

Caracterización de las alteraciones del sistema inmune innato en la lesión medular crónica

Pablo Aguilera Martínez^{1,2*}, David Diaz Martín², Alfredo Prieto Martín²

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** Laboratorio de Enfermedades del Sistema Inmune, Departamento de Medicina y Especialidades Médicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

Resumen

La lesión de médula espinal (LME) es una condición médica grave, que causa elevada discapacidad y morbilidad en las personas que la padecen, así como una disminución en su esperanza de vida. En su fase crónica las manifestaciones clínicas se deben al daño estructural neurológico y al desarrollo de complicaciones secundarias. Existen numerosas evidencias en modelos experimentales y en pacientes que sugieren un papel del sistema inmune (SI) en la progresión del daño neurológico en la LME. También se ha visto que alteraciones del SI provocadas por la lesión medular participan en las manifestaciones clínicas secundarias generales y en otros sistemas a lo largo de la patocronia de la LME. La hipótesis de trabajo postula que la LME se asocia a alteraciones del SI tanto en su fase aguda como crónica, siendo el objetivo de este estudio profundizar en la caracterización de las alteraciones del SI innato de pacientes con LME crónica. Para ello, se caracterizaron distintos tipos celulares del SI innato mediante análisis por citometría de flujo policromática de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de 11 pacientes con LME y 13 controles sanos. Los resultados obtenidos muestran una alteración en las células de estirpe mielomonocitaria con un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias en los pacientes con LME crónica. Una mayor profundización en la caracterización del SI del paciente con LME permitirá identificar biomarcadores que podrán favorecer la individualización del pronóstico y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Palabras clave: lesión médula espinal (LME); sistema inmunitario (SI); monocito; citometría de flujo; biomarcador.

Cita: Pablo Aguilera Martínez, David Diaz Martín, Alfredo Prieto Martín (2015) Caracterización de las alteraciones del sistema inmune innato en la lesión medular crónica. *Dianas* 4(1): e20150901. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20150901. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 26 de junio de 2015

Copyright: © 2015 Pablo Aguilera Martínez et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

***E-mail:** pablo.aguiler17@gmail.com



Introducción

La lesión de médula espinal (LME) es una condición médica grave, que causa elevada discapacidad y morbilidad en las personas que la padecen, así como una disminución en su esperanza de vida [1]. Se produce cuando se interrumpen las vías nerviosas que comunican el encéfalo con el resto del organismo, ocasionando graves alteraciones neurológicas que alteran, limitan o anulan las funciones motoras, sensitivas y vegetativas en las regiones corporales localizadas debajo de la región afectada [2].

La LME supone una discapacidad que produce un grave quebranto en la calidad de vida de las personas que la padecen, así como de su entorno familiar, constituyendo un proceso con marcado consumo de recursos sanitarios y elevado coste socioeconómico [1]. La etiología más frecuente de LME es la traumática, liderada por los accidentes de tráfico, y seguida por caídas fortuitas y accidentes deportivos [2]. La LME tiene una incidencia de 9-53 casos por millón de habitantes en países desarrollados, y de 12-20 casos por millón de habitantes en España [2].

Las manifestaciones clínicas de la LME pueden ser consecuencia directa de la lesión neurológica medular, o bien indirectas por la afectación a nivel de sistema respiratorio, genitourinario, digestivo, endocrinológico e inmunitario/inflamatorio [1]. Debe señalarse que el daño neurológico de la LME no es un proceso estático, sino dinámico, que evoluciona a lo largo del tiempo debido al desarrollo de lesiones de desmielinización crónica, malacia medular y siringomiela [3].

Generalidades del sistema inmunitario

El sistema inmunitario es un complejo sistema de defensa altamente adaptado que proporciona protección frente a agresiones de cualquier tipo, generalmente microbianas. Existen dos tipos de respuestas inmunitarias, la innata y la adaptativa. La respuesta inmune innata es inespecífica, constituye la primera línea de defensa frente a las infecciones más clásicas, sirve de vínculo con el SI adaptativo, y esta mediada por los monocitos, macrófagos, células dendríticas, células Natural Killer (NK) y granulocitos [4]. Por otro lado, la respuesta inmune adaptativa es antígeno específica y altamente eficaz, la realizan los linfocitos B y T, y finaliza con el reconocimiento y la eliminación específica del antígeno causante del daño [5].

Las células del SI inmune innato expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los receptores tipo Toll (TLR). Estos reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), e inician y guían la respuesta inmune [6]. Esta respuesta inmune incluye la producción y secreción de mediadores inflamatorios, como las citoquinas, encargadas de la comunicación entre células del SI [7].

Dentro de las células del SI innato se encuentran los monocitos, los cuales median funciones reguladoras y efectoras esenciales tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. Se encuentran circulando en sangre, desde donde migran a diferentes tejidos, en donde se diferencian en distintos tipos de células efectoras, como macrófagos, células dendríticas o células de la microglía [4]. Los monocitos de sangre periférica son fenotípicamente y funcionalmente heterogéneos, estando clasificados en tres subpoblaciones en función de la expresión de CD14 (receptor del lipopolisacárido bacteriano o LPS) y de CD16 (receptor de baja afinidad para la IgG o Fc γ RIII). La subpoblación monocitaria CD14⁺CD16⁻, denominada como monocitos clásicos, es la más abundante, correspondiendo al 80-90% de los monocitos circulantes. El 10-20% de monocitos restantes corresponde a los denominados monocitos inflamatorios o de transición (CD14⁺CD16⁺), y los monocitos reguladores o no clásicos (CD14^{Low}CD16⁺) [4].

Otro de los tipos celulares del SI innato son las células dendríticas (DCs), cuya función es la de detectar patógenos, procesarlos y trasladarse a los órganos linfoides secundarios más cercanos para presentar los antígenos a los linfocitos T, encargándose de su activación y diferenciación hacia la respuesta defensiva más adecuada [8]. Las DCs se pueden clasificar en dos grandes grupos: las de origen mielóide (mDC) y las de origen linfóide o plasmacitoide (pDC). A las mDCs se les asigna una función de enlace entre la respuesta innata y la respuesta adaptativa, mientras que a las pDCs se les atribuye una función antiviral [8]. También existe una subpoblación monocitaria que muchos autores la consideran directamente un tipo de DC, los monocitos prodendríticos o MDC8, definidos por expresar el marcador SLAN, que se caracterizan por su habilidad espontánea para diferenciarse a DC. Funcionalmente duplican la capacidad de presentación antigénica de las DCs, y se caracterizan por dirigir a linfocitos T hacia una diferenciación tipo Th1 [4, 8].

Relevancia del sistema inmunitario en la lesión medular

El SI y el sistema nervioso central (SNC) constituyen un eje en constante interacción, aun con el privilegio inmunológico, gracias en parte a la existencia de la barrera hematoencefálica (BBB), de este último [9]. Se ha visto que enfermedades del SNC producen alteraciones del SI, así como que el SI participa en la patogenia de dichas enfermedades [10]. En el caso concreto de la LME, el papel del SI se encuentra establecido por la acumulación de evidencias en modelos experimentales y en pacientes que sugieren su contribución a agravar el daño neurológico medular, tanto en sus fases aguda como crónica [11]. En humanos, se ha demostrado que en la fase aguda de la enfermedad se produce un marcado compromiso de los compartimentos circulantes de células del SI innato NK y monocitos [12, 13]. Por el contrario, también se ha sugerido que el SI podría en algunas circunstancias tener efectos beneficiosos en la lesión neurológica, lo que apoyaría la teoría de un papel bimodal del SI en la LME [5].

Diversos motivos, como la aparición de un neurotrauma, pueden provocar la rotura de la BBB, lo que promueve la liberación de grandes cantidades de antígenos del SNC, generando una respuesta inmune adaptativa frente a dichos antígenos [5]. En este sentido, se ha asociado a la LME una activación periférica de linfocitos T y B, con expansión de clones linfocitarios autorreactivos, y producción de autoanticuerpos frente a antígenos de tejido nervioso, como la proteína básica de mielina (MBP) [14].

Las alteraciones del SI provocadas por la lesión medular también participan en las manifestaciones clínicas secundarias generales y en otros órganos a lo largo de la patocronía de la LME [11]. La etiopatogenia de dicha alteración del SI es compleja, pues implica la participación simultánea o secuencial de diferentes mecanismos a lo largo de la evolución de la enfermedad. En la fase aguda el compromiso del SI se relaciona con el estrés de la agresión traumática o del factor etiológico causante, y con las medidas terapéuticas aplicadas [1]. En la fase crónica también se implican otros factores patogénicos que alteran el SI, como el daño en el sistema nervioso autónomo (SNA), las frecuentes infecciones y la existencia de traslocación bacteriana [15]; así como otros factores como la inactividad física, la dieta o factores psicológicos [7].

Hipótesis y objetivo del estudio

La LME es una enfermedad dinámica incluso en su fase crónica por la progresión del daño neurológico y el desarrollo de complicaciones en otros órganos y sistemas, con implicación del SI en su patogenia. Aunque se ha avanzado mucho en los procesos inmunológicos involucrados en la fase aguda (2 semanas), es menos conocido el estado inmunológico de pacientes en la fase postaguda (2-52 semanas) o crónica (más de 52 semanas). Por ello, es necesario avanzar en el conocimiento de las alteraciones del SI en los pacientes con lesión medular crónica.

La hipótesis de trabajo postula que la LME se relaciona a alteraciones del SI en su fase crónica, y que dichas alteraciones pueden contribuir al daño neurológico y a otras manifestaciones clínicas secundaria asociadas a esta enfermedad. El objetivo general de este estudio es profundizar en la caracterización de las alteraciones del SI innato en pacientes con LME crónica. Para conseguir dicho objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos específicos: a) Caracterización de las subpoblaciones de monocitos de sangre periférica, definidas por la intensidad de expresión de CD14 y CD16, y con estudio de la expresión de receptores de quimioquinas, y de la molécula de adhesión L-selectina (o CD62L). b) Análisis de la expresión de los receptores TLR-2, TLR-4 y TLR-9 en las subpoblaciones de monocitos de sangre periférica. c) Análisis de las subpoblaciones de monocitos de sangre periférica productores de citoquinas IL-1 β , IL-10, IL-6 y TNF- α . d) Caracterización de las subpoblaciones de células dendríticas de sangre periférica, por la expresión de CD14, CD16, HLA-DR, CD11c, CD1c y CD123.

Materiales y métodos

Población de estudio y obtención de las muestras

La población de estudio incluye a un total de 11 pacientes con diagnóstico clínico de lesión medular crónica, de un año o más de evolución, que proceden del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo, y a un total de 13 controles, pareados en género y edad, sin que hubiera diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en este aspecto. Los criterios de exclusión fueron: 1) Edad inferior a 18 años o superior a 55 años. 2) Haber padecido una neoplasia, otra enfermedad autoinmune sistémica u órgano específico, o tener antecedentes familiares directos de enfermedad desmielinizante. 3) Padecer una afectación grave a nivel renal, cardíaca o hepática. 4) Grave deterioro del estado general por algún proceso independiente de la LME. 5) Haber recibido tratamiento con esteroides, inmunosupresores u otros fármacos con reconocida actividad sobre el sistema inmune en el año previo al momento de inclusión. 6) Estar embarazada o en el puerperio inmediato en el momento de inclusión en el estudio. 7) Sufrir en el momento de inclusión una enfermedad infecciosa crónica o activa que no esté relacionada con las complicaciones de la LME.

Las muestras de sangre de ambos grupos se extrajeron mediante venopunción antecubital, en tubos de heparina-litio. La sangre de los pacientes se extrajo en el hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo, conservándose a 4°C hasta su entrega en un tiempo inferior a cuatro horas, mientras que la de los controles se extrajo de voluntarios sanos en el Hospital Príncipe de Asturias.

Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Se separaron PBMCs mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (LymphoprepTM, Axis-Shield, Oslo, Noruega), tal y como se describe en [16]. Las PBMCs purificadas se resuspendieron en medio RPMI 1640 (BioWhittaker products, Vervies, Bélgica), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 25 mM de Hepes (BioWhittake), y 1% de Penicilina-Estreptomicina (BioWhittake). El conteo celular inicial se realizó mediante microscopía óptica convencional empleando una cámara Neubauer, determinando la viabilidad celular por dilución previa con Azul Tripan al 0,1%. Las células se mantuvieron a 4°C en una concentración final de 10⁶ células/mL.

Estudio del SI innato mediante citometría de flujo policromática

Para la caracterización de las subpoblaciones de monocitos se emplearon los anticuerpos monoclonales: CD14-QD655, CD16-Alexa405, HLA-DR-PerCP, CD3-APC, CD19-APC, CD56-APC, CCR2-PercP-Cy5.5 y CD62L-Alexa780 (BD Biosciences), CX3CR1-FITC y CD11C-PE-CY7 (e-Biosciences), SLAN-PE (Miltenyi), y la sonda de exclusión vital Acqua-QD565 (Invitrogen).

Para el análisis de TLRs de monocitos se emplearon los anticuerpos monoclonales: CD14-QD655, CD16-Alexa405, TLR2-FITC, TLR4-APC y TLR9-PE (BD Biosciences).

Para la caracterización de las subpoblaciones de células dendríticas se emplearon los anticuerpos monoclonales: CD14-QD655, CD16-Alexa405, HLA-DR-PerCP, CD3-APC, CD19-APC, CD56-APC, CD123-PercP-Cy5.5, y CD62L-Alexa780, (BD Biosciences), CX3CR1-FITC y CD11C-PE-CY7 (e-Bioscience), CD1c-PE (Miltenyi), y la sonda de exclusión vital Acqua-QD565.

Para el análisis de la producción de citoquinas por parte de monocitos de sangre periférica, se realizaron cultivos de PBMCs en medio completo (1 mL de células a 10^6 cel/mL). La estimulación de las PBMCs se realizó añadiendo 10 μ L de LPS (50 μ g/mL) (Sigma Aldrich, Química, España), y 20 μ L de monensina (100 μ M) (Sigma Aldrich), un inhibidor de la secreción vesicular. Para el control sin estimulación, se añadió únicamente 20 μ L de monensina (100 μ M). Se incubaron durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂, y se procedió a añadir los anticuerpos monoclonales CD14-PerCP, CD16-Alexa647 (BD Biosciences), y la sonda de exclusión vital Acqua-QD565. Después, se procedió a fijar y permeabilizar la muestra, siguiendo el protocolo de fijación/permeabilización para realizar marcaje de citoquinas intracelulares con los Reactivos A y B (Fix perm médium A y B de Caltag, INVITROGEN, Austria). Finalmente, se añadieron los anticuerpos monoclonales IL1 β -FITC, IL10-PE, IL6-V505 y TNF α -Alexa700 (BD Biosciences).

En todos los casos, una vez añadidos los anticuerpos monoclonales, las células se incubaron 20 minutos a 4°C en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se realizó un lavado con tampón fosfato salino (PBS), para eliminar el exceso de anticuerpo, y finalmente se añadieron 100 μ L de PBS para su posterior adquisición por citometría de flujo. La adquisición de muestras se llevó a cabo mediante citometría de flujo policromática cuantitativa en nueve colores con un FACSAria II SORP (BD) mediante el programa FACSDiva (BD, versión 6).

Análisis de datos

Los datos obtenidos por citometría de flujo se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR, EEUU), y se elaboró una base de datos en Excell (versión 10). La obtención de gráficas se realizó mediante el programa SigmaPlot (versión 11). El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics (versión 22). Para la comparación de las variables se utilizó el test estadístico no paramétrico U de Mann Witney, considerándose significativas las diferencias encontradas cuando la probabilidad aleatoria (p) era menor a 0,1.

Resultados

Caracterización de las subpoblaciones de monocitos de sangre periférica

Como se indica en la figura 1, no se observan diferencias significativas en la distribución de las distintas subpoblaciones de monocitos de sangre periférica, entre el grupo de controles sanos (CS) y el grupo de pacientes con lesión medular crónica (LME). Por otro lado, se observó en el grupo LME un aumento de monocitos prodendrícticos o MDC8 (figura 1D), aunque este no alcanzó la significación estadística.

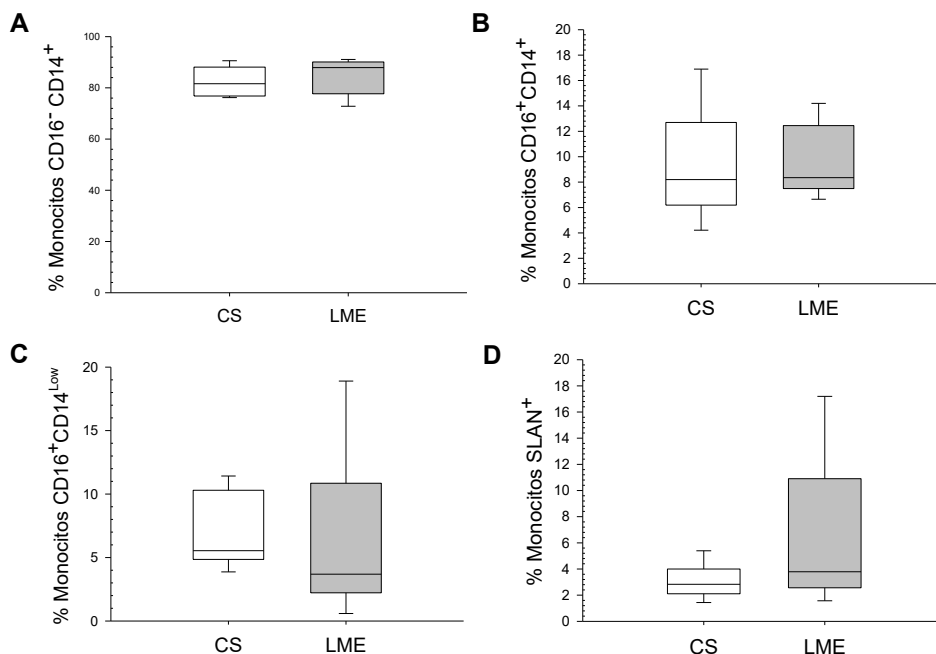


Figura 1.- Distribución de las diferentes subpoblaciones de monocitos de sangre periférica. Se muestra en blanco controles sanos (CS, n=11), y en gris pacientes con lesión medular (LME, n=9). a) Monocitos clásicos (CD14⁺CD16⁻). b) Monocitos inflamatorios o de transición (CD14⁺CD16⁺). c) Monocitos reguladores o no clásicos (CD14^{low}CD16⁺). d) Monocitos prodendrícticos (SLAN⁺).

En cuanto a la expresión de la molécula de adhesión CD62L, se observó en el grupo LME un aumento significativo en los monocitos que la expresan fuertemente (CD62L^{High}) (figura 2A) ($p=0,076$), y una disminución significativa en aquellos que la expresan débilmente (CD62L^{Low}) (figura 2B) ($p=0,017$). Asimismo, no se encontraron diferencias significativas en los monocitos que no la expresan (CD62L⁻), entre grupos CS y LME (figura 2C). El aumento de monocitos CD62L^{High} en el grupo LME fue estadísticamente significativo en las subpoblaciones de inflamatorios ($p=0,017$), reguladores ($p=0,011$), y prodendríticos ($p=0,02$), no así en clásicos (Material suplementario, Figura 6).

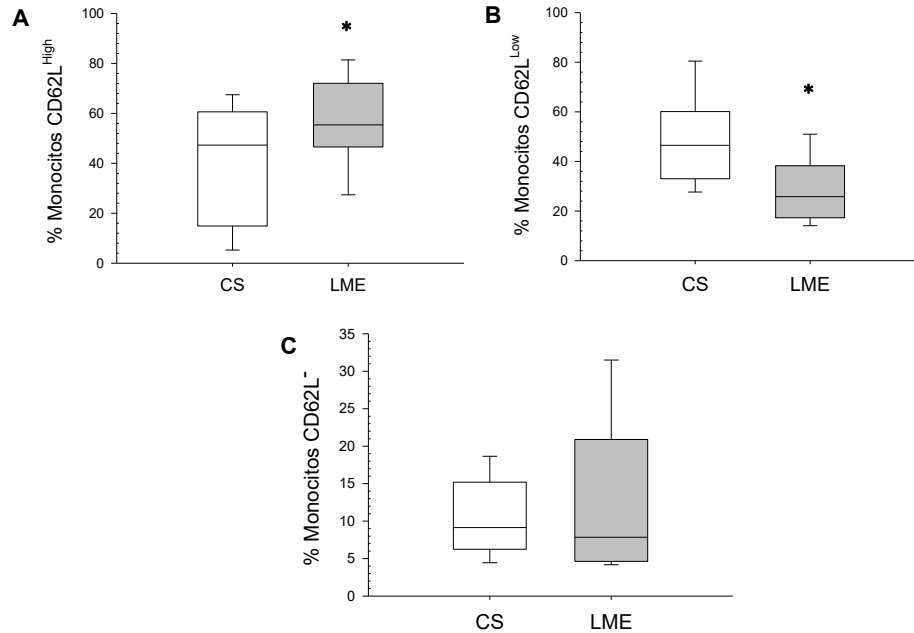


Figura 2. Análisis de la expresión de CD62L en monocitos de sangre periférica. Se muestra en blanco controles sanos (CS, n=11), y en gris pacientes con lesión medular (LME, n=9). a) Monocitos CD62L^{High}. b) Monocitos CD62L^{Low}. c) Monocitos CD62L⁻. * indica una diferencia estadísticamente significativa entre grupos CS y LME.

Análisis de la expresión de TLRs en monocitos de sangre periférica

Como podemos observar en la figura 3A, encontramos un aumento significativo en la proporción de monocitos TLR-9⁺ (figura 3A) ($p=0,057$), en el grupo LME respecto a CS. Dicho aumento significativo se observó también en las subpoblación de monocitos clásicos ($p=0,049$), no así en las subpoblaciones de inflamatorios y reguladores (Material suplementario, figura 7).

También se observó una disminución en el grupo LME de los monocitos TLR-4⁺, tanto a nivel de monocitos totales (figura 3B), como en las distintas subpoblaciones (Material suplementario, figura 8), aunque esta no alcanzó la significación estadística.

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la proporción de monocitos TLR-2⁺ (datos no mostrados) entre grupos CS y LME.

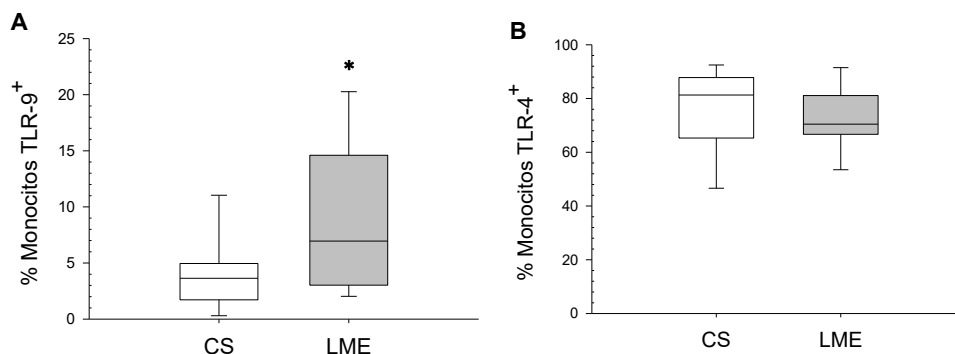


Figura 3.- Análisis de la expresión de TLRs en monocitos de sangre periférica. Se muestra en blanco controles sanos (CS, n=11), y en gris pacientes con lesión medular (LME, n=10). a) Monocitos TLR-9⁺. b) Monocitos TLR-4⁺. * indica una diferencia estadísticamente significativa entre grupos CS y LME.

Análisis de la producción de citoquinas de monocitos de sangre periférica

La figura 4 muestra un aumento significativo de monocitos productores de IL-1 β ($p=0,072$) y de TNF- α ($p=0,072$), tras estimulación con LPS, en el grupo LME. De igual manera, se observó un aumento de monocitos productores de IL-6 (figura 4C), aunque este no alcanzó la significación estadística. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la proporción de monocitos productores de IL-10 (figura 4D). El control sin estimulación (producción espontánea) no mostró diferencias en la proporción de monocitos productores de citoquinas entre grupos CS y LME (Material suplementario, figura 9).

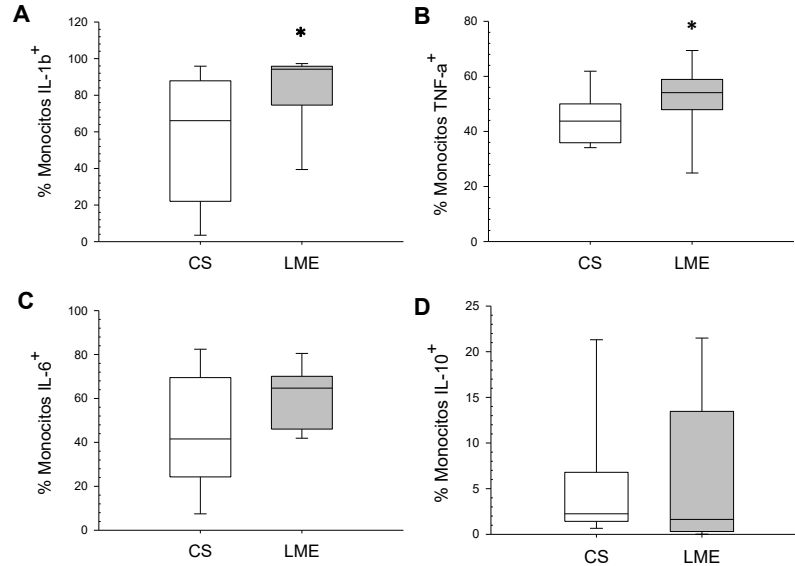


Figura 4.- Análisis de la producción de citoquinas de monocitos de sangre periférica estimulados con LPS. Se muestran en blanco controles sanos (CS, n=10), y en gris pacientes con lesión medular (LME, n=9). a) Monocitos productores de IL-1 β . b) Monocitos productores de TNF- α . c) Monocitos productores de IL-6. d) Monocitos productores de IL-10. * indica una diferencia estadísticamente significativa entre grupos CS y LME.

Caracterización de las subpoblaciones de células dendríticas de sangre periférica

Se observó en el grupo LME una disminución significativa de células dendríticas plasmacitoides (pDC) (Figura 5^a) ($p=0,046$), así como un aumento significativo de células dendríticas mieloides (mDC) (Figura 5^a) ($p=0,046$). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en las subpoblaciones de células mieloides tipo 1 (mDC-I) y tipo 2 (mDC-II) entre grupos CS y LME (Figura 5C y 5D).

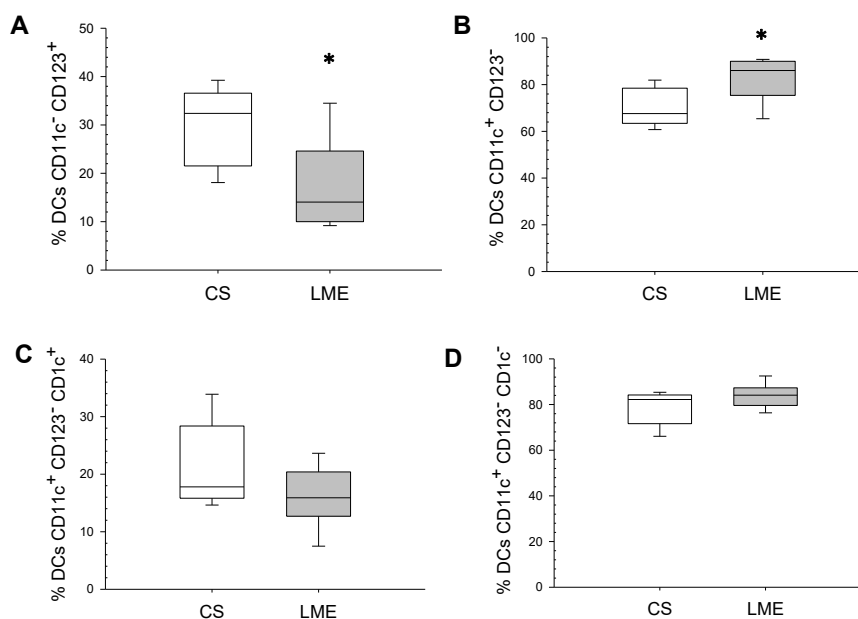


Figura 5.- Caracterización de las subpoblaciones de células dendríticas de sangre periférica. Se muestran en blanco controles sanos (CS, n=7), y en gris pacientes con lesión medular (LME, n=9). a) pDC (CD11c⁻CD123⁺). b) mDC (CD11c⁺CD123⁻). c) mDC-I (CD11c⁺CD123⁻CD1c⁺) d) mDC-II (CD11c⁺CD123⁻CD1c⁻). * indica diferencia estadísticamente significativa entre grupos CS y LME.

Discusión

Este trabajo muestra que el SI innato de los pacientes con LME se encuentra alterado en la fase crónica de la enfermedad. Estos resultados contribuyen así a ampliar el conocimiento de las alteraciones del sistema inmune en las enfermedades neurológicas.

Las distintas subpoblaciones de monocitos de sangre periférica tienen diferentes propiedades de secreción de citoquinas, de expresión de quimiorreceptores, de migración a tejido y de diferenciación en los distintos tipos de células efectoras [4]. Así, el estudio de la distribución de dichas subpoblaciones ha aportado evidencias fisiopatológicas asociadas a diferentes patrones de alteración en los procesos inflamatorios de diferentes enfermedades [17]. En este sentido, en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, se ha empleado la caracterización de monocitos de sangre periférica mediante citometría de flujo como biomarcador predictivo de respuesta a distintos tratamientos [18, 19]. En nuestro estudio, no encontramos diferencias en la distribución de las distintas subpoblaciones de monocitos de sangre periférica. Sin embargo, se observaron alteraciones en la expresión de la molécula de adhesión L-selectina (o CD62L) y en la expresión de los receptores tipo Toll (TLRs).

La L-selectina es una molécula expresada por numerosas células del SI, cuya función es la de promover la adhesión inicial de estas células al endotelio vascular. Además, es un marcador de activación de monocitos [20]. En nuestro estudio observamos un aumento de monocitos que expresan en gran número la L-selectina (CD62L^{High}), junto con una disminución de aquellos que la expresan en bajo número (CD62L^{Low}); siendo estas diferencias especialmente evidentes en las subpoblaciones de monocitos inflamatorios y reguladores. Estudios anteriores ha demostrado que tras el neurotrauma, en el foco de la agresión medular se genera señalización inflamatoria que provoca una infiltración celular preferentemente formada por linfocitos, monocitos y células dendríticas, la cual persiste en el tiempo con evidencias de cronificación [10]. Así, se ha visto que se produce una acumulación de células de la microglía y macrófagos en los espacios medulares lesionados [21]. En este sentido, nuestros resultados indican un estado activado promigratorio de monocitos inflamatorios y reguladores, que podría corresponderse con un aumento en la infiltración de estas células al tejido extravascular inflamado.

Los TLR son receptores localizados en la superficie y en el citoplasma de numerosos tipos celulares del sistema inmune innata, que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos, y que, tras su activación, señalizan al núcleo promoviendo la respuesta inmune. Nuestros resultados muestran un aumento en monocitos de la expresión de TLR-9, el cual reconoce secuencias CpG de ADN no metiladas, características del ADN de bacterias [6]. Se ha visto que las interacciones de las bacterias con el SI no solo desencadena respuestas adaptativas frente a sus antígenos, sino también a través de productos y componentes traslocados como el LPS y el DNA [22]. Además, diversos estudios han demostrado la relevancia patogénica de la traslocación bacteriana subclínica en la inducción de activación del SI y de un estado inflamatorio sistémico [22]. En este sentido, la existencia de la traslocación bacteriana intestinal se ha establecido en modelos experimentales de LME [23].

En los pacientes con LME son frecuentes las infecciones bacterianas en su fase aguda y crónica, y se han relacionado con la progresión del daño neurológico [12], pero dado que los pacientes del estudio no muestran signos de infecciones concurrentes, nuestros resultados apoyan la idea de que se esté produciendo una traslocación bacteriana subclínica de origen intestinal o de otras mucosas como la urinaria, y que esta sea causante, al menos en parte, de la alteración del sistema inmune. Por el contrario, las alteraciones en la expresión de TLRs también podrían ser el reflejo de la afectación directa del sistema inmune por el daño neurológico. En este sentido, en otras líneas de investigación englobadas dentro de este proyecto, se plantea el análisis de los niveles en suero de DNA bacteriano, LPS y de la proteína de unión a LPS (LBP), con el fin de determinar la relevancia de la traslocación bacteriana en los pacientes con LME.

Las citoquinas son pequeñas proteínas fundamentales en la orquestación de la respuesta inmunitaria e inflamatoria y en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune. Una disrupción en el balance de citoquinas conduce a la disfunción inmune y a la inmunopatogénesis [15]. En nuestro estudio se observó un perfil anormal de producción citoquinas por parte de monocitos, con un aumento en la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , y sin variaciones en los niveles de la citoquina inmunosupresora IL-10. Dicho balance muestra un cambio de función hacia un fenotipo proinflamatorio en los monocitos del paciente con LME crónica.

Los macrófagos y células de la microglía presentes en los espacios medulares lesionados expresan marcadores de activación y producen citoquinas y otros mediadores inflamatorios [24]. Se ha comprobado la producción local de IL-1 β , IL-6, TNF- α , quimioquinas, metaloproteasa 9 y radicales libres [25, 26]. Además, en fases crónicas de la enfermedad se ha demostrado la existencia de alteraciones en los niveles sanguíneos de citoquinas. Así, se ha descrito un aumento de IL-6 y TNF- α en suero, sin variaciones en los niveles de IL-4 e IL-10, proponiéndose como indicativo de un sesgo hacia una polarización Th1 [15, 21].

De este modo, el balance proinflamatorio de citoquinas observado en nuestro estudio, podría participar en el progresivo daño neurológico de la LME y en la patogenia de la autoinmunidad. A fin de determinar si dicha alteración en el equilibrio de las citoquinas es sistémica, en otras líneas de investigación dentro de este proyecto, se plantea el análisis de los niveles en suero de las citoquinas IL-1, IL-6, IL12, IL-4, IL-17, TNF α , IL-10 E IFN γ .

La función principal de las células dendríticas consiste en servir de enlace entre el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo. En nuestro estudio pudimos observar un cambio en la distribución de las distintas subpoblaciones de células dendríticas, representado por un aumento en la proporción de mieloides, y una disminución en la de plasmacitoides. Esto podría ser el reflejo de un aumento de capacidad presentadora de antígenos, enlace entre el SI innato y adaptativo, en pacientes con LME crónica. Dicho posible aumento en la capacidad presentadora de antígenos a células del SI adaptativo por parte del SI innato, junto con el citado balance proinflamatorio en la secreción de citoquinas por parte de monocitos, se podría relacionar con una respuesta autoinmunitaria de tipo Th1/Th17 frente a antígenos del SNC.

Para comprobar dicha hipótesis, en otras líneas de investigación dentro de este proyecto, se plante tanto el análisis de producción de citoquinas por parte de linfocitos T de sangre periférica IL-4, IL-17, TNF α , IL-2, IFN γ e IL-10, para definir patrones de polarización Th1/Th2/Th17; como la caracterización de la respuesta inmunitaria autorreactiva frente a la proteína básica de mielina (MBP) por parte de linfocitos T.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio se encuentran en consonancia con la hipótesis de que la lesión medular se asocia a alteraciones del SI en su fase crónica. Más concretamente, todos estos resultados, tomados en conjunto, indican una alteración en las células de estirpe mielomonocitaria con un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias, en los pacientes con LME crónica.

Dado que tiene lugar en pacientes sin evidencias de infección concurrente, esta alteración del SI es consecuencia de la lesión medular, de una forma directa o indirecta. De este modo, esta alteración del SI podría relacionarse bien con un papel del SI en la patogenia de la LME, bien con una alteración directa del SI por el daño neurológico, o bien con la existencia de traslocación bacteria en estos pacientes; sin ser ninguna de estas tres posibilidades excluyentes entre ellas.

Este estudio se encuentra englobado dentro de un proyecto de investigación de mayor envergadura, y aunque los resultados obtenidos son esperanzadores, el estudio tiene importantes limitaciones. Se debe tener en cuenta el escaso número de pacientes y controles analizados, y el hecho de que únicamente se ha estudiado algunos tipos celulares del SI inmune innato, desconociéndose las alteraciones del resto del SI en la LME.

Por ello, en el proyecto de investigación se plantea una caracterización completa de las alteraciones del SI en los pacientes con LME crónica. La adquisición de estos conocimientos permitirá identificar biomarcadores que podrán favorecer la individualización del pronóstico de los pacientes y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, que mejoren la sombría historia natural de la LME.

Referencias bibliográficas

1. Chen Y, Tang Y, Vogel LC, Devivo MJ: Causes of spinal cord injury. *Topics in spinal cord injury rehabilitation* 2013, 19(1):1-8.
2. Rahimi-Movaghar V, Sayyah MK, Akbari H, Khorramirouz R, Rasouli MR, Moradi-Lakeh M, Shokraneh F, Vaccaro AR: Epidemiology of traumatic spinal cord injury in developing countries: a systematic review. *Neuroepidemiology* 2013, 41(2):65-85.
3. Totoiu MO, Keirstead HS: Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination. *The Journal of comparative neurology* 2005, 486(4):373-383.
4. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F: Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology* 2009, 27:669-692.
5. Laliberte AM, Fehlings MG: The immunological response to spinal cord injury: helpful or harmful? *Experimental neurology* 2013, 247:282-285.
6. Chang ZL: Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 2010, 59(10):791-808.

7. Teeling JL, Perry VH: Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: underlying mechanisms. *Neuroscience* 2009, 158(3):1062-1073.
8. Hespel C, Moser M: Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. *European journal of immunology* 2012, 42(10):2535-2543.
9. Carare RO, Hawkes CA, Weller RO: Afferent and efferent immunological pathways of the brain. Anatomy, function and failure. *Brain, behavior, and immunity* 2014, 36:9-14.
10. Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA, Dekaban GA, Marcillo AE, Saenz AD, Pasquale-Styles M, Dietrich WD, Weaver LC: The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain : a journal of neurology* 2006, 129(Pt 12):3249-3269.
11. Hagen EM, Lie SA, Rekand T, Gilhus NE, Gronning M: Mortality after traumatic spinal cord injury: 50 years of follow-up. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2010, 81(4):368-373.
12. Campagnolo DI, Dixon D, Schwartz J, Bartlett JA, Keller SE: Altered innate immunity following spinal cord injury. *Spinal cord* 2008, 46(7):477-481.
13. Riegger T, Conrad S, Schluesener HJ, Kaps HP, Badke A, Baron C, Gerstein J, Dietz K, Abdizahdeh M, Schwab JM: Immune depression syndrome following human spinal cord injury (SCI): a pilot study. *Neuroscience* 2009, 158(3):1194-1199.
14. Ankeny DP, Popovich PG: B cells and autoantibodies: complex roles in CNS injury. *Trends in immunology* 2010, 31(9):332-338.
15. Davies AL, Hayes KC, Dekaban GA: Clinical correlates of elevated serum concentrations of cytokines and autoantibodies in patients with spinal cord injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 2007, 88(11):1384-1393.
16. Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation Supplementum* 1968, 97:77-89.
17. Cairns AP, Crockard AD, Bell AL: The CD14+ CD16+ monocyte subset in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology international* 2002, 21(5):189-192.
18. Chara L, Sanchez-Atrio A, Perez A, Cuende E, Albarran F, Turrion A, Chevarria J, del Barco AA, Sanchez MA, Monserrat J *et al*: The number of circulating monocytes as biomarkers of the clinical response to methotrexate in untreated patients with rheumatoid arthritis. *Journal of translational medicine* 2015, 13:2.
19. Chara L, Sanchez-Atrio A, Perez A, Cuende E, Albarran F, Turrion A, Chevarria J, Sanchez MA, Monserrat J, de la Hera A *et al*: Monocyte populations as markers of response to adalimumab plus MTX in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 2012, 14(4):R175.
20. Rzeniewicz K, Newe A, Rey Gallardo A, Davies J, Holt MR, Patel A, Charras GT, Stramer B, Molenaar C, Tedder TF *et al*: L-selectin shedding is activated specifically within transmigrating pseudopods of monocytes to regulate cell polarity in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015, 112(12):E1461-1470.
21. Beck KD, Nguyen HX, Galvan MD, Salazar DL, Woodruff TM, Anderson AJ: Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain : a journal of neurology* 2010, 133(Pt 2):433-447.
22. Koboziev I, Reinoso Webb C, Furr KL, Grisham MB: Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free radical biology & medicine* 2014, 68:122-133.
23. Liu J, An H, Jiang D, Huang W, Zou H, Meng C, Li H: Study of bacterial translocation from gut after paraplegia caused by spinal cord injury in rats. *Spine* 2004, 29(2):164-169.
24. Pajooesh-Ganji A, Knoblach SM, Faden AI, Byrnes KR: Characterization of inflammatory gene expression and galectin-3 function after spinal cord injury in mice. *Brain research* 2012, 1475:96-105.
25. Donnelly DJ, Popovich PG: Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Experimental neurology* 2008, 209(2):378-388.
26. Nieto-Diaz M, Esteban FJ, Reigada D, Munoz-Galdeano T, Yunta M, Caballero-Lopez M, Navarro-Ruiz R, Del Aguila A, Maza RM: MicroRNA dysregulation in spinal cord injury: causes, consequences and therapeutics. *Frontiers in cellular neuroscience* 2014, 8:53.

Material suplementario

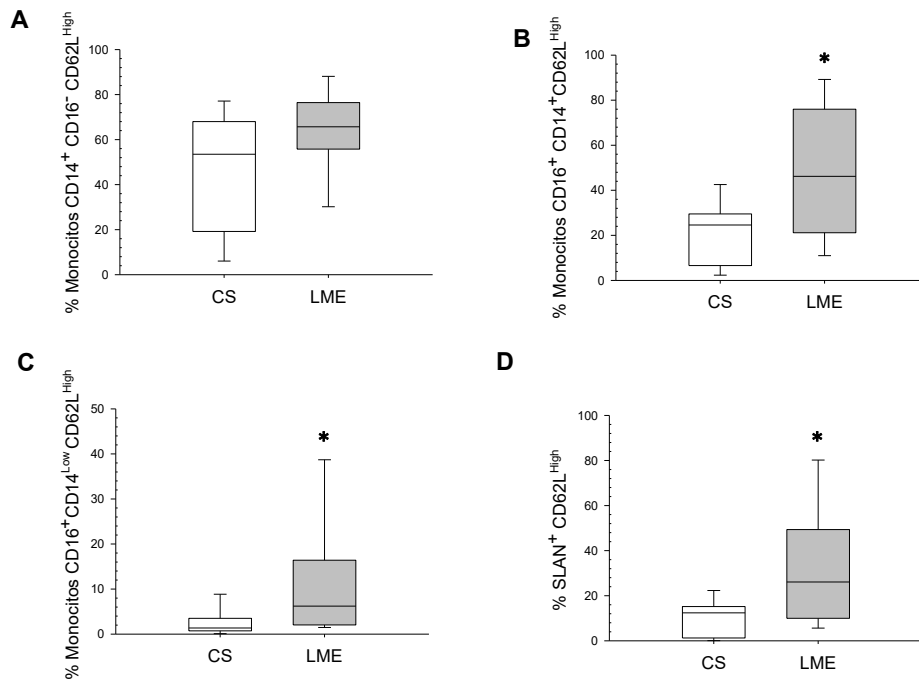


Figura 6. Análisis de la expresión de CD62L^{High} en las diferentes subpoblaciones de monocitos de sangre periférica. Se muestran en blanco controles sanos (CS, n=11), y en gris pacientes con lesión medular (LME, n=9). a) Monocitos clásicos (CD14⁺CD16⁻) CD62L^{High}. b) Monocitos inflamatorios o de transición (CD14⁺CD16⁺) CD62L^{High}. c) Monocitos reguladores o no clásicos (CD14^{low}CD16⁺) CD62L^{High}. d) Monocitos prodendríticos (SLAN⁺) CD62L^{High}. * indica una diferencia estadísticamente significativa entre grupos CS y LME.

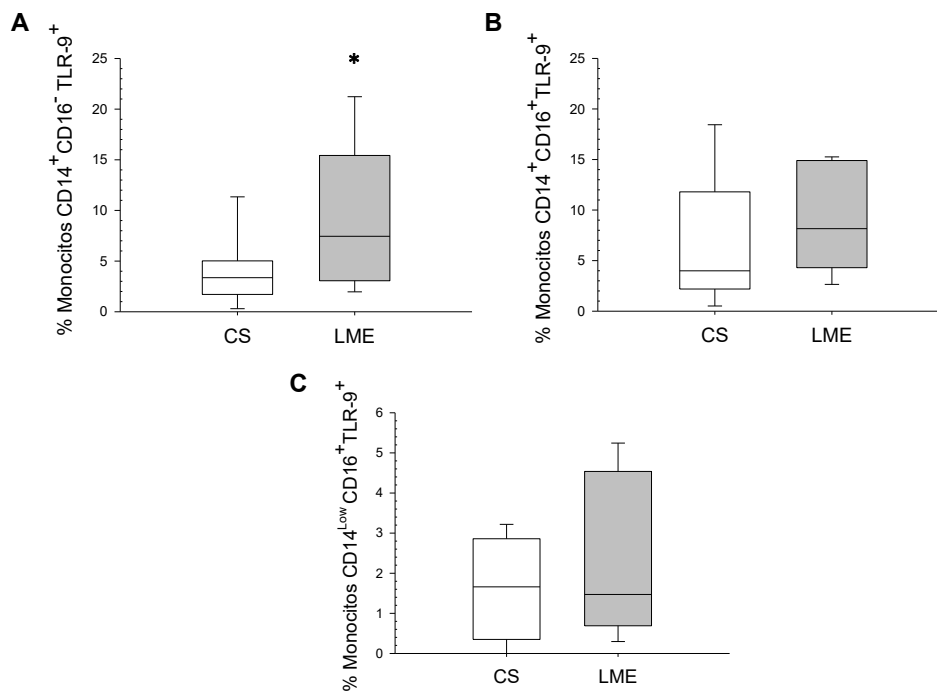


Figura 7.- Análisis de la expresión de TLR-9 en las distintas subpoblaciones de monocitos de sangre periférica. Se muestra en blanco controles sanos (CS, n=11), y en gris pacientes con lesión medular (LME, n=10). a) Monocitos clásicos (CD14⁺CD16⁻) TLR9⁺. b) Monocitos inflamatorios o de transición (CD14⁺CD16⁺) TLR9⁺. c) Monocitos reguladores o no clásicos (CD14^{low}CD16⁺) TLR9⁺. * indica una diferencia estadísticamente significativa entre grupos CS y LME.

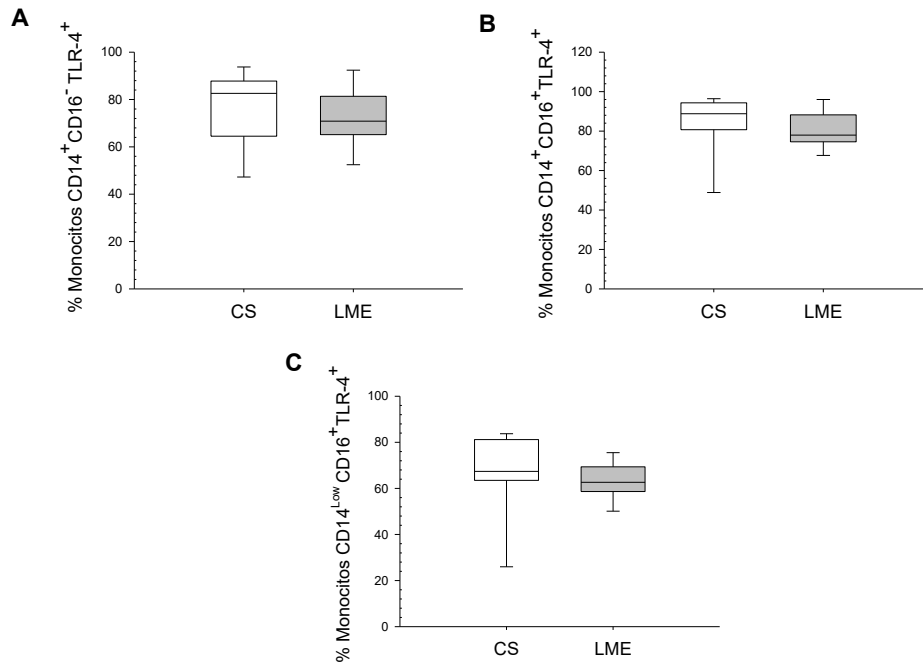


Figura 8.- Análisis de la expresión de TLR-4 en las distintas subpoblaciones de monocitos de sangre periférica. Se muestra en blanco controles sanos (CS, n=11), y en gris pacientes con lesión medular (LME, n=10). a) Monocitos clásicos (CD14⁺CD16⁻) TLR4⁺. b) Monocitos inflamatorios o de transición (CD14⁺CD16⁺) TLR4⁺. c) Monocitos reguladores o no clásicos (CD14^{low}CD16⁺) TLR4⁺.

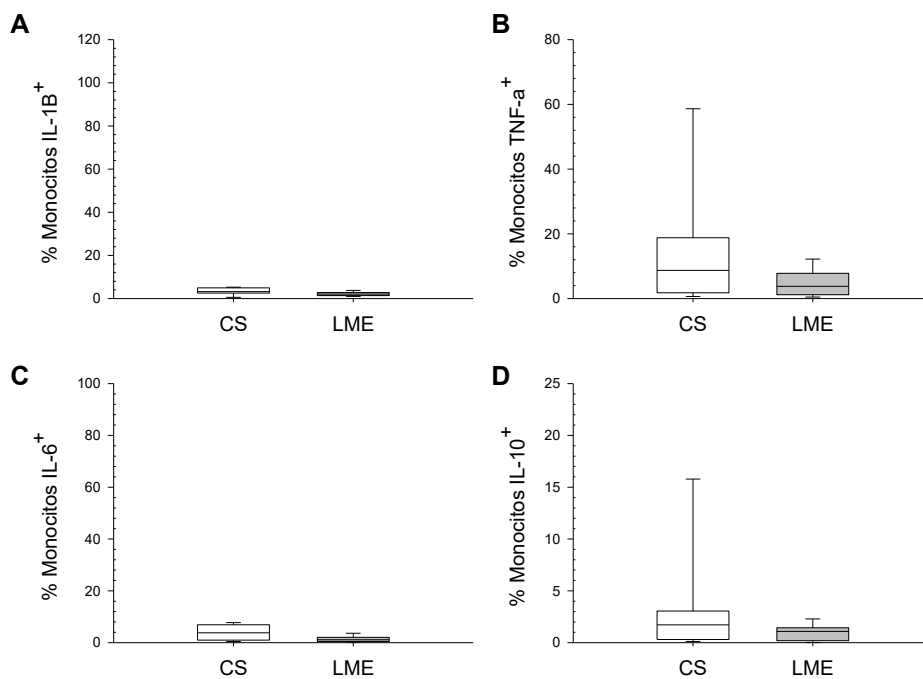


Figura 9.- Análisis de la producción de citoquinas de monocitos de sangre periférica sin estimular. Se muestra en blanco controles sanos (CS, n=10), y en gris pacientes con lesión medular (LME, n=9). a) Monocitos productores de IL-1β. b) Monocitos productores de TNF-α. c) Monocitos productores de IL-6. d) Monocitos productores de IL-10.