 (Fas/Apo-1) as a receptor governing astrocyte apoptotic or inflammatory responses: a key role in brain inflammation? *J Immunol* 162:2326-2333.
256. Sandler AN, Tator CH (1976) Review of the effect of spinal cord trauma on the vessels and blood flow in the spinal cord. *J Neurosurg* 45:638-646.
257. Santambrogio L, Belyanskaya SL, Fischer FR, Cipriani B, Brosnan CF, Ricciardi-Castagnoli P, Stern LJ, Strominger JL, Riese R (2001) Developmental plasticity of CNS microglia 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6295-6300.
258. Schaad NC, Schorderet M, Magistretti PJ (1990) Modulation of VIP-Stimulated cAMP Formation by Excitatory Amino Acids in Mouse Cerebral Cortex. *Eur J Neurosci* 2:525-533.
259. Schmidt HH, Klein MM, Niroomand F, Bohme E (1988) Is arginine a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide? *Eur J Pharmacol* 148:293-295.
260. Schori H, Lantner F, Shachar I, Schwartz M (2002) Severe immunodeficiency has opposite effects on neuronal survival in glutamate-susceptible and -resistant mice: adverse effect of B cells. *J Immunol* 169:2861-2865.
261. Schori H., Yoles E., Schwartz M. (2001) T-cell-based immunity counteracts the potential toxicity of glutamate in the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 119:199-204
262. Schuman EM, Meffert MK, Schulman H, Madison DV (1994) An ADP-ribosyltransferase as a potential target for nitric oxide action in hippocampal long-term potentiation 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11958-11962.
263. Schwab JM, Frei E, Klusman I, Schnell L, Schwab ME, Schluesener HJ (2001) AIF-1 expression defines a proliferating and alert microglial/macrophage phenotype following spinal cord injury in rats. *J Neuroimmunol* 119:214-222.

264. Schwartz M, Kipnis J (2002) Autoimmunity on alert: naturally occurring regulatory CD4(+)CD25(+) T cells as part of the evolutionary compromise between a 'need' and a 'risk'. *Trends Immunol* 23:530-534.
265. Schwartz M, Moalem G, Leibowitz-Amit R, Cohen IR (1999) Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci* 22:295-299.
266. Schwartz M, Shaked I, Fisher J, Mizrahi T, Schori H (2003) Protective autoimmunity against the enemy within: fighting glutamate toxicity. *Trends Neurosci* 26:297-302.
267. Schweizer M, Richter C (1994) Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. *Biochem Biophys Res Commun* 204:169-175.
268. Schwentker A, Billiar TR (2002) Inducible nitric oxide synthase: from cloning to therapeutic applications. *World J Surg* 26:772-778.
269. Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR (2002) Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide* 7:1-10.
270. Sedgwick JD, Mossner R, Schwender S, ter M, V (1991) Major histocompatibility complex-expressing nonhematopoietic astroglial cells prime only CD8+ T lymphocytes: astroglial cells as perpetuators but not initiators of CD4+ T cell responses in the central nervous system. *J Exp Med* 173:1235-1246.
271. Sela M, Teitelbaum D (2001) Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Pharmacother* 2:1149-1165.
272. Shaked I, Porat Z, Gersner R, Kipnis J, Schwartz M (2004) Early activation of microglia as antigen-presenting cells correlates with T cell-mediated protection and repair of the injured central nervous system. *J Neuroimmunol* 146:84-93.
273. Shaked I, Tchoresh D, Gersner R, Meiri G, Mordechai S, Xiao X, Hart RP, Schwartz M (2005) Protective autoimmunity: interferon-gamma enables microglia to remove glutamate without evoking inflammatory mediators. *J Neurochem* 92:997-1009.
274. Shapiro S, Borgens R, Pascuzzi R, Roos K, Groff M, Purvines S, Rodgers RB, Hagy S, Nelson P (2005) Oscillating field stimulation for complete spinal cord injury in humans: a phase 1 trial. *J Neurosurg Spine* 2:3-10.
275. Sheng WS, Hu S, Chao CC (1998) [Immunomodulatory role of opioids in the central nervous system]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 29:125-129.
276. Shi FD, Flodstrom M, Kim SH, Pakala S, Cleary M, Ljunggren HG, Sarvetnick N (2001) Control of the autoimmune response by type 2 nitric oxide synthase. *J Immunol* 167:3000-3006.

277. Shrikant P, Benveniste EN (1996) The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. *J Immunol* 157:1819-1822.
278. Shrikant P, Weber E, Jilling T, Benveniste EN (1995) Intercellular adhesion molecule-1 gene expression by glial cells. Differential mechanisms of inhibition by IL-10 and IL-6. *J Immunol* 155:1489-1501.
279. Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fisher S.K., Uhler M.D. (2005) *Basic neurochemistry molecular, cellular and medical aspects.*
280. Simon A, Martin-Martinelli E, Savy C, Verney C, Raisman-Vozari R, Nguyen-Legros J (2001) Confirmation of the retinopetal/centrifugal nature of the tyrosine hydroxylase-immunoreactive fibers of the retina and optic nerve in the weaver mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 127:87-93.
281. Snell S.R (1994) *Neuroanatomía clínica.* Ed. Médica Panamericana.
282. Sonnewald U, Wang AY, Petersen SB, Westergaard N, Schousboe A, Erikson R, Skottner A (1995) ¹³C NMR study of IGF-I- and insulin-effects on mitochondrial function in cultured brain cells. *Neuroreport* 6:878-880.
283. Spanaus KS, Schlapbach R, Fontana A (1998) TNF-alpha and IFN-gamma render microglia sensitive to Fas ligand-induced apoptosis by induction of Fas expression and down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL. *Eur J Immunol* 28:4398-4408.
284. Stefano GB, Zhu W, Cadet P, Salamon E, Mantione KJ (2004) Music alters constitutively expressed opiate and cytokine processes in listeners. *Med Sci Monit* 10:MS18-MS27.
285. Stoll G, Jander S, Schroeter M (1998) Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 56:149-171.
286. Stover SL, Fine PR (1987) The epidemiology and economics of spinal cord injury. *Paraplegia* 25:225-228.
287. Strassburger D, Irlin Y, Carp H, Lurie S, Pecht M, Trainin N, Toder V (1992) Immune features in complete Freund adjuvant-treated CBA/J mouse model. *Am J Reprod Immunol* 28:277-280.
288. Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40:133-139.
289. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS (2004) Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation* 1:14.
290. Subudhi SK, Alegre ML, Fu YX (2005) The balance of immune responses: costimulation versus coinhibition. *J Mol Med.*
291. Sugawara T, Itoh Y, Mizoi K (1999) Immunosuppressants promote adult dorsal root regeneration into the spinal cord. *Neuroreport* 10:3949-3953.

292. Sun D, Coleclough C, Cao L, Hu X, Sun S, Whitaker JN (1998) Reciprocal stimulation between TNF-alpha and nitric oxide may exacerbate CNS inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 89:122-130.
293. Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, Longuemare MC (1997) Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes 12. *J Neurosci* 17:932-940.
294. Sziraki I, Rauhala P, Koh KK, van BP, Chiueh CC (1999) Implications for atypical antioxidative properties of manganese in iron-induced brain lipid peroxidation and copper-dependent low density lipoprotein conjugation. *Neurotoxicology* 20:455-466.
295. T.Enomoto, Y.Noda, T.Nabeshima (2004) Neuroprotective effects of magnesium on cerebral ischemia and cerebral contusion. *Clin Calcium* 14:60-64.
296. Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S (1994) Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* 6:1567-1574.
297. Tamatani M, Ogawa S, Niitsu Y, Tohyama M (1998) Involvement of Bcl-2 family and caspase-3-like protease in NO-mediated neuronal apoptosis. *J Neurochem* 71:1588-1596.
298. Tan J, Town T, Saxe M, Paris D, Wu Y, Mullan M (1999) Ligation of microglial CD40 results in p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent TNF-alpha production that is opposed by TGF-beta 1 and IL-10. *J Immunol* 163:6614-6621.
299. Tanaka S, Koike T (2002) Selective inflammatory stimulations enhance release of microglial response factor (MRF)-1 from cultured microglia. *Glia* 40:360-371.
300. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Harada N, Johno M, Naruo M (1998) Activated protein C reduces the severity of compression-induced spinal cord injury in rats by inhibiting activation of leukocytes. *J Neurosci* 18:1393-1398.
301. Taylor-Robinson AW, Liew FY, Severn A, Xu D, McSorley SJ, Garside P, Padron J, Phillips RS (1994) Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol* 24:980-984.
302. Teitelbaum D, Arnon R, Sela M (1999) Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of copolymer 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3842-3847.
303. Teitelbaum D, Arnon R, Sela M (1997) Cop 1 as a candidate drug for multiple sclerosis. *J Neural Transm Suppl* 49:85-91.
304. Teitelbaum D, Milo R, Arnon R, Sela M (1992) Synthetic copolymer 1 inhibits human T-cell lines specific for myelin basic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:137-141.

305. Teitelbaum D, Webb C, Bree M, Meshorer A, Arnon R, Sela M (1974) Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Rhesus monkeys by a synthetic basic copolymer. *Clin Immunol Immunopathol* 3:256-262.
306. Thilenius AR, Sabelko-Downes KA, Russell JH (1999) The role of the antigen-presenting cell in Fas-mediated direct and bystander killing: potential in vivo function of Fas in experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 162:643-650.
307. Trabace L, Kendrick KM (2000) Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation. *J Neurochem* 75:1664-1674.
308. Tsacopoulos M, Poitry-Yamate CL, Poitry S, Perrottet P, Veuthey AL (1997) The nutritive function of glia is regulated by signals released by neurons. *Glia* 21:84-91.
309. Tyor WR, Avgeropoulos N, Ohlandt G, Hogan EL (2002) Treatment of spinal cord impact injury in the rat with transforming growth factor-beta. *J Neurol Sci* 200:33-41.
310. Uehara S, Gotoh K, Handa H, Honjo K, Hirayama A (1999) Process of carboxylation of glutamic acid residues in the gla domain of human des-gamma-carboxyprothrombin. *Clin Chim Acta* 289:33-44.
311. van Landeghem FK, Stover JF, Bechmann I, Bruck W, Unterberg A, Buhner C, von DA (2001) Early expression of glutamate transporter proteins in ramified microglia after controlled cortical impact injury in the rat. *Glia* 35:167-179.
312. Vercelli D (2003) Arginase: marker, effector, or candidate gene for asthma? *J Clin Invest* 111:1815-1817.
313. Viani RM, Smith IL, Spector SA (1998) Human immunodeficiency virus type 1 phenotypes in children with advanced disease treated with long-term zalcitabine. *J Infect Dis* 177:565-570.
314. Villinger F, Rollin PE, Brar SS, Chikkala NF, Winter J, Sundstrom JB, Zaki SR, Swanepoel R, Ansari AA, Peters CJ (1999) Markedly elevated levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-alpha, interleukin (IL)-2, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha associated with fatal Ebola virus infection. *J Infect Dis* 179 Suppl 1:S188-S191.
315. Vladutiu AO (1995) Role of nitric oxide in autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 76:1-11.
316. Wang YH, Ito T, Wang YH, Homey B, Watanabe N, Martin R, Barnes CJ, McIntyre BW, Gilliet M, Kumar R, Yao Z, Liu YJ (2006) Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. *Immunity* 24:827-838.
317. Waring SC, Esteban-Santillan C, Reed DM, Craig UK, Labarthe DR, Petersen RC, Kurland LT (2004) Incidence of amyotrophic lateral sclerosis and of the parkinsonism-dementia complex of Guam, 1950-1989. *Neuroepidemiology* 23:192-200.

318. Wekerle H, Sun D, Oropeza-Wekerle RL, Meyermann R (1987) Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. *J Exp Biol* 132:43-57.
319. West NE, Qian H, Guzik TJ, Black E, Cai S, George SE, Channon KM (2001) Nitric oxide synthase (nNOS) gene transfer modifies venous bypass graft remodeling: effects on vascular smooth muscle cell differentiation and superoxide production. *Circulation* 104:1526-1532.
320. Westergaard N, Sonnewald U, Schousboe A (1995) Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited. *Dev Neurosci* 17:203-211.
321. Wiesemann C (2001) [Patient self-determination - the beneficiaries of medicine and their rights] . *Gesundheitswesen* 63:591-596.
322. Wiesemann E, Klatt J, Sonmez D, Blasczyk R, Heidenreich F, Windhagen A (2001) Glatiramer acetate (GA) induces IL-13/IL-5 secretion in naive T cells. *J Neuroimmunol* 119:137-144.
323. Woerly S, Petrov P, Sykova E, Roitbak T, Simonova Z, Harvey AR (1999) Neural tissue formation within porous hydrogels implanted in brain and spinal cord lesions: ultrastructural, immunohistochemical, and diffusion studies. *Tissue Eng* 5:467-488.
324. Wolf SA, Gimsa U, Bechmann I, Nitsch R (2001) Differential expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 on microglial cells induced by Th1 and Th2 cells in organotypic brain tissue. *Glia* 36:414-420.
325. Wu JY, Huang WM, Reed-Fourquet L, Bao J, Nathan B, Wu E, Tsai WH (1991) Structure and function of L-glutamate decarboxylase. *Neurochem Res* 16:227-233.
326. Wyllie R, Arasu TS, Fitzgerald JF (1980) Ascites: pathophysiology and management. *J Pediatr* 97:167-176.
327. Xie J, Wang Y, Kolls J, Malinski T, Nelson S, Summer W, Greenberg SS (1993) Tumor necrosis factor alpha inhibits contractions to sympathetic nerve stimulation by a nitric oxide-dependent mechanism. *Proc Soc Exp Biol Med* 203:446-453.
328. Xie QW, Whisnant R, Nathan C (1993) Promoter of the mouse gene encoding calcium dependent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 177:1779-1784.
329. Xu J, Kim GM, Chen S, Yan P, Ahmed SH, Ku G, Beckman JS, Xu XM, Hsu CY (2001) iNOS and nitrotyrosine expression after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 18:523-532.
330. Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA (2001) A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 166:7282-7289.

331. 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. *J Neurosci* 21:3740-3748.
332. Young W, Koreh I (1986) Potassium and calcium changes in injured spinal cords. *Brain Res* 365:42-53.
333. Yudkoff M, Zaleska MM, Nissim I, Nelson D, Erecinska M (1989) Neuronal glutamine utilization: pathways of nitrogen transfer studied with [15N]glutamine. *J Neurochem* 53:632-640.
334. Zelenia O, Schlag BD, Gochenauer GE, Ganel R, Song W, Beesley JS, Grinspan JB, Rothstein JD, Robinson MB (2000) Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF-kappaB. *Mol Pharmacol* 57:667-678.