

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**ESTUDIO DE CÉLULAS B QUE EXPRESAN EL LIGANDO 4-1BB (CÉLULAS
4BL) EN ENCEFALOMIELITIS EXPERIMENTAL AUTOINMUNE (EAE)
COMO MODELO PARA LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Tesis presentada por la Bachiller:

Carigga Gutiérrez, Nazareth Milagros

Para optar el Título Profesional de:

Ingeniera Biotecnóloga

Asesoras:

Ing. Córdova Barrios, Cinthia

Universidad Católica de Santa María

Ph.D. Lee – Chang, Catalina

UMR 995 Pole Recherche Lille 2

AREQUIPA – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20170000042866

N° Trámite en Fac. 361-2017

Fecha Recep. Fac. 18-09-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL


DE: **CARIGGA GUTIERREZ, Nazareth Milagros**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"ESTUDIO DE LAS CELULAS B QUE EXPRESAN EL LIGANDO 4-1 BB (CELULAS 4 BL) Y SU INTERACCION CON LAS CELULAS T EN ENCEFALOMIELITIS EXPERIMENTAL AUTOINMUNE (EAE) EL MODELO PARA LA ESCLEROSIS MULTIPLE"

DICTAMINADORES: **Blgo. Carlos Paz Aliaga** 2) **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"ESTUDIO DE CELULAS B QUE EXPRESAN EL LIGANDO 4-1BB (CELULAS 4BL) EN ENCEFALOMIELITIS EXPERIMENTAL AUTOINMUNE (EAE) EL MODELO PARA LA ESCLEROSIS MULTIPLE"**, después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente
FIRMAS:   (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA 05/12/2017

ASESOR: **Ing. Cinthia Córdova Barrios**

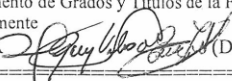
DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente
FIRMA  FECHA 17-12-18

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Ing. Eugenia Zeballos de Zenteno**
- 2) **Dra. Gaby Velasco Lozano**
- 3) **Blgo Carlos Eitel Iván Paz Aliaga**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: **"ESTUDIO DE CELULAS B QUE EXPRESAN EL LIGANDO 4-1 BB (CELULAS 4BL) EN ENCEFALOMIELITIS EXPERIMENTAL AUTOINMUNE (EAE) COMO MODELO PARA LA ESCLEROSIS MULTIPLE"** y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente
FIRMA  (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA 07-01-19

JURADOS: PRESIDENTE **ING. EUGENIA ZEBALLOS DE ZENTENO**
VOCAL **DRA. GADY VELASCO LOZANO**
SECRETARIO **BLGO. CARLOS IVAN PAZ ALIAGA**

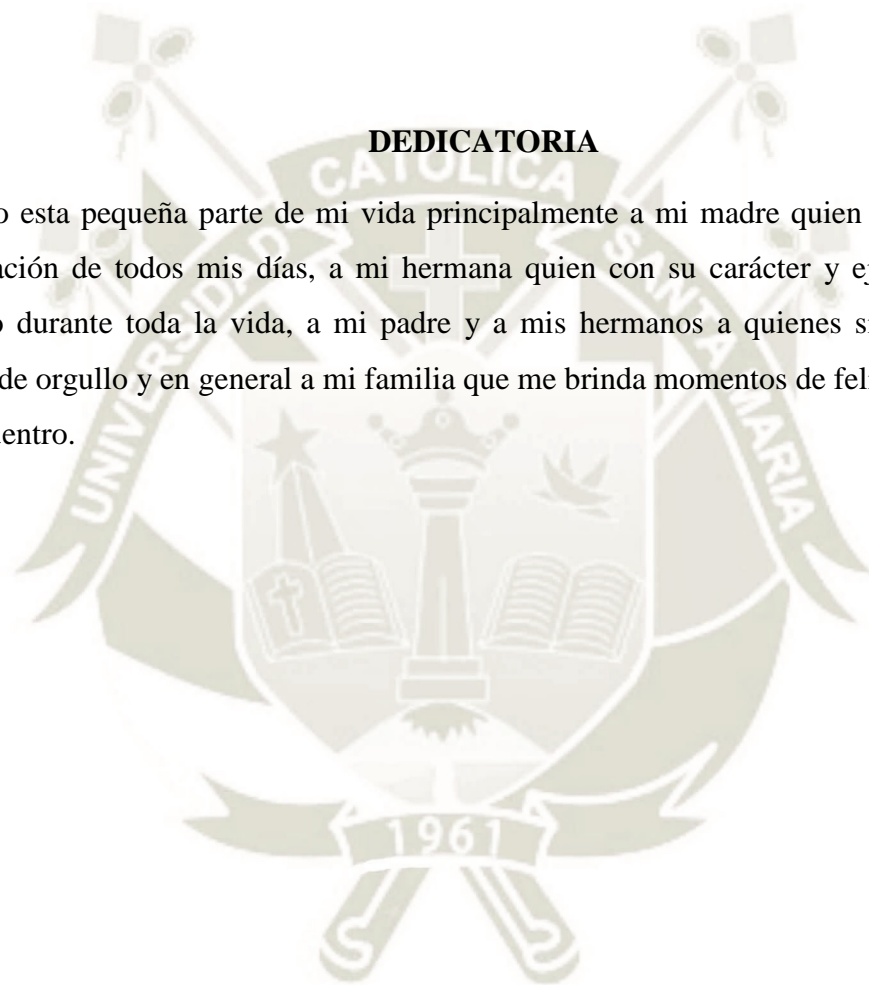
FECHA 10/1/19 HORA 17.00 LOCAL

FIRMA DEL DECANO 

FECHA

DEDICATORIA

Dedico esta pequeña parte de mi vida principalmente a mi madre quien es la fuerza e inspiración de todos mis días, a mi hermana quien con su carácter y ejemplo me ha guiado durante toda la vida, a mi padre y a mis hermanos a quienes siempre quiero llenar de orgullo y en general a mi familia que me brinda momentos de felicidad en cada reencuentro.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial a mi asesora Catalina Lee-Chang quién me acompañó en la elaboración de esta tesis y me motivó a apreciar el mundo de la inmunología, a mi asesora la Ingeniera Cinthia Córdova Barrios quien me apoyó no sólo durante la redacción de la tesis, sino que también a lo largo de mi preparación universitaria.

A Jorge Añacata Pérez que me brindó consejos y aliento invaluable durante todo el proceso, gracias por siempre estar ahí.

A mis grandes amigos, a quienes quiero ver siempre triunfar Claudia Marcapura, Camilo Febres y especialmente a Fabrizio Johnson quien cedió su tiempo para colaborar conmigo siempre con una sonrisa.

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INTRODUCCIÓN	iii
HIPÓTESIS	v
OBJETIVOS	vi
OBJETIVO GENERAL	vi
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	vi
<u>CAPÍTULO I</u>	<u>1</u>
MARCO TEÓRICO	1
1. EL SISTEMA INMUNOLÓGICO EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES DEL SNC	1
1.1. Componentes de la respuesta inmunológica	4
1.2. Células inmunológicas vinculadas a las enfermedades autoinmunes.	5
1.2.1. Linfocitos B	5
1.2.2. Linfocitos T	6
1.2.3. Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)	7
1.2.4. Células presentadoras de Antígeno (APC)	7
1.3. Desarrollo linfocitario y Tolerancia	8
1.3.1. Desarrollo de los linfocitos T	8
1.3.2. Tolerancia	10
1.4.1. Rol de los linfocitos T CD4+ en la EM	11
1.4.2. Rol de los linfocitos T CD8+ en la EM	11
1.4.3. Rol de los linfocitos B en la EM	12
2. ESCLEROSIS MÚLTIPLE	13
2.1. Etiología de la Esclerosis Múltiple	16
2.1.1. Factores no genéticos que podrían desencadenar la enfermedad.	16
2.1.2. Agentes infecciosos que podrían desencadenar la EM	17
2.1.3. Mecanismo de acción de los agentes infecciosos	17
2.1.4. Linfocitos T autorreactivos	18
2.1.5. Linfocitos B Autoreactivos	19
2.1.6. Células regulatorias defectuosas	20
2.1.7. La EM afecta la vaina de mielina	21
2.2. Tipos de Esclerosis múltiple	21

2.2.1. Desarrollo y aparición de los tipos de EM.	21
2.3. Manifestaciones clínicas de la enfermedad	22
3. INTERACCIÓN DE LINFOCITOS T Y B EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE.	23
3.1. Tratamiento de la Esclerosis múltiple y la terapia de depleción de linfocitos B (BCDT).	24
4. LINFOCITOS 4BL	25
5. FUNDAMENTOS TÉCNICOS	28
5.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	28
5.2. Citometría de Flujo	29
<u>CAPÍTULO II</u>	30
MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. LUGAR DE EJECUCIÓN	30
1.1. Ubicación	30
1.2. Actividades que realiza la Unidad	30
1.3. Aspectos técnicos	30
a) Ubicación geográfica	30
b) Plano de ubicación	31
1.4. Área	31
a) Funciones del área	31
2. MATERIAL EXPERIMENTAL	32
2.1. Material biológico	32
2.2. Reactivos	32
2.3. Anticuerpos	33
2.4. Material de vidrio	33
2.5. Material desechable	33
2.6. Kits	34
2.7. Equipos	34
3. METODOLOGÍA	34
3.1. Comparación de los procesos de estimulación del ligando 4-1BB en linfocitos B esplénicos.	34
a) Caracterización del genotipo de ratones según el gen del ligando 4-1 BB por PCR.	34
b) Comparación de antiBCR con antiCD40 versus LPS en la estimulación in vitro del ligando 4-1BB en linfocitos B.	36

c) Activación de funciones efectoras en linfocitos T mediante linfocitos B estimulados <i>in vitro</i> (Células 4BL)	38
d) Comparación de genotipos WT, HT y KO en la estimulación <i>in vitro</i> de 4-1BBL en linfocitos B con antiBCR y antiCD40.	39
e) Activación de funciones efectoras en linfocitos T CD8+ mediante células 4BL (WT, HT y KO) estimuladas <i>in vitro</i>	40
f) Marcaje intra y extracelular de células 4BL activadas <i>in vitro</i> y linfocitos T CD8+.	42
3.2. Análisis de la infiltración de células inmunes B, T CD4+, T CD8+, macrófagos y microglía en el cerebro de ratones con EAE.	43
a) Inmunización de ratones con EAE	43
b) Extracción de células inmunológicas alojadas en el tejido cerebral	44
c) Marcaje intra y extracelular de células infiltradas	45
3.3. Evaluación del fenotipo y de la proliferación de células T <i>in vivo</i> que interactúan con células 4BL en EAE.	45
a) Inmunización y extracción de linfocitos B en ratones con EAE	45
b) Incubación de linfocitos B con linfocitos T	46
c) Eliminación artificial de células 4BL en linfocitos de tipo WT	46
d) Caracterización intra y extracelular	47
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
<u>CAPÍTULO III</u>	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
1. COMPARACIÓN DE LOS PROCESOS DE ESTIMULACIÓN DEL LIGANDO 4-1BB EN LINFOCITOS B ESPLÉNICOS.	48
a) Caracterización del genotipo de ratones según el gen del ligando 4-1 BB por PCR.	48
b) Comparación de antiBCR con antiCD40 versus LPS en la estimulación <i>in vitro</i> del ligando 4-1BB en linfocitos B y evaluación de funciones efectoras en linfocitos T por células 4BL.	49
c) Comparación de genotipos WT, HT y KO en la estimulación <i>in vitro</i> de 4-1BBL en linfocitos B con antiBCR y antiCD40.	52
d) Activación de funciones efectoras en linfocitos T CD8+ mediante células 4BL (WT, HT y KO) estimuladas <i>in vitro</i>	53
2. ANÁLISIS DE LA INFILTRACIÓN DE CÉLULAS INMUNES B, T CD4+, T CD8+, MACRÓFAGOS Y MICROGLÍA EN EL CEREBRO DE RATONES CON EAE.	56

3. EVALUACIÓN DEL FENOTIPO Y DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS T IN VIVO QUE INTERACTÚAN CON CÉLULAS 4BL EN EAE.	65
a) Inmunización y extracción de linfocitos B en ratones con EAE.	65
b) Incubación de linfocitos B con linfocitos T	65
c) Eliminación artificial de células 4BL en linfocitos de tipo WT	65
CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXOS	80
ANEXO I	80
ANEXO II	81
ANEXO III	82



ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- PLANO DEL CENTRO HOSPITALARIO PARA LA UBICACIÓN DEL UMR 995 EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN. FUENTE: GOOGLE MAPS	31
FIGURA 2.- TOMA SATELITAL DEL PLANO DEL CENTRO HOSPITALARIO. FUENTE: GOOGLE MAPS	31
FIGURA 3.-PROCESO DE INMUNIZACIÓN DE LOS RATONES WT Y KO.	43
FIGURA 4.- PCR PARA EVALUACIÓN DE GENOTIPOS WT, HT Y KO. SE MUESTRAN LAS DIFERENTES POSICIONES DE LAS BANDAS OBTENIDAS.	49
FIGURA 5.- ESTIMULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN EN LINFOCITOS CD8+ POR LINFOCITOS B ACTIVADOS CON LPS VS ANTI BCR Y ANTI CD40. (P=0,001, P<0.05 SE CONSIDERÓ SIGNIFICANTE).	50
FIGURA 6.- PROLIFERACIÓN Y LIBERACIÓN DE GRB EN LINFOCITOS T CD8+ ORIGINADA POR LINFOCITOS B ACTIVADOS CON LPS VS ANTI BCR Y ANTI CD40. (P=0,0001, P<0,05 SE CONSIDERÓ SIGNIFICANTE).	51
FIGURA 7.- PROLIFERACIÓN Y LIBERACIÓN DE IFN γ EN LINFOCITOS T CD8+ ORIGINADA POR LINFOCITOS B ACTIVADOS CON LPS VS ANTI BCR Y ANTI CD40. (P=0,0001, P<0,05 SE CONSIDERÓ SIGNIFICANTE).	51
FIGURA 8.-EXPRESIÓN DE T-BET, 4-1BBL, IFN γ R1, IL10 Y TNFA EN LINFOCITOS B LUEGO DE 48 HORAS DE ACTIVACIÓN CON ANTI BCR Y ANTI CD40, EN RATONES WT, HT Y KO.	52
FIGURA 9.- PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T CD8+ ESTIMULADAS POR CÉLULAS 4BL DE WT, HT Y KO LUEGO DE 5 DÍAS DE INCUBACIÓN. SE MUESTRAN TAMBIÉN LOS LINFOCITOS T CONTROL CON Y SIN ACTIVACIÓN (P=0,0001, P<0,05 SE CONSIDERÓ SIGNIFICANTE)	54
FIGURA 10.- LINFOCITOS TCD8+ PROLIFERATIVOS QUE LIBERAN IFN γ INDUCIDAS POR CÉLULAS 4BL (P=0,0002, P<0,05 SE CONSIDERÓ SIGNIFICANTE)	55
FIGURA 11.- LINFOCITOS TCD8+ PROLIFERATIVOS QUE LIBERAN GRB INDUCIDAS POR CÉLULAS 4BL (P=0,0001, P<0,05 SE CONSIDERÓ SIGNIFICANTE)	55
FIGURA 12.- SCORE CLÍNICO PARA LA EVALUACIÓN DE EAE, 20 DÍAS DESPUÉS DE LA INMUNIZACIÓN.	56
FIGURA 13.- PORCENTAJE DE LINFOCITOS B QUE SE INFILTRARON EN EL CEREBRO DE LOS TRES TRATAMIENTOS WT-NAIVE, WT-EAE Y KO-EAE. (P=0,5635, P<0.05 SE CONSIDERÓ SIGNIFICANTE).	57
FIGURA 14.-FENOTIPAJE DE LINFOCITOS B INFILTRADOS EN EL CEREBRO, SE MUESTRA LA EXPRESIÓN DE TBET, 4-1BBL, TNFA E IFN γ .	58

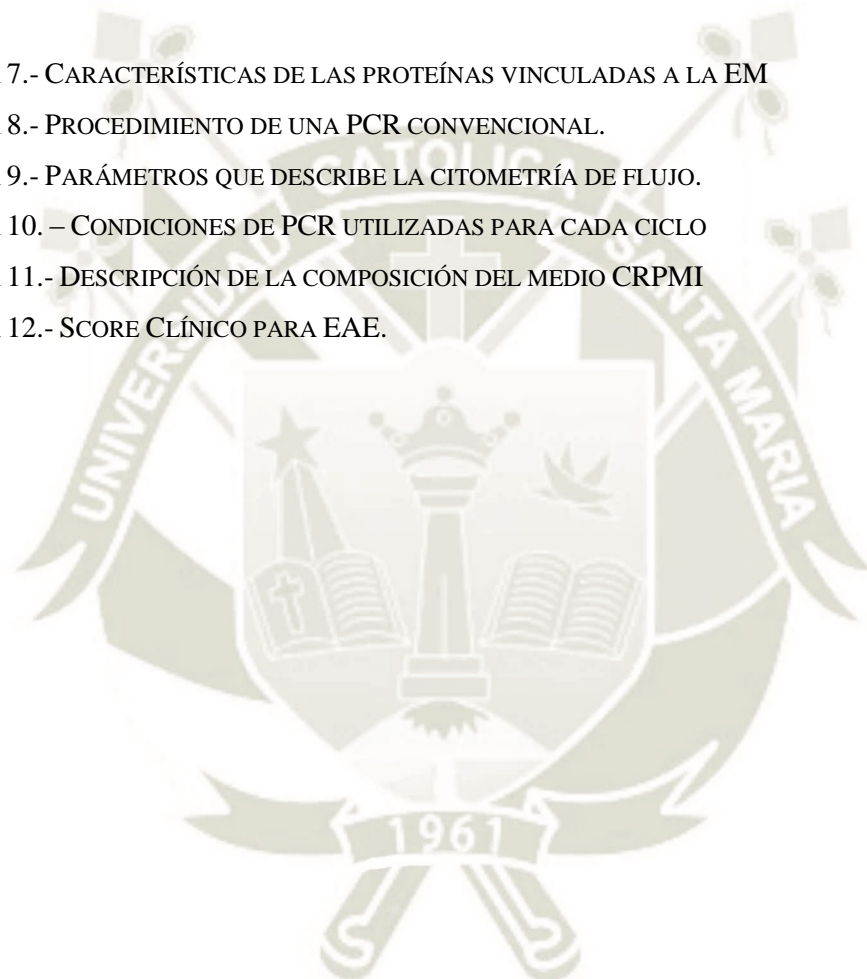
FIGURA 15.- PORCENTAJE DE LINFOCITOS T CD8+ QUE SE INFILTRARON EN EL CEREBRO DE LOS TRES TRATAMIENTOS WT-NAIVE, WT-EAE Y KO-EAE. (P=0,001, P<0.05 SE CONSIDERÓ SIGNIFICANTE).	59
FIGURA 16.- FENOTIPAJE DE LINFOCITOS T CD8+ INFILTRADOS EN EL CEREBRO, SE MUESTRA LA EXPRESIÓN DE GRB, TBET E IFN γ .	60
FIGURA 17.- PORCENTAJE DE LINFOCITOS T CD4+ QUE SE INFILTRARON EN EL CEREBRO DE LOS TRES TRATAMIENTOS WT-NAIVE, WT-EAE Y KO-EAE. (P=0,001, P<0.05 SE CONSIDERÓ SIGNIFICANTE).	60
FIGURA 18.- FENOTIPAJE DE LOS LINFOCITOS T CD4+ INFILTRADAS EN EL CEREBRO, SE MUESTRA LA EXPRESIÓN DE TBET, IFN γ , TNFA, IL17 Y IL10.	61
FIGURA 19.- PORCENTAJE DE CÉLULAS CD11b+ QUE SE INFILTRARON EN EL CEREBRO DE LOS TRES TRATAMIENTOS WT-NAIVE, WT-EAE Y KO-EAE.	62
FIGURA 20.- CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS CD11b+ INFILTRADAS EN EL CEREBRO, SE MUESTRA EN EL CUADRANTE IZQUIERDO (CD45LO) MACRÓFAGOS, EN EL CUADRANTE SUPERIOR DERECHO (CD45ME) MICROGLÍA ACTIVA Y CUADRANTE INFERIOR DERECHO (CD45HI) MICROGLÍA.	62
FIGURA 21.-LIBERACIÓN DE IFN γ Y TNFA POR DIFERENTES TIPOS DE CÉLULAS CD11b+.	63
FIGURA 22.- PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T CD8+ INDUCIDA POR CÉLULAS 4BL IN VIVO.	66
FIGURA 23.- PORCENTAJE DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS TCD8+ ESTIMULADOS IN VIVO POR CÉLULAS 4BL (P=0,0001, P<0.05 SE CONSIDERÓ SIGNIFICANTE).	66
FIGURA 24.- NIVELES DE LIBERACIÓN DE GRB EN LINFOCITOS TCD8+ INDUCIDOS POR CÉLULAS 4BL IN VIVO.	67
FIGURA 25.- PORCENTAJE DE LIBERACIÓN DE GRB EN LINFOCITOS TCD8+ PROLIFERATIVOS. (P=0,0001, P<0.05 SE CONSIDERÓ SIGNIFICANTE).	67
FIGURA 26.- NIVELES DE LIBERACIÓN DE INF γ EN LINFOCITOS T CD8+ INDUCIDOS POR CÉLULAS 4BL IN VIVO.	68
FIGURA 27.- PORCENTAJE DE LIBERACIÓN DE IFN γ EN LINFOCITOS TCD8+ PROLIFERATIVOS. (P=0,0001, P<0.05 SE CONSIDERÓ SIGNIFICANTE).	68
FIGURA 28.- DISEÑO EXPERIMENTAL PARA COMPARACIÓN DE LOS PROCESOS DE ESTIMULACIÓN DEL LIGANDO 4-1BB EN LINFOCITOS B ESPLÉNICOS.	80
FIGURA 29.-DIAGRAMA EXPERIMENTAL PARA LA EVALUACIÓN DEL FENOTIPO Y PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T CD8+ QUE INTERACTÚAN CON CÉLULAS 4BL EN EAE.	81
FIGURA 30.- DISPOSICIÓN DE MARCAJE INTRA Y EXTRACELULAR PARA CARACTERIZAR EL FENOTIPO DE LINFOCITOS B.	82

FIGURA 31.- DISPOSICIÓN DE MARCAJE INTRA Y EXTRACELULAR PARA LA EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LINFOCITOS B.	82
FIGURA 32.- DISPOSICIÓN DE MARCAJE INTRA Y EXTRACELULAR PARA CARACTERIZAR EL FENOTIPO DE LINFOCITOS B ACTIVOS.	83
FIGURA 33.- DISPOSICIÓN PARA MARCAJE INTRA Y EXTRACELULAR DE LINFOCITOS B FUNCIONALES EN LA CUANTIFICACIÓN DE INFILTRACIÓN.	83



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.-CÉLULAS INMUNOLÓGICAS EN EL SNC SANO	3
TABLA 2.-CAMBIOS CELULARES EN LINFOCITOS FRENTE A UNA RESPUESTA INMUNE	7
TABLA 3.- SELECCIÓN EN EL PROCESO DE TOLERANCIA DE LOS LINFOCITOS T	9
TABLA 4.-RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADAPTATIVA EN EM	12
TABLA 5.-FACTORES DE CONTRASTE ENTRE EAE Y EM	13
TABLA 6.- COMPARACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL EAE CON LA ENFERMEDAD DE EM	15
TABLA 7.- CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS VINCULADAS A LA EM	21
TABLA 8.- PROCEDIMIENTO DE UNA PCR CONVENCIONAL.	28
TABLA 9.- PARÁMETROS QUE DESCRIBE LA CITOMETRÍA DE FLUJO.	29
TABLA 10.- CONDICIONES DE PCR UTILIZADAS PARA CADA CICLO	35
TABLA 11.- DESCRIPCIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO CRPMI	36
TABLA 12.- SCORE CLÍNICO PARA EAE.	44



LISTA DE ABREVIATURAS

4-1BBL: Ligando 4-1BB

Ab: Anticuerpo

ACK: Buffer amonio – cloruro – potasio

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ag: Antígeno

APC: Aloficocianina

APC: Célula presentadora de antígeno

BA: Brefeldina A

BCDT: Terapia de depleción de células B

BCR: Receptor de la célula B

BHE: Barrera hematoencefálica

BV 605: Violeta brillante 605

BV711: Violeta brillante 711

BV785: Violeta brillante 785

CD: Grupo de diferenciación

CFA: Adjuvante completo de Freund

CRPMI: RPMI completo

DC: Célula dendrítica

DN: Doblemente negativas

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfatados.

DP: Doblemente positivas

EAE: Encefalomiелitis experimental Autoinmune

EBV: Virus del Epstein Barr

EM: Esclerosis múltiple

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GrB: Granzima B

HHV: Virus del herpes humano

HLA: Antígeno leucocitario humano

HT: Heterocigoto

IFN γ : Interferón gamma

IFN γ R1: Receptor 1 de interferón gamma

IgE: Inmunoglobulina E

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL: Interleuquina

KO: *Knock out*

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LPS: Lipopolisacárido

MBP: Proteína básica de mielina

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MOG: Mielina oligodendrocito

MRI: Imagen de resonancia magnética

NK: Células Natural Killer

PB: Azul pacífico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PE/TR: Ficoeritrina/Rojo Texas

PE: Ficoeritrina

PE-Cy-5: Ficoeritrina cianina 5

PerCP: Clorhidrato de peridinina

PLP: Proteína proteolipídica

PMA: Phorbol 12 miristato 13 – acetato

PPMS: Esclerosis múltiple primaria progresiva.

PSM: Puesto de seguridad microbiológica

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPMI: Medio de cultivo del Instituto memorial Roswell Park

RRMS: Esclerosis múltiple de recaída – recuperación.

SNC: Sistema Nervioso Central

SPMS: Esclerosis múltiple secundaria progresiva.

T_C: Linfocito T citotóxico

TCR: Receptor de la célula T

TEC: Células tímicas epiteliales

T_H: Linfocito T helper

TLR: Receptor de tipo Toll

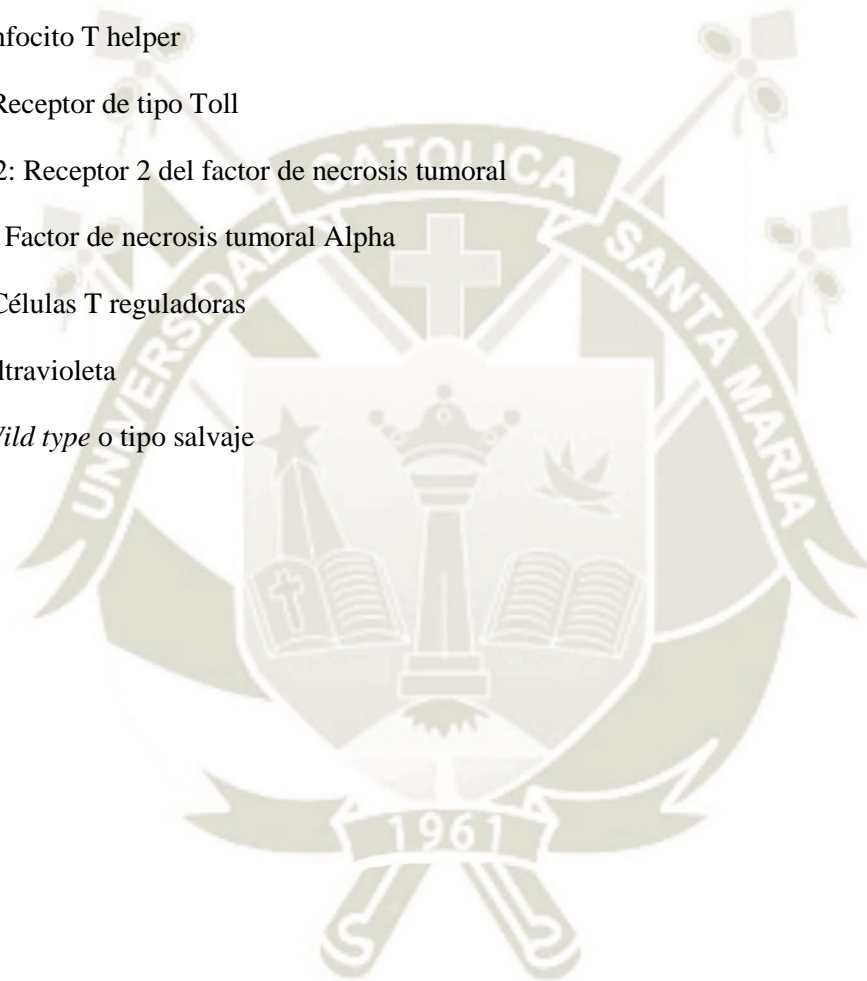
TNFR2: Receptor 2 del factor de necrosis tumoral

TNF α : Factor de necrosis tumoral Alpha

Treg: Células T reguladoras

UV: Ultravioleta

WT: *Wild type* o tipo salvaje



RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune que ataca al sistema nervioso central (SNC) generando daño inflamatorio. Genera lesiones donde es común encontrar fagocitos mononucleares y macrófagos que dañan la mielina que reviste las neuronas, además de extensas poblaciones de células T CD₄⁺ y T CD₈⁺ que agudizan los daños. Sin embargo, a pesar de la presencia de células B en las lesiones su contribución aún no se determina, se sabe que cumplen un rol importante pues cuando son eliminadas las lesiones disminuyen.

Este trabajo tiene como objetivo estudiar las células B que expresan el ligando 4-1BB, un grupo específico de células, en Encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE).

La metodología incluye tres pruebas experimentales para este estudio: En la primera, linfocitos B con el ligando 4-1 BB fueron aislados del bazo de ratones, activados por estimulación e incubados con células T totales para estudiar su fenotipo. Luego, se analizó la capacidad de infiltración de células inmunológicas en el cerebro de ratones con EAE. Finalmente, linfocitos B aislados del bazo de ratones con EAE se sometieron a interacción con células T CD₈⁺, donde se midieron los niveles de proliferación y secreción de citoquinas de activación.

Como resultados se observó que las células T lograban activarse luego de la interacción con células 4BL induciendo la liberación de Interferón gamma (IFN γ) y Granzima B (GrB). Además, se confirmó la presencia de células inmunes de tipo T CD₄⁺, T CD₈⁺, B, macrófagos y microglía en el cerebro de los animales con EAE. Por último, se verificó que en EAE las células 4BL son activadas para luego estimular a células T CD₈⁺ presentes en su entorno, generando la liberación de grandes niveles de IFN γ y GrB.

En conclusión, las células 4BL son un grupo específico de células B que emplean el ligando 4 – 1BB para estimular células T con función citotóxica en EAE, estas células requieren una activación previa y luego son capaces de inducir proliferación y la liberación de citoquinas en células T, exacerbando las lesiones de la enfermedad.

Palabras clave. - Esclerosis múltiple, Encefalomiелitis experimental autoinmune, células 4BL.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease that affects the central nervous system (CNS) leading to inflammatory damage. Is very common to find in the lesions mononuclear phagocytes such as microglia and macrophages that harm the myelin that cover the neurons, as well as large populations of CD4+ and CD8+ T cells that sharpen the damages. However, despite of the presence of B cells in the lesions their contribution is still not determined; it is known that they have an important role since when they are depleted the lesions diminished.

The objective of this work is to study the B cells that express the ligand 4-1BB, a specific group of cells, in experimental autoimmune Encephalomyelitis (EAE).

The methodology includes three experimental tests for this study: First, B-lymphocytes with the ligand 4 – 1BB were isolated, activated and incubated with total T cells to study their phenotype. Second, brain B-lymphocytes were isolated from mice with Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and the capacity of infiltration of immune cells was analyzed. Finally, B – lymphocytes isolated from the spleen of mice with EAE were subjected to interact with CD8+ T cells, where it was measured the levels of proliferation and secretion of activation cytokines.

As results, it was observed that T cells manage to activate after the interaction with 4BL cells inducing the release of IFN γ and granzyme B. In addition, it was confirmed the presence of immune cells T CD4+, T CD8+, B, macrophages and microglia type in the brain of animals with EAE. Last, it was verified that in EAE 4BL cells are activated to them stimulate CD8+ T cells present in their environment, resulting in the release of large amounts of INF γ and granzyme B.

To conclude, 4BL cells are a specific subset of B cells that use the 4 – 1 BB ligand to stimulate T cells with a cytotoxic function on EAE, these cells required a previous activation and them are capable to induce proliferation and the release of cytokines on T cells, exacerbating the lesions in the disease.

Key words. - Multiple sclerosis, Experimental autoimmune encephalomyelitis, 4BL cells.

INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune que tiene como efectores protagonistas a linfocitos T anómalos que atacan los antígenos de mielina de las neuronas del sistema nervioso central. Estos ataques traen como consecuencias lesiones inflamatorias, degeneración neuroaxonal y desmielinización, generando deterioro en el ritmo de vida de los afectados y, en caso de no ser tratada, incluso la muerte. Actualmente, diversos estudios tienen como finalidad descubrir la etiología y posible ruta hacia una cura de esta enfermedad, utilizando como modelo experimental la enfermedad de Encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE) en ratones. (1)

Si bien los linfocitos T son los primeros tipos celulares en manifestarse en las lesiones de la EM, estas células no son las únicas que logran atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) para ingresar al SNC y generar daño mediante su función citotóxica. Entre las células que también se encuentran en las lesiones, los linfocitos B de memoria causaron gran interés, ya que se postulaba que secretaban anticuerpos en el SNC agravando las lesiones en la mielina dentro de la zona de inflamación. (2)

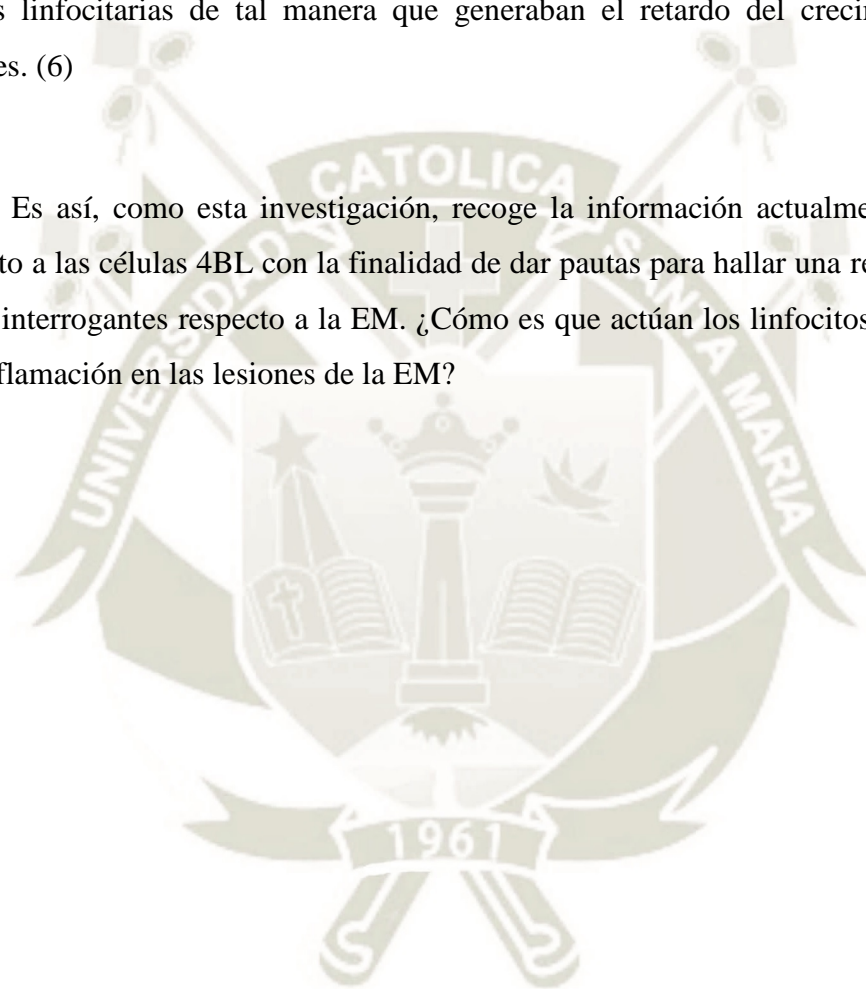
Entonces, con el objetivo de determinar la verdadera función de los linfocitos B dentro de las lesiones de la EM, se experimentó aplicando la depleción de linfocitos B (BCDT) en pacientes con EM, descubriendo así, que los linfocitos B responsables de generar una respuesta proinflamatoria no eran los linfocitos B de memoria, sino aquellos linfocitos B que no tenían la capacidad de liberar anticuerpos. Este descubrimiento, generó nuevas interrogantes por resolver, entre ellas conocer cuáles eran los tipos de linfocitos B involucrados en la EM y cómo es que estos actuaban para exacerbar el proceso inflamatorio. (3)

Una de estas interrogantes está cerca de hallar solución gracias a un grupo específico de linfocitos B descubiertos recientemente. Estos linfocitos fueron denominados células 4BL debido a que expresan en su superficie el ligando 4-1BB. Una de las funciones publicadas en la investigación que generó su descubrimiento es que,

estás células cumplen un rol en el retardo del crecimiento de tumores sólo durante el envejecimiento. (4,5)

La función supresora de las células 4BL despertó el interés por conocer si estos linfocitos estarían ligados a enfermedades autoinmunes como la EM. En dicha investigación las células 4B eran capaces de inducir una respuesta citotóxica en otras células linfocitarias de tal manera que generaban el retardo del crecimiento de los tumores. (6)

Es así, como esta investigación, recoge la información actualmente divulgada respecto a las células 4BL con la finalidad de dar pautas para hallar una respuesta a otra de las interrogantes respecto a la EM. ¿Cómo es que actúan los linfocitos B vinculados a la inflamación en las lesiones de la EM?



HIPÓTESIS

Si las células B que expresan el ligando 4 – 1BB (células 4BL) son capaces de activar a las células T para retardar el crecimiento de tumores en el envejecimiento, es posible que las células 4BL también sean capaces de estimular la activación de células T CD8+ en un modelo de EAE.



OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar las células B que expresan el ligando 4 – 1 BB en encefalomielitis experimental autoinmune (EAE).

Objetivos específicos

1. Comparar los procesos de estimulación del ligando 4 – 1 BB en células B esplénicas.
2. Analizar la infiltración de células inmunes B, T CD4+, T CD8+, macrófagos y microglía en el cerebro de ratones con EAE.
3. Evaluar el fenotipo y la proliferación de células T CD8+ que interactúan con células 4BL en EAE.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. El Sistema inmunológico en las enfermedades autoinmunes del SNC

El sistema inmunológico se define como una red dinámica y versátil de defensa en nuestro organismo, conformada por varias células y moléculas especializadas que actúan de manera específica contra microorganismos patógenos o parte de ellos, que sean ajenos al organismo. Principalmente actúa reconociendo el elemento extraño y efectúa una acción en contra de él. La inmunidad es el estado de protección del organismo en contra de patógenos o sustancias foráneas, conocidos como antígenos (7,8).

La respuesta inmunológica, es un mecanismo de defensa efectivo que depende principalmente de la acción ofensiva del microorganismo patógeno. De tal forma que, las células y moléculas que se activen para generar una respuesta inmunológica dependen de las estructuras químicas presentes en el patógeno. El proceso de reconocimiento del patógeno incluye la interacción entre los organismos foráneos y las moléculas de reconocimiento de las células hospederas, esta interacción desencadena una serie de eventos que luego conducen a la identificación y destrucción del patógeno (8).

La respuesta generada es una respuesta específica que es sensible a cambios químicos dentro del organismo. Esta acción, elimina y neutraliza el microorganismo patógeno empleando una o la combinación de alguna de las múltiples estrategias del sistema inmunológico (9,10).

En el futuro, si en algún momento se produce una nueva exposición hacia el mismo patógeno, el sistema inmune aplicará una respuesta de memoria que será más rápida y especializada. Además, su especificidad le confiere la capacidad de

diferenciar entre patógenos extraños de células o proteínas propias del organismo (8,10).

El SNC es único de manera estructural y funcional, pero al estar conectado con otros tejidos, necesita mecanismos de protección contra las infecciones. Ya que, algún error en el control de la respuesta inmune en el SNC puede desencadenar desordenes inmunopatológicos como la esclerosis múltiple y la neuromielitis óptica (11).

El (SNC) siempre se ha considerado como un espacio “inmuno-privilegiado” debido a que la administración de agentes inmunogénicos dentro del parénquima del SNC normalmente falla en provocar una respuesta inmunológica adaptativa. Este efecto se atribuye a la presencia de barreras endoteliales y epiteliales que restringen el tráfico de leucocitos, además de las barreras más especializadas como la barrera hematoencefálica (BHE), el líquido cefalorraquídeo (LCR) y la barrera leptomenígea(12). Sin embargo, se ha observado que la respuesta inmunológica adaptativa puede iniciarse con antígenos presentes en el SNC (8,11).

Normalmente el SNC contiene solo un tipo de células inmunológicas, las células parenquimales de la microglía, un tipo de macrófagos altamente especializados. Aparte de la microglía, que es renovada por proliferación local, otras poblaciones pueden mantenerse en el SNC por reemplazo de monocitos en la sangre. El líquido cefalorraquídeo (LCR) contiene normalmente tráfico de linfocitos T de memoria, así como linfocitos B y monocitos. Pero ninguna otra célula inmunitaria se ha documentado en un SNC saludable (11). En la Tabla 1 se describen, por ejemplo, las poblaciones celulares que podrían encontrarse en un cerebro sano.

En general, las enfermedades neuroinfecciosas están asociadas con cambios agudos en las funciones mentales y motoras efecto de la disfunción neurológica que puede persistir luego de un evento infeccioso. Durante la fase aguda, la invasión de patógenos al SNC activa la respuesta inflamatoria, ocasionando que las células cerebrales incluyendo macrófagos residentes, microglía, células endoteliales, células ependimales, neuronas y glía (astrocitos y oligodendrocitos) expresen moléculas

representativas de la inmunidad innata que inducen el reclutamiento de leucocitos hacia el área infectada (13,14).

Tabla 1.-Células inmunológicas en el SNC sano (14).

<i>Tipo de célula inmunológica</i>	<i>Origen y ubicación</i>
<i>Microglía parenquimatosa</i>	Surge del saco vitelino del progenitor en los embriones de ratones (día 7) antes de la hematopoyesis definitiva, e ingresan al rudimento cerebral, son mantenidos por proliferación local y evitan que se infiltren células sanguíneas en la microgliosis.
<i>Macrófagos del plexo coroideo y células dendríticas</i>	Los macrófagos y las células dendríticas residen en el plexo coroideo del parénquima (fuera del SNC). Expresan marcadores como CD11c y se incrementan en número durante la inflamación.
<i>Macrófagos meníngeos</i>	Tienen funciones celulares presentadoras de antígenos durante EAE.
<i>Macrófagos perivasculares</i>	Expresan moléculas MHC de clase II en el endotelio cerebrovascular. Son responsables de la re-estimulación de los linfocitos mediante péptido – MHC complejo luego de la extravasación permitiendo el ingreso de los linfocitos activados en el parénquima del SNC.
<i>Composición celular del LCR</i>	Del tráfico total de células del LCR, aproximadamente el 90% son células T, 5% células B, 5% monocitos y menos del 1% células dendríticas.
<i>Otros tipos de células en el SNC</i>	Mastocitos meníngeos y perivasculares también están presentes en el SNC.
<i>Ausentes en el SNC sano</i>	Neutrófilos y otros granulocitos. Células dendríticas a excepción de las que se encuentran en el plexo coroideo.

1.1. Componentes de la respuesta inmunológica

La respuesta inmunológica posee dos componentes, la respuesta humoral y la respuesta celular. La respuesta humoral se define como el efecto de la interacción de las células inmunológicas, específicamente los linfocitos B, con el antígeno, su subsecuente proliferación y diferenciación en células plasmáticas, células especializadas con la capacidad de liberar anticuerpos (8,10).

De esta manera, son los anticuerpos los agentes efectores de la respuesta humoral, acoplándose a los antígenos para neutralizarlos y facilitar su eliminación.

Los mecanismos más importantes mediante los cuales los anticuerpos pueden eliminar un organismo patógeno son (15):

- ❖ Aglutinar el antígeno por reacción cruzada, facilitando que sea ingerido por las células fagocíticas.
- ❖ Activar el sistema del complemento, mediante la unión del antígeno con el anticuerpo, de tal manera que el complemento pueda lisar el microorganismo.
- ❖ Neutralizar toxinas o partículas del microorganismo, revistiéndolas para prever su unión en la célula huésped.

Por otro lado, el sistema inmunológico también se compone de una respuesta celular, la cual es mediada por los linfocitos T que poseen una función efectora. Esta función efectora puede ser de mediación o intervención, función que es característica de los linfocitos T_H (*T helper*) o puede ser una función citotóxica, típica de los linfocitos T_C (*T citotóxic*), estos linfocitos actúan liberando citoquinas que pueden atraer células fagocíticas hacia el organismo patógeno, o mediante la eliminación directa de estas células (8).

1.2. Células inmunológicas vinculadas a las enfermedades autoinmunes.

1.2.1. Linfocitos B

Son células inmunológicas que se generan en la médula ósea, lugar donde permanecen hasta su madurez. Cuando maduran, los linfocitos B son capaces de expresar un receptor específico BCR (*B cell receptor*) una molécula de anticuerpo que se encuentra adosada a la membrana celular y que le permitirá adherir un antígeno en él (8,16).

Los linfocitos B pueden clasificarse en dos líneas diferentes según su origen y función, las células B-1 y las células B-2. Las células B-1 son aquellas que aparecen en menor proporción en nuestro organismo, se originan en la ontogenia y se localizan en el peritoneo y pleura. Estas células producen anticuerpos de tipo IgM, para lo cual no necesitan tener estimulación previa por los linfocitos T, llamada estimulación timo independiente. Las células B-1 presentan el marcador celular CD5, característico de linfocitos T y son contabilizados en la expansión tumoral por leucemia linfocítica crónica (17). Este grupo de linfocitos se subdividen a su vez en la línea B-1a y B-1b (6).

Por otro lado, existen también las células B-2 consideradas como los linfocitos B convencionales. Estas células si requieren la cooperación de los linfocitos T para convertirse en linfocitos efectores, también expresan moléculas de superficie que les permite diferenciarse de linfocitos T como CD19, CD20 y CD21. Además, poseen expresión diferencial de estas moléculas según su estado (6,17).

Un linfocito B maduro que abandona la médula ósea adquiere la denominación de linfocito *naive* hasta que logre encontrar un antígeno que empareje su BCR. Una vez que la unión se produzca la célula puede tomar dos caminos, diferenciarse en célula B de memoria, que facilitará la identificación de un patógeno que haya ingresado al organismo previamente, o convertirse en célula B plasmática, que se encargará de eliminar los patógenos mediante la liberación de anticuerpos específicos (18).

1.2.2. Linfocitos T

Los linfocitos T también se generan en la médula ósea, pero realizan el proceso de maduración en el timo, estas células también poseen un receptor específico TCR (*T cell receptor*) adosado en su membrana cuando alcanzan la madurez, este receptor reconoce y se acopla sólo a antígenos que sean presentados por células que posean complejos MHC (*Major histocompatibility complex*) en animales o HLA (*Human Leucocyte Antigen*) en humanos, en su membrana (8,19). Los linfocitos T pueden clasificarse prioritariamente en dos grupos según las glicoproteínas que expresen en la superficie de su membrana, las células T_H (*T helper*) expresan CD4 y las células T_C (*T cytotoxic*), CD8 (8).

Los linfocitos T $CD4^+$ (T_H) reconocen el antígeno que es presentado por los MHC o HLA de Clase II e interactúan con él. Cuando la interacción se concreta en la unión del complejo al antígeno, el linfocito realiza su función efectora liberando citoquinas que pueden a su vez activar otros linfocitos B, células T_C , macrófagos y otras células inmunológicas (8,20).

Por otro lado, los linfocitos $CD8^+$ (T_C) reconocen el antígeno presentado por el MHC o HLA de Clase I y al ser activadas ejercen una función citotóxica atacando generalmente a las células propias del organismo que se vieron alteradas por el patógeno (8,21).

Diversos inmunólogos dividen las funciones fisiológicas de las citoquinas en 2 subgrupos, *T helper* tipo 1 y tipo 2 (T_H1/T_H2). Las citoquinas T_H1 incluyen interferón gamma (IFN γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF), citoquinas que están asociadas con la activación de diversas enfermedades autoinmunes, incluyendo la esclerosis múltiple, artritis reumatoidea y la diabetes juvenil. Las citoquinas T_H2 son las Interleuquinas 2, 5 y 14 (IL-4, IL-5 y IL-13) que están asociadas con la eliminación de diversas enfermedades y la aparición de las respuestas alérgicas incluida el asma y la sensibilidad a la comida (22). La Tabla 2 describe los diferentes cambios que atraviesan las células inmunológicas cuando son estimuladas por un agente patógeno.

Tabla 2.-Cambios celulares en linfocitos frente a una respuesta inmune (8).

<i>Célula origen</i>	<i>Diferenciación</i>	<i>Actividad</i>	<i>Producto</i>
<i>T</i>	Th1	Proinflamatoria	IFN γ
	Th2	Antiinflamatoria	IL4, IL13
	Th17	Proinflamatoria	IL17, IL21
	CD4 T reg	Reguladora	-
	CD8	Efectora	Perforina, GrB
<i>B</i>	Células plasmáticas	Efectora	Anticuerpos

1.2.3. Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)

Las proteínas de membrana MHC tienen como rol, efectuar la presentación del antígeno, el complejo MHC se conforma por glicoproteínas polimórficas que interactúan normalmente con la membrana de los linfocitos T, específicamente con el TCR. Existen dos tipos de MHC según su composición estructural, los de Clase I que son expresados por casi todas las células nucleadas, consisten en una cadena pesada unida a una proteína invariante llamada β 2 microglobulina, y los de Clase II que consisten en una cadena de α y otra de β globulina, presentes solo en las células APC (*Antigen presenting cells*) (8).

1.2.4. Células presentadoras de Antígeno (APC)

Las APC son células especializadas encargadas de reconocer, digerir y presentar el antígeno, actúan internalizando el antígeno mediante fagocitosis o endocitosis, de esta manera una parte del antígeno es luego mostrada al exterior mediante el MHC de Clase II que está presente en la membrana de las APC. Finalmente, una célula T_H es capaz de reconocer el antígeno expuesto y posteriormente genera señales de activación o secreción de citoquinas (8).

Entre las células que pueden ejercer este rol se encuentran los macrófagos, los linfocitos B y las células dendríticas (DCs). Todas estas células cumplen dos características importantes (10):

- ❖ Expresan un MHC de Clase II en la membrana.
- ❖ Tienen la capacidad de generar señales co – estimulatorias necesarias para la activación de linfocitos T_H .

1.3. Desarrollo linfocitario y Tolerancia

1.3.1. Desarrollo de los linfocitos T

El desarrollo de los linfocitos T puede dividirse en dos etapas (17):

- ❖ Desarrollo temprano de timocitos. - Donde se genera una población inmadura de linfocitos T con TCRs diversos no específicos.
- ❖ Eventos de selección. – Dependen de las interacciones de los TCRs para moldear a la población, de tal forma que sólo las células auto restringidas y auto tolerantes puedan salir a la superficie.

Dentro de la densidad poblacional de linfocitos T cada uno de ellos expresa un TCR distinto y generar esta diversidad es función del timo mediante el proceso de maduración. El desarrollo temprano de los timocitos (Linfocitos T inmaduros) inicia cuando pequeños grupos de células linfoides migran hacia el timo desde la médula ósea y la sangre. Una vez en el timo los timocitos proliferan, se diferencian y atraviesan un proceso de selección (8,17).

Los primeros linfocitos T inmaduros generados en el timo carecen de diferenciadores CD4 o CD8, por lo que reciben la denominación de células doblemente negativas (DN), estos linfocitos atraviesan 4 etapas de clasificación según las moléculas que expresen en su superficie para lograr expresar un sólo TCR específico. Aquí según la expresión de genes y el ordenamiento de proteínas las células DN pueden obtener un $TCR\alpha\beta$ o $TCR\beta\delta$ según las cadenas que lo conformen (8).

El primer nivel de clasificación se da cuando los linfocitos obtienen un TCR y son capaces de expresar en su superficie ambas moléculas de diferenciación CD4 y CD8, convirtiéndose en células doblemente positivas (DP), es en este momento en el que la proliferación cesa. La segunda parte del proceso está conformada por los procesos de selección, donde los timocitos DP pequeños e incapaces de proliferar permanecen en el córtex del timo siendo la población más abundante de él con un 80% de existencia. La selección consiste en moldear la población de los timocitos DP según la afinidad del repertorio TCR por los péptidos MHC que se encuentran dispersos en el córtex. La importancia de este proceso recae en que los linfocitos T tienen que ser capaces de reconocer antígenos ajenos presentados por complejos MHC propios del organismo. Para lograr esto, células especializadas denominadas células tímicas epiteliales (TEC) expresan en sus membranas abundantes moléculas MHC Clase I y Clase II que presentan péptidos propios del organismo derivados generalmente de proteínas extracelulares o intracelulares que fueron degradadas por el metabolismo (8,23).

Tabla 3.- Selección en el proceso de Tolerancia de los linfocitos T (8).

<i>Proceso</i>	<i>Descripción</i>
<i>Selección positiva</i>	Selecciona a los timocitos que expresan TCR capaces de unirse a las moléculas propias de MHC, con afinidad baja o media.
<i>Selección negativa</i>	Descarta a los timocitos que portan TCR de alta afinidad para el complejo MHC/péptido propio del huésped.

Como se observa en la Tabla 3, existen dos mecanismos mediante los cuales los linfocitos T son clasificados antes de madurar, del 98% de timocitos DP presentes en el timo, el 95% no logra ser clasificado por selección positiva, muriendo por apoptosis en un proceso que se conoce como muerte por negligencia. El 2.5% de linfocitos inmaduros DP son eliminadas por selección negativa y sólo el 2% logra convertirse en linfocitos maduros. Este proceso genera linfocitos T maduros con un TCR con afinidad a los complejos MHC del

huésped, pero con rechazo a los péptidos de este, generando así células inmunológicas especializadas que atacarían solo a aquellos organismos patógenos (8).

1.3.2. Tolerancia

La tolerancia se define como los niveles de protección impuestos por el sistema inmunológico con el fin de evitar que nuestras células inmunológicas efectúen una reacción en contra de las propias células del organismo. El proceso se inicia con la tolerancia central en los órganos linfoides primarios, la médula ósea para los linfocitos B y el timo para los linfocitos T, este tipo de tolerancia elimina clones de linfocitos T o B que presenten una afinidad alta a antígenos propios (moléculas del organismo huésped) antes de que maduren. Posteriormente, se realiza la tolerancia periférica que toma lugar en los tejidos linfoides secundarios donde los linfocitos que aún sean autorreactivos se inactivan (8).

Durante su desarrollo en el timo, los timocitos con alta autoreactividad son eliminados y removidos del repertorio celular de las células T a través de la selección negativa. Por otro lado, luego de la selección positiva se originan células que ayudan en la regulación de la inmunidad, estas son las células Treg (Células T reguladoras) que conservan la característica autoreactiva (24).

Los linfocitos CD4⁺ autorreactivos que se generan en el reordenamiento del TCR, requieren de interacciones de baja afinidad entre el TCR y los péptidos propios que se expresan en células con complejo MHC de tipo II, estas interacciones son esenciales para la selección positiva de estas células en el timo. Sin embargo, las interacciones de alta afinidad pueden causar autoinmunidad. Por lo que los mecanismos de tolerancia han evolucionado para limitar las células T con TCR con gran afinidad para los ligandos MHC Clase II con péptidos propios (25).

Uno de los mecanismos empleados por tolerancia es la anergia, que es un mecanismo donde los linfocitos son funcionalmente inactivados luego del

encuentro con un antígeno, pero permanecen vivos en un estado de hiposensibilidad (26). De esta manera las poblaciones son controladas.

1.4. Mecanismo de acción de las células inmunológicas en la EM

1.4.1. Rol de los linfocitos T CD4+ en la EM

El modelo experimental actual de la EM es la Encefalomielitis Autoinmune Aguda (EAE), enfermedad análoga que es estimulada por la inyección de componentes de la proteína de la vaina de mielina junto a un adyuvante, en animales sanos y susceptibles, ocasionando encefalomielitis aguda, crónica o de tipo *relapse-remitting*. Los linfocitos T CD4+ son considerados como actores centrales de la patogénesis de la EM ya que contribuyen a la infiltración de células con actividad pro-inflamatoria al SNC y el LCR. Además, se considera que las moléculas HLA – DR y HLA – DQ que sólo están presentes en los linfocitos T, son las estructuras a las que se les confiere el riesgo genético de obtener EM (27).

1.4.2. Rol de los linfocitos T CD8+ en la EM

Los linfocitos T CD8+ se consideran como las principales células efectoras que ocasionan el daño en el SNC durante la EM. Ya que, el SNC no cuenta con células especializadas que expresen el complejo MHC Clase II, estructura importante para reconocer las células objetivo, que son las neuronas y los oligodendrocitos, esto vincula directamente a los linfocitos T CD8+ como los únicos capaces de reconocerlas y por lo tanto mediadores de la enfermedad (27).

Existe información substancial sobre el rol de los linfocitos T en enfermedades autoinmunes órgano-específicas. Algunos actúan como células efectoras atacando el tejido propio, de manera directa o reclutando linfocitos accesorios como los macrófagos. Otros, en cambio, regulan el tiempo de respuesta e incluso otros ayudan a los linfocitos B productores de anticuerpos (28).

1.4.3. Rol de los linfocitos B en la EM

La contribución de los linfocitos B autoinmunes a la patogénesis inflamatoria parece ser compleja, más allá de producir un efecto humoral estas células también actúan como APCs activando a los linfocitos T patogénicos que mediante su capacidad de secretar citoquinas se involucran creando microambientes favorables para el desarrollo de las respuestas celulares autoinmunes (28). La Tabla 4 muestra cómo se desarrolla la respuesta inmune cuando el organismo atraviesa por la EM.

Tabla 4.-Respuesta inmune innata y adaptativa en EM (29).

<i>Respuesta inmune</i>	<i>Innata</i>	<i>Adaptativa</i>
<i>Activación</i>	Productos microbianos	Antígenos, APCs, citoquinas.
<i>Receptor</i>	TLRs	TCR, BCR
<i>Especificidad</i>	No específico	Específico
<i>Resultado</i>	Producción de citoquinas	Producción de citoquinas, maduración y diferenciación celular.

1.5. Encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE)

La inducción de la EAE puede realizarse en varias especies, no sólo en ratones, sin embargo, son los ratones la especie más común y que ha contribuido en mayor proporción al entendimiento de la autoinmunidad y la neurodegeneración producida por inflamación inducida (30).

La nueva era de la ingeniería genética y transgénica incrementa el potencial de utilidad del modelo de EAE. Por lo que este modelo prevalecerá como herramienta esencial para la investigación preclínica que aborda los mecanismos y las rutas por los cuales se desarrollan las enfermedades autoinmunes. De esta manera el modelo EAE es una vía para los descubrimientos en sistemas in vitro,

como cultivos celulares en células madre, que pueden ser introducidos in vivo (31).

Sin embargo, el modelo experimental no es exacto en su totalidad, por lo que es necesario ser precavidos cuando se deseen interpretar resultados obtenidos a través de él, en la esclerosis múltiple.

Tabla 5.-Factores de contraste entre EAE y EM (31,32).

<i>Condición</i>	<i>Diferencia</i>
<i>Inducción de la enfermedad</i>	Se observan los regímenes de inducción invasivos que emplean adyuvantes.
<i>Curso de la enfermedad</i>	La mayoría de las cepas de ratones (incluida la más utilizada C57 Black 6) desarrollan una enfermedad monofásica.
<i>Ubicación de la inflamación en el SNC</i>	La mayoría de los modelos muestra inflamación en la médula espinal y no en el cerebro como sucede normalmente en la EM.
<i>Infiltrado de células inmunitarias</i>	Debido al régimen de inmunización, la respuesta de las células T está intensamente sesgada hacia las células T CD4+ y no hacia las T CD8+ como sucede normalmente en la EM.
<i>Diferencias inmunes entre especies</i>	Existen diferencias genéticas y fenotípicas en el sistema inmune.

2. Esclerosis Múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria que afecta al SNC, generando lesiones a nivel axonal que desencadenan discapacidad substancial al ocasionar déficits de las funciones neurocognitivas, sensitivas y motoras autónomas. Esta enfermedad afecta aproximadamente a 2.5 millones de individuos alrededor del mundo, donde los más afectados son adultos jóvenes entre los 20 y 40 años. Los síntomas visibles son pérdida de sensibilidad, perturbación visual, visión doble, debilidad muscular, ataxia y equilibrio deteriorado (27,31,33).

Las personas afectadas por la EM sufren deterioros personales y socioeconómicos, ya que genera discapacidad física en adultos jóvenes, especialmente en mujeres, en la época más activa de su vida. Además, los síntomas poseen un carácter heterogéneo incluyendo perturbaciones sensoriales y visuales, deficiencias motoras, fatiga, dolor y déficits cognitivos (31).

Se sabe que la EM es una enfermedad ocasionada por linfocitos autorreactivos de origen aún desconocido. Las terapias que existen actualmente tienen como objetivo disminuir la infiltración de células inmunes desde la periferia hacia el SNC, se utilizan drogas de amplio espectro inmuno-modulatorias que son efectivas reduciendo las recaídas, pero no logran detener la enfermedad y, además, presentan diversos efectos secundarios. La EM es, principalmente, mediada por linfocitos T. Sin embargo, recientemente los linfocitos B tomaron el foco de atención debido al éxito de las terapias dirigidas contra estas células y la evidencia experimental emergente de la existencia de un rol directo de los linfocitos B más allá de la producción de anticuerpos (31,34).

Actualmente, se ha demostrado que la función como APC de los linfocitos B es crucial para la inducción de EAE (el modelo experimental para la EM) provocada por el péptido *myelin oligodendrocyte* (MOG). Esto se logró a través de ratones transgénicos con una diferencia selectiva de MHC Clase II en linfocitos B. Los linfocitos B en este modelo podían producir anticuerpos, pero no podían estimular a otras células como los linfocitos T, esta reducida capacidad estimuladora generó que los animales fueran resistentes a la EAE (34).

A pesar de la EAE se desarrolló como una enfermedad autoinmune mediada por células T luego de la inducción con un antígeno foráneo, es considerada un modelo aceptable para estudiar la EM, que por el contrario surge de manera espontánea en los humanos. La Tabla 6 muestra la comparación de ambas enfermedades según ciertos parámetros inmunológicos normalmente controlados.

Tabla 6.- Comparación del modelo experimental EAE con la enfermedad de EM. (2)

	<i>EAE</i>	<i>EM</i>
<i>Recaídas y parálisis crónica</i>	Si	Si
<i>Demielinización en el SNC</i>	Si	Si
<i>Vínculo MHC de clase II</i>	Si	Si
<i>Presencia de células CD4+T en lesiones inflamatorias perivasculares</i>	Si	Si
<i>Patogenesis mediada por células T</i>	Si	No se sabe
<i>Autoantígenos causantes</i>	MBP, PLP	No se sabe
<i>Enfermedad espontánea</i>	No	Si

Panorama de la Esclerosis múltiple en el Perú

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la prevalencia de la EM a nivel mundial es de 30 afectados por cada 100 000 habitantes, dicha prevalencia se ve afectada por el factor demográfico, siendo que las regiones que poseen una mayor prevalencia son aquellas posicionadas en el norte, como Norte América con 140 afectados por cada 100 000 habitantes y Europa con 108 afectados por cada 100 000 habitantes (zonas de alta prevalencia). En el hemisferio sur, específicamente en Sudamérica la prevalencia disminuye, siendo que la prevalencia en Perú (Lima) es de 7.6 afectados por cada 100 000 habitantes (zona de baja prevalencia) (35,36).

La característica clínica de la enfermedad más recurrente se da con brotes de disfunción neurológica que son seguidos por una recuperación total o parcial, este tipo de manifestación se denomina Esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR), que afecta al 80% de la población y en mayor proporción a mujeres (36).

Los síntomas que se presentan con mayor frecuencia al inicio de la EM son: neuritis óptica (36%), síntomas motores (35%) y síntomas sensitivos (33%), en el

transcurso de la enfermedad pueden sumarse otras condiciones como: síntomas cerebelosos (49%), sensitivos (47%) y compromiso de esfínteres (42%) (35,36).

2.1. Etiología de la Esclerosis Múltiple

Los estudios realizados sobre esta patología adjudican como principal factor desencadenante, a la activación de los linfocitos T CD4⁺ autorreactivos, específicamente a los linfocitos T_{H-1}. Sin embargo, se conoce que el daño en los axones es propio de la acción conjunta de anticuerpos, linfocitos T CD8⁺ y el complemento, mientras que los linfocitos T_{H-2}, CD4⁺ reg (Células reguladoras) y NK (Natural Killer) se encargan de las redes inmunomoduladoras que pretenden combatir la enfermedad (27).

2.1.1. Factores no genéticos que podrían desencadenar la enfermedad.

Existen factores ambientales que pueden generar alteraciones en el sistema inmunológico, tales como los agentes infecciosos y el estilo de vida de las personas, que han sido propuestos como inductores o contribuyentes con el desarrollo de esta enfermedad. Los factores que se describen como contribuyentes son fenómenos observados de manera repetitiva en los pacientes con MS (27).

Uno de los factores que puede desencadenar la enfermedad es la variación en los niveles hormonales, esto se supone, debido a la observación de que las mujeres que sufren de EM durante el periodo de gestación atraviesan por un cese de recaídas, pero cuando el embarazo termina los índices de recaídas incrementan. Además, niveles elevados de estradiol y bajos de progesterona tienen una correlación con actividad MRI (*Magnetic resonance imaging*) de la enfermedad. A pesar de que no se conoce el mecanismo que relaciona la secreción de hormonas sexuales con la EM, existe una relación entre los factores estimuladores de la secreción de estrógenos y la secreción de citoquinas proinflamatorias (1,27).

Por otro lado, la contribución del factor ambiental de ubicación de la población genera una gradiente de prevalencia de norte a sur, esta gradiente no

se puede sustentar sólo con las características genéticas de los habitantes, pues existe la influencia de las actividades de migración y de la exposición a los rayos UV de acuerdo con las zonas. Se puede decir que la falta de luz solar puede inducir un exceso de melatonina que exagera las respuestas de los linfocitos T_{H1} , linfocitos vinculados a las respuestas proinflamatorias en la enfermedad. Otro de los factores estudiados es el factor geográfico que se ve influenciado por el desarrollo socioeconómico de la población, la industrialización, el urbanismo, la contaminación, los cambios en la dieta e incluso los hábitos como el fumar. De esta manera, se explica por qué el “factor higiene” puede ser un desencadenante de la enfermedad, pues zonas con poco o limitado contacto a agentes patológicos desarrollan un sistema inmunológico mermado, que podría ser fácilmente susceptible de fallas inmunológicas (27).

2.1.2. Agentes infecciosos que podrían desencadenar la EM

El origen y las razones de la activación de los linfocitos T autorreactivos aún no se conocen en su totalidad, pero se sostiene dentro de las teorías que el antígeno que genera esta activación podría estar relacionado a agentes infecciosos que hayan entrado en contacto con el huésped. Aquellos virus patógenos que generan una infección persistente como el herpesvirus o los retrovirus son agentes candidatos que han sido estudiados entre los posibles candidatos. Dentro del grupo de herpesvirus las especies más estudiadas son el HHV – 6 (*Human herpesvirus 6*) y el EBV (*Epstein – Barr virus*) que comparten como características neurotropismo, naturaleza ubicua e infección latente y recurrente. La EM puede también verse inducida o exacerbada por infecciones microbianas, estos agentes son mayormente patógenos y ubicuos altamente prevalentes en la población como *Chlamydia pneumoniae* (27).

2.1.3. Mecanismo de acción de los agentes infecciosos

Los agentes infecciosos pueden actuar mediante dos mecanismos para ocasionar la EM, que son la mímica molecular (*molecular mimicry*) y la activación testigo (*bystander activation*) (27).

Durante la selección en el timo, los linfocitos T que reconocen complejos MHC y antígenos propios con afinidad moderada son seleccionados positivamente, luego son exportados a la periferia donde madurarán reconociendo antígenos foráneos, pero prevaleciendo como posibles linfocitos autorreactivos. Cuando sean activados migrarán hacia la BHE, se infiltrarán en el cerebro, reconocerán un antígeno propio del tejido cerebral generando daño y posibles enfermedades autoinmunes. Esta posible activación puede generarse por reactividad cruzada, la característica principal del mecanismo de la mímica molecular (24).

De esta forma, la mímica molecular se daría cuando se produzca una infección en el SNC con un patógeno con un epítipo (fragmento de un antígeno) mímico o similar al de un autoantígeno de mielina, de tal manera que puede inducir reactividad cruzada en respuesta a linfocitos T autorreactivos (27).

Otra forma en la que los agentes patógenos pueden desencadenar la EM es mediante la activación testigo, que puede clasificarse en dos categorías: La activación de linfocitos T autorreactivos de manera independiente al TCR es la primera, donde los péptidos propios del huésped no se unen al TCR, sino que, a una molécula similar, el TLR (*Toll-like receptor*), esto desencadena una respuesta inmune que incrementa la expresión de citoquinas y especies reactivas de oxígeno activando así a APCs y linfocitos T autoreactivos. El develado del antígeno huésped y el efecto auxiliar de agentes infecciosos en APCs es otra de las formas donde, los linfocitos T específicos para algún virus viajan hasta el lugar de la infección, reconocen el epítipo del patógeno y destruyen a las células huésped que fueron infectadas, liberando así auto antígenos que, posteriormente con la ayuda de agentes infecciosos en una nueva activación de linfocitos T autorreactivos, podrían desencadenar un ataque autoinmune (27,37).

2.1.4. Linfocitos T autorreactivos

Los linfocitos T están comúnmente relacionados con la enfermedad ya que en las etapas tempranas de la EM son las primeras células en observarse. Además las evidencias genéticas de la asociación del HLA con la enfermedad

reflejan que existe la presentación de un auto-antígeno del SNC en los linfocitos T autorreactivos (31).

Cómo la desmielinización es un factor clave de la enfermedad, se postula que los auto-antígenos involucrados en la autoinmunización son las siguientes proteínas de naturaleza diversa que se encuentran en el SNC, la MBP (*Myelin basic protein*), PLP (*Proteolipid protein*) y MOG (*myelin oligodendrocyte*) (38).

Normalmente en la EAE, los linfocitos T CD4⁺ sufren una estimulación que les permite infiltrarse en el cerebro, donde son re-activadas mediante la presentación de un antígeno propio del organismo por las APCs, incluyendo entre estas a las células dendríticas DC11b⁺, esto resulta en inflamación y reclutamiento de monocitos al SNC. Bajo este panorama los linfocitos T_{H1} y T_{H17} son los subgrupos más implicados en la enfermedad (39).

Los linfocitos T CD8⁺, por otro lado, se encuentran en mayor frecuencia en las lesiones corticales que se producen en la materia blanca y gris del SNC, la frecuencia de estos linfocitos es proporcional con el daño axonal ocasionado. Este tipo de linfocitos son fácilmente activadas por un mecanismo denominado *epitope spreading*, donde las células que fueron previamente infectadas propagan los antígenos patógenos al morir por apoptosis, ocasionada por células dendríticas derivadas de monocitos del SNC (40).

2.1.5. Linfocitos B Autoreactivos

Los linfocitos B vinculados a la EM son aquellos que pueden encontrarse en las meninges, parénquima y LCR; así también como linfocitos B intratecales que producen anticuerpos detectables en el LCR empleadas como mecanismo de diagnóstico para diversas enfermedades neurológicas (31).

En una de las fases de la EM, la fase progresiva secundaria es común encontrar estructuras linfoides terciarias de agregados de células B plasmáticas, linfocitos B, linfocitos T y DCs foliculares; esta es una característica de enfermedades inflamatorias o procesos infecciosos de largo periodo (41,42).

Aún es materia de especulación el mecanismo que desencadena la activación de los linfocitos B, así como su selección, afinidad y maduración; debido a la ausencia de un antígeno causante conocido.

2.1.6. Células regulatorias defectuosas

La aparición y el efecto de los linfocitos T y B autorreactivos en EM puede deberse en parte a las funciones defectuosas de las células inmunológicas regulatorias como la T_{reg}FOXP (linfocitos regulatorios T CD4+). Una teoría propone que en vez de ocasionar una adecuada eliminación periférica de linfocitos T efectores, son las células reguladoras defectuosas las que activamente se vuelven resistentes a los mecanismos supresivos (43).

Se piensa que la neurodegeneración en la EM es la culminación de una cascada de eventos producidos en axones y neuronas debido al estrés oxidativo, las deficiencias energéticas, los desbalances iónicos y la falla de mecanismos neuroprotectores, pero estos procesos son a su vez exacerbados por la inflamación crónica ocasionada por la acción de linfocitos que se vuelven residentes del CNS o ya lo son. Se ha vuelto aparente que las células que residen en el SNC que sienten perturbaciones homeostáticas, mayormente microglía y astrocitos, pueden también producir un rango de mediadores inflamatorios neurotóxicos que promueven y mantienen el daño neuronal (44).

En modelos de EAE se observa que, al inicio de la enfermedad, los macrófagos son las células que dan inicio al proceso de desmielinización, mientras que la microglía se encarga de la limpieza de la debris celular ocasionada, esto podría interpretarse como un ejercicio neuroprotector en ellas (45).

De manera contraria, las neuronas sanas constantemente expresan inhibidores que bloquean la capacidad fagocítica de la microglía, lo que implica que, si no son controladas, estas podrían provocar daño en el tejido cerebral (46).

2.1.7. La EM afecta la vaina de mielina

La vaina de mielina es particularmente vulnerable a productos no específicos como citoquinas citotóxicas, excitotoxinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) o especies de óxido nítrico que son normalmente liberadas por macrófagos y microglía activa. Actualmente el diagnóstico de la EM depende de la MRI empleando gadolinium, un agente de contraste que resalta las lesiones activas (47). En la tabla 7 pueden observarse algunas características de las proteínas más importantes presentes en el SNC, vinculadas a la enfermedad.

Tabla 7.- Características de las proteínas vinculadas a la EM (27).

<i>Proteína</i>	<i>Característica</i>
<i>Proteína básica de Mielina - Myelin Basic Protein (MBP)</i>	Es la segunda proteína más abundante en la vaina de mielina con un 40% de presencia. Fue la primera en emplearse para el modelo EAE.
<i>Proteína Proteolípido - Proteolipid Protein (PLP)</i>	Es la proteína de mielina más abundante es posible encontrarla en un 50% de las estructuras neuronales
<i>Glicoproteína Mielina Oligodendrocito - Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG)</i>	Prevalece con un 0.05% de existencia en la mielina, sólo se encuentra en la superficie externa de la membrana de los oligodendrocitos. Debido a su ubicación es accesible a anticuerpos y se piensa que es un factor importante en las respuestas inmunes humorales y celulares. No se encuentra en nervios periféricos sólo en el cerebro y la médula espinal.

2.2. Tipos de Esclerosis múltiple

2.2.1. Desarrollo y aparición de los tipos de EM.

La enfermedad suele iniciarse con la fase de *Relapsing-remitting Multiple Sclerosis* (RRMS) donde ocurren daños activos de desmielinización que luego

son seguidos por periodos de descanso, que nuevamente se ven afectados por recaídas con la aparición de nuevas lesiones o la activación de lesiones antiguas (47).

La fase de RRMS es seguida por una fase ininterrumpida de progresión de la enfermedad llamada *Secondary Progressive Multiple Sclerosis* (SPMS) (47). Sin embargo, un 10 – 20% de los casos son de progresión continua de la enfermedad desde el inicio, conocido como *Primary Progressive Multiple Sclerosis* (PPMS) (29).

Diversos estudios sugieren que la EM es una entidad singular con diversos fenotipos clínicos. El paso de la fase de RRMS a SPMS parece estar relacionado al periodo de inflamación crónica prolongada en el SNC y la edad del paciente (47).

En RRMS la infiltración de células inmunológicas al SNC resulta en un daño profundo a la BHE, lo que puede ser demostrado con MRI con gadolinium. En las fases de PPMS y SPMS un ligero deterioro de la BHE puede percibirse por la fuga de proteínas del suero. Sin embargo, el daño es muy ligero como para detectarse por MRI, el proceso inflamatorio en este caso se da de manera desasociada a la BHE ya que las células infiltradas se encuentran alrededor de pequeñas venulas y venas (48).

2.3. Manifestaciones clínicas de la enfermedad

Los signos patológicos de la EM son inflamación, desmielinización, remielinización, neurodegeneración y formación de cicatrices gliales que ocurren de manera focal o difundida a través de la materia gris o blanca en el cerebro y la médula espinal. Estas características están presentes en las tres fases de la enfermedad, pero difieren y varían respecto al tiempo cuantitativa y cualitativamente (1).

Las placas que se forman en la EM están en el cerebro y la médula espinal, la materia blanca que rodea los ventrículos, nervios y tractos ópticos, cuerpo caloso, pedúnculos cerebelosos, tractos largos y región subpial de la médula y el tallo cerebral, también en la materia gris (49).

Las lesiones en la EM cuentan con poblaciones celulares infiltradas importantes de linfocitos T y macrófagos perivasculares y parenquimales. La observación de la infiltración de células inmunológicas en la enfermedad sugiere que existen dos tipos de inflamación en las lesiones activas, la respuesta inicial, mayormente la activación de linfocitos T CD8+ y microglía y el reclutamiento secundario de linfocitos T, B y macrófagos como consecuencia de la destrucción de la mielina (47).

3. Interacción de linfocitos T y B en Esclerosis Múltiple.

Durante el desarrollo de la enfermedad, la activación inicial de los linfocitos T CD4+ *in vivo* requiere previamente la aparición de dos señales celulares, la primera es una señal de unión a través del TCR provista por el MHC Clase II y la segunda señal requiere de moléculas co-estimuladoras en la forma de ligando CD28 y moléculas B7, moléculas que normalmente se encuentran en la membrana celular y son expuestas a la superficie cuando la primera señal es recibida. Estas señales son provistas por una APC. Actualmente se sabe que esta conexión genera una retroalimentación en las APC que puede excitar o inhibir la interacción. Muchas veces una mala interacción puede ocasionar que los linfocitos entren en un periodo de inactivación, también llamado anergia (50).

La contribución de los linfocitos B como APC interactuando con linfocitos T CD4+ es aún controversial, ya que esta interacción depende del estado de ambos linfocitos. Cuando están ambos inactivados, la interacción no resulta.

Los linfocitos B como APCs inactivos no expresan de manera suficiente las moléculas de MHC Clase II o no expresan las moléculas co-estimuladoras, que también son necesarias para la generación de la primera señal. Sin activación los linfocitos T tampoco pueden expresar en su superficie la molécula CD40L, molécula complementaria que solo es expresada por linfocitos T activas (50).

En cambio, los linfocitos T que fueron activadas previamente por otras APCs son menos exigentes para interactuar con un MHC Clase II y ya expresan el CD40L, lo que facilita la interacción con los linfocitos B. Sin embargo, los linfocitos B pueden activar linfocitos T *naive*, si previamente tuvieron contacto con componentes bacterianos como LPS, expresando niveles más altos de MHC Clase II y moléculas estimuladoras B7 (50).

3.1. Tratamiento de la Esclerosis múltiple y la terapia de depleción de linfocitos B (BCDT).

Varias terapias contra la MS han sido desarrolladas considerando que los linfocitos T CD4+ T_{H1} eran los principales mediadores, de tal manera que sustancias supresoras de los mismos como IFN β y glatiramer acetato han sido empleadas normalmente. También se han desarrollado terapias que reducen las recaídas, pero no previenen completamente la ocurrencia de exacerbaciones o el deterioro progresivo (51). Métodos inefectivos por lo tanto contra las formas progresivas de la EM.

Los linfocitos B y sus mecanismos humorales, tenían previamente la función de ser empleados para el diagnóstico, específicamente en la EM se constataba la presencia de bandas oligoclonales de los mismos en el LCR y el incremento de la síntesis de IgG intratecal. Además, las células B plasmáticas y de memoria pueden ser encontradas en las lesiones y en el LCR de los pacientes con EM, esto servía como evidencia de la enfermedad, acompañado de anomalías en la producción de citoquinas (51).

Uno de los tratamientos más empleados es mediante el Rituximab®, que es un anticuerpo monoclonal quimérico construido para eliminar a los linfocitos B CD20+ mediante una combinación de efectos citotóxicos celulares y del complemento para promover apoptosis en ellos. Las células plasmáticas no son un objetivo del Rituximab® por lo que luego de su aplicación, los niveles de anticuerpos totales no se vieron afectados. Ya que el marcador CD20 no se expresa en linfocitos plasmáticas (productoras de anticuerpos) y en células madre (52).

Los linfocitos B maduros y las células B plasmáticas son observados frecuentemente en lesiones activas inflamatorias de la EM, donde también anticuerpos específicos de mielina se detectan en el área de desmielinización del SNC. Esto ocasionó que la actividad humoral de los linfocitos B, sea un objetivo terapéutico motivando a su vez la depleción de estas células con anti-CD20. Sin embargo, se encontró que existe también una función celular en los linfocitos B en la EM, como APCs (53).

Los linfocitos B pueden desempeñar múltiples funciones en la EM ya que participan en el transporte del antígeno (54), son APCs (55) y también actúan como células regulatorias. Eliminar la capacidad de APCs en los linfocitos B puede frenar la activación de los linfocitos T y con eso las manifestaciones clínicas e histológicas de la autoinmunidad del SNC (56).

Los pacientes que fueron sometidos a BCDT demostraron que existe una disminución selectiva de marcadores citoquímicos como CXCL13 y CCL19 y no la disminución general de quimiocinas inflamatorias como se había pensado, demostrando así que la liberación de quimiocinas y anticuerpos no es la única forma en la cual los linfocitos B pueden reducir el tráfico de las células inmunes al SNC (51).

Al eliminar a los linfocitos B en pacientes con EM se esperaba confirmar que eran anticuerpos autoinmunes los que exacerbaban las lesiones en la mielina y definir mejor su rol patogénico. Sin embargo, el daño cesó luego de esta depleción, generando un nuevo paradigma en la enfermedad. Una de las explicaciones más certeras fue que los linfocitos eliminados, linfocitos B de la periferia, del tejido linfático o quizá incluso aquellos del SNC tenían un rol patogénico más relevante.

4. Linfocitos 4BL

La paradoja del retardo de crecimiento de los tumores en las personas de avanzada edad llevó a los investigadores al descubrimiento de un nuevo grupo de células, las células 4BL que estimulaban a los linfocitos T CD8+ productores de Granzima B, de tal manera que esta citoquina ocasionaba el retardo del crecimiento

de los tumores. El paso de la edad afecta la distribución de las células inmunológicas debido al descenso de la linfopoiesis, el grupo de linfocitos B maduros de memoria con contacto previo a un antígeno es mayor al grupo de linfocitos B *naive*. El proceso de envejecimiento afecta de manera similar a los linfocitos T, permitiendo que aquellos que poseen memoria sean los más abundantes, respondiendo de manera muy sensible a un estímulo pequeño y secretando factores citotóxicos como perforinas y granzima B (GrB). Bajo esta premisa se descubrió que los linfocitos antitumorogénicos T CD8⁺ pueden ser inducidos cuando los linfocitos B reguladores se convierten en linfocitos activadores que expresan un ligando específico, el 4-1BBL (5). De manera similar los macrófagos y las células dendríticas expresan 4-1BBL, este ligando puede expresarse de manera transitoria en linfocitos B cuando se estimula el B-cell receptor (BCR) y el CD40 (6).

Se descubrió entonces un nuevo grupo de linfocitos que se acumulan en el envejecimiento de los mamíferos, este nuevo grupo fue denominado con células 4BL (*4-1BBL+ B cells*). Se cree que derivan de linfocitos B de memoria expuestos previamente a un antígeno propio, generando preferencia por ellos. Las células 4BL expresan en su superficie HLA-I, la molécula co-estimuladora CD86 y 4-1BBL (CD137L). El Receptor 4-1BB (CD 137) se expresa en las células natural killer (NK), linfocitos T y células dendríticas (DCs) del bazo. La acumulación de estas células no es un proceso exclusivo de la edad, sino que puede ser inducido (5).

Se sabe que las células 4BL activan a los linfocitos T CD8⁺ pero no se conoce los antígenos que se encuentran envueltos en la inducción. El estudio realizado en las células de tejidos adultos sugiere las células 4BL pueden participar también en la acumulación de T CD8⁺ en enfermedades como artritis reumatoide, esclerosis múltiple y diabetes tipo 1, enfermedades que responden a un nivel bajo de estímulo y que secretan perforinas y GrB.

En la búsqueda del origen de las células 4BL se descubrió el mecanismo por el cual podrían activarse y que derivaban de linfocitos B1a. El envejecimiento genera un desequilibrio en contra de la linfopoiesis y a favor de la mielopoiesis,

generando la acumulación de monocitos y macrófagos que expresan citoquinas proinflamatorias como TNF α e IFN γ . Las células B1a son las productoras primarias de los anticuerpos, estas se producen en la médula ósea y se reduce su producción luego del nacimiento. Sin embargo, se observó que cuando un mamífero envejece su frecuencia se incrementa en el bazo (6).

Entonces se descubrió que las células 4BL no fueron inducidas por el envejecimiento sino por la estimulación de células mieloides provenientes de personas de mayor edad. Estas células primero indujeron el BCR y el CD40 generando la expresión de 4-1BBL, IFN γ R1 y TNF α en las células B1a. Luego del acoplamiento del 4-1BBL y el IFN γ R1 las células B1a expresaron TNF α y CD86. Las células 4BL resultantes emplearon el TNF α para inducir linfocitos T CD8+ mediante el TNFR2 y el CD86 para producir GrB (5).

La esclerosis múltiple se relaciona generalmente con la actividad de los linfocitos T y su comportamiento anormal como principal causante. Sin embargo, la terapia emergente que emplea anticuerpos monoclonales anti – CD20 para eliminar los linfocitos B y restringir su actividad celular en la EM (BCDT) trajo a discusión nuevas teorías sobre el rol de los linfocitos B en la EM. Los resultados observados gracias a la BCDT reforzaron la hipótesis sobre la existencia de un rol más protagónico para este tipo de linfocitos, sobre todo respecto a su respuesta inmune celular (51).

La necesidad por dar respuesta a esta nueva interrogante permitió mediante diversos estudios, identificar un subgrupo específico de linfocitos B humanos que producen citoquinas pro-inflamatorias, este tipo de linfocitos incrementan su frecuencia en la EM y tienen la capacidad de activar a las células mieloides con un perfil pro-inflamatorio, demostrando que poseen un rol importante en la patogenicidad de la enfermedad (3).

Esta investigación fue la que abrió las puertas para postular que los linfocitos B son elementos críticos al momento de desarrollar lesiones inflamatorias en la EM, pero también para precisar que su funcionalidad no se limita a la producción de

anticuerpos. Diversas investigaciones luego permitieron demostrar que los linfocitos B eran necesarios para facilitar el paso de los linfocitos T desde la periferia hacia el SNC, además de influenciar en la producción de citoquinas (57).

5. Fundamentos técnicos

5.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una de las técnicas más empleadas en el campo de la biología molecular, ya que su uso permite amplificar secciones específicas de ADN empleando la muestra de ADN a multiplicar, de oligonucleótidos específicos para las secciones iniciales y finales del segmento (*primers*), desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs), magnesio como cofactor enzimático, un ciclo térmico y la enzima polimerasa.

El proceso de amplificación se compone de diversos ciclos que aumentan o disminuyen según la cantidad de material que se quiera obtener al final. Sin embargo, cada ciclo se compone de 3 pasos básicos descritos en la Tabla 8.

Tabla 8.- Procedimiento de una PCR convencional. (58)

<i>Paso</i>	<i>Temperatura, °C</i>	<i>Tiempo, min</i>	<i>Descripción</i>
<i>Desnaturalización</i>	95	1	Se expone las bases nitrogenadas al desenrollarse la doble cadena de ADN.
<i>Alineación</i>	40 – 60	1 – 5	Los primers se unen al ADN molde y son la base para la creación de las nuevas cadenas.
<i>Extensión</i>	72	1 – 2	La polimerasa inicia su trabajo de extensión al encontrarse a temperatura óptima.

Teóricamente la PCR amplifica el DNA de manera exponencial, doblando el número de material genético presente en cada ciclo. (59) Posteriormente, se realiza la detección y cuantificación del material amplificado, esta puede realizarse por electroforesis o monitoreo visual.

5.2. Citometría de Flujo

La Citometría de flujo es un método de análisis que mide de manera rápida, específica y precisa características físicas y/o químicas de células o partículas que se encuentran suspendidas en una solución líquida.

Se basa en el principio de que al hacer pasar células en suspensión alineadas una por una delante de un haz luminoso, estas son capaces de brindar información sobre su composición y tamaño según la variación que ocasionen en este haz luminoso o la excitación que el haz genere en ellas y el fluorocromo de marcaje (60).

Finalmente, las señales luminosas que se detectan son transformadas en impulsos eléctricos que a la vez se convierten en señales digitales simples de leer a través de una computadora, brindando así la citometría de flujo tres parámetros importantes, descritos en la Tabla 9, que ayudan a describir y clasificar una célula o un grupo celular.

Tabla 9.- Parámetros que describe la citometría de flujo.

<i>Información que brinda la citometría</i>	<i>Detalle</i>
<i>Tamaño celular: Forward Scatter (FSC)</i>	Información sobre la estructura celular externa.
<i>Granulosidad celular: Side Scatter (SSC)</i>	Información sobre la estructura celular interna.
<i>Fluorescencia (FL)</i>	Información sobre el tipo celular y su marcaje.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de ejecución

1.1. Ubicación

El presente trabajo de investigación fue realizado en la Unidad Mixta de Investigación 995: Inmunidad, Inflamación y fibrosis auto y halo reactiva. En el equipo NEMESIS de Neuroinflamación y Esclerosis Múltiple.

El laboratorio se encuentra ubicado en el centro de investigación (Pôle Recherche) del Centro Hospitalario de la Universidad de Lille 2 y está asociado al Instituto Nacional de la Salud y la investigación médica de Francia (INSERM) y al Centro Internacional de Investigación sobre la Inflamación de Lille (LIRIC).
Director del Equipo: Ph. D. Lennart Mars

1.2. Actividades que realiza la Unidad

La UMR 995 se encarga de estudiar, comprender y generar nuevas terapias para las enfermedades inflamatorias autoinmunes, que se inician cuando la homeostasis del sistema inmune adaptativo se ve comprometida. Además de explorar los mecanismos moleculares y celulares de estas enfermedades.

1.3. Aspectos técnicos

a) Ubicación geográfica

Centro de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Lille 2, quinta etapa central. 1 place de Verdun, Cedex. 59 045 Lille, Cedex – Francia.

b) Plano de ubicación

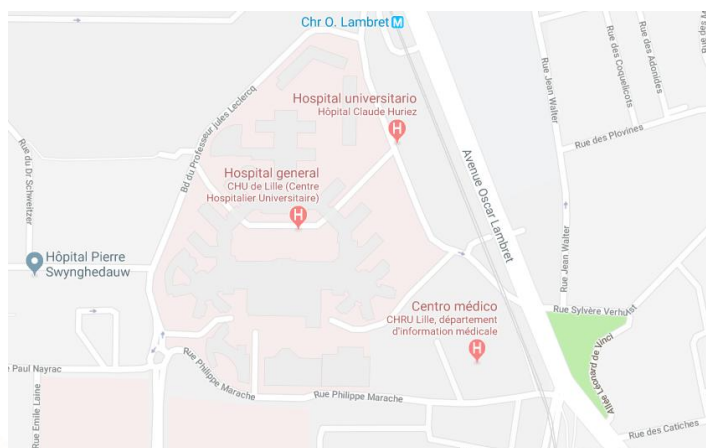


Figura 1.- Plano del Centro Hospitalario para la ubicación del UMR 995 en el Centro de Investigación. Fuente: Google maps

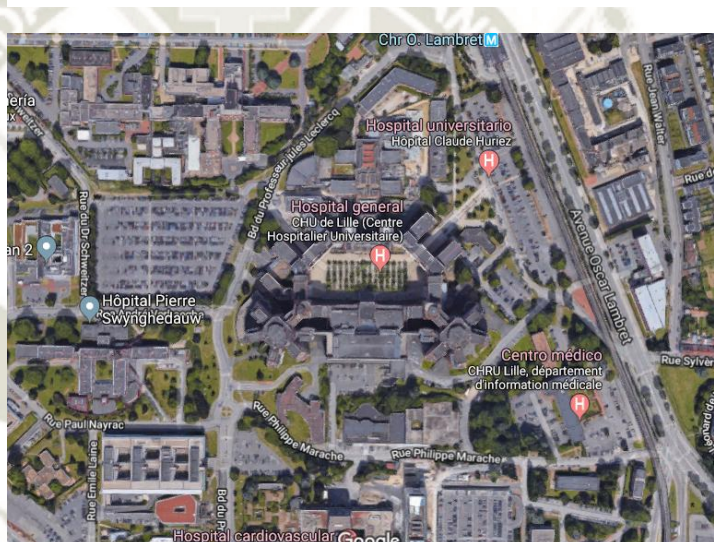


Figura 2.- Toma satelital del plano del Centro Hospitalario. Fuente: Google maps

1.4. Área

Equipo 3, NEMESIS: Neuroinflamación y Esclerosis múltiple. Dirigido por: Lennart Mars, Ph. D. Tutoría: Catalina Lee – Chang, Ph.D.

a) Funciones del área

Investigar la patofisiología y el tratamiento de la inflamación en el cerebro, con un particular interés en la Esclerosis Múltiple. El laboratorio se encarga así de:

- ❖ Identificar los factores fisiopatológicos claves de las patologías inflamatorias.
- ❖ Estudiar biomarcadores de diagnóstico y el seguimiento de las enfermedades inflamatorias.
- ❖ Desarrollar nuevos tratamientos químicos, de terapias celulares, de estrategias terapéuticas inmunológicas.

2. Material Experimental

2.1. Material biológico

- ❖ 16 ratones hembras C57/B16 de 16 semanas. (*wild type*).
- ❖ 3 ratones hembras C57/B16 de 16 semanas. (heterocigotos).
- ❖ 12 ratones hembras C57/B16 de 16 semanas. (*knock – out*).

2.2. Reactivos

- ❖ MgCl₂ 1mM
- ❖ dNTPs 200 μM
- ❖ Taq polimerasa
- ❖ Tampón de lisis buffer ACK, Thermofisher®.
- ❖ Anti – inmunoglobulina M (1mg/mL).
- ❖ Anti CD40 (1mg/mL).
- ❖ Anti – CD3 (3ul/mL).
- ❖ PMA, Sigma®.
- ❖ Ionomicina Iono, Sigma®.
- ❖ Brefeldina A, GolgiPlug.
- ❖ Buffer de Fijación y Permeabilización, Sigma®.
- ❖ MOG.
- ❖ CFA.
- ❖ Tóxina Pertussis.
- ❖ Medio RPMI, Gibco™
- ❖ Azul de tripán, StemCell™

2.3. Anticuerpos

- ❖ IgM conjugada con FITC (II/41), eBiosciences®.
- ❖ CD119 conjugada con Streptavidina PercP (2E2), BioLegend®.
- ❖ CD19 conjugada con BV 605 (1D3), BD Bioscience.
- ❖ 4-1BBL conjugada con PE (TKS-1), BioLegend®.
- ❖ IFN γ conjugado con PB (XMG1-2), BioLegend®.
- ❖ T-bet conjugado con BV711 (4B10), BioLegend®.
- ❖ TNF α conjugado con BV785 (MPG-XT22), BioLegend®.
- ❖ IL – 10 conjugado con PE/TR (JES5-16E3), BioLegend®.
- ❖ CD8b conjugado con FITC (eBioH35-17.2), eBioscience®.
- ❖ CD19 conjugado con PE-Cy-5 (6D5), BioLegend®.
- ❖ T-bet conjugado con Brilliant Violet (711 4B10), BioLegend®.
- ❖ IL17A conjugado con Brilliant Violet 650 (TC11 18H10.1), BioLegend®.
- ❖ TNFa conjugado con Brilliant Violet (785 MP6-XT22), BioLegend®.
- ❖ INF γ conjugado con Pacific Blue (XMG1.2), BioLegend®.
- ❖ IL10 conjugado con PETR (JES 5-16 E3), BioLegend®.
- ❖ Granzima B conjugado con APC (BG11), BioLegend®.
- ❖ RORgt conjugado con PE (AFKJS-9), eBioscience®.

2.4. Material de vidrio

- ❖ Cámara de conteo Thoma, Zuzi®
- ❖ Tubos de ensayo Falcon 10 mL, EasySep™
- ❖ Homogeneizador Pitorro de boro silicato.

2.5. Material desechable

- ❖ Filtro de 70 μ m FisherBrand™.
- ❖ Tubos cónicos de 50 y 20 mL Falcon™.
- ❖ Pipetas pasteur de 1 mL FisherBrand™.
- ❖ Jeringas de plástico de 1 y 10 mL FisherBrand™.
- ❖ Microplaca de 96 pocillos de fondo redondo de Greiner Bio – One™.
- ❖ Microplaca de 12 pocillos de fondo redondo de Greiner Bio – One™.

2.6. Kits

- ❖ Kit de aislamiento para células B de ratón EasySep de Stemcell™.
- ❖ Kit de aislamiento para células T CD8+ de ratón EasySep de Stemcell™.
- ❖ Kit de aislamiento para células T totales de ratón EasySep de Stemcell™.

2.7. Equipos

- ❖ Imán para tubos de ensayo EasySep™
- ❖ Microscopio óptico Leica DMi8.
- ❖ Micropipetas de 10 uL, 200 uL, y 1000 uL.
- ❖ Cabina de Baño María.
- ❖ Incubadora.

3. Metodología

El estudio presentado es una investigación netamente experimental, desarrollada a partir de tres pruebas experimentales donde se analizan las variables de proliferación celular, expresión de 4-1BBL, expresión de citoquinas (INF γ , TNF α , Granzima B, IL10 y IL17) comparando tres grupos experimentales KO, WT y HT.

3.1. Comparación de los procesos de estimulación del ligando 4-1BB en linfocitos B esplénicos.

a) Caracterización del genotipo de ratones según el gen del ligando 4-1BB por PCR.

Tres genotipos diferentes fueron considerados para la evaluación del ligando 4-1 BB en los diferentes experimentos del presente estudio. Se emplearon ratones hembra C57 Black/6 de 16 semanas de edad en todos los experimentos realizados.

Se efectuó la caracterización genética mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en conjunto con electroforesis en gel para la evaluación de las bandas.

Los genotipos evaluados fueron ratones de tipo *wild type* (salvaje sin modificaciones genéticas), *heterocigoto* (cruce de ratones modificados con ratones salvajes) y *knock – out* (ratones que carecían en su secuencia los genes para expresar el ligando 4-1BB).

La PCR fue realizada bajo las siguientes condiciones; MgCl₂ (1mM), dNTPs (200µM), Taq polimerasa (0,2 µL/pocillo), ADN base (1 µL/pocillo) y como primers las secuencias:

- BBL-1B: CACTGACCGACCGTGGTAATG.
- NEO3-64: GACATAGCGTTGGCTACCCGTG.
- BBL-3: AGCCCGGTATCTCTGAGGAG.

Luego, 35 ciclos fueron efectuados según las condiciones descritas en la Tabla 10, se muestran además las condiciones previas y posteriores que sólo se repitieron una vez.

Tabla 10. – Condiciones de PCR utilizadas para cada ciclo

<i>Proceso</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
<i>Activación enzimática</i>	3 minutos	94°C
<i>Desnaturalización</i>	30 segundos	94°C
<i>Alineación</i>	30 segundos	55°C
<i>Extensión</i>	1 minuto	72°C
<i>Hold</i>	7 minutos	72°C

Finalmente, las secuencias fueron colocadas en un gel de agarosa al 2% para la electroforesis y el posterior revelado de bandas, que fue evaluado para confirmar la diferencia de genotipos empleados.

b) Comparación de antiBCR con antiCD40 versus LPS en la estimulación in vitro del ligando 4-1BB en linfocitos B.

Fueron sacrificados doce ratones hembras que pertenecían a la misma camada (ratones congénicos) C57 Black/6 de 16 semanas de edad, seis ratones tenían el genotipo *wild type* (WT) y los seis restantes el genotipo *knock out* (KO). Se sacrificaron por dislocación cervical manual, y los bazos de cada uno fueron extraídos en condiciones estériles y conservados en medio CRPMI (RPMI completo). La Tabla 11 describe la composición del medio.

Tabla 11.- Descripción de la composición del medio CRPMI

<i>Composición RPMI Completo, 500 mL</i>	
<i>FBS – Suero fetal bovino</i>	50 mL
<i>Piruvato</i>	5 mL
<i>HEPES</i>	5 mL
<i>Aminoácidos no esenciales</i>	5 mL
<i>Penicilina/Estreptomicina</i>	5 mL
<i>Glutamina</i>	5 mL
<i>β-Mercaptoetanol</i>	5 mL
<i>Medio de cultivo RPMI</i>	420 mL

Los bazos fueron triturados por separado en una campana PSM (Puesto de seguridad microbiológica) Clase II utilizando como solución homogeneizadora medio RPMI, el contenido resultante fue filtrado usando un filtro Fisher Brand de 70 μ m de poro.

La obtención de los esplenocitos se llevó a cabo empleando una concentración 1:2 de tampón de lisis ACK *lysis buffer* de ThermoFisher® para la eliminación de los glóbulos rojos. Y posteriormente, se realizó el conteo de las células restantes con el fin de conseguir una concentración de 2×10^6 células/mL. El conteo se realizó con una cámara Thoma® en un microscopio óptico invertido.

Luego, para el aislamiento de los linfocitos B de cada población, se utilizó el kit *Mouse B Cell Isolation kit EasySep* de Stemcell™ con medio CRPMI como buffer, las células fueron seleccionadas positivamente con billas magnéticas del kit en una columna imantada. Nuevamente se realizó un conteo celular y las células se concentraron a 2×10^6 células/mL.

Estimulación del ligando 4-1BB

Los linfocitos correspondientes a cada población fueron colocados en placas de 12 pocillos, donde se incubaron con dos tipos de soluciones estimulantes anti BCR junto con anti CD40 y LPS.

Se trabajó con una concentración de 1 millón de células por mL, 3 subgrupos de cada población fueron colocados en los pocillos, para cada uno de los siguientes tratamientos:

- WT estimulado con aBCR (1mg/mL) y aCD40 (1 mg/mL).
- KO estimulado con aBCR (1mg/mL) y aCD40 (1 mg/mL).
- WT estimulado con LPS
- KO estimulado con LPS

En los controles de expresión de ligandos y marcadores celulares se utilizaron esplenocitos sin ningún tipo de estimulación de tipo WT para evaluar el fenotipo de las células mediante la expresión de los siguientes anticuerpos marcadores: CD25, CD119, CD19, CD138, IL17, tbet, TNF α , Marcador de viabilidad, IFN γ , 41BBL, IL10 y IL27.

La placa con ambos tratamientos fue incubada durante 48 horas en condiciones de 95% oxígeno y 5% de CO₂. Finalmente, las células 4BL activadas *in vitro* fueron confirmadas con citometría de flujo y análisis de fenotipaje.

c) Activación de funciones efectoras en linfocitos T mediante linfocitos B estimulados *in vitro* (Células 4BL)

Luego de las 48 horas de incubación los linfocitos B estimulados y activados fueron expuestos a interacción con linfocitos T CD8⁺ en proporción 1:1 con la finalidad de evaluar la capacidad de estimulación de los linfocitos B para la proliferación y liberación de citoquinas efectoras.

Se aislaron células T CD8⁺ a partir de un ratón hembra C57 Black/6 de 16 semanas de edad de tipo WT. El animal fue sacrificado por dislocación cervical manual y se extrajo el bazo, el tejido fue triturado y lisado empleando el tampón de lisis *ACK lysis buffer* de ThermoFisher®, bajo las mismas condiciones del tratamiento previo. El aislamiento se realizó empleando el kit *mouse CD8⁺T cell isolation kit EasySep* de Stemcell™. Las células fueron contadas y concentradas a 1x10⁶ células/mL.

Se emplearon dos controles, el control positivo estaba conformado por linfocitos TCD8⁺ extraídos activados *in vitro* con anti – CD3 (3uL/mL), mientras que el control negativo no contaba con activación.

Se utilizó una placa de 96 pocillos para el cultivo de células 4BL de tipo WT y KO activados con LPS y activados con aBCR con CD40, así como del grupo control, para su interacción con los linfocitos T CD8⁺. La placa se mantuvo en incubación con condiciones de 95% oxígeno y 5% de CO₂ durante 5 días.

Los tratamientos que se describen a continuación fueron realizados en tres repeticiones.

- Células T CD8+ no activadas.
- Células T CD8+ activadas.
- Células T CD8+ y B WT estimuladas con aIgM y aCD40.
- Células T CD8+ y B KO estimuladas con aIgM y aCD40.
- Células T CD8+ y B WT estimuladas con LPS.
- Células T CD8+ y B KO estimuladas con LPS.

Además, se colocaron pocillos adicionales con linfocitos de tipo WT sin ningún tipo de tratamiento para evaluar el fenotipo de las células mediante la expresión de los siguientes anticuerpos marcadores: tbet, IL17, CD8b, TNFa, CD19, IFNg, IL10 y GrB. Finalmente, las células CD8+ estimuladas *in vitro* fueron confirmadas con citometría de flujo y análisis de fenotipaje.

d) Comparación de genotipos WT, HT y KO en la estimulación *in vitro* de 4-1BBL en linfocitos B con antiBCR y antiCD40.

Fueron sacrificados nueve ratones hembras congénicos C57 Black/6 de 16 semanas de edad, cada subgrupo de 3 ratones tenía un genotipo diferente WT, HT o KO.

Se sacrificaron por dislocación cervical manual, y los bazo de cada uno fueron extraídos y conservados en medio CRPMI. El tejido de los órganos fue triturado bajo una campana PSM clase 2 utilizando como solvente RPMI. El contenido resultante se filtró.

Se empleó una concentración 1:2 de tampón de lisis ACK lysis buffer de Thermofisher® para la eliminación de los glóbulos rojos. Y posteriormente, se concentraron las células restantes a 2×10^6 /mL.

El aislamiento de linfocitos B se realizó de manera directa sobre la solución filtrada del bazo, se empleó el *Mouse B Cell Isolation kit EasySep* de Stemcell™ usando medio CRPMI como buffer.

Estimulación del ligando 4-1BB

Los linfocitos fueron colocados en placas de 12 pocillos, donde se incubaron con la solución estimulante anti BCR junto con anti CD40.

Se trabajó con una concentración de 1 millón de células por mL, 3 subgrupos de cada población fueron colocados en los pocillos, para cada uno de los siguientes tratamientos:

- WT estimulado con aBCR (1mg/mL) y aCD40 (1 mg/mL).
- HT estimulado con aBCR (1mg/mL) y aCD40 (1 mg/mL).
- KO estimulado con aBCR (1mg/mL) y aCD40 (1 mg/mL).

En los controles de expresión de ligandos y marcadores celulares se utilizaron esplenocitos sin ningún tipo de estimulación de tipo WT para evaluar el fenotipo de las células mediante la expresión de los siguientes anticuerpos marcadores: CD25, CD119, CD19, CD138, IL17, tbet, TNFa, Marcador de viabilidad, IFNg, 41BBL, IL10 y IL27.

La placa con los linfocitos fue incubada durante 48 horas en condiciones de 95% oxígeno y 5% de CO₂. Finalmente, las células 4BL activadas *in vitro* fueron confirmadas con citometría de flujo y análisis de fenotipaje.

e) Activación de funciones efectoras en linfocitos T CD8+ mediante células 4BL (WT, HT y KO) estimuladas *in vitro*

Luego de las 48 horas de incubación los linfocitos B estimulados y activados fueron expuestos a interacción con linfocitos T CD8+ en proporción 1:1.

Se utilizaron células T CD8+ provenientes de un ratón hembra C57 Black/6 de 16 semanas de edad de tipo WT. Se extrajo el bazo, el tejido fue triturado y lisado empleando el tampón de lisis *ACK lysis buffer* de Thermofisher®. El aislamiento se realizó empleando el kit *mouse CD8+T cell isolation kit EasySep* de Stemcell™. Las células fueron contadas y concentradas a 1×10^6 células/mL.

Se emplearon dos controles, el control positivo estaba conformado por linfocitos TCD8+ extraídos activados *in vitro* con anti – CD3 (3uL/mL), mientras que el control negativo no contaba con activación.

Se utilizó una placa de 96 pocillos para el cultivo de células 4BL de tipo WT, HT y KO activados con aBCR y CD40, así como del grupo control, para su interacción con los linfocitos T CD8+. La placa se mantuvo en incubación con condiciones de 95% oxígeno y 5% de CO₂ durante 5 días.

Los tratamientos que se describen a continuación fueron realizados en tres repeticiones.

- Células T CD8+ no activadas.
- Células T CD8+ activadas.
- Células T CD8+ y B WT estimuladas con aIgM y aCD40.
- Células T CD8+ y B HT estimuladas con aIgM y aCD40.
- Células T CD8+ y B KO estimuladas con aIgM y aCD40.

Además, se colocaron pocillos adicionales con linfocitos de tipo WT sin ningún tipo de tratamiento para evaluar el fenotipo de las células mediante la expresión de los siguientes anticuerpos marcadores: tbet, IL17, CD8b, TNFa, CD19, IFNg, IL10 y GrB. Finalmente, las células CD8+ estimuladas *in vitro* fueron confirmadas con citometría de flujo y análisis de fenotipaje.

f) Marcaje intra y extracelular de células 4BL activadas *in vitro* y linfocitos T CD8+.

Las células en placa fueron estimuladas luego del periodo de incubación con una mezcla de PMA Sigma® (Phorbol 12 miristato 13-acetato) concentración 1/2000, Ionomicina Iono Sigma® concentración 1/1000 y Brefeldina A GolgiPlug concentración 1/1000. Las células estuvieron en contacto con la solución durante 5 horas. El Anexo III muestra disposición de los controles y marcadores en las placas de cultivo.

Marcaje para fenotipaje de células 4BL

Se realizó un marcaje extracelular empleando los siguientes anticuerpos: IgM conjugada con FITC (II/41, eBiosciences®), CD119 conjugada con Streptavidina PercP (2E2, BioLegend®), CD19 conjugada con BV 605 (1D3, BD Bioscience) y 4-1BBL conjugada con PE (TKS-1, BioLegend®), las células luego atravesaron un proceso de fijación y permeabilización con *Fixation/Permeabilization buffer* y luego fueron marcadas con los siguientes anticuerpos intracelulares: IFN γ conjugado con PB (XMG1-2, BioLegend®), t-bet conjugado con BV711 (4B10, BioLegend®), TNF α conjugado con BV785 (MPG-XT22, BioLegend®) y IL - 10 conjugado con PE/TR (JES5-16E3, BioLegend®).

Marcaje para fenotipaje de linfocitos T CD8+

Se realizó el marcaje extracelular empleando los siguientes anticuerpos extracelulares CD8b conjugado con FITC (eBioH35-17.2, eBioscience®), CD19 conjugado con PE-Cy-5 (6D5, BioLegend®) y con los anticuerpos intracelulares luego de fijación y permeabilización. T-bet conjugado con Brilliant Violet (711 4B10, BioLegend®), IL17A conjugado con Brilliant Violet 650 (TC11 18H10.1, BioLegend®), TNF α conjugado con Brilliant Violet (785 MP6-XT22, BioLegend®), INF γ conjugado con Pacific Blue (XMG1.2, BioLegend®), IL10 conjugado

con PETR (JES 5-16 E3, BioLegend®), Granzyme B conjugado con APC (BG11, BioLegend®).

3.2. Análisis de la infiltración de células inmunes B, T CD4+, T CD8+, macrófagos y microglía en el cerebro de ratones con EAE.

a) Inmunización de ratones con EAE

La inmunización se realizó en 6 ratones C57 Black/6 de tipo WT, 3 C57 Black/6 de tipo KO utilizando una emulsión de MOG, adyuvante completo de Freund (CFA) y Toxina Pertussis; el procedimiento fue realizado por el equipo de neurobiólogos a cargo de la unidad UMR 995. El proceso experimental puede verse en la Figura 3.

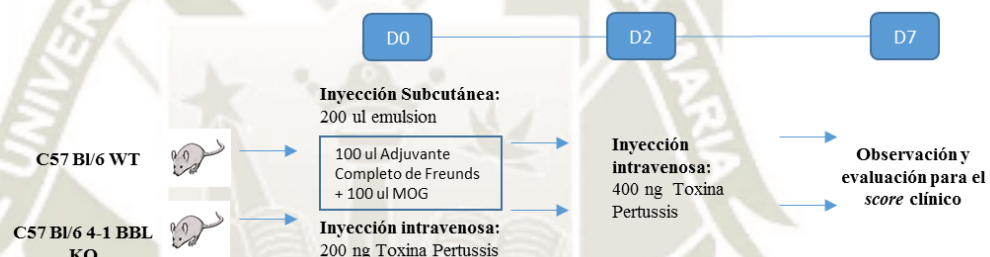


Figura 3.-Proceso de inmunización de los ratones WT y KO.

El material biológico conformado por 9 ratones fue distribuido de la siguiente manera, 3 ratones WT fueron dejados sin inmunización (WT-Naive), 3 ratones WT fueron inmunizados y 3 ratones KO fueron inmunizados. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

- Ratón WT Naive
- Ratón WT EAE
- Ratón KO EAE

En el día 0, la inmunización fue realizada colocando una inyección subcutánea de 100 uL de MOG + 100 uL de Adyuvante Completo de Freund (CFA), además de una inyección intravenosa de 200 ng de toxina Pertussis.

En el día 2 se colocó una inyección intravenosa de 400 ng de toxina Pertussis. La evaluación del score clínico se inició en el día 7 de la inducción, los ratones fueron evaluados según las condiciones descritas en la Tabla 12.

Tabla 12.- *Score* Clínico para EAE (61).

<i>Ponderación</i>	<i>Descripción sintomática</i>
0	Ratón normal, sin síntomas de la enfermedad.
1	Cola atónica o extremidades traseras débiles, pero no ambas.
2	Cola atónica y extremidades traseras débiles.
3	Parálisis parcial de las extremidades traseras.
4	Parálisis total de las extremidades traseras.
5	Estado moribundo, muerte.

b) Extracción de células inmunológicas alojadas en el tejido cerebral

Luego de 36 días, todos los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Los bazo y cerebros fueron luego recolectados por separado.

El tejido cerebral fue homogeneizado empleando un homogeneizador Pitorro de boro silicato, bajo condiciones asépticas en cámara de cultivo celular. Se empleó RPMI como solvente y las células se colocaron en una placa de 96 pocillos para su incubación en condiciones de 95% de oxígeno y 5% de CO₂ en una cámara incubadora.

c) Marcaje intra y extracelular de células infiltradas

El homogeneizado celular se colocó en una placa con 96 pocillos en un volumen de 200uL y las células se prepararon para el marcaje empleando Ionomicina, Brefeldina A y PMA.

Se realizó un marcaje extracelular empleando los siguientes anticuerpos extracelulares: IgM conjugada con FITC (II/41, eBiosciences®), CD119 conjugada con Streptavidina PercP (2E2, BioLegend®), CD19 conjugada con BV 605 (1D3, BD Bioscience) y 4-1BBL conjugada con PE (TKS-1, BioLegend®), CD8b conjugado con FITC (eBioH35-17.2, eBioscience®), CD4 conjugada con PE-Cy-5 (6D5, BioLegend®).

Las células luego atravesaron un proceso de fijación y permeabilización con *Fixation/Permeabilization buffer* y luego fueron marcadas con los siguientes anticuerpos intracelulares: IFN γ conjugado con PB (XMG1-2, BioLegend®), t-bet conjugado con BV711 (4B10, BioLegend®), TNF α conjugado con BV785 (MPG-XT22, BioLegend®) y IL – 10 conjugado con PE/TR (JES5-16E3, BioLegend®), T-bet conjugado con Brilliant Violet 711 (4B10, BioLegend®), IL17A conjugado con Brilliant Violet 650 (TC11 18H10.1, BioLegend®), INF γ conjugado con Pacific Blue (XMG1.2, BioLegend, Granzyme B conjugado con APC (BG11, BioLegend®).

3.3. Evaluación del fenotipo y de la proliferación de células T *in vivo* que interactúan con células 4BL en EAE.

a) Inmunización y extracción de linfocitos B en ratones con EAE

Se extrajeron los bazo de los ratones que fueron inmunizados con MOG, CFA y Toxina Pertussis, sacrificados luego de 36 días de evaluación.

Los bazos fueron homogenizados en CRPMI por separado según el genotipo, luego se aislaron los linfocitos B empleando el *Mouse B Cell Isolation kit EasySep* de Stemcell™.

Adicionalmente se extrajo el bazo de un ratón sano C57 Black/6 de la misma edad para extraer las células T totales, se empleó el *total T cell isolation kit EasySep* de Stemcell™. La concentración celular de linfocitos totales fue de 1×10^6 células/mL.

Una fracción de las células T totales se activó con anti – CD3 para emplearse como control de la estimulación de las células B.

b) Incubación de linfocitos B con linfocitos T

En una placa de 96 pocillos se depositaron en proporción 1:1 los linfocitos B de tipo WT con EAE, KO con EAE y WT sin EAE junto a las células T totales. De igual forma, la misma concentración se depositó en pocillos con células T activadas con anti – CD3 y células T sin activación.

c) Eliminación artificial de células 4BL en linfocitos de tipo WT

De manera especial se separó una fracción de células B de tipo WT con EAE, para realizar una depleción de las células B que expresaban el 4-1BBL (4BL) esto se realizó empleando el anticuerpo anti – CD137 y el kit *Mouse B Cell Isolation kit EasySep* de Stemcell™.

Las células 4-1BBL negativas, originadas de manera artificial, también fueron colocadas en un pocillo con células T totales, para evaluar el efecto de la eliminación del ligando en la estimulación.

De tal manera que los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

- Células T CD8+ no activadas.
- Células T CD8+ activadas.
- Células T CD8+ y B WT Naive.

- Células T CD8+ y B WT EAE.
- Células T CD8+ y B KO EAE.
- Células T CD8+ y B WT EAE – 4-1BBL.

d) Caracterización intra y extracelular

Se dejaron las células en incubación durante 5 días y finalmente se reactivaron con BA, PMA y Ionomicina, para el marcaje celular. Se dejaron incubar durante 5 horas para luego marcarlas de manera extracelular e intracelular. Se emplearon los mismos anticuerpos que en el primer experimento.

Finalmente, el conteo y caracterización celular fue realizado por citometría de flujo empleando el software FlowJo que generó los gráficos presentados en este estudio.

4. Análisis estadístico

Se evaluó la significancia de las diferencias observadas entre los grupos experimentales, para cada experimento se evaluó la normalidad en la distribución de los datos mediante la prueba de Shapiro Wilk, mientras que para evaluar la diferencia entre los grupos se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software STATA 15, donde los valores resultantes de p menores de 0.05 fueron considerados significativos. Además, cada condición experimental fue realizada en triplicado.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de los linfocitos B en el modelo animal de EAE en ratones tiene como objetivo identificar la influencia de las células 4BL en el proceso inflamatorio de la enfermedad. A pesar de que la modulación de la producción de quimiocinas es una función importante en las ellas, este no parece ser el único rol que desempeñan en la patogénesis de la enfermedad.

Los experimentos realizados permiten dar indicios del proceso bajo el cual las células 4BL son estimuladas y la acción que ejercen en linfocitos T con funciones citolíticas efectoras.

1. Comparación de los procesos de estimulación del ligando 4-1BB en linfocitos B esplénicos.

a) Caracterización del genotipo de ratones según el gen del ligando 4-1BB por PCR.

Los ratones empleados en este estudio fueron de tres genotipos distintos, WT, HT y KO, esta diferencia fue confirmada a través de una PCR simple, donde los primers utilizados caracterizaron los genotipos de la siguiente manera:

- BBL-1B: CACTGACCGACCGTGGTAATG.
- NEO3-64: GACATAGCGTTGGCTACCCGTG.
- BBL-3: AGCCCGGTATCTCTGAGGAG

Genotipo de ratón KO: BBL-3 y NO3-64 (203 pares de bases).

Genotipo de ratón WT: BBL-1B y BBL-3 (119 pares de bases).

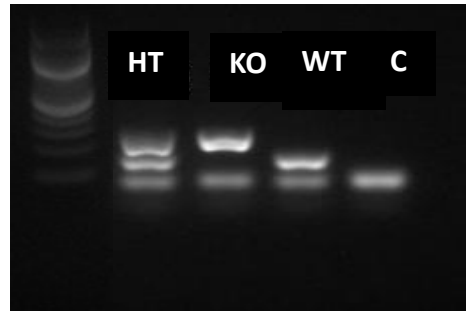


Figura 4.- PCR para evaluación de genotipos WT, HT y KO. Se muestran las diferentes posiciones de las bandas obtenidas.

Como se observa en la Figura 4 las muestras de ADN tienen un patrón distinto entre ellas, señalando que los tres genotipos son diferentes y deberían mostrar características de fenotipaje distintas.

b) Comparación de antiBCR con antiCD40 versus LPS en la estimulación in vitro del ligando 4-1BB en linfocitos B y evaluación de funciones efectoras en linfocitos T por células 4BL.

Linfocitos B provenientes de ratones WT y KO fueron estimulados empleando dos compuestos diferentes, LPS y aBCR con aCD40, la estimulación luego de 48 horas de incubación fue cuantificada.

Primero, como se observa en la Figura 5, se evaluó la capacidad de proliferación ocasionada por los linfocitos B, posibles células 4BL, en los linfocitos CD8+, mediante la cuantificación del porcentaje de proliferación por citometría de flujo. Se observa que los linfocitos B estimulados lograron porcentajes de proliferación altos en los linfocitos CD8+ para ambos tratamientos.

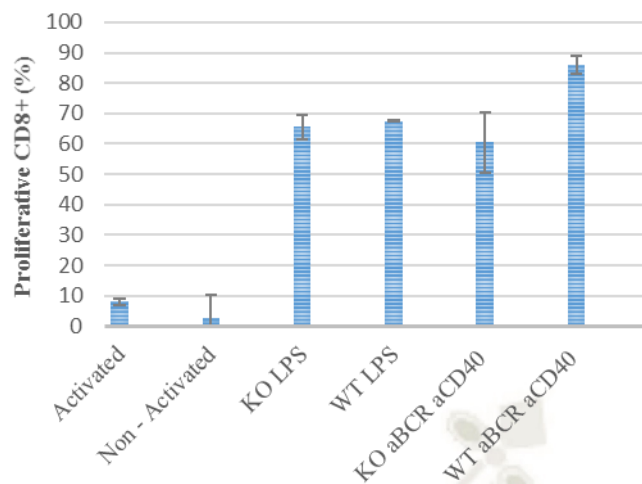


Figura 5.- Estimulación de la proliferación en linfocitos CD8+ por linfocitos B activados con LPS vs antiBCR y antiCD40. ($P=0,001$, $P<0,05$ se consideró significativa).

Los controles de linfocitos T CD8+ activados y no activados con antiCD3 muestran un contraste con la estimulación proveniente de los linfocitos B de ambos tratamientos. Se observa que existe una diferencia significativa en la proliferación según los tratamientos ($P<0,05$). Resultando que, el tratamiento en células WT con antiBCR y antiCD40 demostró tener un mayor porcentaje de proliferación. Sin embargo, dicha diferencia no se observó en el tratamiento de las células KO.

Luego, se realizó la cuantificación de los linfocitos CD8+ proliferativos que secretaron IFN γ y Granzima B al medio exterior celular (Figuras 6 y 7), como medida de activación de los linfocitos efectores. La Figura 6 muestra que existe un mayor porcentaje de expresión de IFN γ en las células WT y KO que fueron tratadas con antiBCR y antiCD40. La cuantificación también fue realizada por citometría de flujo.

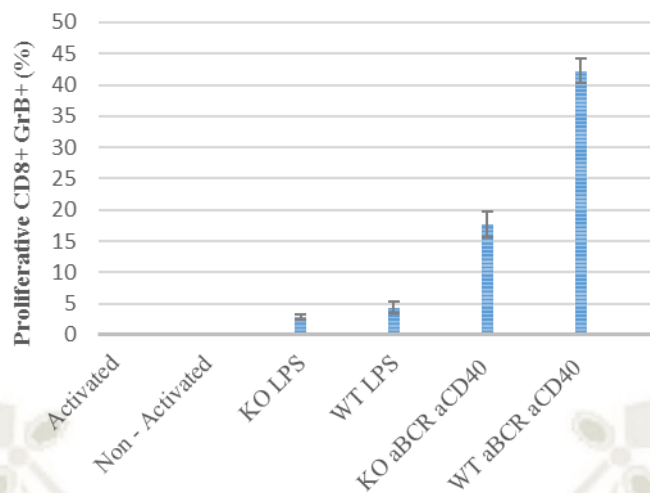


Figura 6.- Proliferación y liberación de GrB en linfocitos T CD8+ originada por linfocitos B activados con LPS vs antiBCR y antiCD40. ($P=0,0001$, $P<0,05$ se consideró significativa).

De manera similar, la Figura 7 muestra un porcentaje mayor de liberación de GrB en células estimuladas con el tratamiento de aBCR y aCD40 en comparación con la estimulación con LPS.

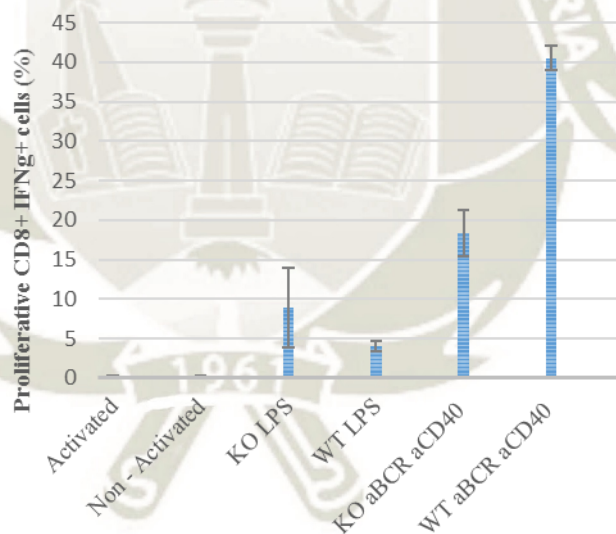


Figura 7.- Proliferación y liberación de IFN γ en linfocitos T CD8+ originada por linfocitos B activados con LPS vs antiBCR y antiCD40. ($P=0,0001$, $P<0,05$ se consideró significativa).

Los resultados de este primer experimento muestran que los linfocitos B estimulados con antiBCR y antiCD40 demuestran una mayor activación de linfocitos T CD8+, lo que se expresó en mayores niveles de proliferación, liberación de IFN γ y Granzima B.

c) Comparación de genotipos WT, HT y KO en la estimulación *in vitro* de 4-1BBL en linfocitos B con antiBCR y antiCD40.

Los linfocitos B aislados de los ratones de diferentes genotipos (WT, HT y KO) fueron incubadas con antiBCR y antiCD40. Luego de 48 horas, se evaluó el fenotipaje de cada uno de los modelos, cuantificando la expresión de T – bet (factor de transcripción), IFN γ R1 (receptor), 4–1BB (ligando de interés); así como la liberación de IL10 y TNF α (citoquinas proinflamatorias) que fue observada y medida en estos grupos mediante citometría de flujo (Figura 8).

Los resultados observados comprueban la existencia de células 4BL, además de la expresión activa de citoquinas y factores de transcripción.

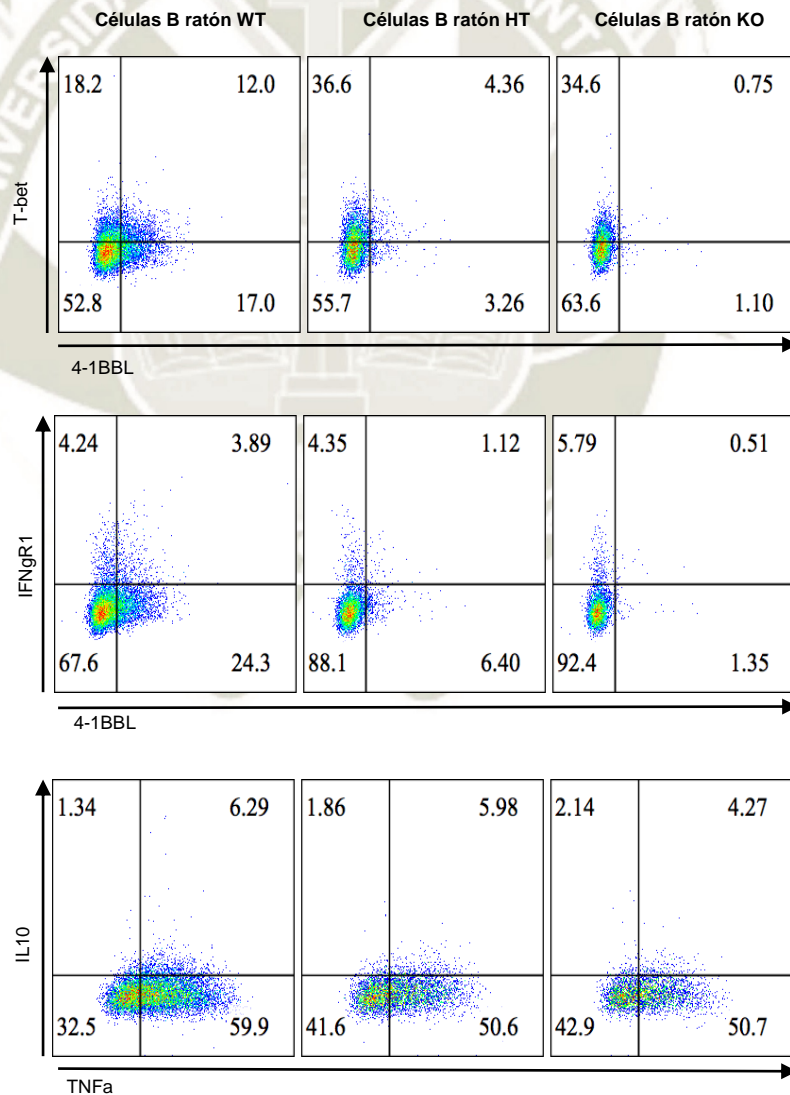


Figura 8.-Expresión de T-bet, 4-1BBL, IFN γ R1, IL10 Y TNF α en linfocitos B luego de 48 horas de activación con antiBCR y antiCD40, en ratones WT, HT y KO.

Los linfocitos B estimulados *in vitro*, expresaron el ligando 4-1BB en ratones WT y KO de manera significativa. La expresión del ligando 4-1 BB estuvo presente con mayor intensidad en el grupo WT con un 17% de aparición celular. Es importante considerar que las células 4BL derivan de las células tipo B1a que representan el 5% de la población total de linfocitos en mamíferos (6). De manera consecuente, el grupo HT expresó el ligando sólo en el 3.26% de sus células, mientras que el grupo KO sólo logró una expresión del 1.1%. Comprobando así la existencia de células 4BL.

Adicionalmente, las células 4BL demostraron tener un perfil de activación según su fenotipaje.

Se observó que las células 4BL presentes en el grupo WT tenían un porcentaje de expresión del factor de transcripción T - bet de 12%, mientras que el grupo HT permanecía con un 4.36% y el KO con un 0.75%. Esto a consecuencia de que las células linfocitarias que se encuentran activas tienden a iniciar procesos internos de transcripción para generar la liberación de citoquinas o receptores según sea su función. La importancia de este factor radica en la ayuda que brinda para que el IFN γ R1 y el CD86 sean expresados en la superficie. (5,6)

Las células 4BL también mostraron expresión del receptor tipo I para el IFN γ , como respuesta a la estimulación artificial. De igual forma fueron las células 4BL de tipo WT las que presentaron un mayor porcentaje de expresión.

Posteriormente, se cuantificó la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL10 y TNF α . Donde los tres grupos muestran valores similares de expresión al encontrarse activas.

d) Activación de funciones efectoras en linfocitos T CD8+ mediante células 4BL (WT, HT y KO) estimuladas *in vitro*

Las células 4BL generadas *in vitro* permanecieron en interacción con linfocitos T CD8+ con el objetivo de observar si eran capaces de inducir en ellas un efecto citotóxico. Para probar esto, linfocitos T CD8+ fueron empleados

como control comparando los niveles de proliferación y expresión con células T no activadas y células T activadas con antiCD3.

Los linfocitos aislados de ratones WT, HT y KO primero fueron activados mediante incubación con antiBCR y antiCD40 durante 48 horas, luego fueron co – cultivados con linfocitos T CD8+ durante 5 días. Luego de ese periodo, se cuantificaron los niveles de IFN γ y Granzima B.

La figura 9 muestra que los linfocitos T CD8+ activados por las células 4BL fueron capaces de proliferar en los tres genotipos, estos mostraron altos niveles de proliferación, WT (75%), HT (85%) y KO (87%). Pero, la proliferación observada en el grupo WT fue significativamente menor que la de los otros grupos.

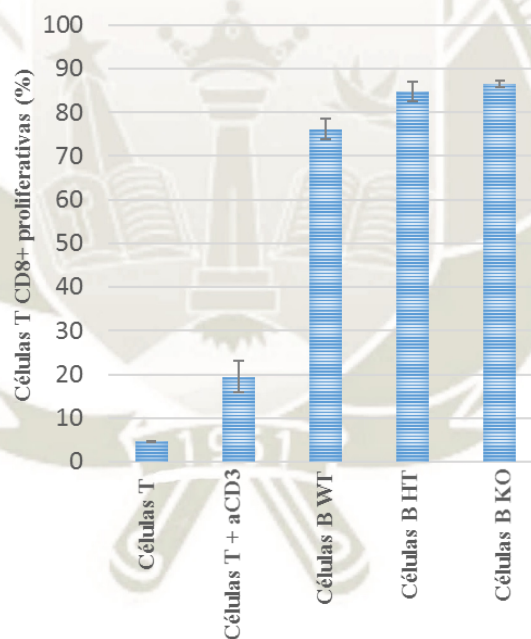


Figura 9.- Proliferación de linfocitos T CD8+ estimuladas por células 4BL de WT, HT y KO luego de 5 días de incubación. Se muestran también los linfocitos T control con y sin activación ($P=0,0001$, $P<0,05$ se consideró significativo)

Finalmente, se midió la liberación de IFN γ y Granzima B en las células T CD8+ proliferativas. Aquí se observó que los linfocitos B de tipo WT causaron mayor influencia en la activación de los linfocitos T CD8+, ya que estas células tuvieron mayor expresión de IFN γ (WT:15% y KO:11%) y Granzima B (WT:24% y KO:15%) en comparación con las células B de tipo KO. Los

porcentajes entre los grupos WT y HT son similares, mientras que el grupo KO es menor significativamente en ambas pruebas (Figuras 10 y 11).

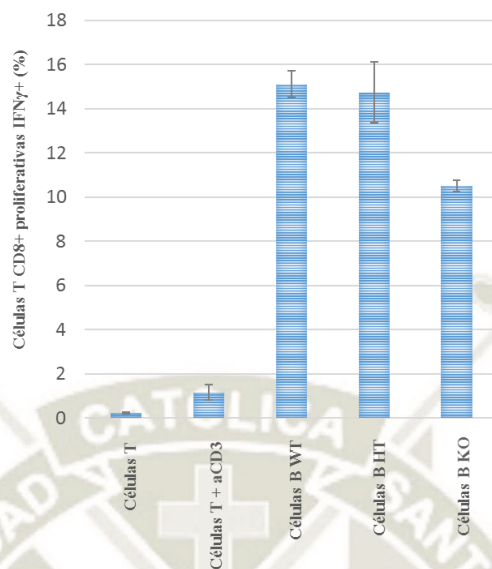


Figura 10.- Linfocitos TCD8+ proliferativos que liberan IFN γ inducidas por células 4BL (P=0,0002, P<0,05 se consideró significativa)

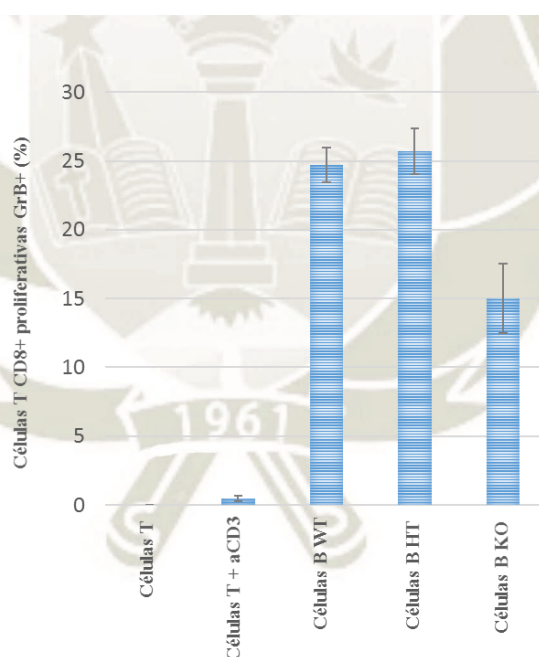


Figura 11.- Linfocitos TCD8+ proliferativos que liberan GrB inducidas por células 4BL (P=0,0001, P<0,05 se consideró significativa)

Los resultados presentados son consistentes con la identificación de un subgrupo específico de células B que estimulan respuestas proinflamatorias. Como se evidenció previamente mediante estudios inmunológicos en envejecimiento para controlar el crecimiento tumoral, las células B que

expresaban el ligando 4-1BB (células 4BL) podían estimular la acción efectora de las células T CD8+ (6).

De manera crucial se descubrió que las células 4BL inducían células T GrB+ CD8+ a través de la interacción 4-1BBL/4-1BB y el eje TCR/MHC (5). Demostrando que grupos específicos de células B tienen funciones específicas en el sistema inmunológico en el envejecimiento.

La investigación presentada confirma los resultados de investigaciones previas demostrando que las células B, específicamente aquellas 4-1BBL+ efectuaban una función APC frente a las células T CD8+ para estimular su función efectora.

2. Análisis de la infiltración de células inmunes B, T CD4+, T CD8+, macrófagos y microglía en el cerebro de ratones con EAE.

El análisis de infiltración fue realizado luego de la inmunización de ratones de tipo WT y KO, se realizó a través de la evaluación del desarrollo de la enfermedad observando el *score* clínico luego de 7 días de haber sido inmunizados, hasta el día 20 luego de la inmunización (Figura 12).

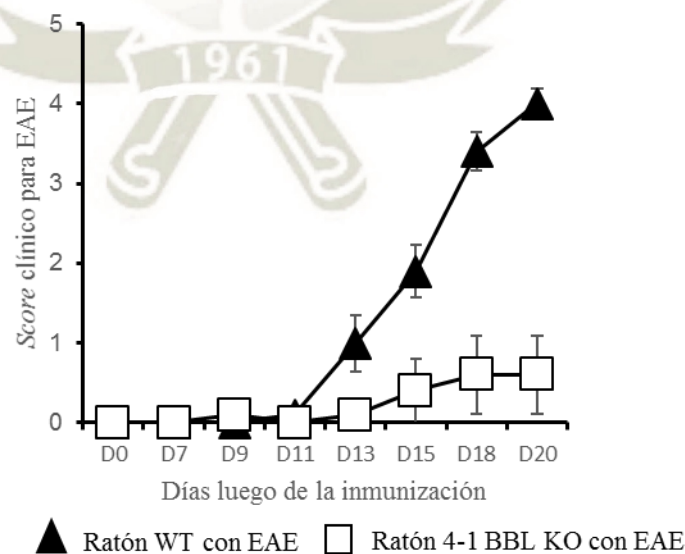


Figura 12.- Score clínico para la evaluación de EAE, 20 días después de la inmunización.

Los registros obtenidos confirman que los ratones de tipo WT que fueron inducidos con EAE desarrollaron características más agudas en la enfermedad que fueron evidentes a partir del día 11 post-inmunización, el deterioro fue progresivo generando a partir del día 13 atonicidad en la cola y debilidad en uno de los miembros inferiores, luego atravesando parálisis parcial y posterior parálisis total en ambas extremidades traseras, para finalmente llegar a un estado moribundo o de muerte con parálisis total del animal.

Como se observa en el score clínico, ratones WT – EAE desarrollaron un score más alto luego de 11 días después de la inmunización, por el contrario, los ratones KO – EAE permanecieron con un score bajo durante los 20 días de evaluación.

Se realizó el aislamiento de linfocitos B, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células inmunes CD 11b+ a partir del cerebro de los diferentes ratones, para observar la posible infiltración de estas células en el cerebro durante la EAE. Linfocitos B fueron encontrados en el cerebro, el porcentaje de aparición fue medido en los tres grupos, la población de linfocitos B en los tres modelos tuvo una distribución similar (Figura 13).

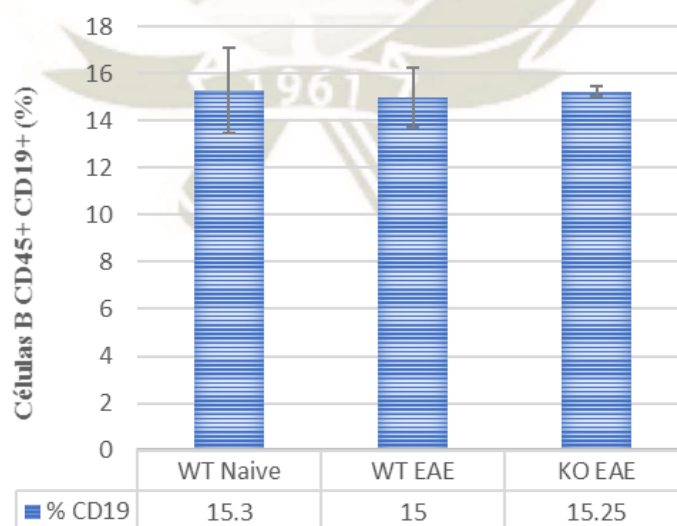


Figura 13.- Porcentaje de linfocitos B que se infiltraron en el cerebro de los tres tratamientos WT-Naive, WT-EAE y KO-EAE. ($P=0,5635$, $P<0.05$ se consideró significativa).

Luego, el perfil de activación de los linfocitos B fue analizado midiendo la expresión de marcadores extra e intracelulares (T – bet, 4-1BBL, TNF α e IFN γ). Se observó que los linfocitos B de WT–EAE y WT–Naive que expresaban en su superficie el 4-1BBL (Células 4BL) tenían un patrón similar de expresión del factor de transcripción T-bet. Además, como se observa en la Figura 14, la liberación de IFN γ y TNF α fue muy similar para WT-EAE y WT-Naive.

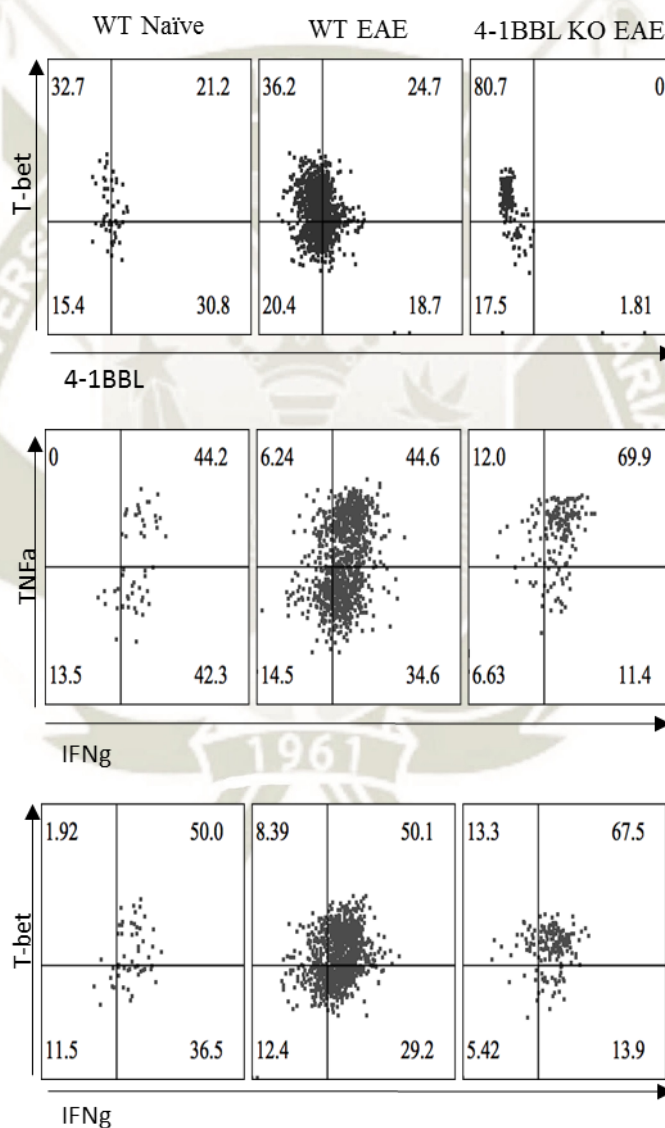


Figura 14.-Fenotipaje de linfocitos B infiltrados en el cerebro, se muestra la expresión de Tbet, 4-1BBL, TNF α e IFN γ .

La existencia de células inmunológicas presentes en el cerebro fue ampliamente observada en el grupo WT-EAE en comparación con los grupos

WT-Naive y KO-EAE. No sólo la presencia de linfocitos B era abundante para este grupo, sino que existía un porcentaje de 24.7% de células 4BL con expresión del factor de transcripción T-bet, mostrando un estado alerta y de activación. (Figura 14).

Estas células también dieron muestra de haber liberado al medio externo citoquinas efectoras como TNFa e IFNg.

Linfocitos T CD8+ se aislaron del cerebro de los ratones, se midió el porcentaje de existencia y se observó que existía una proporción baja de estas células en el cerebro de ratones KO – EAE, demostrando que posiblemente el cerebro de estos ratones actúa de una manera impermeable hacia las células T CD8+. (Figura 15).

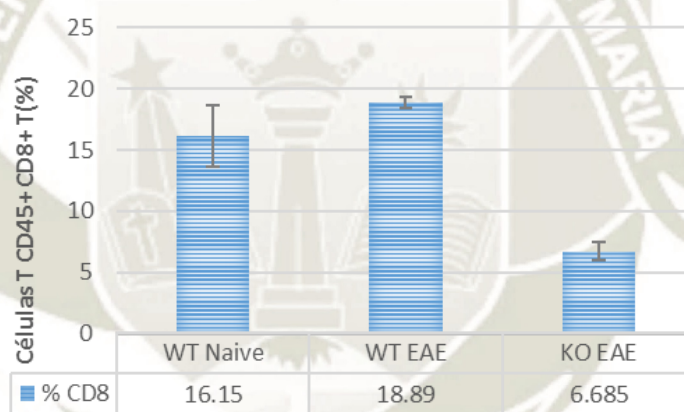


Figura 15.- Porcentaje de linfocitos T CD8+ que se infiltraron en el cerebro de los tres tratamientos WT-Naive, WT-EAE y KO-EAE. ($P=0,001$, $P<0.05$ se consideró significativo).

Se realizó una evaluación del fenotipo de expresión en los linfocitos T CD8+, que mostraron la expresión de marcadores celulares intra y extracelulares (GrB, IFN γ y T-bet). Se encontraron células T CD8+ infiltradas en el cerebro de los tres grupos, las células infiltradas eran GrB+ e IFN γ + con buenos niveles de expresión. Luego de medir los niveles de la expresión del factor T-bet estos fueron ligeramente más altos en los grupos WT–Naive y WT–EAE en comparación a los cerebros KO – EAE (Figura 16).

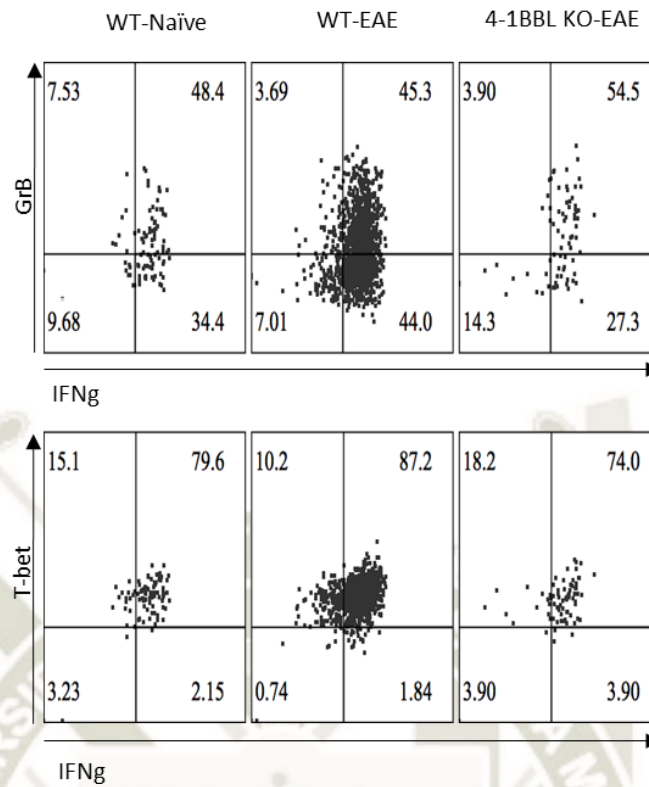


Figura 16.- Fenotipaje de linfocitos T CD8+ infiltrados en el cerebro, se muestra la expresión de GrB, Tbet e IFN γ .

Linfocitos T CD4+ que también fueron aislados mostraron diferencia en sus porcentajes, los ratones WT–Naive mostraron una existencia de 29.5% de células T CD4+, los KO – EAE de 37.65% y los WT – EAE de 44.75% (Figura 17). Mediante el análisis del fenotipo de activación con marcadores intra y extracelulares (T – bet, IFN γ , TNF α , IL10 y IL17) se observó que a pesar de que WT–EAE y WT–Naive mostraron patrones similares de expresión, los tres sujetos tenían un perfil de activación.

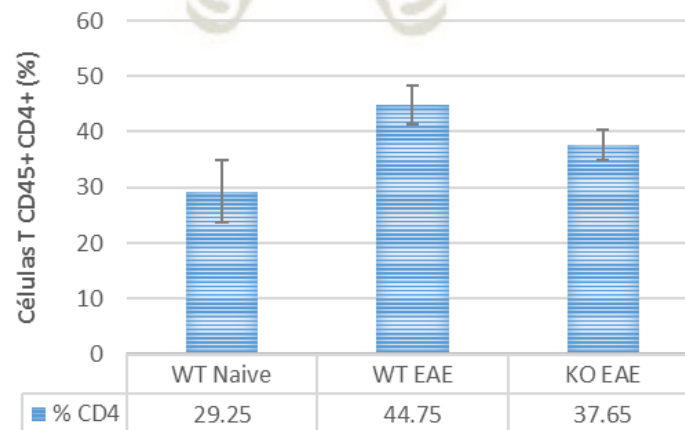


Figura 17.- Porcentaje de linfocitos T CD4+ que se infiltraron en el cerebro de los tres tratamientos WT-Naive, WT-EAE y KO-EAE. ($P=0,001$, $P<0.05$ se consideró significativa).

Cuando se analizó la expresión de citoquinas en los linfocitos T CD4+ se observó que los tres grupos tenían patrones similares, las células WT-EAE tuvieron una alta expresión de IFN γ en células que expresaban T-bet, luego las células T CD4+ de WT-EAE también tuvieron niveles altos de expresión de TNF α , pero las células KO-EAE tuvieron expresión ligeramente más alta. Cuando se midieron los niveles de IL17 y IL10 se encontró que las células WT-Naive y WT-EAE tuvieron niveles similares de expresión, en contraste las células KO-EAE no generaron una buena liberación de ellos (Figura 18).

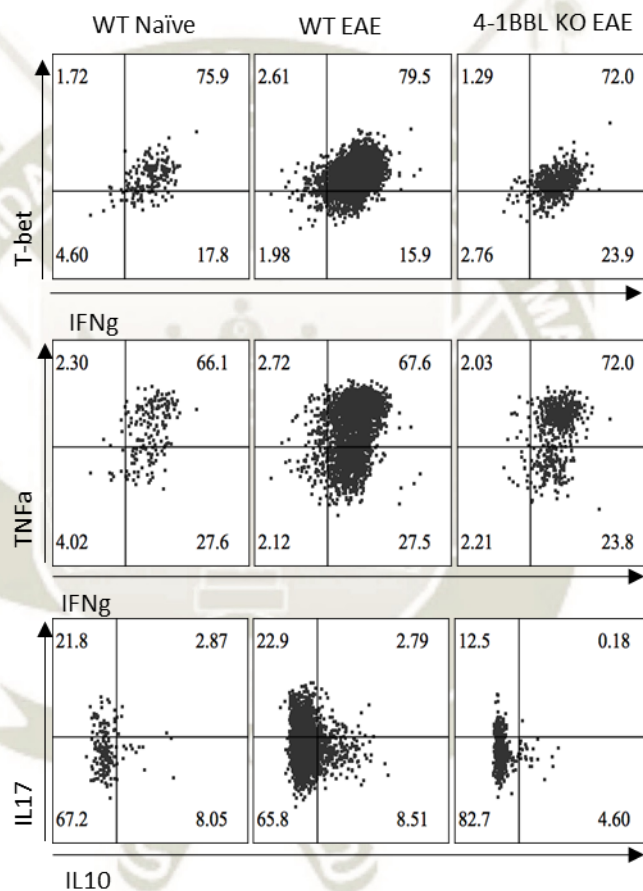


Figura 18.- Fenotipaje de los linfocitos T CD4+ infiltradas en el cerebro, se muestra la expresión de Tbet, IFN γ , TNF α , IL17 y IL10.

Finalmente, la cuantificación y el análisis de células CD11b+ y su fenotipo se realizaron. Primero, el número total de estas células se contabilizó en cada sujeto (Figura 19). Las células WT-EAE excedieron el número de células en comparación a los otros sujetos, mostrando un mayor flujo de infiltración de estas células en el cerebro.

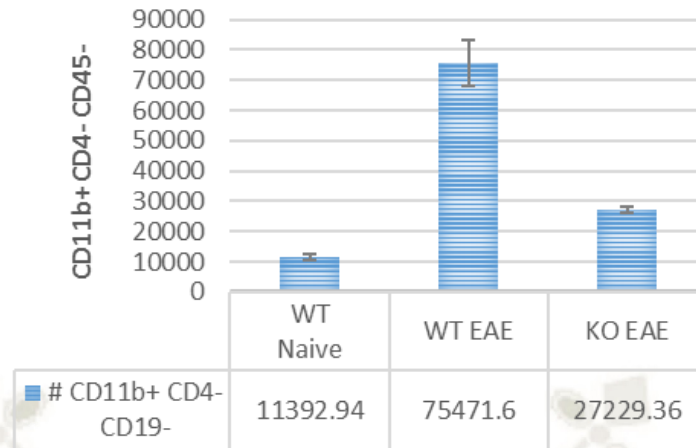


Figura 19.- Porcentaje de células CD11b+ que se infiltraron en el cerebro de los tres tratamientos WT-Naive, WT-EAE y KO-EAE.

Segundo, las células CD11b+ que se infiltraron en el cerebro se clasificaron según la expresión del marcador de superficie CD45. El subgrupo que expresaba CD45 en baja concentración se consideró como Macrófagos, el de expresión media de CD45 como Microglia activada y el de CD45 alto como Microglía (Figura 20). Los macrófagos presentaron mayor densidad en los cerebros.

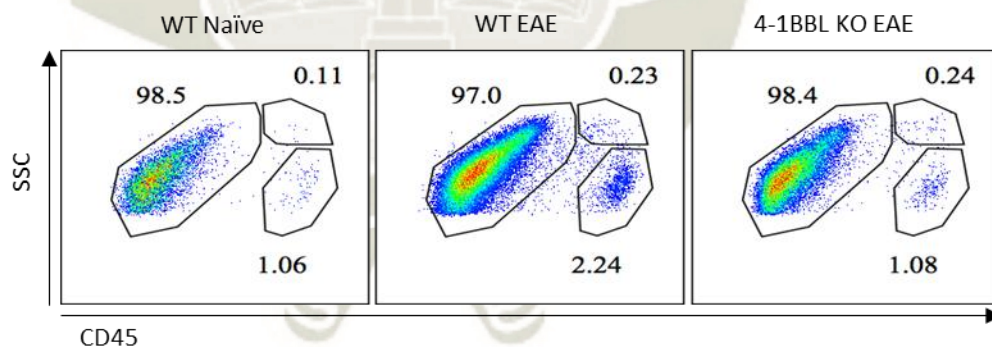


Figura 20.- Clasificación de las células CD11b+ infiltradas en el cerebro, se muestra en el cuadrante izquierdo (CD45lo) macrófagos, en el cuadrante superior derecho (CD45me) microglia activa y cuadrante inferior derecho (CD45hi) microglía.

Luego, la población CD11b+ se analizó según la expresión de citoquinas de activación IFN γ y TNF α considerando la clasificación previa según el CD45. En la Figura 21 se observa que la microglía no activada demostró tener mayor densidad celular, en contraste con la microglía activada que mostró la expresión de estas citoquinas en niveles similares en los tres experimentos. Finalmente, los

macrófagos presentes en el cerebro estuvieron altamente activados y en mayor cantidad en el cerebro WT-EAE.

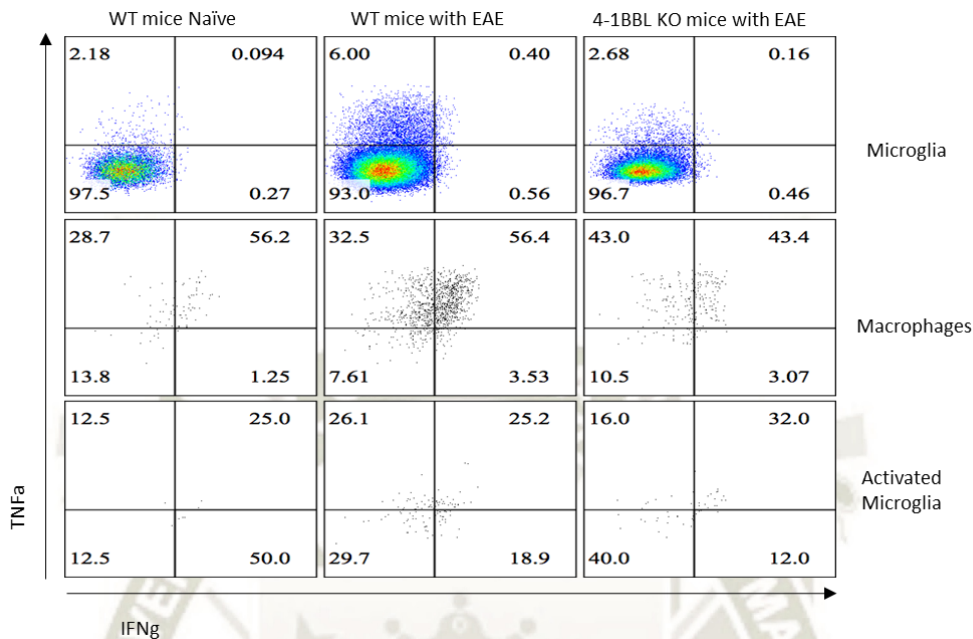


Figura 21.-Liberación de IFN γ y TNF α por diferentes tipos de células CD11b+.

El *score* clínico de EAE mostró que los ratones KO-EAE no presentaron los síntomas en la misma intensidad que los ratones WT-EAE, debido posiblemente a la carencia del ligando 4-1BB. Además, luego de la observación de las células infiltradas en el cerebro, se remarcó que las células B presentes mantienen su proporción, pero incrementan en número dentro del cerebro de los ratones WT-EAE.

Hubo una significativa correlación entre las células B infiltradas y su perfil de activación. Las células 4BL expresaron niveles altos de T-bet que se encuentra relacionado con la expresión de IFN γ así como la de TNF α . Las células T CD8+, en contraste, tuvieron interferencia para filtrarse en el cerebro de los ratones KO-EAE, pero no respecto a WT-EAE. En suma, estas células mostraron un perfil activado con la expresión de Granzima B e IFN γ .

Luego, el análisis de la infiltración de células T CD4+ mostró que los cerebros de los ratones WT-EAE mantenían una tendencia a permitir la infiltración de estas células de manera preferente respecto a los otros sujetos y

células. Además, las células T CD4+ tenían un perfil de activación expresando IFN γ y TNF α , pero con niveles bajos de IL10 y IL17.

Evidencia interesante se encontró en relación con la presencia de células CD11b+ en el cerebro, lo que sostiene que los macrófagos ingresaron de manera sencilla en el cerebro en el curso de la enfermedad, permitiendo también la interacción de la microglía. Así también los resultados mostraron que los macrófagos infiltrados expresaban niveles elevados de expresión de TNF α e INF γ .

De manera contraria a las expectativas, se encontró la presencia de células inmunológicas en los cerebros de animales sanos, a pesar de considerar este espacio como uno impermeable a la presencia del sistema inmune. Diversos autores sostienen que la BHE puede estar en contacto con vasos linfáticos que podrían ser los causantes del transporte y acceso de estas células.

El relativo estatus inmuno privilegiado del SNC se ha considerado durante bastante tiempo como base de la iniciación de las respuestas inmunes adaptativas en la periferia contra los antígenos del SNC. Pero incluso en SNC sanos, las células T de memoria pueden atravesar la BHE, dando luces sobre una posible activa inmuno vigilancia en el SNC (11,62).

Como se anticipaba los experimentos realizados cumplen con el objetivo de lograr la inducción del subgrupo específico de células 4BL y comparar el fenotipo de estas células cuando en EAE. Así como su capacidad de infiltrar el SNC.

3. Evaluación del fenotipo y de la proliferación de células T in vivo que interactúan con células 4BL en EAE.

a) Inmunización y extracción de linfocitos B en ratones con EAE.

Como experimento final las células esplénicas de ratones inmunizados con EAE se analizaron para observar si las células 4BL provenientes WT – EAE eran capaces de inducir un perfil citotóxico en las células T CD8+ en un modelo in vivo.

La Figura 12 que muestra el score clínico de los ratones inmunizados confirma que los grupos WT y KO fueron inmunizados y que los ratones WT desarrollaron la enfermedad.

b) Incubación de linfocitos B con linfocitos T

Los linfocitos B se aislaron del bazo de los ratones WT–Naive, WT–EAE y KO–EAE, los linfocitos fueron incubados durante 5 días con linfocitos T CD8+, luego se analizó el fenotipaje. Linfocitos T no activados y activados con anti–CD3 se emplearon como control estándar de activación.

c) Eliminación artificial de células 4BL en linfocitos de tipo WT

Como un experimento adicional, células 4-1BBL+ se eliminaron del subgrupo de WT–EAE y fueron evaluadas. (WT-EAE con células 4BL eliminadas).

Primero, los niveles de proliferación se midieron luego del periodo de incubación en los subgrupos estimulados por los linfocitos B de WT – Naive, WT – EAE, 4-1BBL KO – EAE y WT – EAE 4BL- (Figuras 22 y 23). Los niveles de proliferación fueron similares en los tres grupos, mostrando que estas células eran viables.

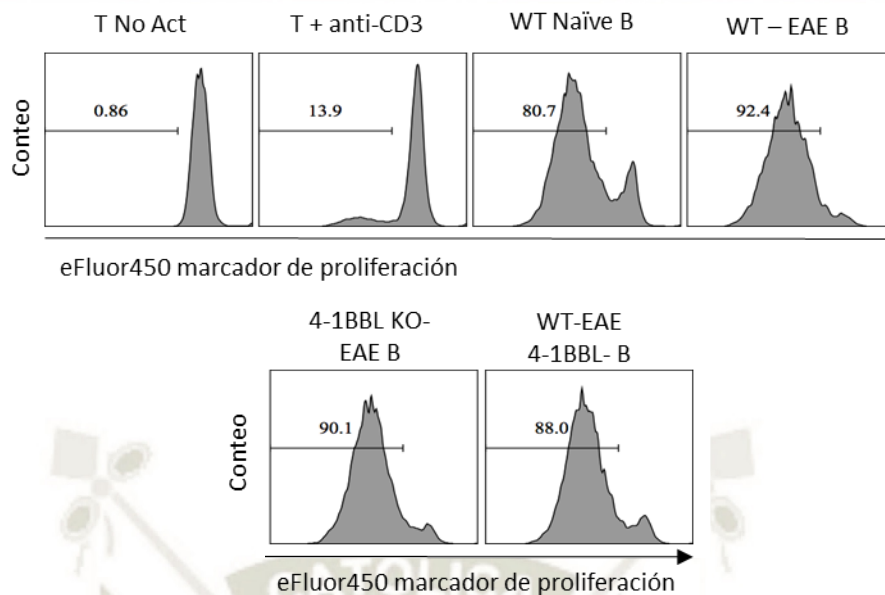


Figura 22.- Proliferación de linfocitos T CD8+ inducida por células 4BL in vivo.

Además, los valores de proliferación para las células KO-EAE y WT-EAE-4BL- mostraban el mismo porcentaje de proliferación.

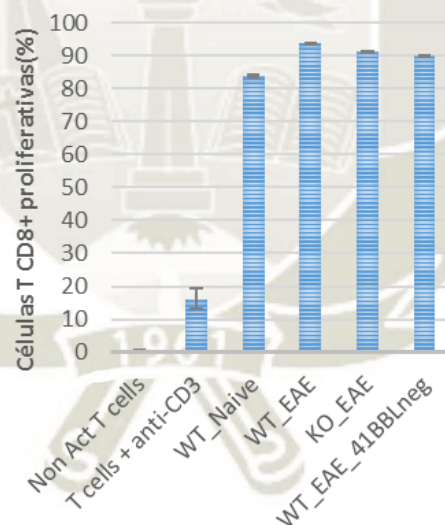


Figura 23.- Porcentaje de proliferación de linfocitos TCD8+ estimulados in vivo por células 4BL ($P=0,0001$, $P<0.05$ se consideró significativo).

Luego, se midió la liberación de GrB en los linfocitos T CD8+ estimulados por los B linfocitos (Figuras 24 y 25). Todos los controles y el subgrupo estimulado por los linfocitos B de WT–Naïve no mostraron expresión significativa, similar a los linfocitos de 4-1BBL KO–EAE. Sin embargo, el subgrupo de linfocitos T CD8+ que se incubaron con linfocitos B de WT–EAE

no mostró una expresión importante de GrB. De manera importante, cuando las células 4BL se eliminaron de este grupo, la liberación disminuye.

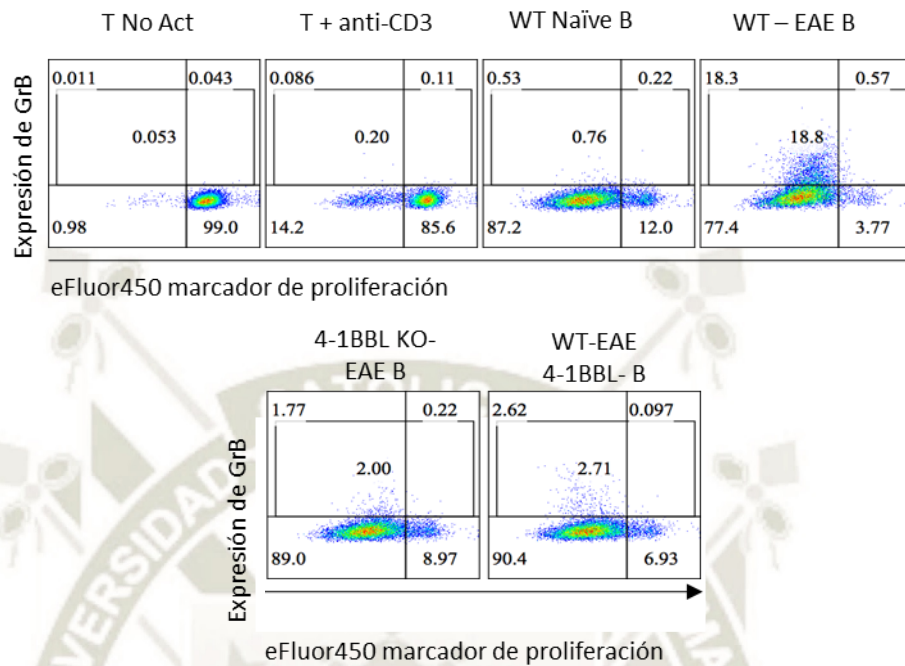


Figura 24.- Niveles de liberación de GrB en linfocitos TCD8+ inducidos por células 4BL in vivo.

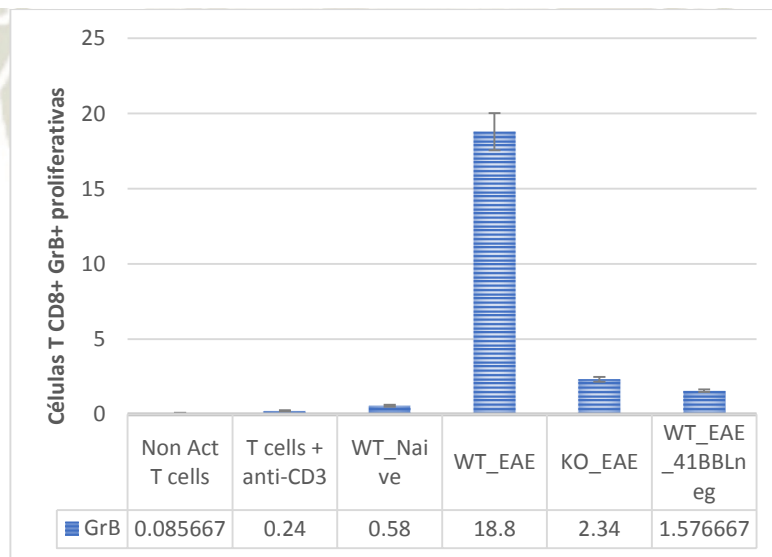


Figura 25.- Porcentaje de liberación de GrB en linfocitos TCD8+ proliferativos. ($P=0,0001$, $P<0,05$ se consideró significativa).

Finalmente, para confirmar que los linfocitos T CD8+ mostraban un perfil de activación, se analizó la expresión de $IFN\gamma$. De todos los grupos sólo los linfocitos B WT-EAE estimularon la proliferación de linfocitos T CD8+, ni el grupo de 4-1BBL KO-EAE o el WT-EAE con depleción de células 4BL fue capaz de inducir esta proliferación (Figuras 26 y 27). De manera similar sucedió

con la expresión de GrB, cuando las células 4BL fueron eliminadas, la expresión de IFN γ y GrB disminuye.

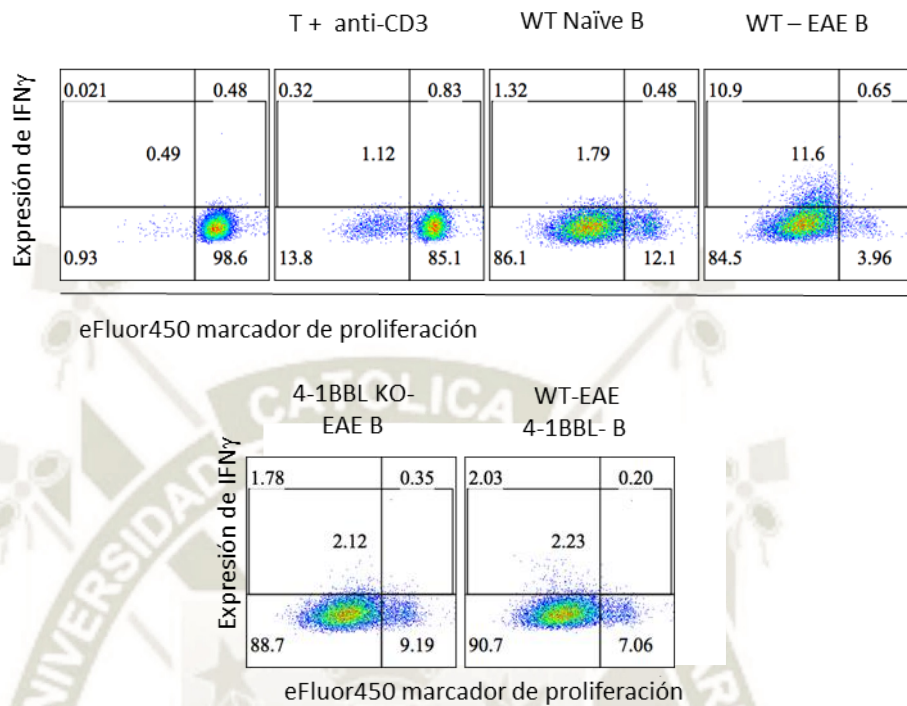


Figura 26.- Niveles de liberación de IFN γ en linfocitos T CD8+ inducidos por células 4BL in vivo.

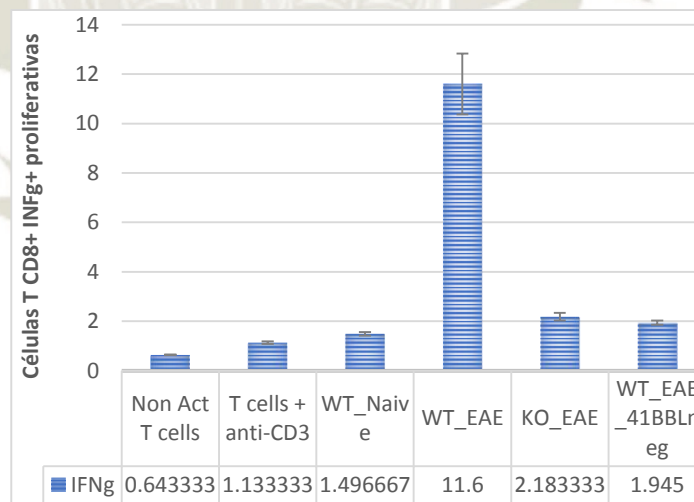


Figura 27.- Porcentaje de liberación de IFN γ en linfocitos TCD8+ proliferativos. ($P=0,0001$, $P<0.05$ se consideró significativo).

La estimulación del BCR y el CD40 generaron la expresión del ligando 4-1BB en linfocitos B, estos resultados corroboran con los obtenidos previamente por Lee-Chang et al. 2016. Las células 4BL generadas *in vivo* mostraron además un perfil de activación al liberar citoquinas proinflamatorias como IL10 y TNF α que también estimularon la expresión de IFN γ R1 y el factor de transcripción T – bet.

El estudio realizado provee evidencia adicional sobre la disposición de los linfocitos B para ser estimulados para convertirse en células 4BL activadas, listas para interactuar con otras células. Ninguna de estas características se observó en linfocitos B provenientes de ratones KO para 4-1BBL.

El análisis posterior demostró que cuando los tres diferentes genotipos de linfocitos B eran expuestos a interacción con los linfocitos T CD8+, aquellos linfocitos de origen WT que podían expresar el ligando 4-1BB probaron tener mayor influencia en la activación citotóxica de linfocitos T efectores, ocasionando la liberación de IFN γ y GrB. De manera contraria, las células de origen KO mostraron índices de proliferación similares, pero no eran capaces de estimular en la misma intensidad el perfil citotóxico. Lo más remarcable de esta relación es que las células carentes de 4-1BBL no pudieron generar una respuesta citotóxica que derivaría en una reacción autoinmune.

Es interesantemente crucial notar que además de confirmar que las células 4BL desempeñan un rol en la activación citotóxica de linfocitos T CD8+, se pudo demostrar que esta función está directamente ligada a la expresión del 4-1BBL en la superficie de linfocitos B, lo que se pudo comprobar mediante la depleción de células 4BL en cerebros WT-EAE, provocando la incapacidad de estas células de estimular el efecto citotóxico sin la expresión del ligando.

Como proponen Molnarfi et al. 2013 y O'Neil et al. 2007, la expresión del complejo MHC de Clase II y el CD80/86 en linfocitos B es una característica importante para la activación de linfocitos T autorreactivas. Lo que sugiere que durante la EM el microambiente del SNC puede atraer linfocitos B y promover

su expansión, maduración y producción de anticuerpos, citoquinas y quimiocinas. Incluso aún, reclutar linfocitos T efectores (55,63).

De manera adicional, los linfocitos B también pueden ser un efectivo APC, especialmente cuando existe baja densidad de antígeno. Los resultados presentados permiten generar la hipótesis de que, bajo las condiciones de la enfermedad, es posible que los linfocitos B sean APCs de los linfocitos T CD8+, ocasionando lesiones inflamatorias.



CONCLUSIONES

1. La investigación presentada describe cómo las células B esplénicas de los ratones estudiados demostraron tener una predisposición a convertirse en células 4BL en las condiciones adecuadas. Ya que fueron estimuladas con anti - BCR y anti - CD40 para convertirse en células de tipo 4BL inductoras de Granzima B e Interferón γ y en células T CD8+ proliferativas.
2. Además, la evidencia presentada en este estudio sugiere que todas las células que infiltraron en el cerebro se encontraban activadas y que la mayor proporción de esta infiltración se dio en el cerebro de los ratones de tipo WT_EAE. En contraste, el cerebro de los ratones KO_EAE mostró tener un reclutamiento diferencial que limitaba la entrada de las células T CD8+.
3. Un progreso considerable se logró demostrando que las células B esplénicas provenientes del cerebro del ratón de tipo WT_EAE fueron potentes inductores de la secreción de Interferón γ y Granzima B en las células T CD8+, gracias a la presencia del ligando 4-1BB.
4. La investigación presentada es útil e importante para resolver el conflicto de la activación inmunológica previa al desarrollo de la EM, ya que demuestra que los linfocitos B esplénicos son capaces de estimular citoquinas citotóxicas en las células T CD8+, cuando presentan el ligando 4-1BB.
5. Las células 4BL son un grupo específico de células B que expresan el ligando 4-1BB para estimular a las células T con función citotóxica en EAE, estas células requieren una activación previa y luego son capaces de inducir proliferación y la liberación de citoquinas en células T, exacerbando las lesiones de la enfermedad.

RECOMENDACIONES

1. A partir del estudio presentado es recomendable enfocar las nuevas tecnologías hacia el seguimiento de comunicación intercelular en condiciones de esclerosis múltiple, identificar los tipos celulares y sus características fenotípicas permitirá discernir entre células objetivo para los tratamientos y células colaboradoras del proceso de regulación.
2. Es importante reconocer y desarrollar mecanismos que puedan informar sobre la capacidad de tolerancia inmunológica de algunas células, para de esta manera controlar la creación de células autorreactivas que puedan afectar al organismo.
3. Es recomendable también continuar con los estudios de infiltración inmunológica en el cerebro del modelo animal de EAE, para determinar si existe en realidad una cantidad considerable de células autorreactivas capaces de atravesar la BHE debido a la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: An overview. *Brain Pathol.* 2007;17(2):210–8.
2. Zamvil SS, Steinman L. The T Lymphocyte in Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1990;8(1):579–621. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.iy.08.040190.003051>
3. Li R, Rezk A, Miyazaki Y, Hilgenberg E, Touil H, Shen P, et al. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci Transl Med* [Internet]. 2015;7(310):310ra166-310ra166. Available from: <http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.aab4176>
4. Takahashi C, Mittler RS, Vella AT. Differential clonal expansion of CD4 and CD8 T cells in response to 4-1BB ligation: contribution of 4-1BB during inflammatory responses. *Immunol Lett.* 2001;76(3):183–91.
5. Lee-chang C, Bodogai M, Moritoh K, Olkhanud PB, Chan AC, Croft M, et al. Accumulation of 4-1BBL 1 B cells in the elderly induces the generation of granzyme-B 1 CD8 1 T cells with potential antitumor activity. 2015;124(9):1450–60.
6. Lee-Chang C, Bodogai M, Moritoh K, Chen X, Wersto R, Sen R, et al. Aging Converts Innate B1a Cells into Potent CD8 + T Cell Inducers. *J Immunol* [Internet]. 2016;196(8):3385–97. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1502034>
7. Élie Metchnikoff. *Immunity in infective diseases.* Vol. 136, Cambridge at the university press. 1905. 617 p.
8. Owen JA, Punt J, Stranford SA. *Kuby Immunology* [Internet]. Vol. XXXIII, Uma ética para quantos? 2012. 81-87 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003161> <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cid/cir991> <http://www.scielo.cl/pdf/udecada/v15n26/art06.pdf> <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84861150233&partnerID=tZOtx3y1>
9. Paul WE. *Fundamental Immunology* 5th edition. System. 2003;(August).
10. Silverstein AM. Cellular versus humoral immunity: Determinants and

- consequences of an epic 19th century battle. *Cell Immunol.* 1979;48(1):208–21.
11. Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2012;12(9):623–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3265>
 12. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(9):545–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3871>
 13. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature.* 2014;507(7492):366–70.
 14. S Klein, Robyn; Garber, Charise; Howard N. Infectious immunity in the central nervous system and brain function. 2016;131(20):1796–803.
 15. Broere F, Apasov SG, Sitkovsky M V, Eden W Van. Principles of Immunopharmacology. 2011;15–28. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-0346-0136-8>
 16. Carsetti R, Rosado MM, Wardemann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev.* 2004;197(March):179–91.
 17. Mastache EF, Abalde SL. Linfocitos T y B . diversidad : mecanismos moleculares . funcionales. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2005;9(33):2162–73. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0211-3449\(05\)73617-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0211-3449(05)73617-1)
 18. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(3):213–9.
 19. Hoyer KK, Kuswanto WF, Gallo E, Abbas AK. Distinct roles of helper T-cell subsets in a systemic autoimmune disease. *Blood.* 2009;113(2):389–95.
 20. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM. Immunological decision-making: How does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology.* 2008;123(3):326–38.
 21. Baldwin TA, Sandau MM, Jameson SC, Hogquist KA. The timing of TCR α expression critically influences T cell development and selection. *J Exp Med* [Internet]. 2005;202(1):111–21. Available from:

- <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20050359>
22. Steinman L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat Immunol.* 2004;5(6):575–81.
 23. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: Modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010;10(4):236–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2729>
 24. Cheng M, Anderson MS. Thymic tolerance as a key brake on autoimmunity. *Nat Immunol* [Internet]. 2018;19(7):659–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-018-0128-9>
 25. Malhotra D, Linehan JL, Dileepan T, Lee YJ, Purtha WE, Lu J V., et al. Tolerance is established in polyclonal CD4 + T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns. *Nat Immunol* [Internet]. 2016;17(2):187–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3327>
 26. Kalekar LA, Schmiel SE, Nandiwada SL, Lam WY, Barsness LO, Zhang N, et al. CD4+ T cell anergy prevents autoimmunity and generates regulatory T cell precursors. *Nat Immunol* [Internet]. 2016;17(3):304–14. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.3331>
 27. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol.* 2016;36(2):115–27.
 28. Pöllinger B, Krishnamoorthy G, Berer K, Lassmann H, Bösl MR, Dunn R, et al. Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *J Exp Med* [Internet]. 2009;206(6):1303–16. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20090299>
 29. Lublin FD, Reingold SC, Cohen J a, Cutter GR, Thompson AJ, Wolinsky JS, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Defining the clinical course of multiple sclerosis The 2013 revisions.* 2014;1–10.
 30. Yednock TA, Cannon C, Lawrence CF, Sanchez-Madrid F, Co U. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature.* 1992;356:133–5.
 31. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(9):545–58. Available from:

- <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3871>
32. Ben-Nun A, Kaushansky N, Kawakami N, Krishnamoorthy G, Berer K, Liblau R, et al. From classic to spontaneous and humanized models of multiple sclerosis: Impact on understanding pathogenesis and drug development. *J Autoimmun* [Internet]. 2014;54:33–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2014.06.004>
 33. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* [Internet]. 2010;9(5):520–32. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70064-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70064-8)
 34. Pröbstel AK, Sanderson NSR, Derfuss T. B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):16576–92.
 35. Darwin VE, Jorge KC, Carlos CB, Ana CG, Martin TB, Antonio BO, et al. Prevalencia de Esclerosis Múltiple en Lima – Perú. 2009;20(3):146–50.
 36. Darwin VE, Cruz Cruz A, Mori Quispe N, Rojas Huerto E, Caparo Zamalloa C, Castañeda Barba C, et al. Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de Esclerosis múltiple. 2017. 111 p.
 37. Fillatreau S, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):391–7.
 38. Popescu BFG, Lucchinetti CF. Pathology of Demyelinating Diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2012;7(1):185–217. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-011811-132443>
 39. McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med*. 2005;11(3):335–9.
 40. Ji Q, Castelli L, Goverman JM. MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8 + T cells. *Nat Immunol*. 2013;14(3):254–61.
 41. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain*. 2011;134(9):2755–71.

42. Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. Lymphoid organ development: From ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol*. 2006;7(4):344–53.
43. Venken K, Hellings N, Broekmans T, Hensen K, Rummens J-L, Stinissen P. Natural Naive CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} Regulatory T Cell (Treg) Development and Function Are Disturbed in Multiple Sclerosis Patients: Recovery of Memory Treg Homeostasis during Disease Progression. *J Immunol* [Internet]. 2008;180(9):6411–20. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.180.9.6411>
44. Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2014;10(4):225–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.37>
45. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, et al. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med* [Internet]. 2014;211(8):1533–49. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20132477>
46. Neher JJ, Neniskyte U, Zhao J-W, Bal-Price A, Tolkovsky AM, Brown GC. Inhibition of Microglial Phagocytosis Is Sufficient To Prevent Inflammatory Neuronal Death. *J Immunol* [Internet]. 2011;186(8):4973–83. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1003600>
47. Lassmann H, Van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: Pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2012;8(11):647–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2012.168>
48. Hochmeister S, Grundtner R, Bauer J, Engelhardt B, Lyck R, Gordon G, et al. Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(9):855–65.
49. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* [Internet]. 2008;372(9648):1502–17. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61620-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61620-7)
50. Constant SL. B lymphocytes as antigen-presenting cells for CD4⁺ T cell priming in vivo. *J Immunol* [Internet]. 1999;162(10):5695–703. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10229801>

51. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2008;358(7):676–88. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0706383>
52. Anderson D, Reff M, Chambers K, Newman R, Hanna N, Leonard J. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1992;80:191a, #754 ST–Depletion of B cells in vivo by a.
53. Meinel E, Krumbholz M, Hohlfeld R. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: Migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann Neurol*. 2006;59(6):880–92.
54. Phan TG, Grigorova I, Okada T, Cyster JG. Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nat Immunol*. 2007;8(9):992–1000.
55. Molnarfi N, Schulze-Topphoff U, Weber MS, Patarroyo JC, Prod’homme T, Varrin-Doyer M, et al. MHC class II–dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J Exp Med* [Internet]. 2013;210(13):2921–37. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20130699>
56. Matsushita N, Pilon-Thomas SA, Martin LM, Riker AI. Comparative methodologies of regulatory T cell depletion in a murine melanoma model. *J Immunol Methods*. 2008;333(1–2):167–79.
57. Piccio L, Naismith R, Trinkaus K, Klein R. Changes in B-and T-Lymphocyte and Chemokine Levels With Rituximab Treatment in Multiple Sclerosis. *Arch ...* [Internet]. 2010;67(6):707–14. Available from: <http://archneur.ama-assn.org/cgi/content/abstract/67/6/707%5Cnpapers3://publication/uuid/F42A2C76-301E-4BF4-BD61-BE022CEA8DF7>
58. Espinosa L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecol Mol* [Internet]. 2007;110034(11):517–40. Available from: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>
59. Life technologies. Real-time PCR handbook. Applied Biosystems. 2014. 1-70 p.
60. Barrera Ramírez LM, Drago Serrano ME, Pérez Ramos J, Zamora AC, Gómez

- Arroyo F, Del Rosario Sainz Espuñes T, et al. Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir.* 2004;17(1):42–55.
61. Miller SD, Karpus WJ, Scott Davidson T. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. *Natl Inst Heal* [Internet]. 2017;(3):181–94. Available from: message:%3C72e0ec5627302.588f396a@uni-bielefeld.de%3E
 62. Shechter R, London A, Schwartz M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: Absolute barriers versus educational gates. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013;13(3):206–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3391>
 63. O’Neill SK, Cao Y, Hamel KM, Doodles PD, Hutas G, Finnegan A. Expression of CD80/86 on B Cells Is Essential for Autoreactive T Cell Activation and the Development of Arthritis. *J Immunol* [Internet]. 2007;179(8):5109–16. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/179/8/5109.full>

ANEXOS

ANEXO I

Diagrama del proceso experimental realizado para el aislamiento y la activación de células B esplénicas de ratones *wild type* (WT), heterocigoto (HT) y *knock – out* para el 4-1BBL (KO).

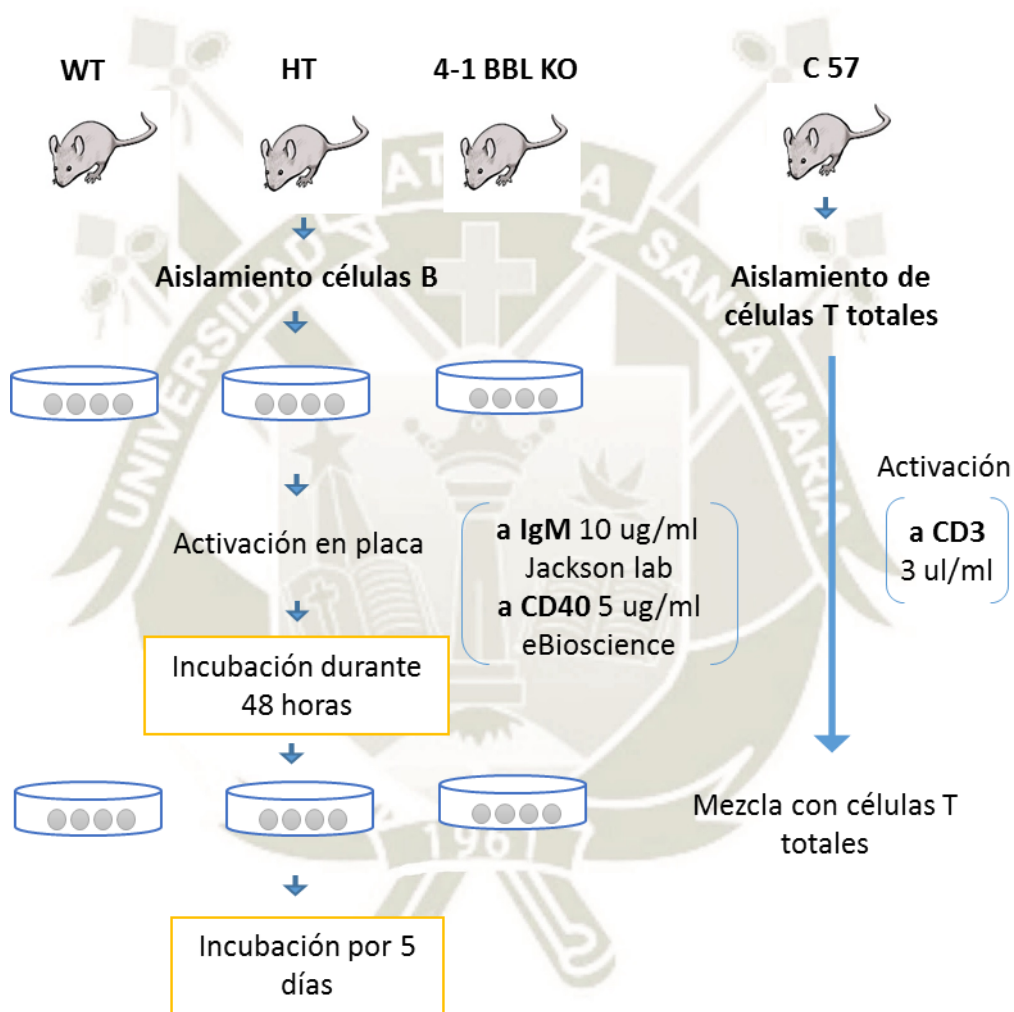


Figura 28.- Diseño experimental para comparar los procesos de estimulación del ligando 4-1BB en linfocitos B esplénicos.

ANEXO II

Diagrama del proceso experimental para determinar la funcionalidad de las células B esplénicas aisladas de ratones con Encefalomiелitis Experimental Autoinmune (EAE).

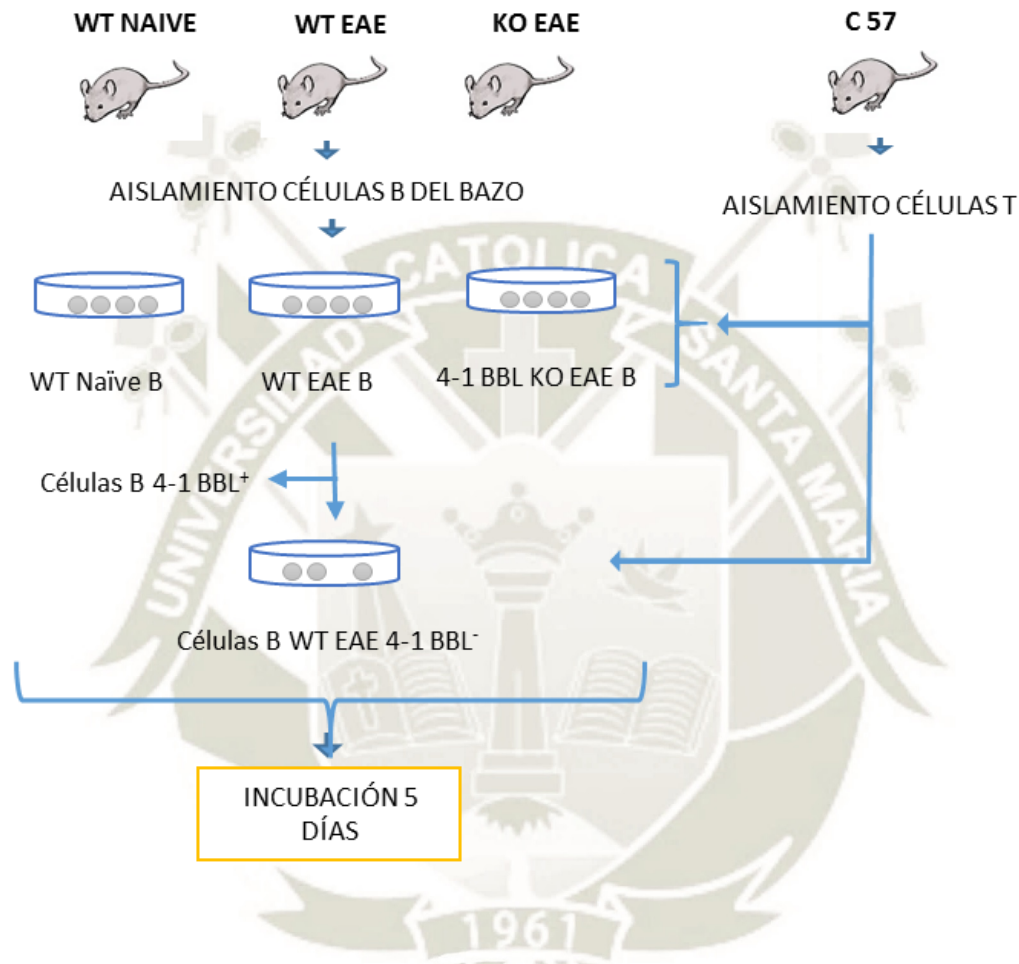


Figura 29.-Diagrama experimental para la evaluación del fenotipo y proliferación de linfocitos T CD8⁺ que interactúan con células 4BL en EAE.

ANEXO III

Distribución del marcaje celular en las placas de incubación para los distintos experimentos.

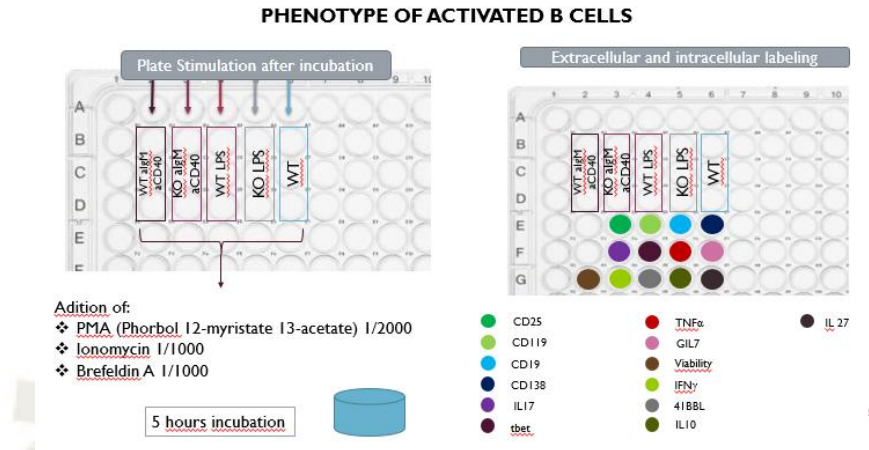


Figura 30.- Disposición de marcaje intra y extracelular para caracterizar el fenotipo de linfocitos B.

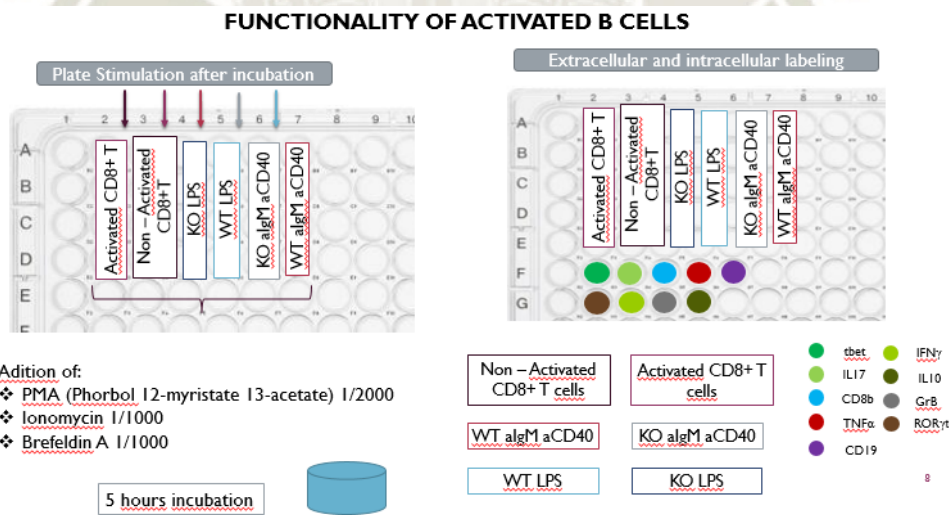


Figura 31.- Disposición de marcaje intra y extracelular para la evaluación de la funcionalidad de linfocitos B.

PHENOTYPE OF ACTIVATED B CELLS

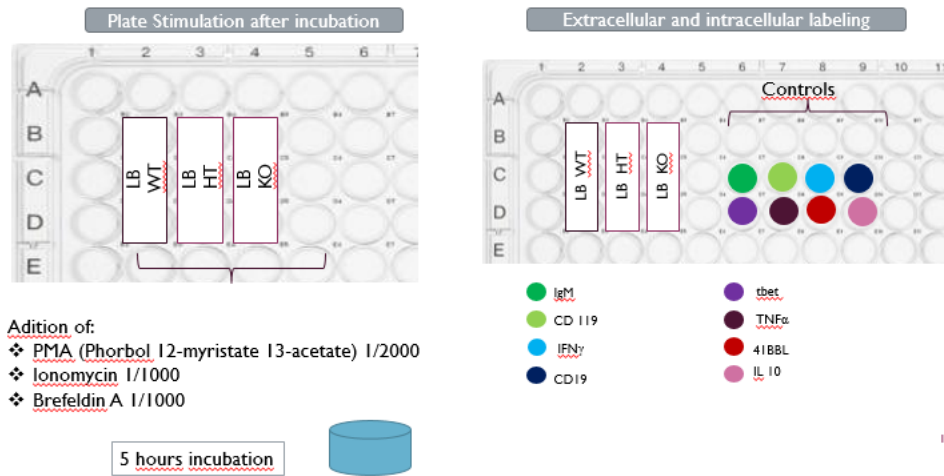


Figura 32.- Disposición de marcaje intra y extracelular para caracterizar el fenotipo de linfocitos B activos.

FUNCTIONALITY OF ACTIVATED B CELLS

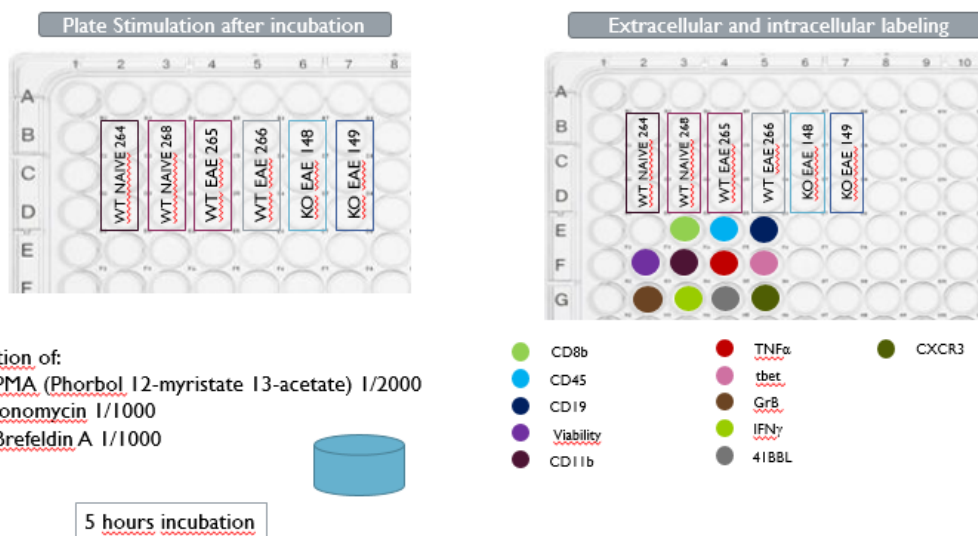


Figura 33.- Disposición para marcaje intra y extracelular de linfocitos B funcionales en la cuantificación de infiltración.