



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

“ESTUDIO SOBRE LA
COMPARTIMENTACIÓN DE LA RESPUESTA
INMUNOLÓGICA EN LAS COLUMNAS
CORTICALES DEL RATÓN ADULTO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. EXP. JOSÉ DE JESÚS PÉREZ
HERNÁNDEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANAHI CHAVARRÍA KRAUSER

COMITÉ TUTOR: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
DR. RUY PERÉZ TAMAYO

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2010.



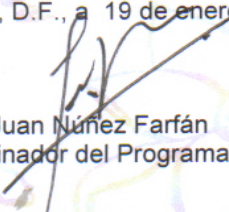
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de octubre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **PÉREZ HERNÁNDEZ JOSÉ DE JESÚS** con número de cuenta **507019727** con la tesis titulada **"ESTUDIO SOBRE LA COMPARTIMENTACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN LAS COLUMNAS CORTICALES DEL RATÓN ADULTO"**, realizada bajo la dirección del DRA. ANAHÍ CHAVARRIA KRAUSER:

Presidente: DR. RUY PÉREZ TAMAYO
Vocal: DRA. ANA BRIGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
Secretario: DRA. ANAHÍ CHAVARRIA KRAUSER
Suplente: DR. GABRIEL MANJARREZ GUTIÉRREZ
Suplente: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de enero de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, de igual manera agradezco el apoyo que ha brindado el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de una beca con número de registro 216909.

Gracias a los miembros de mi comité tutoral: Dra. Anhai Chavarría Krauser, Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina y al Dr. Ruy Pérez Tamayo, por la dirección durante el desarrollo del trabajo, sus invaluable sugerencias, comentarios y apoyo técnico.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Anahi Chavarría por ser un excelente tutor, por brindarme la oportunidad de subir este peldaño y ser un apoyo moral tantas veces como lo he necesitado.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez por ser siempre un respaldo académico y técnico desde que nos conocemos.

A mis compañeros de laboratorio Carlos, Miguel, Ernesto, Denisse y Doña Mago, que han colaborado de alguna manera en mi crecimiento personal, ya sea con ayuda técnica, una palabra, una palmada en la espalda o una buena cantidad de sonrisas, gracias amigos.

A todos los que desde fuera del mundo académico me han apoyado incondicionalmente, Rogel por siempre decirme en lo que me equivoco aunque no sea cómodo y por ser un respaldo y compañero en distintos proyectos y planes de vida (siempre nos cuidaremos las espaldas guerrero jaguar). A Tanis y Omar por ser unos excelentes parientes pero sobre todo por ser unos amigos incondicionales, a Norma, Don Raúl y Doña Rosa por ser tan hospitalarios, y acompañarme en un largo camino que aunque nos ha distanciado compartimos con mucho cariño y respeto. A mi Nina Otilia por darme la mano cuando más lo he necesitado a lo largo de toda mi vida.

Sobre todo quiero agradecer a Gaby por ser el aliciente para cerrar este capítulo de mi vida he iniciar uno nuevo, por consolarme en los momentos de angustia y animarme en los momentos de desesperación, por ser feliz con migo. “Juntos somos uno, pero mucho más que dos”.

DEDICATORIAS.

A mis padres Aurelia y Sebastián por todo el esfuerzo que han hecho para brindarme la oportunidad de alcanzar estas metas.

A Dios por siempre guiar mis pasos, iluminarme con la luz natural de la razón y permitirme comprender cuando menos una pequeña parte de el atreves de la ciencia, por asesorarme en la toma de decisiones y permitirme crecer y convertirme en un hombre de fe. “Gracias Dios”

ABREVIATURAS UTILIZADAS

SNC= Sistema Nervioso Central

S1= Corteza Somatosensorial Primaria

BHE= Barrera hematoencefálica

MHCII= Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II

TGF- β = Factor de Crecimiento Transformante- β

PC= Pericitos

CPA= Células Presentadoras de Antígenos

RI=Respuesta Inmune

PRR= Receptor de Reconocimiento de Patrones de superficie

MMR= Receptor de Manosas

TLR= Receptores tipo Toll

SR= Scavenger receptor

ROS= Especies de Oxígeno Reactivo

GABA= Acido γ -aminobutírico

GFAP= Proteína Àcida Fibrilar Glial

FMN =Motoneuronas Faciales

TNF α = Factor de Necrosis Tumoral Alfa

IFN γ = Interferón gamma

IL= Interleucina

CO= Citocromo oxidasa

LCR= Líquido Cefalorraquídeo

MCP-1/CCL2= Proteína quimio-atrayente de monocitos

MIP-1 α /CCI3= Proteína inflamatoria de macrófagos.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN -----	13
II. ANTECEDENTES -----	15
1. Respuesta inmune en el SNC -----	15
<i>1.1 Barrera Hematoencefálica</i> -----	15
<i>1.2 Respuesta inmune innata</i> -----	16
1.2.1 <i>Microglía</i> -----	17
1.2.2 <i>Astrocitos</i> -----	19
1.2.3 <i>Macrófagos y Células Dendríticas</i> -----	20
1.2.4 <i>Linfocitos</i> -----	21
<i>1.3 Respuesta inmune molecular</i> -----	21
1.3.1 <i>Presentación de antígeno</i> -----	21
1.3.2 <i>Citocinas y Quimiocinas</i> -----	23
<i>1.4 Heterogeneidad de la respuesta inmune en el SNC</i> -----	25
2. Sistema Nervioso Central -----	28
3. Módulos neurales -----	29
4. Corteza somatosensorial primaria como compartimento inmunológico. -----	30
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	32
IV. HIPÓTESIS -----	33
V. OBJETIVO GENERAL -----	33
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS -----	33
VII. METODOLOGÍA -----	34
1. Animales -----	34

2. Recorte de vibrisas faciales	35
3. Lesión en corteza y preservación del material biológico	35
4. Inmunohistoquímica	36
5. Cuantificación de marcadores celulares y citocinas	37
6. Análisis estadístico	37
VIII. RESULTADOS	38
1. Animales sin lesión en S1	38
<i>1.1. Marcadores celulares</i>	38
<i>1.2 Expresión de Citocinas</i>	38
2. Animales lesionados en S1 en el campo de los barriles	39
<i>2.1 Marcadores celulares</i>	39
<i>2.2 Expresión de Citocinas</i>	40
3. Animales lesionados en S1 fuera del campo de los barriles	41
IX. DISCUSIÓN	53
X. CONCLUSIONES	59
XI. BIBLIOGRAFÍA	60

RESUMEN

El Sistema Nervioso Central (SNC) presenta una respuesta inmune muy heterogénea, esta heterogeneidad depende de la neuroanatomía, el microambiente bioquímico y el tipo de daño. Es sabido que la corteza cerebral esta constituida por unidades modulares denominadas columnas que agrupan células nerviosas y conexiones que procesan información semejante. De esta información surgieron las siguientes preguntas: Si los compartimentos inmunológicos coinciden con los módulos neurales, ¿es posible que el módulo neural influya en las características del módulo inmunológico?, ¿es posible que al haber un cambio de la función en los módulos corticales, entonces cambien las características de los compartimentos inmunológicos? Para contestar estas preguntas se utilizo el modelo de la corteza somatosensorial primaria (S1) del ratón CD1 adulto, se realizaron lesiones en S1 en el campo de los barriles y en un área cercana a ésta (corteza disgranular), en animales sujetos o no a recorte de las vibrisas faciales. En los animales controles se observaron macrófagos, microglia y astrocitos, predominantemente en los septos, independientemente de la condición de sus vibrisas. Los barriles en estos animales mostraron una inmunoreactividad para citocinas pro-inflamatorias (TNF α y IFN γ). En contraste, los ratones con vibrisas y lesionados en el campo de los barriles, mostraron un incremento significativo de la microglia, los macrófagos, los astrocitos y las citocinas (IL4, IL10, TNF α y IFN γ), con respecto a los controles. Esta reacción estuvo confinada principalmente al borde de la lesión. En los animales lesionados en el área de los barriles, cuyas vibrisas fueron recortadas se observo una disminución de dicha reactividad. Las lesiones realizadas en la corteza disgranular, mostraron una reactividad similar para células gliales y citocinas en animales con y sin vibrisas. Por lo tanto podemos concluir que la distribución e inmunoreactividad de las células de la glia, se modifica al inducir un cambio de la función en un modulo neural. Los datos obtenidos en el

presente trabajo apoyan la existencia de compartimentos inmunológicos en el SNC y que éstos están relacionados estructural y funcionalmente con los módulos neurales.

SUMMARY

The Central Nervous System (CNS) presents a highly diverse immune response, this heterogeneity depends on the neuroanatomy, the biochemical microenvironment and type of damage. It is known that the cortex is made up of modular units called columns grouped nerve cells and connections that process information such. This information led to the following questions: If immunological compartments coincide with neural modules, is it possible that the neural module influence the immunological characteristics of the module?, is it possible that having a change of function in cortical modules, then change the immunological characteristics of the compartments?. To answer these questions we use the model of the primary somatosensory cortex (S1) of adult CD1 mice, lesions were made in the area S1 barrels and in an area close to it (dysgranular cortex), in animals subjected or not to cut the facial vibrissae. In the control animals were observed macrophages, microglia and astrocytes, predominantly in the septa, irrespective of the status of your nostrils. The barrels on these animals showed immunoreactivity for pro-inflammatory cytokines (TNF α y IFN γ). In contrast, mice with vibrissa and injured in the field of the barrels showed a significant increase in microglia, macrophages, astrocytes and cytokines (IL 4, IL10, TNF α y IFN γ), with respect to controls. This reaction was confined mainly to the edge of the lesion. In the injured animals in the area of the barrels, which were trimmed vibrissae was observed a decrease in the reactivity. The lesions made in the dysgranular cortex showed a similar reactivity for glial cells and cytokines in animals with and without vibrissae. We can therefore conclude that the distribution and immunoreactivity of glia cells is modified by inducing a change in neural function in a module. The data obtained in this work support the existence of immunological compartments in the CNS and that they are structurally and functionally related with neural modules.

I. INTRODUCCIÓN

La corteza cerebral, está constituido por unidades modulares denominadas columnas que agrupan células nerviosas y conexiones que procesan un tipo de información semejante (Mountcastle 1979, Leise 1990). Esto es muy evidente en la neocorteza de los mamíferos en las áreas sensoriales, motoras y de asociación frontal. La columna se caracteriza por estar constituida por mini-columnas de neuronas cuyas interconexiones son predominantemente verticales y funcionan como circuitos neurales paralelos (Leise 1990). Un ejemplo de estos módulos corticales es el arreglo modular que forma un mapa corporal a nivel de corteza somatosensorial primaria (S1) del ratón adulto. Cada módulo representa colecciones discretas de mecanorreceptores ubicados en la superficie corporal. En S1, los módulos se denominan barriles y se encuentran formados por las aferentes tálamo-corticales provenientes de los núcleos del complejo ventrobasal y las dendritas de las células estelares espinosas. También existen un número reducido de interneuronas, células gliales y vasos sanguíneos. Un poco más de 200 barriles constituyen la representación cortical del cuerpo (Riddle et al. 1992). De éstos, los más prominentes son los que forman la subrepresentación de las vibrisas faciales que se conoce como el campo o área de barriles posteromedial. Debido a su definición anatómica, podemos identificarlos con mucha precisión en la capa IV de la corteza somatosensorial (Killackey et al. 1979, White et al., 1993, Woolsey et al. 1997.).

Anteriormente el SNC era considerado un órgano inmunológicamente privilegiado, pues se pensaba que el tráfico de leucocitos hacia su interior era mínimo o inexistente. Sin embargo, en la actualidad se conoce que la inflamación, y por lo tanto la migración de leucocitos, puede existir en la mayoría de los compartimentos vascularizados del cuerpo, incluyendo el SNC (Chavarria et al. 2004, Hickey 1999).

El privilegio inmunológico se le atribuyó debido a dos características estructurales, la primera es la carencia de los clásicos vasos linfáticos, y la segunda es la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual presenta una compleja organización de las células endoteliales cerebrales, los pericitos y los pies astrocíticos. Esto le confiere propiedades dinámicas y funcionales, como la semipermeabilidad, que protegen y mantienen la homeostasis del microambiente cerebral (Abbott 2002, Becher et al. 2006).

Aunque en todo el tejido nervioso puede presentarse una respuesta inmune, ésta no es homogénea, sino al contrario es muy variada en su tipo e intensidad dependiendo la zona y el microambiente que se estudie (Chavarria et al. 2006). Esto nos sugiere una relación entre la respuesta inmune y los compartimentos modulares.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si el cambio de función inducido por el recorte de las vibrisas faciales, modifica la respuesta celular del componente inmunológico en el módulo neural correspondiente a los barriles de S1 del ratón CD1 adulto, para lo cual se realizaron lesiones en S1 en el campo de los barriles y en un área cercana a ésta (corteza disgranular), en animales con y sin recorte de vibrisas faciales. Nuestros datos muestran que la distribución de la inmunoreactividad de la microglia, macrófagos y astrocitos se modifica con la supresión de estímulos sensoriales al módulo neural, como consecuencia del recorte de las vibrisas faciales. Los datos obtenidos en el trabajo apoyan la existencia de los compartimentos inmunológicos en el SNC y que éstos están relacionados estructural y funcionalmente con los módulos neurales.

II. ANTECEDENTES

1. Respuesta Inmune en el SNC

Hace algunas décadas se le consideraba al SNC como un sitio inmunológicamente privilegiado, característica que ha sido atribuida principalmente por la presencia de la Barrera hematoencefálica (BHE), la baja expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, MHCII de sus siglas en inglés y a la carencia de vasos linfáticos (Becher et al. 2006).

1.1. La Barrera Hematoencefálica

El concepto actual de BHE describe el paso de células del sistema inmune, permitiendo así que se inicie una respuesta inmunológica, sin embargo, el microambiente del SNC establece un estricto control de la entrada y salida de éstas, de tal manera que en condiciones fisiológicas el tránsito es bajo (Engelhardt 2006). La BHE es una barrera celular que controla el ambiente interno del SNC de los vertebrados, representa la frontera entre los capilares del SNC y el líquido extracelular de las neuronas y de las células gliales, además asegura la homeostasis específica cerebral, lo que permite una adecuada función de las neuronas (Haseloff et al. 2005). Tres elementos celulares de la microvasculatura del cerebro la componen: células endoteliales, pies astrocíticos y pericitos. Las células endoteliales de la BHE difieren de las células endoteliales del resto del cuerpo porque carecen de fenestraciones, presentan un escaso transporte vesicular, poseen uniones estrechas que limitan el flujo celular y de moléculas hidrofílicas a través de ella, mientras que las moléculas hidrofílicas pequeñas difunden libremente (Ballabh et al. 2004). Las proteínas transmembranales de las uniones estrechas (occludinas, claudinas y JAMs) sellan el espacio intercelular de las células endoteliales e intracelularmente interactúan con proteínas de andamiaje como ZO-1, ZO-2, ZO-3 y otras proteínas del

citoesqueleto. En las uniones adherentes, las caderinas estabilizan la adherencia entre las células endoteliales y las cateninas vinculan las caderinas al citoesqueleto (Gloor et al.2001).

A través del análisis de la microvasculaatura del cerebro se demostró que los pies astrocíticos forman una fina lámina en la superficie exterior del endotelio, y se ha sugerido que la astrogliia es responsable del desarrollo y el fenotipo especializado del endotelio del cerebro (Abbott 2002).

Un ejemplo que ilustra este punto es el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), producido por los astrocitos, que interviene en la regulación de ciertas proteínas, la producción de angiopoyetina-1, incrementa la expresión de proteínas de uniones estrechas y disminuye la permeabilidad de H3-Sacarosa. (Haseloff et al. 2005).

Por otra parte los pericitos (PC), que se encuentran ubicados histológicamente alrededor de las células endoteliales de los capilares, las vénulas y las arteriolas, juegan un papel importante en la estabilidad de la pared del vaso sanguíneo. Los PC expresan receptores para catecolaminas, angiotensina II, péptidos intestinal vasoactivo, endotelina-1 y vasopresina. Por otro lado, se ha observado que los PC previenen los índices de apoptosis en células endoteliales co-cultivadas con astrocitos (Ballabh et al. 2004).

1.2. Respuesta inmune innata

La principal línea de defensa del SNC es la respuesta inmune (RI) innata, basada en la participación y activación de las células residentes del SNC (la microglia, los astrocitos y las células endoteliales) y otras células presentadoras de antígeno (CPA) como los macrófagos perivasculares, células dendríticas y linfocitos T, así como la participación de diversos componentes moleculares del sistema inmunológico. Dentro de las moléculas participantes se han descrito los receptores de reconocimiento de patrones de superficie (PRR, de sus siglas en

inglés), como el receptor de manosas (MMR), los receptores *scavenger* (SR), las pentrexinas, las colectinas y los receptores tipo Toll (TLR), que hasta el momento han sido descritos 10 en humanos y 12 en ratones, los receptores para las proteínas del sistema de complemento (CR3 y CR4); así como las proteínas del sistema de complemento, citocinas y las quimiocinas (Hauwel et al. 2005). En los siguientes párrafos describiremos de manera general los principales componentes de la respuesta inmune innata en el SNC.

1.2.1. *Microglia*

Las células de la microglia comprenden entre el 15 y el 20% del total de las células gliales, son de origen hematopoyético y se clasifican en células en reposo con prolongaciones citoplasmáticas ramificadas finas, células activadas con prolongaciones más cortas y gruesas, y células reactivas con forma ameboidea (Hess et al. 2004). La microglia está presente en gran número en la mayoría de las regiones del cerebro, pero su distribución no es homogénea, existen diferencias y variaciones en los procesos celulares de la microglia en distintas regiones del cerebro (Hess et al. 2004). Se ha descrito una densidad mayor en regiones como: hipocampo, telencéfalo, ganglios basales y sustancia nigra, en contraste existe una menor densidad en regiones como corteza cerebral, cerebelo y tallo cerebral. Por su morfología se ha clasificado en tres categorías a la microglia: 1) *células compactas*, las cuales poseen procesos muy cortos y están presentes únicamente en sitios donde no hay BHE, 2) *células longitudinalmente ramificadas*, ubicadas principalmente en los tractos de las fibras, cuyos múltiples procesos largos están organizados de manera paralela y en ocasiones perpendicular al eje de las fibras nerviosas, 3) *células radialmente ramificadas*, ubicadas en todo el neuropili. La variación sistemática en la morfología de la microglia, sugiere que estas células son sensibles a las diferencias moleculares de su microambiente (Lawson et al. 1990).

Dentro de sus principales funciones, se han descrito la fagocitosis, el sostén, promover la migración celular, favorecer el crecimiento axonal y la diferenciación terminal de los diferentes subconjuntos neuronales, a través de la liberación de componentes de la matriz extracelular, de factores solubles y de contactos directos célula-célula (Vilhardt 2005). Sin embargo, la microglia puede dejar rápidamente el estado de reposo al entrar en contacto con señales patológicas endógenas, como disfunción o muerte neuronal, agregados anormales de proteínas, interacción con células de la RI, o señales exógenas como infecciones. Cuando la microglia es reactiva cambia a una morfología ameboidea, prolifera, migra, aumenta la expresión de MHCII y moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 y CD86), pudiendo funcionar como CPA (Aloisi 2001). Adicionalmente, puede aumentar su capacidad fagocítica al sobre-expresar los PRRs como el MMR, algunos TLRs, SRs, CR3 y CR4. También inicia la secreción de mediadores pro-inflamatorios como las prostaglandinas, TNF α , IL1 β y quimiocinas, secreción de proteasas y generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) e intermediarios de nitrógeno como el óxido nítrico (Vilhardt, 2005). En contraste con su papel francamente pro-inflamatorio, se ha descrito que la microglia activa, también puede secretar componentes anti-inflamatorios como IL10 y TGF β , así como sustancias neurotróficas como las neurotrofinas (Vilhardt 2005, Hauwel et al. 2005). Estos trabajos sugieren una interacción cercana de la microglia con el componente neuronal y su ambiente, aunque este mecanismo aún no es claro, se ha observado la expresión de receptores a neurotransmisores como la dopamina (Mastroeni et al. 2008), el glutamato y el ácido γ -aminobutírico (GABA) en la microglia (Färber y Kettenmann 2005). También, se ha documentado que la microglia puede expresar marcadores neuronales tales como GABA y descarboxilasa del ácido glutámico (GAD-67) a través de estimulación de INF γ o IL4 producidos por los linfocitos T (Butovsky 2007).

1.2.2. *Astroцитos*

Los astroцитos son las células gliales más abundantes, son de origen neuroectodérmico y principalmente están involucradas en la homeostasis cerebral y en las funciones neuronales, participan en el mantenimiento y la inducción de la BHE, en los procesos de cicatrización y la reparación del tejido nervioso. Últimamente se le ha atribuido una participación importante en la regulación de la RI en el SNC ya que expresan un conjunto de PRRs involucrados en la RI innata, incluyendo los TLRs, SRs, MMR y algunos componentes del sistema de complemento (Farina et al. 2007). Los astroцитos tienen una localización estratégica cerca de otras células de la glia y de los vasos sanguíneos, formando una barrera entre el parénquima cerebral y el sistema vascular y pueden activarse al entrar en contacto los PRRs con su ligando ó después de la exposición con el $IFN\gamma$ (Wang et al. 2005). Los astroцитos activados presentan una mayor expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, de sus siglas en inglés), además de una mayor expresión de MHCII, de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD40) y de moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) (Chavarria et al. 2004, Farina et al. 2007). Sin embargo, su papel como CPA es controversial y se piensa que su participación es secundaria (Becher et al. 2006). Después de ser activados, los astroцитos presentan también la capacidad de secretar citocinas como IL12 y algunas quimiocinas (MCP-1/CCL2, ECL/CCL19, MIP-3 α /CCL20 y CXCL10) que promueven cambios en la permeabilidad de la BHE y favorecen de esta manera una respuesta inflamatoria de tipo TH1 (Farina et al. 2007, Hauwel et al. 2005, Nikceвич et al. 1997 Parck et al. 2006). Por otra parte, se ha observado que los astroцитos son sensibles a la expresión de citocinas pro-inflamatorias como el $INF\gamma$, ya que se ha observado que después de una denervación entorrinal, se induce la expresión del mRNA del receptor para $INF\gamma$ por parte de astroцитos ubicados en el hipocampo a los dos días posteriores a la lesión (Wang and Zhou 2005).

Por otro lado, se ha demostrado que los linfocitos T de rata pre-incubados con astrocitos pierden completamente la habilidad de proliferar ante un estímulo mitogénico, así como la administración de astrocitos a ratas con encefalomiélitis alérgica experimental reduce la inflamación y los síntomas clínicos, sugiriendo que los astrocitos participan de manera importante en el control de la inflamación excesiva en el cerebro (Trajkovic et al. 2004).

1.2.3. Macrófagos y Células Dendríticas

Justo en los límites de la BHE como lo son, el espacio perivascular, las leptomeninges y los plexos coroideos, se encuentran células fagocíticas como los macrófagos y las células dendríticas. Los macrófagos expresan constitutivamente MHCII, CD11b y CD45 lo que puede ayudar a distinguirlos de la microglia que presenta una baja expresión de CD45 en estado no activado (Hauwel et al. 2005). Su principal función es la de ser CPA, y cuando hay alguna lesión, participar en la fagocitosis y secreción de citocinas pro-inflamatorias ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL12) y algunas quimiocinas (MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3), que favorecen la quimiotaxis y la inflamación (Chavarria et al. 2004). En contraste, los macrófagos también tienen un papel regulador ya que se ha demostrado que producen factores anti-inflamatorios y neurotróficos como NGF (Yamate et al. 2009).

Las células dendríticas pueden encontrarse principalmente en los plexos coroideos y en las meninges (McMahon et al. 2006). Son células de origen hematopoyético, se clasifican en dos subgrupos (linfoide y mieloide) y están divididas en varias subpoblaciones debido a los marcadores celulares que expresan. En estado inmaduro presentan baja expresión de MHCII moléculas co-estimuladoras (Chavarria et al. 2004). La principal función que se les ha atribuido es la vigilancia inmunológica y ser la CPA por excelencia. Sin embargo, también tienen un papel

importante en la inflamación, al producir citocinas como IL23, IL1 β , IL12, IFN γ y TNF α , además de IL10 (Chavarría et al. 2004, McMahon et al. 2006).

1.2.4. Linfocitos

El tráfico de leucocitos dentro del SNC posee procesos altamente regulados, lo cual protege al cerebro de fenómenos inflamatorios generalizados que pudieran comprometer de manera importante la homeostasis requerida para las funciones neurales (Galea et.al 2007). En condiciones fisiológicas existe una vigilancia inmunológica en los espacios perivasculares, con la participación de células T, que atraviesan la pared de los vasos de las vénulas poscapilares, sin embargo, el avance hacia el parénquima cerebral depende del reconocimiento antigénico (Becher, 2006). Se ha cuestionado si la especificidad antigénica por parte de las células T es un prerrequisito para facilitar su tránsito al SNC, sin embargo, varios investigadores han transferido a animales células T reactivas contra antígenos neurales o antígenos irrelevantes y se ha observado que ambos tipos infiltran al cerebro de manera similar (Galea et.al 2007).

1.3.Respuesta Inmune Molecular

1.3.1. Presentación de antígenos

La presentación de antígenos es un proceso crucial durante una respuesta inmunológica para la producción de células T protectoras que respondan a la presencia de patógenos o de estructuras foráneas al sistema. Este proceso requiere de CPA capaces de degradar microorganismos y expresar péptidos antigénicos a través del MHCII en su superficie celular. Cuando un linfocito T encuentra y reconoce el antígeno en una CPA, el complejo TCR/CD3 del linfocito se enlaza fuertemente al complejo péptido/MHC presente en la CPA profesional. El CD4, un co-receptor

del complejo TCR, también se une a una sección diferente de la molécula del MHCII. Estas interacciones permiten a las quinasas en las porciones intracelulares de las proteínas TCR, CD3 y CD4, activarse mediante fosforilación. Estas moléculas activan las vías bioquímicas principales en el citosol del linfocito T. Estas vías ahora activas son conocidas como *Señalización 1* de la activación de linfocitos T, ya que es la primera y principal señal pro-activación en la célula T. Cuando ocurre un reencuentro con el mismo antígeno dado, los linfocitos T de memoria son reactivados usando las mismas vías TCR. (Abbas et al. 2004).

La unión del antígeno-MHCII al complejo TCR y el CD4 pueden participar en la adhesión de la CPA y el linfocito T durante el proceso de activación celular, pero son en realidad la proteína integrina LFA-1 en la superficie del linfocito T y la ICAM en la CPA las más importantes en este tipo de interacción (Harrington 2005)

Las células T CD4 reconocen dichos antígenos unidos al MHC clase II, mientras que las células T CD8 reconocen antígenos unidos al MHC clase I. Existen “CPAs profesionales” equipadas para iniciar una respuesta inmunológica primaria a través de la presentación de antígenos a células T inespecíficas, del mismo modo existen “CPA no profesionales” que sólo pueden iniciar respuestas inmunes secundarias a través de la presentación de antígeno a células T activadas (Becher et.al 2006).

El estado de privilegio inmune del SNC se ha asociado a la presentación antigénica por parte de células dendríticas o macrófagos inmaduros, la expresión de citocinas anti-inflamatorias como el TGF- β , así como la generación de células T reguladoras (Tregs) (Cobbold et al. 2006, Lin et al. 2005). Incluso en estados patológicos, se ha observado que las células T CD4+ autorreactivas pueden proporcionar un cierto estado de neuroprotección transitoria a las motoneuronas faciales

dañadas (FMN) en ratones, mientras que las células T específicas contra antígenos no cerebrales, no confieren dicha neuroprotección a las FMN (Byram et al. 2004).

1.3.2. Citocinas y Quimiocinas

Las citocinas son proteínas con acciones pleiotrópicas que median muchas de las funciones de las células de la RI y son secretadas principalmente por las células inmunológicas aunque también las células del parénquima cerebral pueden secretarlas. De acuerdo al tipo de respuesta que generan, clásicamente y en forma general, se les ha clasificado en citocinas tipo TH1 y tipo TH2. Entre las tipo TH1 están las interleucinas IL1 β , IL12, IFN γ y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α); entre las tipo TH2 principalmente IL10, IL4, IL6 y TGF β (Abbas et al., 2004; Strle et al., 2001). Varias citocinas (TNF α - IFN γ , IL-1, IL-6, IL-18, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, TGF β , IL17 y IL23) se han descrito en SNC, incluso en estado fisiológico (Ver tabla 1, Doman et al. 2008, Churchill et al. 2006, Toby et al. 2009).

Las quimiocinas son proteínas mediadoras de la respuesta y tráfico de los leucocitos. Están clasificadas en 4 subfamilias: C, CC, CXC y CX₃C. Se ha demostrado que las subfamilias CC y CXC participan como mediadores del desarrollo y la inflamación en el SNC. En SNC son producidas principalmente por las células de la glia. Las principales quimiocinas en SNC son: proteína quimio-atrayente de monocitos (MCP-1/CCL2), RANTES/CCL5, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α /CCL3), MIP-1 β /CCL4, y la proteína inducida por IFN γ (IP-10/CXCL10). Su principal función es la quimiotaxis o atracción de los leucocitos hacia la zona de daño promoviendo la inflamación (Babcock et al. 2003, Baggiolini 2001).

Tabla 1. Principales citocinas presentes en el SNC y sus funciones.

Cítocina	Efectos en el SNC	Células Productoras	Referencias
IFN γ	<ol style="list-style-type: none"> 1. Activación de macrófagos. 2. Estimulación de la expresión de MHCII y moléculas co-estimuladoras. 3. Diferenciación de linfocitos TH1. 4. Daño a células endoteliales de la BHE. 5. Incrementa moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, E-selectina) en la BHE. 6. Inducción de la producción de óxido nítrico. 7. Inducción de la producción de TNFα en microglia. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Células TH1 2. Células TH17 3. Células NK 4. Neuronas 5. Microglia 6. Astrocitos 	<p>Neuman et al. 1997, Chavarria et al. 2004, Srendi-Kenigsbuch, 2002.</p>
TNF α	<ol style="list-style-type: none"> 1. Activación y atracción de neutrófilos. 2. Aumento del tráfico de leucocitos al espacio perivascular y el LCR. 3. Inducción de la expresión de quimiocinas (CCL2 y MMP-9). 4. Aumento de la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, E-selectina). 5. Inducción de apoptosis y producción de óxido nítrico. 6. En concentraciones elevadas inhibe la potenciación largo plazo (LTP). 7. Bajas concentraciones favorecen la plasticidad sináptica. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Células TH1 2. Macrófagos 3. Microglia 4. Células endoteliales 5. Mastocitos 	<p>Chavarria et al. 2004, Morganti-Kossmann et al. 2002, Srendi-Kenigsbuch, 2002, Liu et al. 2007.</p>
IL10	<ol style="list-style-type: none"> 1. Reducción de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como IL1β y TNFα. 2. Inhibición de la expresión y activación de sus receptores. 3. Inhibición de la expresión de moléculas de MHCII e IL12. 4. Inducción de anergia en el infiltrado de células T. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Células TH2 2. Células Tregs 3. Microglia 4. Astrocitos 5. Neuronas 	<p>Stryle et al. 2001, Tu et al. 2007, Culpan et al. 2006, Akdis and Blaser 1999.</p>

IL4	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inhibición de la expresión y liberación de IL1β, IL6 y TNFα por los macrófagos. 2. Inhibición de la expresión de de MHCII inducida por IFNγ. 3. Inhibición de la producción de óxido nítrico. 4. Estimulación de la llegada de linfocitos TH2. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Células TH2 2. Mastocitos 3. Astrocitos. 4. Microglia. 	Strle et al. 2001, Hulchof et al. 2002, Abbas et al. 2004, Clos et al. 1997.
IL6	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inducción de la diferenciación de las células B a células plasmáticas. 2. Estimulación de la secreción de anticuerpos. 3. Supervivencia neuronal después de un daño. 4. Acción inflamatoria. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Células TH2 2. Macrófagos 3. Microglia 4. Astrocitos 5. Neuronas 	Srendi-Kenigsbuch 2002, Hacham et al. 2004.
TGF- β	<ol style="list-style-type: none"> 1. Citocina inmuno reguladora 2. Papel neuroprotector como factor trófico. 3. Induce cicatrización después de daño en SNC. 4. Inducción de células T reguladoras en SNC 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Células T reguladoras 2. Microglia 3. Astrocitos 4. Neuronas 	Wiss-Coray 2006, Komuta et al. 2009. Prochazkova et al. 2009.

1.4. Heterogeneidad de la respuesta inmune en el Sistema Nervioso Central

Observaciones previas sugieren que la organización de la respuesta inmunológica difiere entre las distintas regiones del SNC. Por ejemplo, cisticercos ubicados en el parénquima cerebral o en los surcos, se asocian con niveles bajos de citocinas y de anticuerpos específicos en el líquido cefaloraquídeo. En contraste, los parásitos localizados en el espacio subaracnoideo de la base del cráneo o intraventriculares, inducen una respuesta más pronunciada con altos niveles de citocinas y de anticuerpos específicos (Chavarria et al., 2005). Así mismo, en un modelo de malaria cerebral por *Plasmodium coatneyi* en primates se evaluó la expresión de citocinas pro-inflamatorias (IL1 β , IL12, IFN γ y TNF α) en diversas regiones del parénquima cerebral. Se observó que la expresión de estas citocinas fue mayor en el cerebelo de los monos infectados. Por

otro lado se demostró que en los monos controles la expresión de estas mismas citocinas fue heterogénea al comparar la corteza cerebral, la sustancia blanca, el cerebro medio y el cerebelo (Tongren et al. 2000). Esta heterogeneidad de la respuesta inmune no solo se observa durante la infección directa del SNC, sino también en las respuestas inmunológicas secundarias a infecciones periféricas. Para ilustrar este punto, cabe mencionar que la infección experimental por tripanosomas en la rata conduce a una producción más elevada de citocinas en los plexos coroideos con relación al parénquima cerebral (Sharafeldin et al, 1999).

Es posible que estas respuestas compartimentadas sean el resultado de la heterogeneidad en la distribución, la densidad y el tipo de CPA en las diversas regiones del SNC (Galea et al. 2005, Guillemin et al. 2004, Matyszak et al, 1996, McMenamin et al. 2003). En apoyo a esta posibilidad, se ha observado que los plexos coroideos y las meninges presentan principalmente macrófagos y células dendríticas, mientras que en el parénquima cerebral la microglia y los macrófagos perivasculares son los tipos celulares que predominan del componente inmunológico (Galea et al. 2005, Guillemin et al. 2004, Matyszak et al, 1996, McMenamin et al. 2003). Los macrófagos principalmente se encuentran en el tejido conectivo de la dura madre y aracnoides, a nivel sub-pial; en el estroma de los plexos coroideos: en el epéndimo o en el espacio perivascular de los vasos sanguíneos del parénquima cerebral (Galea et al. 2005, Mercier et al. 2002, McMenamin et al. 2003, Perry et al. 1985). Las células dendríticas se localizan más en la superficie de la piamadre y de los plexos coroideos, también en la aracnoides (Matyszak et al. 1996, McMenamin et al. 2003). Las células microgliales son macrófagos residentes del parénquima cerebral cuya distribución en el SNC es heterogénea, en la corteza cerebral son alrededor del 5% de las células, mientras que en la sustancia nigra es el 12%(Lawson et al. 1990). Igualmente su morfología varía de región a región, sugiriendo que ésta y la distribución pueden ser determinadas por el ambiente específico de cada región cerebral (Lawson et al. 1990,

Savchenko et al. 2000). No sólo la distribución, la densidad y el tipo de CPA pueden afectar la respuesta inmunológica en los diferentes compartimentos del SNC, sino también la expresión de MHCII, una molécula necesaria para la presentación de antígenos. Se ha observado que la expresión del MHCII varía en diferentes regiones del SNC, siendo muy baja o casi inexistente en la corteza parietal y la cerebelar, mientras que en la sustancia blanca cerebelar (fibras nerviosas) y la médula espinal es alta (Vass et al. 1990). Los macrófagos y las células dendríticas de las meninges y los plexos coroideos expresan constitutivamente el MHCII, mientras que la microglia muestra un perfil apagado pero pueden llegar a expresar el MHCII después de un estímulo específico (McMenamin et al. 2003, Perry 1998). Igualmente la expresión constitutiva de IFN γ y TNF α en las CPA de meninges y en los plexos coroideos pudieran no sólo influir en la expresión del MHCII, sino facilitan las respuestas inflamatorias de estos compartimentos. La expresión constitutiva de estas citocinas pro-inflamatorias en ciertas regiones del SNC pudiera explicar porqué en algunas patologías (meningitis, neurocisticercosis ventricular o subaracnoidea) son más inflamatorias y presentan sintomatología más severa con respecto a otras (neurocisticercosis en parénquima cerebral). Por otro lado, las citocinas anti-inflamatorias como la IL10 y el TGF β , así como el factor de crecimiento neural (NGF) abaten la expresión del MHCII (Hailer et al. 1998, Hailer et al. 2001, Lee et al. 2005, Stampachiacchiere et al. 2005), por lo que factores secretados por los astrocitos se vuelven claves en la generación de los ambientes inmunológicos específicos y en la modulación de la respuesta inmunológica ante un evento inflamatorio o infeccioso. Por lo tanto la heterogeneidad de la expresión del MHCII, las citocinas, y la distribución heterogénea de las CPA en las diferentes regiones del SNC apoya la existencia de compartimentos inmunológicos en el SNC, cuya identidad estructural aún desconocemos.

2. Sistema Nervioso Central

El Sistema Nervioso Central (SNC), que comprende el cerebro y la médula espinal, es usualmente dividido en siete partes: cerebelo, la médula, el puente, el cerebro medio, el diencefalo, y los hemisferios cerebrales. La médula, el puente y el cerebro medio en su conjunto son llamados tallo cerebral. El diencefalo y los hemisferios cerebrales son llamados cerebro anterior (Purves et al. 2004). Histológicamente, el SNC está dividido en dos categorías celulares: Las células nerviosas (neuronas) y las células de la glia, de estas últimas hay al menos tres tipos: astrocitos, oligodendrocitos y las células de la microglia (Carpenter 1991, Purves et al. 2004).

Los hemisferios cerebrales son la parte más variable del SNC de los mamíferos, en particular la cubierta de los hemisferios denominada corteza cerebral o neocorteza, Las otras estructuras están formadas por la arquicorteza y la paleocorteza (Purves et al. 2004).

La corteza se encuentra organizada horizontalmente en láminas celulares. En la mayoría de los mamíferos hay de tres a seis láminas designadas usualmente con números romanos, siendo la primera la más exterior y en contacto con las meninges, continuando la numeración en forma progresiva hacia el interior. Cada capa tiene características funcionales y anatómicas particulares que se distingue por el tipo, densidad y arreglo de las células que presenta y el tipo de conexiones que establece. En los mamíferos la neocorteza constituye el 90% de la superficie de los hemisferios y presenta seis capas. La capa I, llamada lámina molecular contiene células con axones horizontales y células de Golgi tipo II. La capa II, granular externa, consiste en paquetes cerrados de células granulares. La capa III o piramidal externa está compuesta de dos subcapas de neuronas piramidales pequeñas. La capa IV, granular interna, contiene células estelares. La capa V, piramidal interna, consiste principalmente en neuronas piramidales medianas y grandes. Y la VI, capa multiforme, contiene predominantemente células alargadas o fusiformes (Carpenter 1991, Purves et al. 2004).

La corteza cerebral no sólo se encuentra organizada en láminas, también se divide en áreas de procesamiento específico. De tal manera que encontramos el área auditiva, la motora, la somatosensorial, la visual, y las que están relacionadas con los procesos más complejos como la memoria, el pensamiento, las emociones, etc. (Purves et al. 2004, Kandel et al. 2000).

3. Módulos Neurales

La neocortiza está también organizada en unidades verticales o columnares que agrupan neuronas y conexiones que procesan un tipo de información semejante (Leise 1990, Mountcastle 1979). Una característica definitoria de éstas en la corteza sensorial es que sus células poseen características fisiológicas similares, sin embargo existe cierta variabilidad dentro de cada minicolumna (Kathleen and Noritaka 2004). Adicionalmente, las minicolumnas están organizadas dentro de módulos funcionales de un alto orden llamadas columnas corticales, que consisten en varias minicolumnas unidas por conexiones de corto alcance (Amirikian and Georgopoulos 2003).

La evidencia anatómica hasta ahora acumulada, junto con diversos estudios neurofisiológicos, sugieren que las columnas corticales participan en el procesamiento de información de tipo neural (Leise 1990, Livingstone et al. 1984, Mountcastle 1979). Por ejemplo, en la corteza visual de los primates y felinos, existen columnas de células que procesan preferentemente información proveniente del ojo izquierdo o del ojo derecho (columnas de dominancia ocular; Leise 1990). En la corteza visual primaria de monos encontramos en la capa IV, columnas de dominancia ocular, además de patrones modulares repetitivos denominados “manchas” en las capas II y III, del mismo modo en el bulbo olfatorio de las ratas encontramos como ejemplo de módulos a los glomérulos olfatorios (Purves et al. 2004). Especies subterráneas como la rata-topo que dependen de tener contacto, poseen representaciones de las superficies sensoriales en la corteza

somatosensorial, de igual manera se han observado grandes representaciones corticales de estructuras orales en primates. (Catania and Henry 2006). El concepto modular propone que la red neuronal en una columna cortical realiza transformaciones básicas de señales que a su vez se integra con la actividad en otras redes y áreas cerebrales. (Lübke and Feldmeyer 2007).

4. Corteza somatosensorial primaria como compartimento inmunológico

El modelo de la corteza somatosensorial primaria del ratón adulto contiene un mapa corporal constituido por módulos columnares denominados barriles (White et al, 1993). En los pasados 10 años el también llamado “campo de los barriles” ha sido un modelo atractivo para el estudio de circuitos neuronales organizados en columnas corticales (Lübke 2007). Cada uno de los barriles representa grupos de mecanorreceptores localizados en las vibrisas faciales del ratón, los cuales poseen canales iónicos sensibles a estímulos mecánicos que pueden llevar a evocar potenciales de acción en las neuronas sensitivas de la rama infraorbital del nervio trigeminal, las neuronas sensitivas hacen sinapsis excitatoria de tipo glutamatérgico en el núcleo trigeminal del tallo cerebral. Las neuronas trigeminotalámicas en el núcleo trigeminal principal están organizadas somatotópicamente en estructuras denominadas “barriletes” que reciben los estímulos desde los bigotes, las neuronas trigeminales principales envían proyecciones hacia el núcleo posteromedial del tálamo (VPM, de sus siglas en inglés) que a su vez se organiza en otra estructura anatómica denominada “barreloides”. Los axones de las neuronas del VPM proyectan hacia la neocorteza somatosensorial formando discretas agrupaciones en la capa IV las cuales forman las bases del mapa de los barriles (ver Figura. 1, Petersen et al. 2007).

Debido a su definición anatómica, podemos identificar a los barriles con mucha precisión (Killackey et al. 1979, Woolsey et al. 1970). Esto facilita la evaluación de la relación entre la modularidad neural con la inmunológica.

Previamente en el laboratorio se ha observado que el área de los barriles de la corteza somatosensorial primaria presenta una menor densidad de células microgliales y macrofágicas con respecto a las zonas aledañas, y que se distribuyen preferencialmente en el septo de los barriles (Figura 2 E). Adicionalmente, observamos la expresión de IL10 en el centro de los barriles en las terminaciones nerviosas, probablemente axones (Figura 4 A). Después de realizar una lesión circunscrita en el tejido adyacente al área de los barriles, se observó una respuesta intensa de astrocitos, macrófagos y microglia activada (Figura 11 A y Figura 11 C). En estas lesiones se encontró predominantemente $IFN\gamma > TNF\alpha > IL10 > IL4$ (Figura 12 A, Figura 12 C, Figura 12 G y Figura 12 E). En contraste, las lesiones realizadas en el campo de los barriles muestran una respuesta celular marcada en el borde de la lesión y en los barriles próximos a ésta (Figura 5 A y Figura 6 A). La respuesta fue más intensa en el septo de los barriles con respecto al interior de los mismos. Las citocinas inflamatorias e IL4 mostraron un patrón de distribución similar (Figura 8 A, Figura 9 A y Figura 10 A) (Chavarría et al. 2006, Pérez-H et al. 2006). Estos datos obtenidos en el laboratorio apoyan la existencia de los compartimentos inmunológicos en el SNC, además sugieren posibles relaciones estructurales.

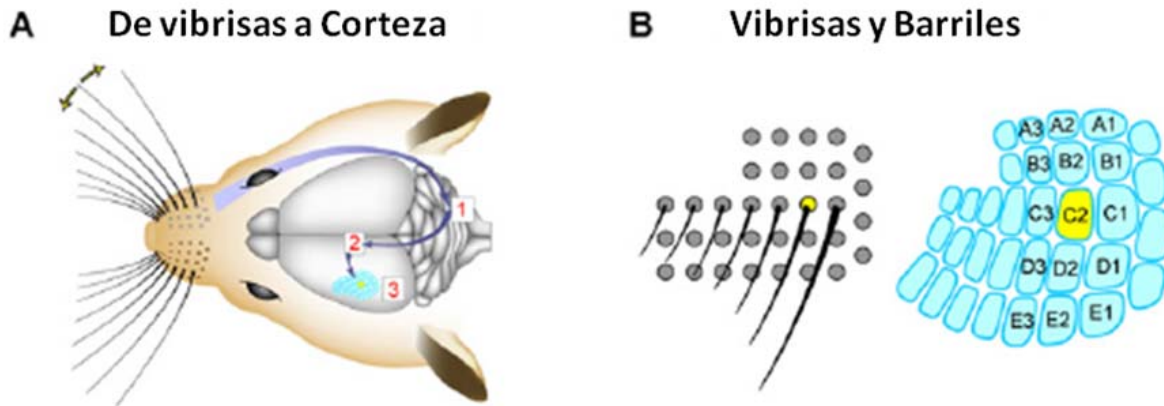


Figura 1 Rutas sinápticas para procesar información en los barriles corticales proveniente desde las vibrisas faciales en roedores.

A) El movimiento de las vibrisas evoca potenciales de acción en el nervio trigeminal, que libera glutamato en una primera sinapsis del tallo cerebral 1. Las neuronas del tallo cerebral envían información señorial al tálamo 2. Finalmente, el tálamo envía información a la corteza somatosensorial primaria 3. B) Correspondencia idéntica entre bigotes y barriles (Diagrama tomado de Petersen 2007).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En base a los datos reportados en la bibliografía y nuestras observaciones y tomando en cuenta que los compartimentos inmunológicos coinciden con los módulos neurales, nos surgen las siguientes preguntas: ¿es posible que el módulo neural influya en las características del compartimento inmunológico? Si los módulos corticales fungieran como entidades bi-funcionales que integran tanto información neuronal como inmunológica, ¿es posible que al haber un cambio de función en los módulos corticales entonces cambien las características de los compartimentos inmunológicos? Para contestar estas preguntas se empleó el modelo de la corteza somatosensorial primaria del ratón CD1 adulto.

IV. HIPÓTESIS

El cambio funcional en el área de los barriles en S1, como consecuencia del recorte de las vibrisas faciales en el ratón CD1 adulto, conduce a un cambio en el compartimento inmunológico asociado a este modulo y por lo tanto modifica su comportamiento ante un estímulo la inflamatorio.

V. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar si el recorte de las vibrisas faciales modifica la respuesta celular y de citocinas del componente inmunológico en el módulo de los barriles.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la distribución y densidad de células microgliales, macrófagos perivasculares y astrocitos en el área de los barriles de la S1 en ratones adultos controles y ratones adultos con recorte de vibrisas faciales, utilizando técnicas de inmunohistoquímica y análisis digital de imágenes.
2. Evaluar la distribución y densidad de células microgliales, macrófagos perivasculares y astrocitos, en ratones adultos sin recorte de vibrisas faciales lesionados en el campo de los barriles o corteza disgranular y ratones adultos con recorte de vibrisas faciales lesionados en campo de los barriles o corteza disgranular, utilizando técnicas de inmunohistoquímica y análisis digital de imágenes.
3. Evaluar la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias en S1 en ratones adultos controles y ratones adultos con recorte de vibrisas faciales, utilizando técnicas de inmunohistoquímica y análisis digital de imágenes.

4. Evaluar la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias en S1 en ratones adultos sin recorte de vibrisas faciales lesionados en el campo de los bariles o corteza disgranular y ratones adultos con recorte de vibrisas faciales lesionados en el campo de los bariles o corteza disgranular, utilizando técnicas de inmunohistoquímica y análisis digital de imágenes.

VII. METODOLOGÍA

1. Animales

Se usaron ratones machos de la cepa CD1 de 6 semanas de edad, los cuales fueron mantenidos en un ciclo luz:oscuridad 14:10 horas, con agua y comida *ad libitum*. Se dividieron en 6 grupos de 4 animales cada uno, como se muestra en la tabla 2. Los ratones fueron proporcionados por el bioterio del Departamento de Medicina Experimental, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tabla 2. Grupos experimentales.

	Recorte de vibrisas	Lesión en S1 Barriles	Lesión S1 Corteza disgranular
Grupo 1			
Grupo 2	X		
Grupo 3	X	X	
Grupo 4		X	
Grupo 5	X		X
Grupo 6			X

2. Recorte de vibrisas faciales

Para estudiar la relación funcional del compartimento inmunológico con la corteza somatosensorial se efectuó recorte de las vibrisas faciales a los ratones experimentales, con el fin de suprimir los impulsos sensoriales hacia el área de los barriles, esto basándose en que se ha demostrado que el recorte de vibrisas induce cambios metabólicos, como disminución en la degradación de glucosa en el área de los barriles (Meir et al. 2003), así como diferencias en los niveles de zinc en la sinapsis en ratones jóvenes que tuvieron recorte de las vibrisas faciales durante tres semanas (Czupryn y Skangiel 2001). El recorte de vibrisas se realizó con tijeras convencionales, a ras de la piel en ambas mejillas ya que se ha reportado que los cambios se inducen en el hemisferio contralateral (Sadaka et al. 2003), cada tercer día a partir de la sexta semana de edad hasta la décima semana.

3. Lesión en corteza cerebral y preservación del material biológico

Para realizar las lesiones los ratones fueron anestesiados administrándoles xilacina 10 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal de manera intramuscular y ketamina 90 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal de manera intraperitoneal. Posteriormente los ratones fueron colocados en un aparato estereotáxico y lesionados en S1 con una aguja de 22 G $\frac{1}{4}$ (0.7 mm x 32 mm) en las coordenadas: anteroposterior; -1.5 mm; profundidad; 0.5 mm; lateral; -2.7 mm con relación a bregma y una inclinación del poste a 10°. A los dos días de haber realizado la lesión, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (20 mg/kg de peso corporal) inyectada intraperitonealmente, perfundidos con solución salina isotónica y posteriormente con paraformaldehído al 4% en solución de fosfatos a 0.1 M y pH de 7.4. Se eligió este período de tiempo debido a que la respuesta celular en el SNC es de inicio rápido y a las 24-48 horas hay

gran reactividad de la glia. Los animales fueron decapitados, se obtuvieron los cerebros, se separaron las cortezas de cada cerebro y se postfijaron colocados sobre portaobjetos recubiertos con cinta de teflón para extender las cortezas y facilitar la visualización del mapa de los barriles. Las muestras se congelaron por inmersión en 2-metilbutano previamente enfriado con hielo seco. Después de ser congeladas, las muestras se almacenaron a -74° C hasta efectuar los experimentos.

4. Inmunohistoquímica

Se realizaron cortes tangenciales seriados (25 μ m de espesor) de las cortezas cerebrales a una temperatura de -20° C utilizando un criostato. Los cortes fueron recuperados y colocados en pozos con una solución crioprotectora (25% de etilenglicol, 25% de glicerol y 50% de solución amortiguadora de fosfatos (PB) a 0.1M y con un pH de 7.4.

Se hicieron 3 lavados de 10 minutos con PBT (Tritón X-100, 0.3% en PB), en seguida se inactivó la actividad de la peroxidasa endógena en el tejido con 3% H_2O_2 en PB durante 10 minutos y se lavaron 3 veces por 10 minutos con PBT. Los cortes fueron incubados con una solución amortiguadora de citratos durante 60 minutos a 70° C. Posteriormente se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se realizaron 2 lavados de 10 minutos con PBT, se les agregó el anticuerpo primario diluido en una solución de bloqueo que contiene albúmina bovina sérica al 3% y tritón X-100 al 0.3% disueltos en PB, en agitación y a temperatura ambiente durante toda la noche. Los anticuerpos primarios fueron: cabra anti-TNF α de ratón, rata anti-IL4 de ratón (ambos de Santa Cruz 1:500), rata anti-F4/80 de ratón, rata anti-IL10 de ratón, (ambos de Serotec, 1:500), cabra anti-IFN γ de ratón, cabra anti-GFAP o ratón anti-MHCII de ratón (todos de Chemicon, 1:500). Al día siguiente los cortes fueron lavados 3 veces por 10 minutos

con PBT. Posteriormente, los cortes se incubaron por 90 minutos a temperatura ambiente en agitación con los anticuerpos secundarios biotinilados dirigidos contra IgGs de rata, cabra y ratón (Chemicon, a una dilución 1:500) en correspondencia con los anticuerpos primarios utilizados, todos fueron diluidos en PB. Pasado ese tiempo se retiró el exceso de los anticuerpos y los cortes se lavaron tres veces con PBT. Los cortes se incubaron con el complejo avidina-peroxidasa (Elite AB Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por una hora a temperatura ambiente en agitación, se lavaron tres veces con PB, y la actividad de peroxidasa se reveló con un kit de 3,3-diaminobencidina y peróxido de hidrógeno de acuerdo al protocolo recomendado por el proveedor (Vector Laboratories). Los cortes se tiñeron para visualizar los barriles de la corteza somatosensorial con hematoxilina acuosa al 5% durante 5 minutos, se lavaron con agua corriente de la llave hasta eliminar el excedente de colorante, se colocaron de nuevo en PB. Al final del procedimiento, los cortes se montaron sobre laminillas cubiertas de gelatina y se dejaron secar hasta el día siguiente en ambiente libre de polvo, se montaron en Clarion y se observaron en un microscopio de campo claro. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Nikon y una cámara digital acoplada a este.

5. Cuantificación de marcadores

Se realizó la cuantificación de marcadores celulares y de citocinas mediante un análisis de imágenes usando el software libre ImageJ, determinando el número de células positivas en cada uno de los barriles, tomando en cuenta las células presentes tanto en el interior como en el septo de los mismos. Se evaluaron aproximadamente 8 barriles por animal.

6. Análisis estadístico

Todos los valores obtenidos de los animales fueron representados como medias, los datos fueron derivados de cuatro animales por cada grupo. El análisis estadístico se realizó a través de una herramienta estadística facilitada por www.vassar.edu usando una prueba T de student para

comparar entre grupos y entre la primera y segunda fila de barriles (para el caso de los animales lesionados) tomando como significantes los valores de $P \leq 0.05$.

VIII. RESULTADOS

1. Animales sin lesión en S1

1.1. Marcadores celulares

La expresión de GFAP (proteína fibrilar ácida de la glia), la cual puede ser usada como marcador específico que nos permite observar la distribución de los astrocitos, fue más acentuada en el área de los barriles de los animales sin vibrisas faciales con respecto a los animales controles ($P= 0.004$, Figura 2 G), además de que este tipo celular mostró una morfología que sugiere un estado reactivo: núcleos grandes, mayor cantidad de prolongaciones citoplasmáticas y engrosamiento de las mismas (Figura 2 B, ver recuadro). La expresión de MHCII, fue menor en el área de los barriles de manera similar a las observaciones realizadas previamente en los animales controles con vibrisas faciales, (Figura 2 C y D). Con respecto a la expresión de F4/80, marcador que permite observar células de la microglia y macrófagos, se pudo observar una expresión basal en las áreas que rodean el campo de los barriles, (Figura 2 E y F), en este caso se pudo observar una expresión basal mayor en los barriles de ratones con vibrisas faciales con respecto a los animales sin vibrisas faciales ($P= 0.0005$, Figura 2 E).

1.2. Expresión de Citocinas

Los animales sin vibrisas faciales no lesionados en la corteza somatosensorial primaria S1 tuvieron una respuesta semejante a nuestras observaciones previas, ya que no se apreció reactividad en el campo de los barriles para las citocinas pro-inflamatorias $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, ni para

la citocina anti-inflamatoria IL4, de igual manera la expresión de éstas no se observó en el resto de S1 al igual que en los animales controles con vibrisas faciales (Figura 3). En cuanto a la expresión de IL10, que anteriormente se había observado en animales controles con vibrisas faciales, se detectó nuevamente en las terminaciones nerviosas en el interior de los barriles y en las estructuras subcorticales (Figura 4 A y C, ver flecha), en contraste en los animales sin vibrisas faciales no se observó expresión alguna (Figura 4 B y D).

2. Animales lesionados en S1 en el campo de los barriles.

2.1 Marcadores celulares

Las lesiones realizadas en S1 de los animales con vibrisas faciales mostraron una respuesta tanto de microglia, macrófagos, astrocitos, así como la expresión del MHCII, confinada principalmente al septo de los barriles cercanos al borde de la lesión (Figura 5 A, Figura 6 A y Figura 7 A). La expresión de células positivas a F4/80 y la presencia de astrocitos fue significativamente menor entre los barriles de la primera fila, (cerca de la lesión), y la segunda hilera en los animales con vibrisas faciales ($P = 0.04$ y $P = 0.002$ respectivamente, Figura 5 C y Figura 6 C).

La expresión de MHCII mostró un patrón de distribución similar en los ratones lesionados con las vibrisas faciales, sin presentar una diferencia estadística en la cantidad de células que fueron MHCII positivas entre la primera y la segunda fila de barriles (Figura 7 C).

En cuanto a los ratones sin vibrisas faciales lesionados en el campo de los barriles observamos que la expresión de F4/80 está confinada principalmente al borde de la lesión y carece de la distribución característica concordante con los septos de los barriles próximos a la lesión que se había observado en los ratones con vibrisas faciales lesionados en la misma área (Figura 5 B). La cantidad de células por barril en la primera fila es menor con respecto a lo documentado en los animales con vibrisas ($P = 0.01$, Figura 5 C). La distribución de astrocitos en los animales sin

vibrisas fue semejante a lo observado en los animales con vibrisas, aunque la cantidad de astrocitos por barril en la fila de barriles más cercana a la lesión es significativamente menor ($P=0.002$, Figura 6 B y C). La reactividad está prácticamente limitada a esta primera fila.

La expresión del MHCII en los animales con recorte de vibrisas faciales está confinada principalmente al borde de la lesión y de igual manera carece de la distribución característica concordante con los septos de los barriles próximos a la lesión que se había observado en los ratones con vibrisas faciales lesionados en la misma área (Figura 7 B). Sin embargo, la cantidad de células que expresan MHCII por barril en los animales sin vibrisas faciales fue mayor en la fila de barriles pegados al borde de la lesión ($P=0.004$, Figura 7 C).

2.2. Expresión de Citocinas

En cuanto a la expresión de citocinas pro-inflamatorias ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$) y las anti-inflamatorias (IL10, IL4) encontramos que en los animales con vibrisas faciales las lesiones realizadas en el campo de los barriles muestran una respuesta celular marcada en el borde de la lesión y en los barriles próximos a ésta, la expresión fue predominantemente $IFN\gamma > TNF\alpha > IL10 > IL4$ (Figura 8 A, Figura 9 A, Figura 10 A y B). Sin embargo estos patrones de distribución difieren en los animales lesionados en los barriles sin vibrisas faciales. La expresión de $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$ estuvo restringida al borde de las lesiones (Figura 8 B y Figura 9 B), y no se observó el patrón de distribución de la expresión como en los animales con vibrisas faciales lesionados. La cantidad de células que expresaron $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$ es menor en los barriles pegados al borde de la lesión en comparación con los animales lesionados con vibrisas faciales ($P=0.006$ y $P=0.004$, Figura 8 C y Figura 9 C). En el caso de IL4 e IL10 no se observó reactividad alguna ni en el borde de la lesión ni en los barriles próximos a ésta (Figura 10 B y D).

3. Animales lesionados en S1 fuera del campo de los barriles.

Por otro lado, las lesiones realizadas en S1 pero fuera del campo de los barriles mostraron respuestas similares en ambos observó de ratones lesionados, con y sin vibrisas faciales. La reactividad de F4/80 y MHCII se detectó principalmente en el borde de la lesión y en macrófagos perivasculares, mientras que los astrocitos muestran un estado franco de gliosis con núcleos grandes, mayor cantidad de prolongaciones citoplasmáticas y engrosamiento del citoplasma (Figura 11). Asimismo, la expresión de las citocinas (Figura 12) mostró una respuesta similar a lo reportado previamente en nuestros antecedentes, observándose el halo de reactividad que disminuye al alejarse del sitio de lesión.

Tabla 2. Resumen cualitativo de la expresión de marcadores celulares y citocinas en los distintos grupos experimentales.

<i>GRUPO</i>	<i>ASTROCITOS</i>	<i>MICROGLIA Y MACROFAGOS</i>	<i>MHCII</i>	<i>INFγ</i>	<i>TNFα</i>	<i>IL4</i>	<i>IL10</i>
Control con vibrisas.	*	*	*	-	-	-	-
Control sin vibrisas.	**	*	**	-	-	-	-
Lesionados en S1 en el área de los barriles con vibrisas.	***	***	***	**	***	*	*
Lesionados en S1 en el área de los barriles, sin vibrisas.	**	**	**	**	**	-	-
Lesionados en S1 con vibrisas.	**	**	**	**	**	*	*
Lesionados en S1 sin vibrisas.	**	**	**	**	**	*	*

- = Ausencia de marca, * = Expresión basal, ** = Expresión intermedia, *** = Expresión máxima

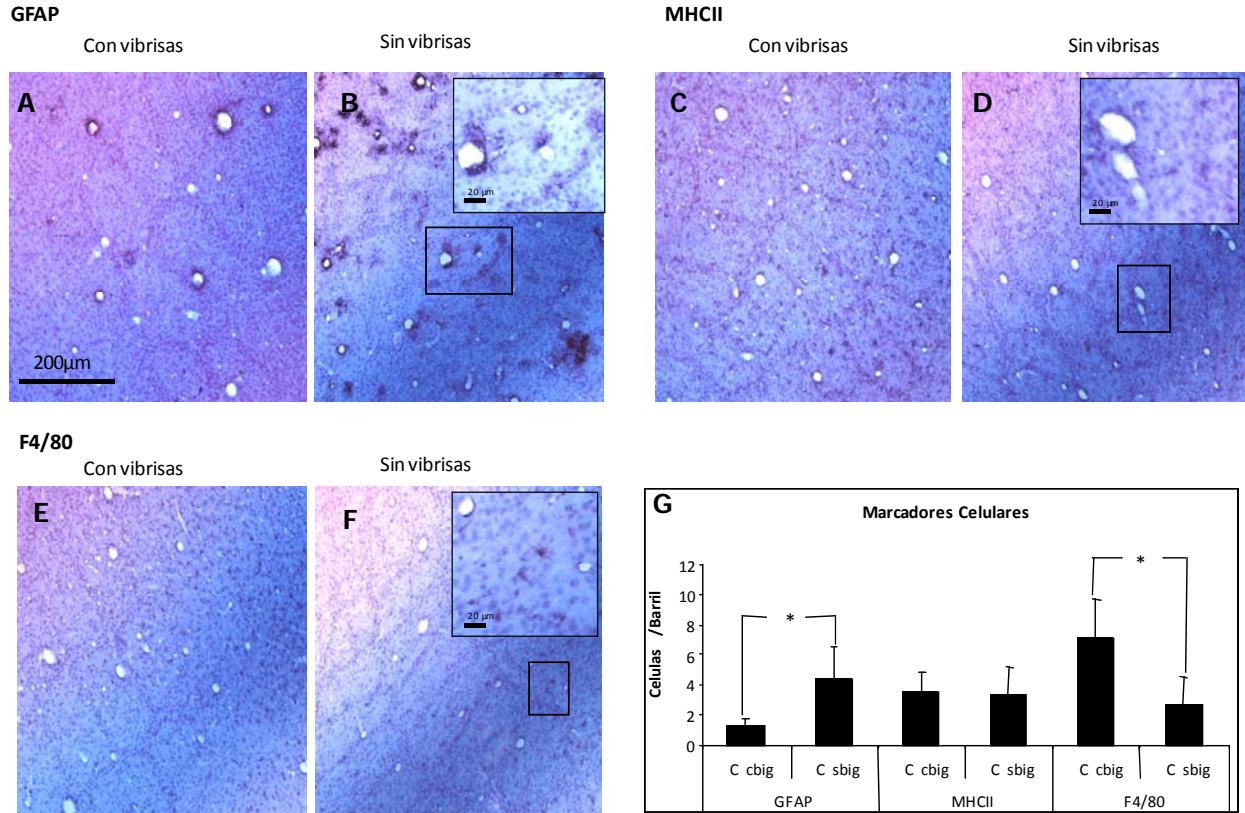


Figura 2 Distribución de astrocitos, microglia, macrófagos y del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHCII) en barriles de animales no lesionados en corteza cerebral. A, C y E muestran imágenes del área de los barriles de animales controles con vibrissas faciales, B, D y F animales experimentales sin vibrissas faciales. A y B muestran la expresión de GFAP (astrocitos) en los barriles, C y D el MHCII, E y F la expresión de F4/80 (microglia y macrófagos). El recuadro en B muestra Astrocitos asociados a vasos sanguíneos, el recuadro en D muestra la expresión de MHCII en microglia, el recuadro en F muestra macrófagos perivasculares y microglia. Las imágenes son mostradas a un aumento de 10X y los recuadros a 20X. G) Representa la comparación cuantitativa de la expresión de marcadores celulares (Células/Barriles). C cbig- Controles con vibrissas. Csbig- Controles sin vibrissas faciales. Se realizó una *t* de Student para comparar las diferencias entre ambos grupos de animales, * $P \leq 0.01$

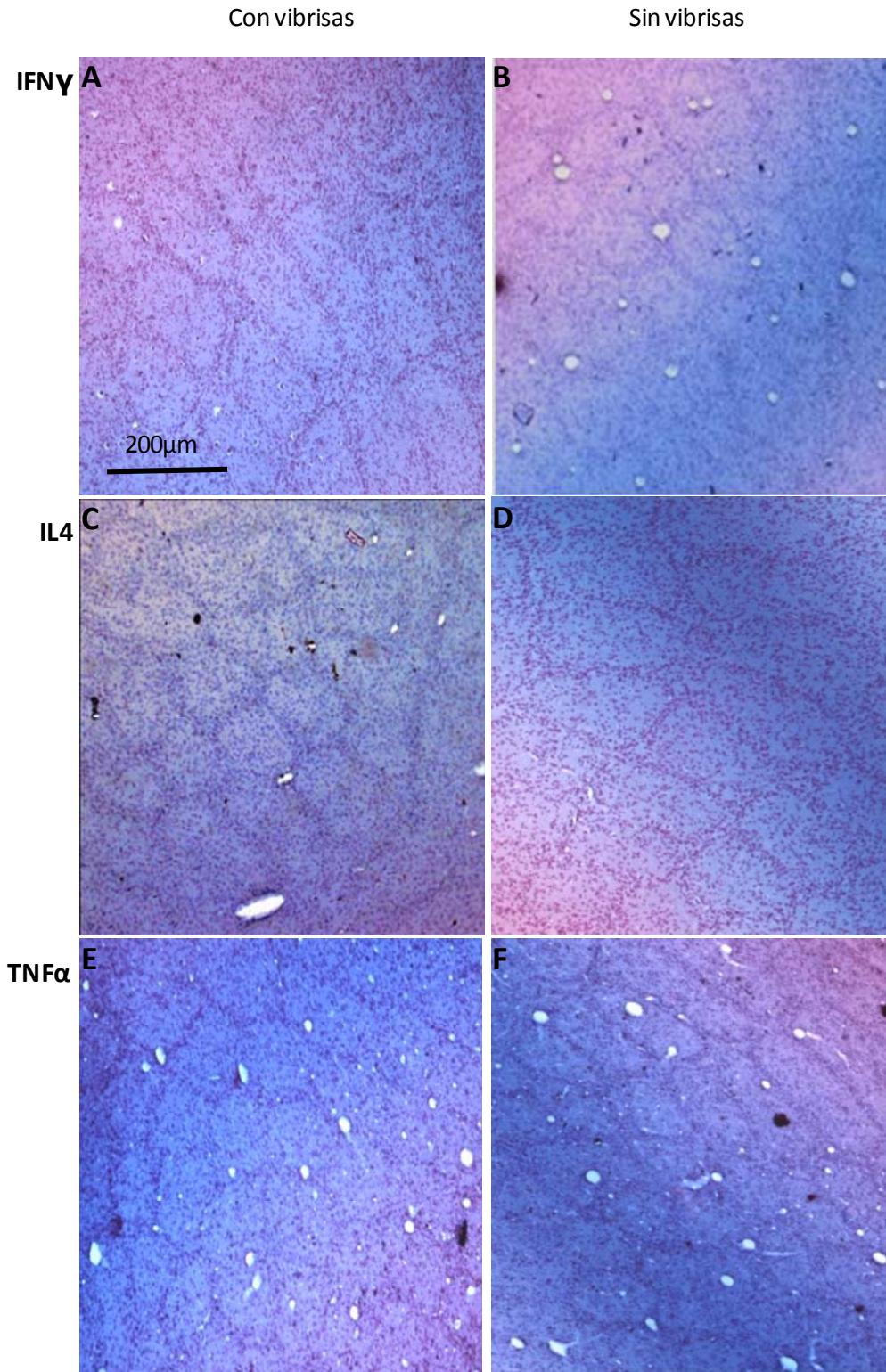


Figura. 3 Expresión de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en los barriles de animales no lesionados en S1. A, C y E muestran imágenes del área de los barriles de animales controles con vibrisas faciales. B,

D y F animales experimentales sin vibrisas faciales. A y B muestran la expresión de $IFN\gamma$, C y D de IL4, E y F de $TNF\alpha$. Las imágenes son mostradas en un aumento de 10X.

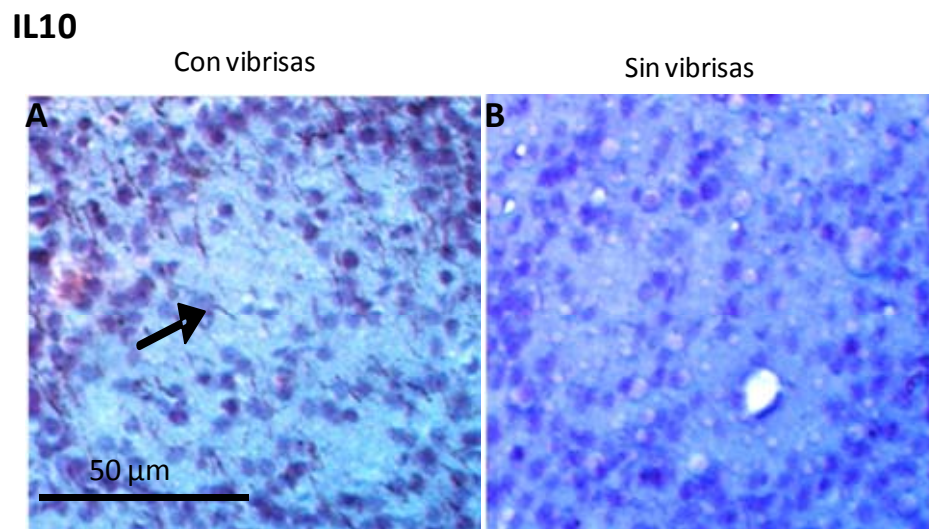


Figura 4. Expresión de IL10 en el campo de los barriles. A y B muestra barriles de animales con vibrisas faciales(A) y sin vibrisas faciales (B). Las flechas señalan fibras nerviosas con expresión de IL10. Las imágenes son mostradas a un aumento de 20X.

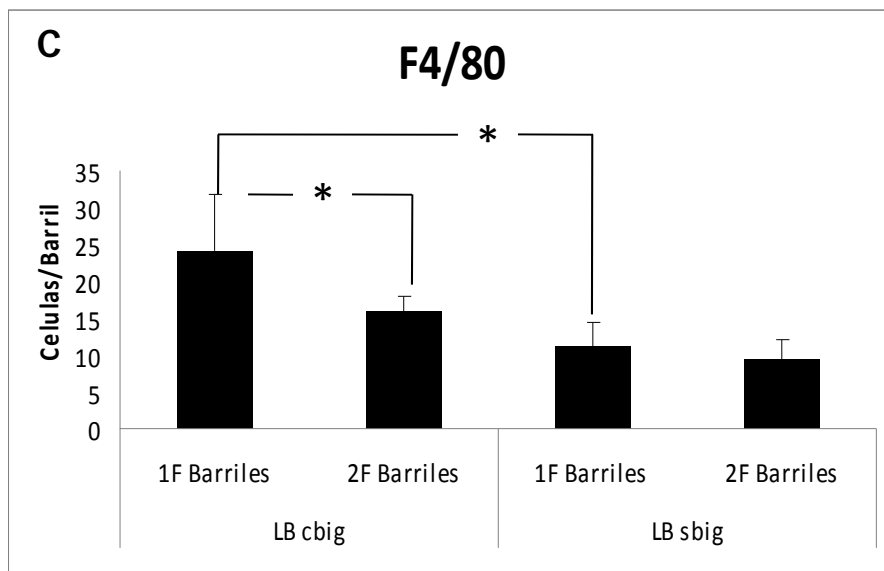
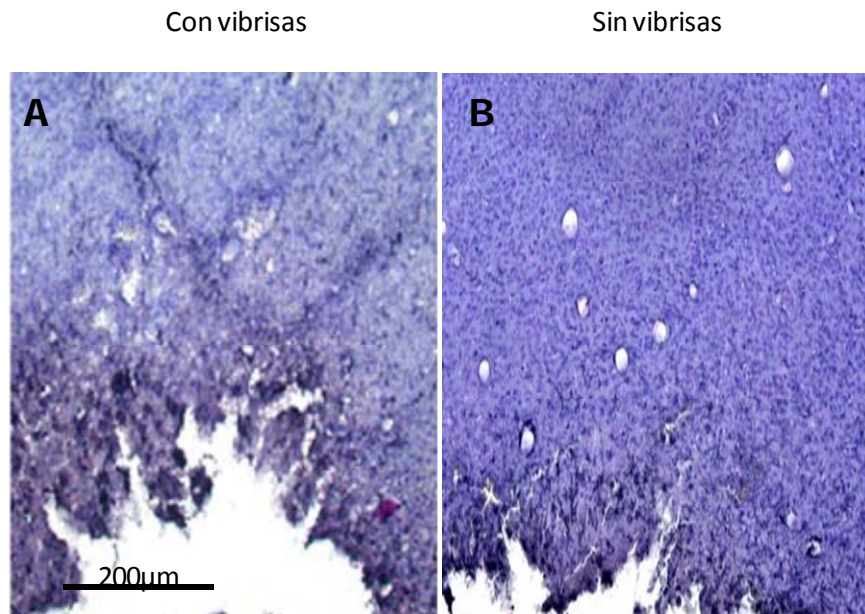


Figura 5. Distribución de microglia y macrófagos en los barriles de animales lesionados mecánicamente. Lesión en la zona modular de los barriles de S1 de animales con vibrisas (A) y sin vibrisas faciales (B). Las imágenes son mostradas a un aumento de 10X. C) Representa la comparación cuantitativa de la expresión de F4/80 (Células/Barriles). LB cbig- Lesionados en área de barriles con vibrisas. LB sbig- Lesionados en área de barriles sin vibrisas faciales. 1F- Primera fila de barriles pegada a la lesión. 2F- Segunda fila de barriles cerca de la lesión. Se realizó una *t* de Student para comparar las diferencias entre ambos grupos de animales, * $P \leq 0.05$.

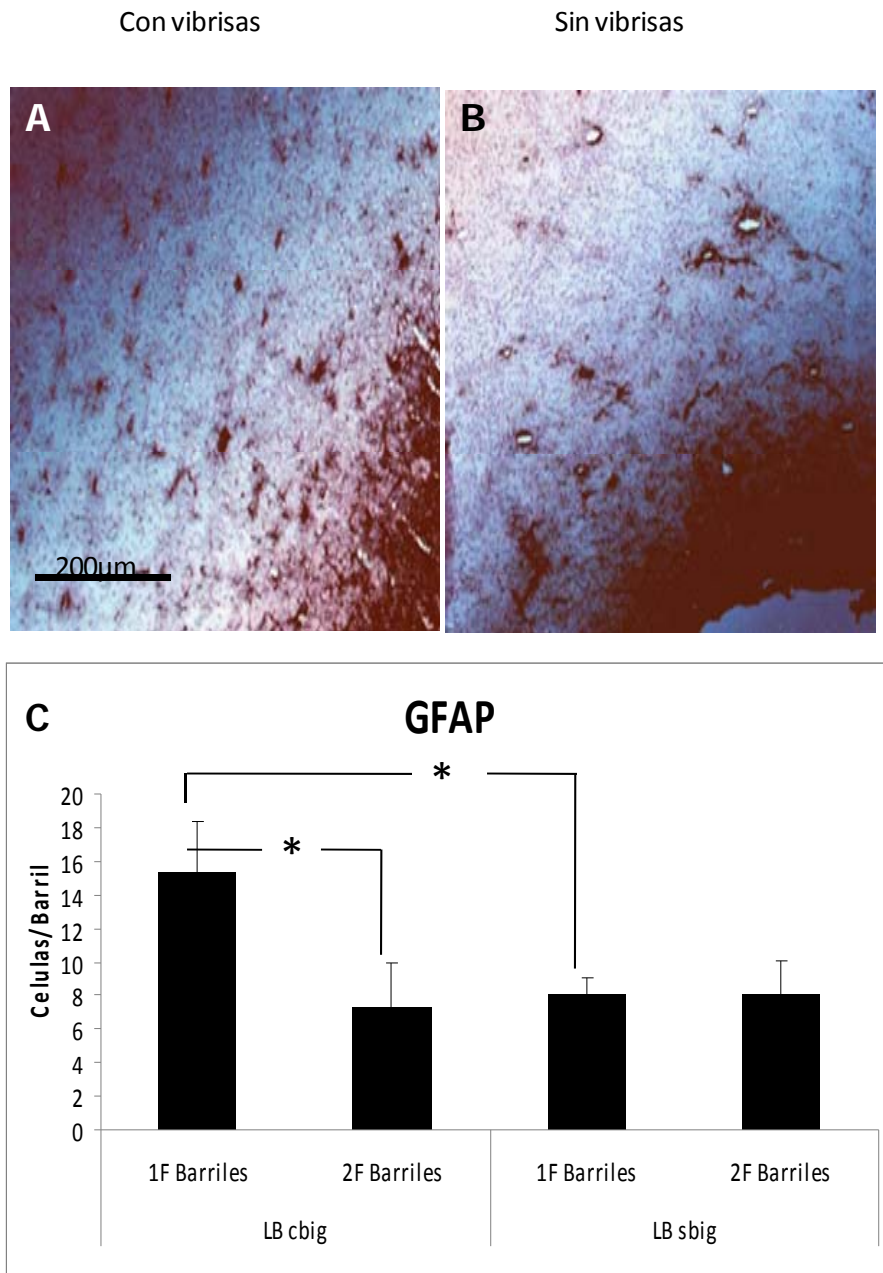


Figura 6. Distribución de astrocitos en los barriles de animales lesionados mecánicamente. Lesión en la zona modular de los barriles de S1 de animales con vibrisas (A) y sin vibrisas faciales (B). Las imágenes son mostradas a un aumento de 10X. C) Representa la comparación cuantitativa de la expresión de GFAP (Células/Barriles). LB cbig- Lesionados en área de barriles con vibrisas. LB sbig- Lesionados en área de barriles sin vibrisas faciales. 1F- Primera fila de barriles pegada a la lesión. 2F- Segunda fila de barriles cerca de la lesión. Se realizó una *t* de Student para comparar las diferencias entre ambos grupos de animales, * $P \leq 0.05$.

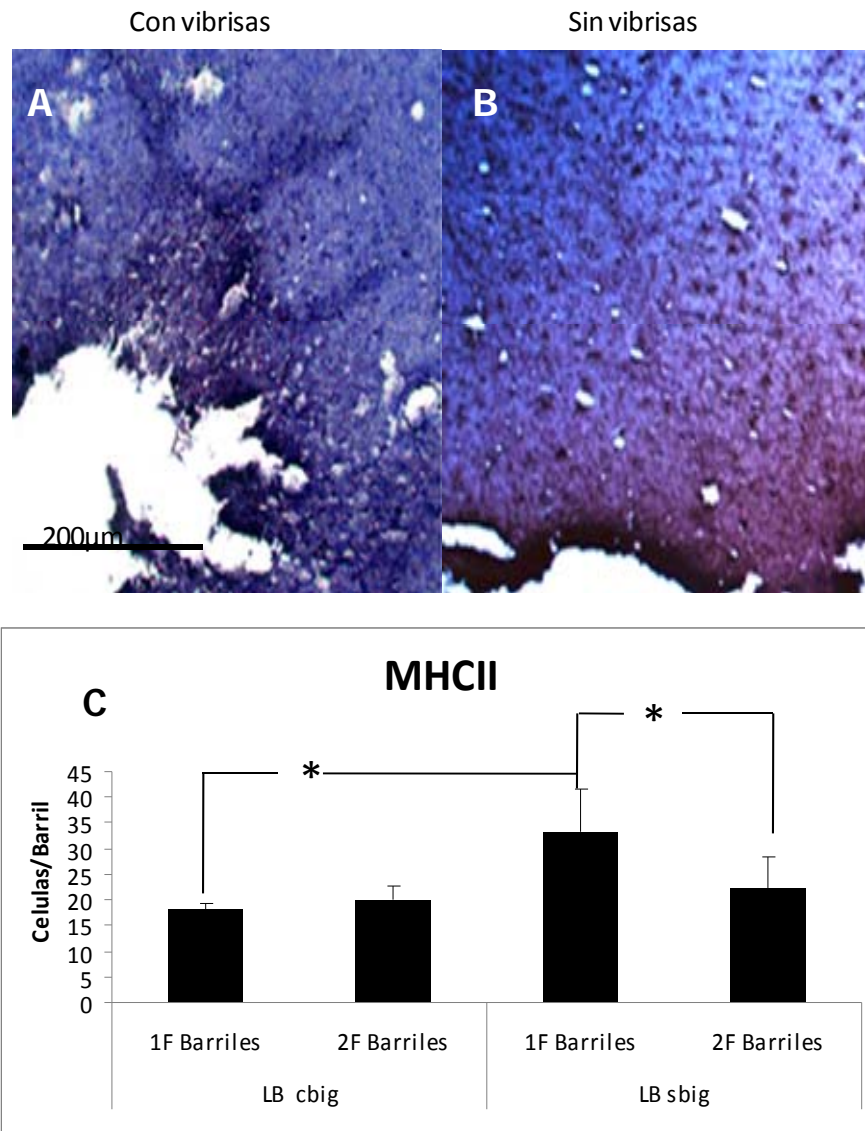


Figura 7 Distribución del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) en los barriles de animales lesionados mecánicamente. Lesión en la zona modular de los barriles de S1 de animales con vibrisas (A) y sin vibrisas faciales (B). Las imágenes son mostradas a un aumento de 10X. C) Representa la comparación cuantitativa de la expresión de MHCII (Células/Barriles). LB cbig- Lesionados en área de barriles con vibrisas. LB sbig- Lesionados en área de barriles sin vibrisas faciales. 1F- Primera fila de barriles pegada a la lesión. 2F- Segunda fila de barriles cerca de la lesión. Se realizó una *t* de Student para comparar las diferencias entre ambos grupos de animales, * $P \leq 0.05$.

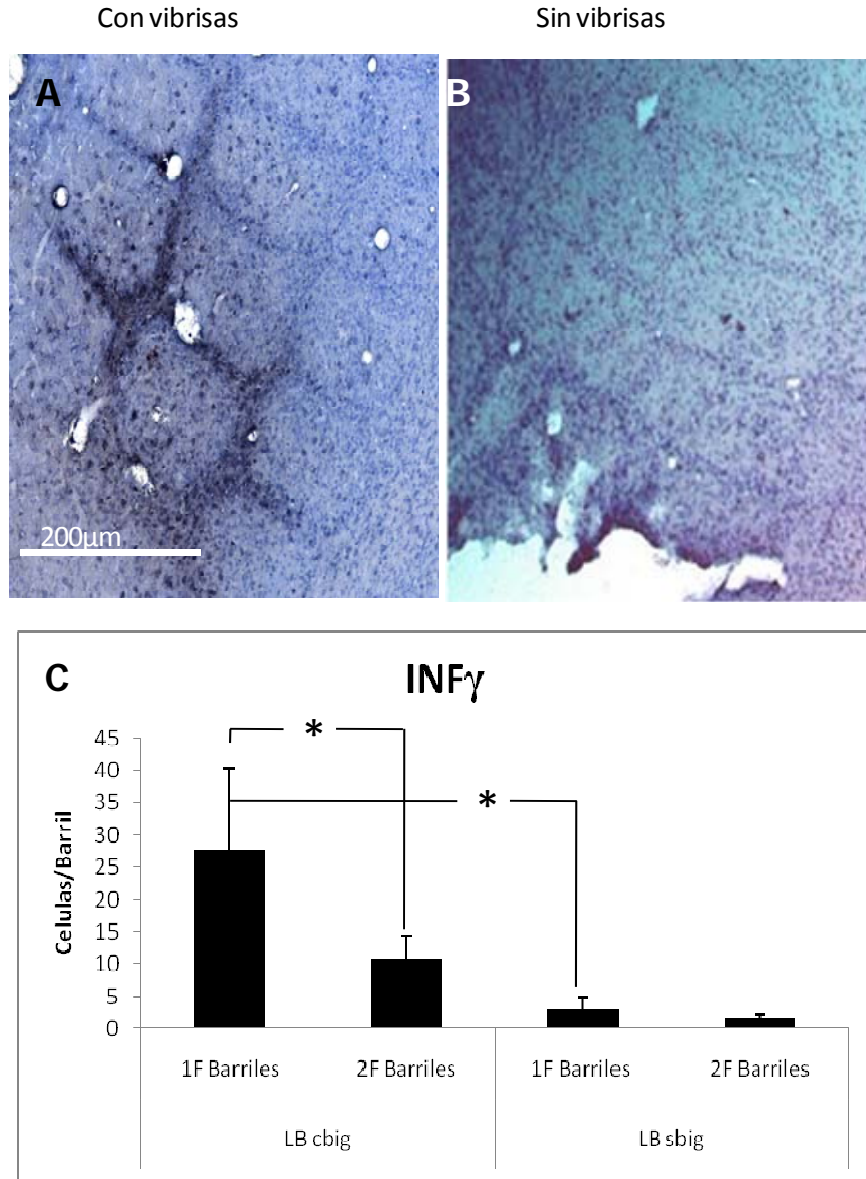


Figura 8. Expresión de IFN γ en los barriles de animales lesionados mecánicamente. Lesión en la zona modular de los barriles de S1 de animales con vibrisas (A) y sin vibrisas faciales (B). Las imágenes son mostradas a un aumento de 10X. C) Representa la comparación cuantitativa de la expresión de IFN γ (Células/Barriles). LB cbig- Lesionados en área de barriles con vibrisas. LB sbig- Lesionados en área de barriles sin vibrisas faciales. 1F- Primera fila de barriles pegada a la lesión. 2F- Segunda fila de barriles cerca de la lesión. Se realizó una *t* de Student para comparar las diferencias entre ambos grupos de animales, * $P \leq 0.05$.

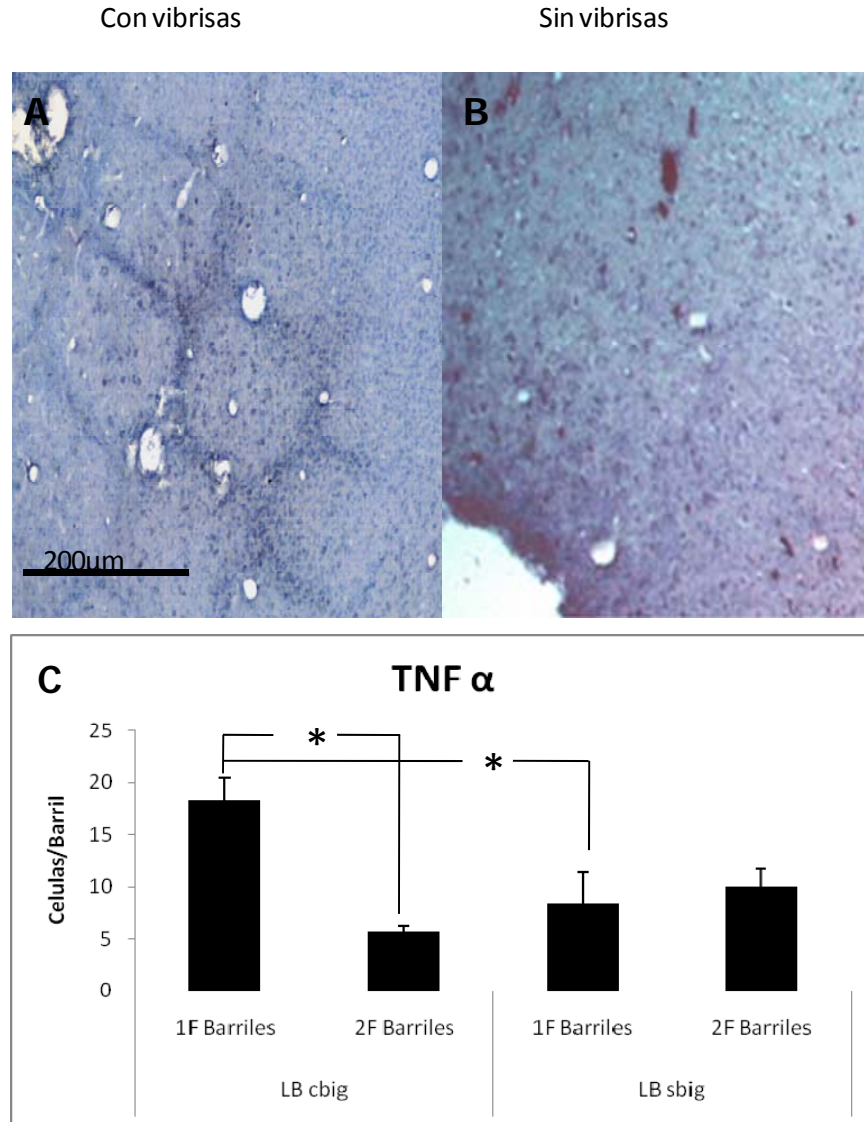


Figura 9. Expresión de TNF α en barriles de animales lesionados mecánicamente. Lesión en la zona modular de los barriles de S1 de animales con vibrisas (A) y sin vibrisas faciales (B). Las imágenes son mostradas a un aumento de 10X. C) Representa la comparación cuantitativa de la expresión de TNF α (Células/Barriles). LB cbig- Lesionados en área de barriles con vibrisas. LB sbig- Lesionados en área de barriles sin vibrisas faciales. 1F- Primera fila de barriles pegada a la lesión. 2F- Segunda fila de barriles cerca de la lesión. Se realizó una *t* de Student para comparar las diferencias entre ambos grupos de animales, * $P \leq 0.01$.

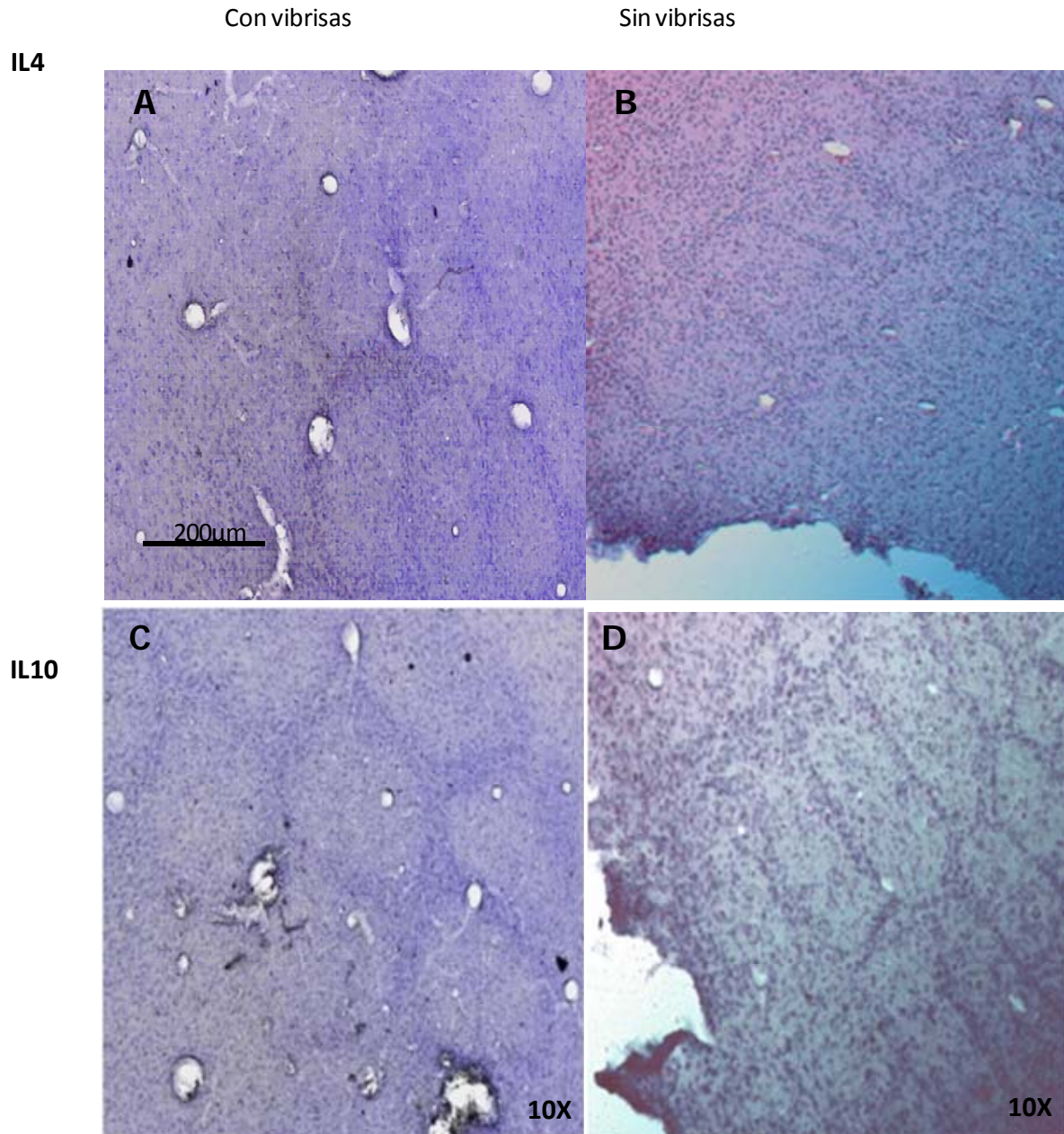


Figura 10. Expresión de IL4 e IL10 en los barriles de animales lesionados mecánicamente. Lesión en la zona modular de los barriles de S1 de animales con vibrisas (A y C) y sin vibrisas faciales (B y D). A y B muestran la expresión de IL4, C y D de IL10. Las imágenes son mostradas a un aumento de 10X.

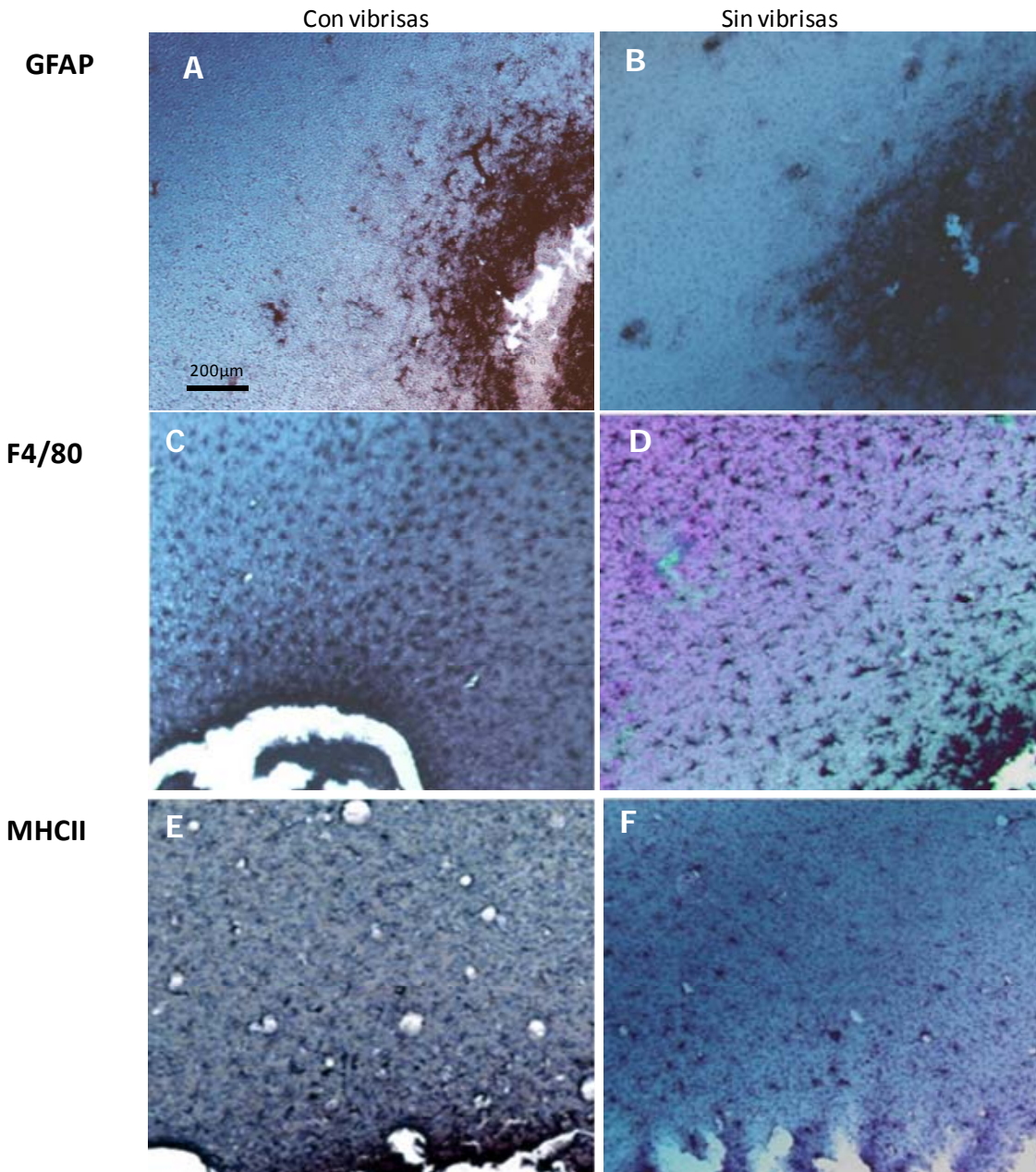


Figura 11. Distribución de astrocitos, microglia, macrófagos y del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) en la corteza cerebral de animales lesionados en S1 fuera del campo de los barriles. A, C y E muestran imágenes de animales controles lesionados en S1 fuera del área de los barriles con vibrisas faciales, B, D y F de animales lesionados en S1 fuera del área de los barriles sin vibrisas faciales. A y B muestran la expresión de GFAP (astrocitos), C y D la expresión de F4/80 (microglia y macrófagos), E y F del MHCII. Las imágenes son mostradas a un aumento de 10X.

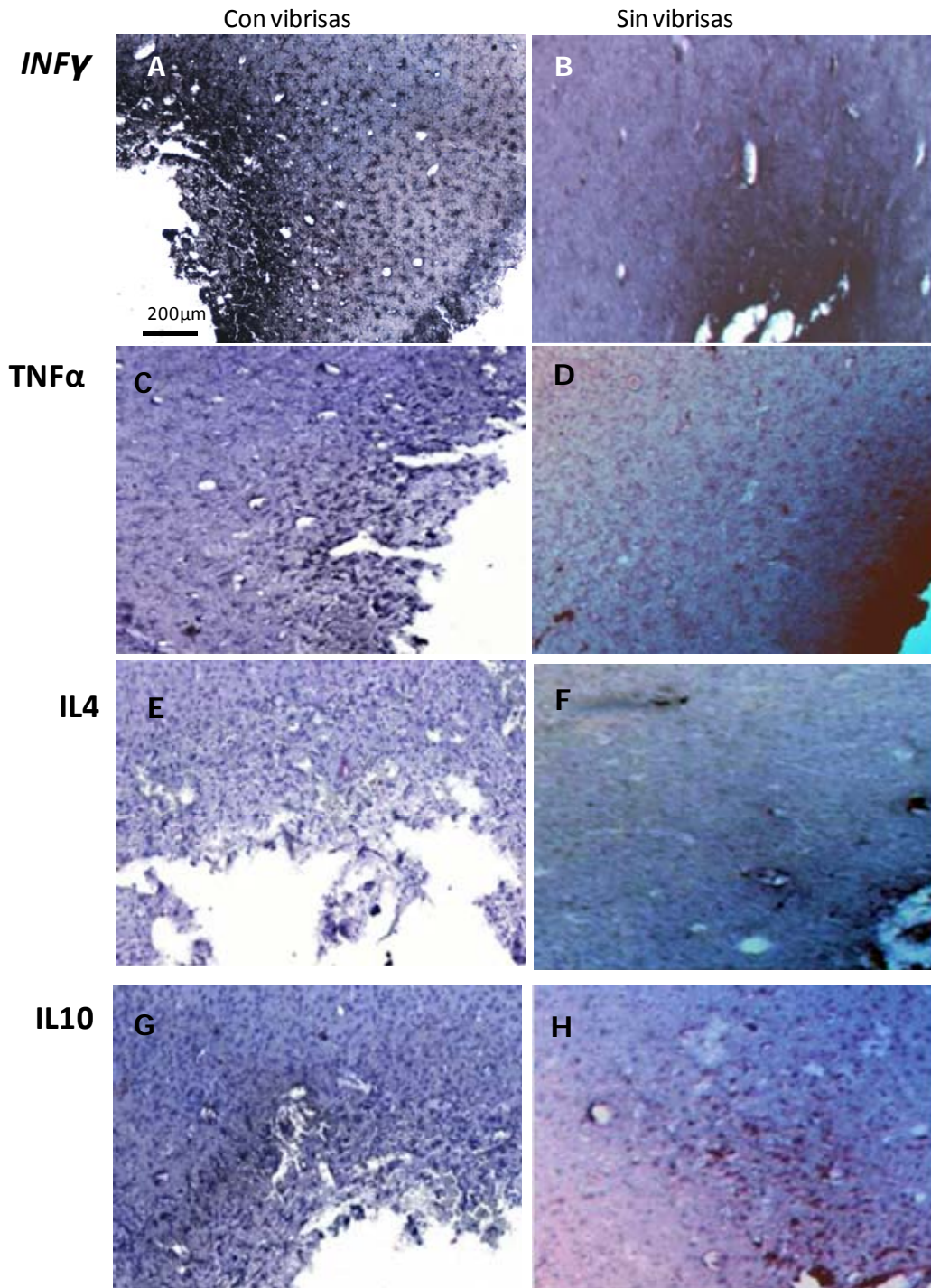


Figura 12. Expresión de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en la corteza cerebral de animales lesionados en S1 fuera del campo de los barriles. A, C, E y G muestran imágenes de animales controles lesionados en S1 fuera del área de los barriles con vibrisas faciales, B, D, F y H de animales lesionados en S1 fuera del área de los barriles sin vibrisas faciales. A y B muestran la expresión de IFN γ , C y D de TNF α , E y F de IL4, G y H de IL10. Las imágenes son mostradas a un aumento de 10X.

IX. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en este estudio abordan la existencia de compartimentos inmunológicos y la posibilidad de que éstos pueden estar relacionados tanto, estructural como funcionalmente con los módulos neurales. En este proyecto nos enfocamos a estudiar el componente inflamatorio de la respuesta inmunológica en una zona modular de la S1 correspondiente al mapa corporal de las vibrisas faciales, denominada barriles. Nuestras observaciones muestran que la S1 tiene una organización inmunológica particular en condiciones normales en el área de los barriles. En primera instancia la distribución de las células gliales es diferente en el área de los barriles con respecto a otras zonas de la corteza cerebral, tanto en animales con vibrisas faciales y sin vibrisas, mostrando una menor densidad de microglia y macrófagos perivasculares en los barriles y su distribución está asociada preferentemente a los septos y es escasa en el interior de los mismos. Estos tipos celulares participan en los fenómenos de protección contra patógenos, de inmunoregulación y de reparación de los tejidos, fagocitando restos celulares. Además interviniendo en procesos regenerativos de tejido nervioso (Chen L et al. 2002). Por otro lado, la microglia y los macrófagos son los principales participantes en los eventos inflamatorios que pueden llevar a daño tisular (Chavarria et al. 2004); por lo que su menor densidad en el área de los barriles pudiera conferir cierta “protección” ante un estímulo inflamatorio. Asimismo, la menor expresión de MHCII en la corteza cerebral especialmente en la zona modular de los barriles, también pudiera ser relevante en el ambiente inmuno-privilegiado del SNC. Cabe destacar que en el grupo de animales con vibrisas faciales mostró un mayor número de células microgliales expresando F4/80 en condiciones fisiológicas, lo cual nos indica cambios sutiles en el perfil inmunológico después del recorte de vibrisas faciales..

Las diferencias que observamos en el campo de los barriles con respecto al resto de la S1 apoyan la existencia de compartimentos inmunológicos asociados a los módulos neurales, estas observaciones se ven apoyadas por los datos obtenidos al lesionar fuera y dentro de la zona modular.

Al comparando los resultados obtenidos en los animales lesionados en la S1, observamos que la respuesta de las células gliales no difiere cuando la lesión fue realizada fuera del área modular de los barriles, la distribución glial se concentró alrededor del borde de la lesión y mostró una respuesta intensa que disminuye en las zonas alejadas de la lesión, patrón que se conserva en ambos grupos de animales, con vibrisas y sin vibrisas; lo cual nos sugiere que el recorte de vibrisas no afecta otras zonas de S1 y que solo está enfocado a la función modular de los barriles. Esta distribución contrasta con la que hallamos al lesionar en la zona modular de los barriles.

Por otra parte en los animales que conservan sus vibrisas faciales apreciamos que la respuesta glial se da únicamente en los barriles cercanos a la lesión (aproximadamente en la primera y segunda fila de barriles más próximos al sitio de la lesión) y es más intensa en los septos con respecto al interior de los barriles, en contraste la respuesta celular en las lesiones dentro de la zona de barriles en animales con recorte de las vibrisas faciales es significativamente diferente, lo cual discutiremos a continuación.

Se sabe que los astrocitos tienen un papel importante en la modulación de la respuesta inmunológica en el SNC (Aschner 1998), sin embargo, no observamos una presencia de astrocitos GFAP positivos en condiciones normales, pero en los animales con recorte de las vibrisas aun sin ser lesionados pudimos apreciar una mayor cantidad de astrocitos que expresan GFAP. En las lesiones efectuadas en la zona de los barriles se observó en ambos grupos de animales con y sin vibrisas faciales un patrón de distribución es similar. Cabe resaltar que la respuesta es mayor en los animales que conservan sus vibrisas faciales, en relaciona a los que no

las tiene. Se ha reportado que los astrocitos requieren más tiempo para su activación que las células microgliales (Cornet et al, 2000) y aunque los animales de experimentación fueron sacrificados a los dos días después de haber realizado la lesión, podemos inferir que el recorte de las vibrisas faciales afecta el comportamiento de los astrocitos tanto en animales sin lesión como los lesionados. La respuesta celular que se observó fue principalmente de la microglia y de los macrófagos. La microglia muestra un perfil de activación no sólo por morfología sino también al encontrar la expresión de MHCII tanto en el borde de la lesión como en zonas alejadas. En el caso de las lesiones en la zona de los barriles encontramos la expresión del MHCII en concordancia con la distribución de las células microgliales y macrófagos ya mencionada. Estas características descritas pudieran conferirle a la zona modular una respuesta más delimitada y controlada con respecto al resto de la corteza cerebral. Sin embargo, en los animales sin vibrisas faciales esta distribución post-lesión no se observó, ya que la respuesta está prácticamente delimitada al borde de la lesión y sin acentuamiento en los barriles próximos, además de ser menor la respuesta.

La presencia de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias no se observó en animales, sin lesión cortical, con vibrisas y sin vibrisas, sin embargo un hallazgo relevante es la presencia de IL10 en las terminaciones nerviosas en el interior de los barriles y en estructuras subcorticales en condiciones normales. La IL10 es una citocina con propiedades anti-inflamatorias o inmunoreguladoras, y se le ha atribuido un papel de neuroprotectora, puesto que previene la muerte celular al bloquear la caspasa 3 (Beachis et al. 2001). La presencia de la IL10 en el interior de los barriles pudiera conferirle características inmunológicas diferentes que al septo de los mismos, estas características se ven afectadas en los animales con la ausencia de las vibrisas faciales. Cabe destacar que la presencia de IL10 en el interior de los barriles, que se observó en condiciones normales, desaparece totalmente después de la lesión, es probable que esta citocina haya sido

utilizada para regular el proceso inflamatorio, y de esta manera delimitar el daño así como prevenir la muerte neuronal (Beachis et al. 2001).

En las lesiones realizadas fuera de los barriles observamos la presencia de IL10 e IL4 en células con morfología de macrófagos (en animales con y sin vibrisas faciales). Previamente se ha reportado que los macrófagos al fagocitar mielina producen moléculas anti-inflamatorias (Bavone et al. 2006). Dado que en el borde de la lesión hay muerte celular incluso de oligodendrocitos, es posible que los macrófagos activados puedan fagocitar restos de mielina, dando como resultado la producción de IL10 e IL4. Este fenómeno no ocurre con la misma intensidad en las lesiones realizadas en el área de los barriles, lo que sugiere que el mecanismo de inmuno-regulación pudiera ser diferente. Sin embargo, cabe destacar que en los animales con recorte de vibrisas no se apreció IL10 ni IL4 al lesionar en la zona de los barriles, lo que hace más evidente que el recorte de vibrisas modifica la respuesta inmunológica en esta área de la S1.

En contraste con la respuesta anti-inflamatoria, la respuesta de citocinas pro-inflamatorias es considerablemente más intensa en todos los ratones lesionados, especialmente la de $INF\gamma$. La presencia de esta citocina es muy marcada en el borde de las lesiones y su periferia de las zonas no modulares, lo cual contrasta con la intensidad y distribución de $INF\gamma$ en los barriles y bordes lesionados en animales con vibrisas faciales, donde se expresa más en los septos con respecto al interior de los barriles, distribución que no se observó en los animales lesionados en los barriles sin vibrisas faciales, donde la expresión de esta citocina es prácticamente nula. Adicionalmente, se observó que el área de expresión de $INF\gamma$ es menor en el área de los barriles, en los cerebros lesionados. $INF\gamma$ puede ser un agente neurotóxico (Lambertsen et al. 2004) y pudiera considerarse que la baja expresión de $INF\gamma$ en la zona modular limite la extensión del daño tisular. Dado que observamos que la expresión de $INF\gamma$ es menor en el interior de los barriles con respecto a los septos, es posible que la IL10 (en el caso de animales con vibrisas faciales) haya

regulado o incluso suprimido en esta área la respuesta inflamatoria de $IFN\gamma$. Así mismo, llama la atención la expresión de $IFN\gamma$ en la microglia activada y en macrófagos de las zonas no modulares. Por otro lado, la expresión de $TNF\alpha$ en las lesiones tanto en la zona modular como la no modular es diferente en cuanto a intensidad con respecto a $IFN\gamma$, esta citocina muestra una distribución similar a la respuesta de $IFN\gamma$, es decir, en la zona modular es más pronunciada en los septos que en el interior de los barriles. $TNF\alpha$ es una molécula pleiotrópica que tiene efectos tanto pro-inflamatorios como un papel neuroprotector al inducir plasticidad neural cuando está presente en cantidades pequeñas (William et al. 2000). Es posible que la baja expresión de esta citocina en el área modular pudiera estar relacionada más con el efecto neuroprotector que inflamatorio, cabe destacar que en los animales con recorte de vibrisas al lesionar en la zona modular la expresión de $TNF\alpha$ es mayor con respecto a la de $IFN\gamma$, condición contraria a los animales con vibrisas faciales, lo que hace más evidente el cambio de la función inmunológica en el compartimento inherente al módulo de los barriles.

De manera general, los resultados de los animales lesionados en S1 a los cuales se les recortaron las vibrisas periódicamente, tanto en el campo de los barriles como fuera de ellos, nos dejan ver que la reactividad tanto de células inmunológicas como de las citocinas es menor, con respecto a nuestras observaciones hechas en ratones lesionados en la S1 sin recorte de las vibrisas faciales, esto pudiera deberse a que la actividad metabólica en el área de los barriles se ve afectada después del recorte de vibrisas faciales (Meir et al. 2003), dando por resultado una depresión en las neuronas corticales y la desregulación de algunos factores de transcripción como CREB (Harwel et al. 2005), así como cambios en la expresión de receptores a GABA (Fuchs and Salasar 1998) y la síntesis de este neurotransmisor (Akahtar and Land 1992). Esto puede acarrear un cambio en el microambiente de este módulo neural, lo cual repercute en la respuesta tanto de

astrocitos como de macrófagos y la microglia, ya que se sabe que estos tipos celulares expresan receptores a distintos neurotransmisores, por ejemplo: los astrocitos expresan transportadores a GABA y Glutamato, y tienen una participación importante en la regulación de las concentraciones sinápticas de estos neurotransmisores (Schousboe 2003). Se ha reportado que la producción de algunas citocinas como IL6 e IL12 puede estar regulada por receptores a GABA tipo A en macrófagos (Reyes-Garcia et al. 2007), por otro lado, se ha documentado que las células de la microglia expresan receptores tanto a glutamato como a GABA (Färber and Kettenmann 2005), pudiera indicar que tienen capacidad de responder a la actividad neuronal y ésta a su vez puede influenciar en las características inmunológicas de dichos tipos celulares, es posible que las células del sistema inmunológico establecen una relación directa con funciones neurales.

Adicionalmente, se ha demostrado que los linfocitos T y la microglia tienen un papel importante en la neurogénesis hipocampal y el aprendizaje en conductas espaciales en ratas adultas (Ziv et al. 2006). La microglia además tiene una participación directa en los procesos de plasticidad neural tales como son la eliminación de sinapsis y la regeneración axonal posterior a lesiones (Cullheim and Thams 2007). Así como una participación en la potenciación a largo plazo (LTP), en cuyo caso se ha observado que la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-1 α , IL-18 e IFN γ está relacionada con deficiencias en la LTP en ratas viejas (Griffin et al. 2006). Cabe mencionar que la manipulación para el recorte de las vibrisas así como la ausencia de estas en los ratones, confiere un cierto grado de estrés, se sabe que el estrés de tipo social, puede aumentar el tráfico de monocitos y la producción de citocinas pro-inflamatorias desde la médula ósea al bazo (Sheridan et al. 2000), además aumenta la capacidad de respuesta de estos durante el curso de la infección por HSV1 (Dong-Newsom et al. 2009), sin embargo, en ratones con altos

niveles de ansiedad ocasionada por retención física, se produce un decremento en la eficiencia de la respuesta inmune (Rammal et al. 2009). Estos datos nos permiten ver que existe una comunicación activa entre células nerviosas e inmunológicas dentro del SNC, a su vez nuestros resultados sugieren que el cambio en la función de un módulo neural puede afectar el comportamiento de un compartimento inmunológico y al revés, dejando claro que existe una relación no sólo estructural sino a nivel funcional entre los módulos neurales y los compartimentos inmunológicos.

X. CONCLUSIONES

1. La distribución, de astrocitos expresando GFAP en el área de los barriles es mayor en animales con recorte de las vibrisas faciales.
2. La respuesta celular y de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, resultado de una lesión circunscrita al área de los barriles en S1 de ratones adultos, es menor entre animales con vibrisas faciales y animales sin vibrisas.
3. La respuesta celular y de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, resultado de una lesión en S1 fuera del área de los barriles no se ve modificada entre animales con vibrisas faciales y animales sin vibrisas.
4. Los datos obtenidos en este estudio apoyan la existencia de los compartimentos inmunológicos en el SNC y que éstos están relacionados estructural y funcionalmente con los módulos neurales. Los compartimentos inmunológicos pueden conferirle a los módulos neurales características inmunológicas diferentes que pudieran estar relacionados con eventos de mayor o menor inflamación, por lo tanto con mayor o menor daño tisular y la pérdida o conservación de la función.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A, Lichtman A. (2004). **Inmunología celular y molecular**. 5ª ed. Elsevier España, S.A. Madrid, España.
2. Akdis C. and Blaser K. (1999). **IL-10-Induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy**. FASEB J. 13. 603-609.
3. Abbott N. J. (2002). **Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability**. J. Anat. 200, 629–638.
4. Akahtar ND and Land PW. (1991). **Activity-dependent regulation of glutamic acid decarboxylase in the rat barrel cortex: effects of neonatal versus adult sensory deprivation**. J. Comp. Neurol 307(2):200-13.
5. Aloisi F. (2001). **Immune function of microglia**. Glia.36(2):165-79.
6. Aschner M. (1998). **Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes**. Toxicol Let. 102(103):283-7.
7. Babcock A, Kuziel W, Rivest S, Owens T. (2003). **Chemokine Expression by Glial Cells Directs Leukocytes to Sites of Axonal Injury in the CNS**. J Neurosci. 23(21): 7922-7930.
8. Boven LA, Van Meurs M, Van Zwam M, Wierenga-Wolf A, Hintzen RQ, Boot RG, Aerts JM, Amor S, Nieuwenhuis EE, Laman JD. (2006). **Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis**. Brain. 129(2):517-26.
9. Bagrat Amirikian and Apostolos P. Georgopoulos. (2003). **Modular organization of directionally tuned cells in the motor cortex: Is there a short-range order?** PNAS 100 (21):12474–12479.

10. Baggiolini M. (2001). **Chemokines in pathology and medicine**. *J Intern Med.* 250: 81-104.
11. Ballabh P., Braun A., and Nedergaard M. (2004). **The blood–brain barrier: an overview Structure, regulation, and clinical implications**. *Neurobiol Dis.* 16 :1–13.
12. Becher B., Bechmann I., and Creter M. (2006). **Antigen presentation in autoimmune and SNC inflammation: how T lymphocytes recognize the brain**. *J. Mol. Med.* 84:532-543.
13. Bachis A, Colangelo AM, Vicini S, Doe PP, De Bernardi MA, Brooker G, Mocchetti I. (2001). **Interleukin-10 prevents glutamate-mediated cerebellar granule cell death by blocking caspase-3-like activity**. *J Neurosci.* 21(9):3104-12.
14. Butovsky Oleg, Bukshpan Shay, Kunis Gilad, Jung Steffen, and Schwartz Michal. (2007). **Microglia can be induced by IFN- γ or IL-4 to express neural or dendritic-like markers**. *Mol. Cell. Neurosci.* 35:490–500
15. Bronchti G, Schonenberger N, Welker E, Van der Loos H. (1992). **Barrelfield expansion after neonatal eye removal in mice**. *Neuroreport.* 3:489-92.
16. Byram Susanna C. , Carson Monica J., DeBoy Cynthia A., Serpe Craig J., Sanders, Virginia M. and Jones Kathryn J. (2004). **CD4-Positive T Cell-Mediated Neuroprotection Requires Dual Compartment Antigen Presentation**. *J. Neurosci.* 24(18):4333– 4339.
17. Carpenter M. (1991). **Core Text of Neuroanatomy**. 5a ed. Williams and Wilkins. Baltimore, USA: 481
18. Catania KC, Henry EC. (2006). **Touching on somatosensory specializations in mammals**. *Curr Opin Neurobiol.* 16(4):467-73.

19. Chen L, Yang P, Kijlstra A. (2002). **Distribution, markers, and functions of retinal microglia.** *Ocul Immunol Inflamm.* 10(1):27-39.
20. Chavarria A, Fleury A, Garcia E, Marquez C, Fragoso G, Sciotto E. (2005). **Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immuneinflammatory profiles.** *Clin Immunol.* 116(3):271-8.
21. Chavarria A, Alcocer –Varela J. (2004). **Is damage in central nervous system due to inflammation?** *Autoimmunity Reviews* 3: 251-260.
22. Chavarria A, J.Perez-H., C. Ortiz-Martínez, M. Cerbón and G. Gutierrez-Ospina. (2006). **Compartmentalized immune response in the barrel field of the mouse primary somatosensory cortex.** *J. Neuroimmunol.* 178 :108.
23. Churchill L, Taishi P, Wang M, Brandt J, Cearley C, Rehman A, Krueger J. (2006). **Brain distribution of cytokine mRNA induced by systemic administration of interleukin-1 β or tumor necrosis factor α .** *Brain Res.* 1120: 64 – 73.
24. Cornet A, Bettelli E, Oukka M, Cambouris C, Avellana-Adalid V, Kosmatopoulos K, Liblau RS. (2000) **Role of astrocytes in antigen presentation and naive T-cell activation.** *J Neuroimmunol.* 106(1-2):69-77.
25. Cobbold SP, Adams E, Graca L, Daley S, Yates S, Paterson A, Robertson NJ, Nolan KF, Fairchild PJ, Waldmann H. (2006). **Immune privilege induced by regulatory T cells in transplantation tolerance.** *Immunol Rev.* 213:239-55.
26. Cullheim S, Thams S. (2007). **The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion.** *Brain Res Rev.* 55(1):89-96.
27. Culpan D, Prince J, Matthews S, Palmer L, Hughes A, Love S, Kehoe P, Wilcock P. (2006). **Neither sequence variation in the IL-10 gene promoter nor presence of IL-10 protein in the cerebral cortex is associated with Alzheimer’s disease.** *Neurosci. Lett.* 408: 141–145.

28. Czupryn A Artur, Skangiel-Kramska Jolanta. (2001). **Differential response of synaptic zinc levels to sensory deprivation in the barrel cortex of young and adult mice** Exp Brain Res 141:567–572.
29. Dammann Olaf, and O’Shea T.Michael, (2008). **Cytokines and Perinatal Brain Damage.** Clin. Perinatol. 35; 4.
30. Dong-Newsom P., Powell N.D., Bailey M.T., Padgett D.A. and Sheridan J.F. (2009). **Repeated social stress enhances the innate immune response to a primary HSV-1 infection in the cornea and trigeminal ganglia of Balb/c mice.** Brain, Behavior, and Immunity
31. Engelhardt B. (2006). **Regulation Of Immune cell entry into the central nervous system.** Results Probl. Cell Differ. 43: 259-80.
32. Färber Katrin and KettenmannHelmut. (2005). **Physiology of microglial cells.** Brain Res Brain Res Rev. 48:133-143.
33. Farina C, Aloisi F, Meinl E. (2007). **Astrocytes are active players in cerebral innate immunity.** Trends Immunol. 28 (3): 138-145.
34. Fuchs Jannon and Salasar Eduardo. (1998). **Effects of Whisker Trimming on GABAA Receptor Binding in the Barrel Cortex of Developing and Adult Rats. Effects of Whisker Trimming on GABAA Receptor Binding in the Barrel Cortex of Developing and Adult Rats.** J. Comparativ. Neurol. 395:209-216
35. Griffin R, Nally R, Nolan Y, McCartney Y, Linden J, Lynch MA. (2006). **The age-related attenuation in long-term potentiation is associated with microglial activation.** J Neurochem. 99(4):1263-72.
36. Hacham M, White R, Argo S, Segal S, Apte R. (2004). **Interleukin-6 and interleukin-10 are expressed in organs of normal young and old mice.** Eur. Cytokine Netw. 15 (1): 37–46.
37. Hailer NP, Heppner FL, Haas D, Nitsch R. (1998). **Astrocytic factors deactivate**

- antigen presenting cells that invade the central nervous system.** Brain Pathol. 8(3): 459-74.
38. Hailer NP, Glomsda B, Blaheta RA. (2001). **Astrocytic factors down-regulate the expression of major histocompatibility complex-class-II and intercellular adhesion molecule-1 on human monocytes.** Neurosci Lett. 298(1): 33-6.
39. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. (2005). **Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.** Nat Immunol. 6(11):1069-70.
40. Haseloff R. F., Blasig, I. E., Bauer H.-C., and Bauer H. (2005). **In Search of the Astrocytic Factor(s) Modulating Blood–Brain Barrier Functions in Brain Capillary Endothelial Cells In Vitro.** Cell Mol Neurobiol. 25:1.
41. Harwel Corey, Burbach Barry, Svoda Karel and Nedivi Elly. (2005). **Regulation of cpg15 Expression during Single Whisker Experience in the Barrel Cortex of Adult Mice.** J. Neurobiol. 65:85-96.
42. Hauwel M, Furon E, Canova C, Griffiths M, Neal J, Gasque P. (2005). **Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, “protective” glial stem cells and stromal ependymal cells.** Brain Res Brain Res Rev. 48: 220-233.
43. Hulshof S, Montagne L, De Groot C, Van Der Valk P. (2002). **Cellular Localization and Expression Patterns of Interleukin-10, Interleukin-4, and Their Receptors in Multiple Sclerosis Lesions.** Glia. 38: 24–35
44. Hickey W. (1999). **Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles.** Semin Immunol. 11: 125-137.

45. Galea I, Palin K, Newman TA, Van Rooijen N, Perry VH, Boche D. (2005). **Mannose Receptor Expression Specifically Reveals Perivascular Macrophages in Normal, Injured and Diseased Mouse Brain.** *Glia*. 49:375–384.
46. Guillemin GJ, Brew BJ. (2004). **Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification.** *J. Leukoc. Biol.* 75: 388–397.
47. Gloora S. M., Wachtela M., Bolligera M. F., Ishiharab H., Landmann R., Freib K. (2001). **Molecular and cellular permeability control at the blood–brain barrier.** *Brain Res Brain Res Rev* 36; 258–264.
48. Kathleen S. Rockland . Noritaka Ichinohe. (2004). **Some thoughts on cortical minicolumns.** *Exp Brain Res* 158: 265–277
49. Kandel E. Shwartz J. Jessell T. (2000). **Principles of Neural Science.** 4a ed. McGraw-Hill Companies.
50. Kloss CU, Kreutzberg GW, Raivich G. (1997). **Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines.** *J Neurosci Res.* 49(2):248-54.
51. Killackey HP, Belford GR. (1979). **The formation of afferent patterns in the somatosensory cortex of the neonatal rat.** *J Comp Neurol.*;183(2):285-303.
52. Komuta Y, Teng X, Yanagisawa H, Sango K, Kawamura K, Kawano H. (2009). **Expression of Transforming Growth Factor-beta Receptors in Meningeal Fibroblasts of the Injured Mouse Brain.** *Cell Mol Neurobiol.* 1007/s10571-009-9435-x
53. Lawson L., Perry H, Dri P.and Gordon S. (1990). **Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain.** *Neuroscience* 39(1): 151-170.

54. Lambertsen KL, Gregersen R, Meldgaard M, Clausen BH, Heibol EK, Ladeby R, Knudsen J, Frandsen A, Owens T, Finsen B. (2004). **A role for interferon-gamma in focal cerebral ischemia in mice.** *Exp Neurol.* 63(9):942-55.
55. Lee KS, Baek DW, Kim KH, Shin BS, Lee DH, Kim JW, Hong YS, Bae YS, Kwak JY. (2005). **IL-10-dependent down-regulation of MHC class II expression level on monocytes by peritoneal fluid from endometriosis patients.** *Int Immunopharmacol* 5(12): 1699-712.
56. Leise E. (1990). **Modular construction of the nervous system: a basic principle of design for invertebrates and vertebrates.** *Brain Res Brain Res Rev,* 15: 1-23.
57. Lin HH, Faunce DE, Stacey M, Terajewicz A, Nakamura T, Zhang-Hoover J, Kerley M, Mucenski ML, Gordon S, Stein-Streilein J. (2005). **The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance.** *J Exp Med.* 16;201(10):1615-25.
58. Livingstone MS, Hubel DH. (1984). **Anatomy and Physiology of a color system in the primate visual cortex.** *J Neurosci* 4: 2830- 2835.
59. Lübke J. and Feldmeyer D. (2007). **Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex.** *Brain Struct Funct* 212:3–17.
60. Maier DL, Grieb GM, Stelzner DJ, McCasland JS. (2003). **Large-scale plasticity in barrel cortex following repeated whisker trimming in young adult hamsters.** *Exp Neurol.* 184(2):737-45.
61. Matyszak MK, Perry VH. (1996). **The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system.** *Neuroscience.* 74: 599–608.

62. Mastroeni D., Grover A., Leonard B., Joyce J., Coleman P., Kozik B., Bellinger D., Rogers J. (2008). **Microglial responses to dopamine in a cell culture model of Parkinson's disease.** *Neurobiol Aging*
63. McMenamin PG, Wealthall RJ, Deverall M, Cooper SJ, Griffin B. (2003). **Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus: three-dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy.** *Cell Tissue Res.* 313(3):259-69.
64. McMahon EJ, Bailey SL, Miller SD. (2006). **CNS dendritic cells: critical participants in CNS inflammation?** *Neurochem Int.* 49(2):195-203.
65. Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI. (2002). **Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network.** *J Comp Neurol.* 451(2): 170-88.
66. Minagar A, Steven J. (2003). **Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis.** *Mult Scler.* 9: 540-549.
67. Morganti-Kossmann M, Rancan M, Stahel P, Kossmann T. (2002). **Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword.** *Curr Opin Crit Care.* 8:101–105.
68. Mountcastle V. (1979). **An organizing principle for cerebral function: the unit module and distributed system.** In Smitt FO, Worden FG (Editors), *The neurosciences forth study program*, MIT, Cambridge, MA. 21-42.
69. Neumann H, Schmidt H, Wilharm E, Behrens L, Wekerle H. (1997). **Interferon gamma gene expression in sensory neurons: evidence for autocrine gene regulation.** *Exp Med.* 15; 186 (12): 2023-2031.
70. Nikcevich KM, Gordon KB, Tan L, Hurst SD, Kroepfl JF, Gardinier M, Barrett TA, Miller SD (1997). **IFN-gamma-activated primary murine astrocytes express B7**

- costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells.** *J Immunol* 158:614–621.
71. Park C, Lee S, Cho IH, Lee HK, Kim D, Choi SY, Oh SB, Park K, Kim JS, Lee SJ. (2006). **TLR3-mediated signal induces proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in astrocytes: differential signaling mechanisms of TLR3-induced IP-10 and IL-8 gene expression** .*Glia*. 53(3):248-56.
72. Perry VH, Hume DA, Gordon S. (1985). **Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain.** *Neuroscience*. 15(2): 313-26.
73. Petersen C. (2007). **The Functional Organization of the Barrel Cortex.** *Neuron* 56(2):339-55.
74. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Hall W, LaMantia A, McNamora J, Williams S. (2004). **Neuroscience.** 3a ed. Sinaver Associates.
75. Prochazkova J, Fric J, Pokorna K, Neuwirth A, Krulova M, Zajicova A, Holan V. (2009). **Distinct regulatory roles of transforming growth factor-beta and interleukin-4 in the development and maintenance of natural and induced CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells.** *Immunology*. 128(1):670-8.
76. Rammal H, Bouayed J, Falla J, Boujedaini N, Soulimani R. (2009). **The impact of high anxiety level on cellular and humoral immunity in mice.** *Neuroimmunomodulation*. 17(1):1-8.
77. Reyes-García Maria Guadalupe, Hernández-Hernández Francisca, Hernández-Téllez Beatriz and García-Tamayo Fernando. (2007). **GABA (A) receptor subunits RNA expression in mice peritoneal macrophages modulate their IL-6/IL-12 production.** *J Neuroimmunol*. 18: 64-68.

78. Riddle D, Richards A, Zsuppan F, Purves D. (1992). **Growth of the rat somatic sensory cortex and its constituent parts during postnatal development.** *J Neurosci* 12: 3509-3524.
79. Sadaka Yair, Weinfeld Elizabeth, Dmitri L. and White Eduard L. (2003). **Changes in Mouse Barrel Synapses Consequent to Sensory Deprivation from Birth.** *J Comp Neurol.* 457(1):75-86.
80. Savchenko V. L., McKanna J. A., Nikonenko I. R. and Skibo G. G. (2000). **Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity.** *Neuroscience* 96(1):195–203.
81. Stampachiachiere B, Aloe L. (2005). **Differential modulatory effect of NGF on MHC class I and class II expression in spinal cord cells of EAE rats.** *J Neuroimmunol.* 169(1-2): 20-30.
82. Schousboe A. (2003). **Role of Astrocytes in the Maintenance and Modulation of Glutamatergic and GABAergic Neurotransmission.** *Neurochem Res*, 28(2); 347–352.
83. Sheridan, J.F., Stark, J.L., Avitsur, R., Padgett, D.A., 2000. **Social disruption, immunity and susceptibility to viral infection. Role of glucocorticoid insensitivity and NGF.** *Ann. NY Acad. Sci.* 917, 894–905
84. Srendi-Kenigsbuch D, (2002). **TH1/TH2 Cytokines in the Central Nervous System.** *Int J Neurosci.* 112: 665-703.
85. Stephen P Cobbold., Adams Elizabeth, Graca Luis, Daley Stephen, Yates Stephen, Paterson Alison, Robertson Nathan J., Nolan Kathleen F., Fairchild Paul J. and

- Waldmann Herman (2006). **Immune privilege induced by regulatory T cells in transplantation tolerance.** Immunol Rev. 213: 239–255.
86. Sadaka Yair, Weinfeld Elizabeth, Dmitri L. and White Eduard L. (2003). **Changes in Mouse Barrel Synapses Consequent to Sensory Deprivation from Birth.** J Comp Neurol 457:75–86
87. Sharafeldin A, Hamadien M, Diab A, Li HL, Shi FD, Bakhiet M. (1999). **Cytokine Profiles in the Central Nervous System and the Spleen During the Early Course of Experimental African Trypanosomiasis.** Scand. J. Immunol. 50: 256–261.
88. Strle K, Zhou J, Shen WH. (2001). **Interleukin-10 in the Brain.** Crit Rev Immunol. 21(5): 427-49.
89. Toby J. Imler Jr., Thomas M. Petro. (2009). **Decreased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis during resveratrol administration is associated with increased IL-17+IL-10+ T cells, CD4– IFN- γ + cells, and decreased macrophage IL-6 expression.** Int Immunopharmacol. 9:134–143
90. Toldi J, Farkas T, Volgyi B. (1994). **Neonatal enucleation induces cross-modal changes in the barrel cortex of rat. A behavioural and electrophysiological study.** Neurosci Lett. 167(1-2):1-4.
91. Tongren JE, Yang C, Collins WE, Sullivan JS, Lal AA, Xiao L. (2000). **Expression of proinflammatory cytokines in four regions of the brain in Macaque mulatta (rhesus) monkeys infected with Plasmodium coatneyi.** Am J Trop Med Hyg.; 62(4): 530-4.
92. Trajkovic Vladimir, Vuckovic Olivera, Stosic-Grujicic Stanislava, Miljkovic Djordje, Popadic Dusan, Markovic Milos, Bumbasirevic Vladimir, Backovic Aleksandar,

- Cvetrovic Ivana, Harhaji Ljubica, Ramic Zorica, and Marija Strojko Mostarica. (2004). **Astrocyte-Induce Regulatory T Cells Mitigate CNS Autoimmunity**. *Glia* 47:168-179.
93. Tu H, Rady P, Juelich T, Tying S, Koldzic-Zivanovic N, Smith E, Hughes T. (2007). **Interleukin-10 Regulated Gene Expression in Cells of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Origin**. *Cell Mol Neurobiol*.27 (2): 161-170.
94. Vass K, Lassmann H. (1990). **Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system**. *Am J Pathol.*;137(4):789-800.
95. Vilhardt F. (2005). **Microglia: phagocyte and glia cell**. *Int J Biochem Cell Biol*. 37(1):17-21.
96. White E, Peters A. (1993). **Cortical modules in the Posteromedial barrel subfield (Sml) of the mouse**. *J Comp Neurology* 334: 86-96.
97. Wang Y, Zhou C. (2005). **Involvement of Interferon- γ and Its Receptor in the Activation of Astrocytes in the Mouse Hippocampus Following Entorhinal Deafferentation**. *Glia*. 50:56–65.
98. William C. Covey, Tracey A. Ignatowski , Paul R. Knight, Robert N. Spengler (2000). **Brain-derived TNF α : involvement in neuroplastic changes implicated in the conscious perception of persistent pain**. *Brain Res*. 859:113–12.
99. Wyss-Coray T. (2006). **Tgf-Beta pathway as a potential target in neurodegeneration and Alzheimer's**. *Curr Alzheimer Res*. 3(3):191-5.
100. Woolsey TA, Van der Loos H. (1970). **The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units**. *Brain Res*. 17(2):205-42.

101. Yamate J, Ishimine S, Izawa T, Kumagai D, Kuwamura M. (2009). **Macrophage populations and expressions of regulatory proinflammatory factors in the rat meninx under lipopolysaccharide treatment in vivo and in vitro.** *Histol Histopathol.* 24(1):13-24.
102. Yan-Ling Liu, Li-Jun Zhou, Neng-Wei Hu, Ji-Tian Xu, Chang-You Wu, Tong Zhang, Yong-Yong Li and Xian-Guo Liu. (2007). **Tumor necrosis factor- α induces long-term potentiation of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn in rats with nerve injury: The role of NF-kappa B, JNK and p38 MAPK.** *Neuropharmacology* 52:708-715
103. Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. (2006). **Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood.** *Nat Neurosci.* 9(2):268-75.
104. Zheng D, Purves D. (1995). **Effects of increased neural activity on brain growth.** *Proc Natl Acad Sci U S A;* 92: 1802-6.