

Estudio de la senescencia linfocitaria T en pacientes con lesión de médula espinal crónica.

Sergio Dávila Martínez^{1, 2, a}, Sergio Haro Girón², Andrea López Suárez², Raquel Oliva Martín², David Díaz Martín^{2, b}

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 Medicina individualizada traslacional en inflamación y cáncer, departamento de medicina y especialidades médicas, facultad de medicina, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

a. sergio.davila@edu.uah.es b. david.diaz@uah.es

Palabras clave: Lesión de médula espinal crónica; Linfocito T, Proteína básica de mielina; autorreactividad; apoptosis; senescencia.

Resumen

La Lesión de Médula Espinal (LME) es una patología grave que causa un daño que conduce a cambios irreversibles en el sistema nervioso central, provocando con ello una elevada discapacidad y morbilidad en las personas que la padecen, así como disminución en su esperanza de vida. Como consecuencia del daño primario en la médula espinal se desencadena un proceso inflamatorio en el que interviene el sistema inmunológico (SI), que mantiene este estado inflamatorio de forma prolongada en el tiempo. Se han demostrado alteraciones en el sistema inmune tanto innato como adaptativo, durante una primera fase aguda, y existen diferentes estudios que demuestran que estas alteraciones se mantienen durante una fase crónica de la enfermedad. En otras patologías de base inmunológica se ha evidenciado una senescencia prematura del SI como consecuencia de este estado inflamatorio crónico. La hipótesis de este trabajo establece que los pacientes con LME presentan un estado de envejecimiento prematuro del SI, y concretamente del compartimento linfocitario T. Se realiza una caracterización de los linfocitos T cooperadores (Th) y citotóxicos (Tc) en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), obtenidas de muestras de sangre de pacientes con LME en estado crónico y controles sanos. Los resultados obtenidos muestran alteraciones en el compartimento linfocitario T de pacientes con LME crónica, con un estado linfocitario altamente diferenciado, una pequeña disminución del receptor coestimulador CD28, una disminución de la población de linfocitos T no activados apoptóticos, un aumento de la población de linfocitos T activados apoptóticos y un aumento de las células T reactivas específicas contra MBP. Esto se traduce en un envejecimiento del SI en estos pacientes con LME, que podría provocar una disfunción inmunitaria que conllevara la aparición de infecciones y predispusiera al desarrollo de una enfermedad autoinmune.

Cita: Dávila Martínez, Sergio; Haro Girón, Sergio; López Suárez, Andrea; Oliva Martín, Raquel; Díaz Martín, David (2017) Estudio de la senescencia linfocitaria T en pacientes con lesión de médula espinal crónica. *dianas* 6 (2): e20170905. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20170905.
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Dávila-Martínez S, Haro-Girón S, López-Suárez A, Oliva-Martín R, Díaz-Martín D. Algunos derechos reservados. 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/>

Introducción

La LME es una condición médica grave que afecta cada año a 2500.000-500.000 personas en todo el mundo, y que causa una elevada discapacidad y morbilidad en la gente que la padece, con su consecuente consumo de recursos sanitarios y sus elevados costes socioeconómicos, puesto que se produce como consecuencia de un daño en los nervios que se sitúan dentro del canal espinal, afectando total o parcialmente a la zona, y produciendo una interrupción en las conexiones nerviosas entre el cerebro y el resto del organismo, generando con ello alteraciones de la función motora, sensitiva o autónoma, que repercute en la calidad de vida de la persona afectada [1]. La etiología de la LME es variada, y en general la causa más común es la traumática [2].

La LME es una enfermedad dinámica, que se puede dividir en dos fases independientes, la fase aguda y la crónica. La aguda es la fase mejor conocida, en la que se produce el daño inicial y la extravasación celular hacia la zona afectada, y con ello el inicio del proceso inflamatorio, acompañado del daño nervioso. Posteriormente la enfermedad evoluciona hacia una fase crónica, la cual ha sido menos estudiada, y en la que se sabe que existe una disfunción del SI a nivel sistémico, continuando además el estado inflamatorio en la zona de la lesión [1].

En relación al SI también se ha visto que este sistema sufre alteraciones, quizás debido a que se ve afectada la continua interacción entre el SI y el sistema nervioso (SN). Se sabe que los órganos linfoides se encuentran altamente inervados por el sistema nervioso simpático (SNS) [3], permitiendo una

regulación de los diferentes componentes de este sistema, entre los que se encuentra un tipo celular muy importante y que se cree que se ve afectado durante la patogenia de esta enfermedad, que es el compartimento de linfocitos T [4, 5].

El SI es un sistema complejo formado por un conjunto de células y procesos biológicos, capaces de defender al organismo mediante una respuesta coordinada. Entre los diferentes tipos celulares se encuentran los linfocitos, que reconocen antígenos extraños específicamente y son capaces de responder contra ellos. Existen dos ramas, por un lado los linfocitos B (LB), encargados de reconocer antígenos solubles extracelulares y de la superficie celular, y por otro lado los linfocitos T (LT), que constituyen entre el 60 y el 80 % de los linfocitos sanguíneos periféricos, y que se encargan de reconocer antígenos provenientes del espacio intracelular (mediante una presentación previa). Son las células más relevantes a la hora de dirigir la respuesta inmune, tanto a nivel humoral en la secreción de anticuerpos, como directamente a nivel citotóxico. Ambos tipos celulares forman parte de un tipo de defensa, la defensa específica, que permite actuar contra antígenos concretos, previamente reconocidos y procesados por el resto de componentes que forman parte de este tipo de respuesta, entre las que destacan las células dendríticas [6].

Para el correcto funcionamiento de esta respuesta se ha visto que el compartimento linfocitario T es un compartimento dinámico, donde se pueden encontrar diferentes tipos de LT, entre los que destacan los linfocitos T citotóxicos (Tc), con marcadores específicos en su superficie, como el CD8, y que actúan directamente en la destrucción del antígeno, y los cooperadores (Th), con el marcador de superficie CD4, que actúan indirectamente sobre la destrucción del antígeno, regulando la respuesta contra el mismo. El LT reconoce un antígeno (presentado), y en este contexto se activa tras recibir señales intracelulares debido a la ocupación de sus receptores frente al antígeno, de sus correceptores (CD4 o CD8) y sus receptores coestimuladores, como es CD28, iniciándose así una transmisión de información hacia la célula presentadora del antígeno, que desencadena todo el proceso [6]. Dentro de estos tipos de linfocitos T además encontramos diferentes subpoblaciones, con una función y estado de diferenciación distinta, y que se pueden definir a través de marcadores específicos de superficie, como son CD45RA y CD27. Con ello se fijan cuatro subtipos funcionales diferentes: por un lado las células naive (CD45RA+CD27+), que son células que circulan por sangre y tejidos linfoides, que nunca han entrado en contacto con el antígeno extraño, las células memoria efectora (CD45RA-CD27-), que surgen cuando un LT naive entra en contacto con un antígeno específico, y que además se pueden a su vez subdividir en EM3 (con características de célula efectora, CD28-) y EM4 (con características de célula memoria CD28+), las células memoria central (MC, CD45RA-CD27+), que son células circulantes que sirven de “memoria del SI”, a las que se diferencian linfocitos T tras el declive de la concentración de antígeno, y las células memoria efectora terminada (CD45RA+CD27-), que son los linfocitos más diferenciados con un fenotipo de senescencia, y donde encontramos también subdivisiones, destacando las pE (CD28-), que no presentan una diferenciación total [1,7].

Para mantener unos niveles fisiológicos de las distintas subpoblaciones linfocitarias T acordes a las necesidades del organismo, el sistema inmunológico posee un proceso regulador, que es el proceso de apoptosis, que permite disminuir los niveles de estos subtipos de linfocitos cuando un proceso inflamatorio cesa, o para intentar acabar con algunos tipos de microorganismos intracelulares. Sin embargo, también regula la muerte de algunos linfocitos para evitar reconocimiento de antígenos propios no dañinos y con ello impedir la aparición de procesos de autorreactividad.

En este sentido la respuesta antígeno específica es un proceso muy especializado que debe ser regulado de una forma muy fina, sobre todo a nivel de iniciación y finalización de la respuesta, pero sin embargo se ha visto que la edad juega un papel primordial, ya que con el paso del tiempo progresivamente se va produciendo un declive en la regulación de esta respuesta [8]. Debido a esta desregulación del sistema inmune ocasionado por el envejecimiento, este va entrando en un estado de senescencia, que repercute en un estado inflamatorio crónico, y que genera alteraciones sobre el funcionamiento normal del SI, como por ejemplo: una disminución en el repertorio antigénico (como consecuencia de una disminución del repertorio de TCR), una peor respuesta frente a antígenos externos, disminución de la tasa de apoptosis, una disminución de la proliferación celular, la aparición de reacciones frente a antígenos propios...etc, y también se producen cambios a nivel fenotípico en las células, como la pérdida progresiva de marcadores de superficie como CD28, que hace que se produzca una acumulación de células CD28-, y que provoca problemas para su activación, reduce su capacidad de producción de IL-2 (necesaria para la proliferación del linfocito), y se reduce la susceptibilidad al proceso de apoptosis, todo ello llevando a un estado de activación parcial e incluso anergia [1]. Todas estas alteraciones favorecen un estado de inmunodeficiencia, que por un lado impide la generación de una memoria inmunológica efectiva, lo que hace que la respuesta a vacunas no sea del todo efectiva, y permite la aparición de infecciones y de enfermedades “asociadas a la edad”, como son el síndrome metabólico, la aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas etc, y con sus correspondientes riesgos para la salud y su impacto socioeconómico [8,9].

Además, existen estudios que sostienen que en pacientes con LME crónico, como consecuencia del estado inflamatorio crónico, la desregulación del sistema inmunológico y el constante contacto con antígenos propios del sistema nervioso central (como consecuencia de la destrucción neuronal), pueden aparecer procesos de autoreactividad frente a proteínas propias, como la proteína básica de mielina (MBP), proteína encargada de la transmisión de los potenciales de acción a lo largo del axón [10,11].

Nuestra hipótesis establece que los pacientes con LME presentan un estado de envejecimiento prematuro del SI, y concretamente del compartimento linfocitario T. Estas alteraciones pueden ser las responsables de que los pacientes con LME crónica tengan un sistema inmunológico deteriorado, inmunodeprimido, que provoque alteraciones en procesos de regulación como la apoptosis u ocasione la aparición de procesos de autorreactividad. Por ello, se propone el compartimento linfocitario T como posible diana terapéutica para poder mejorar el estado de los pacientes con esta enfermedad.

El objetivo de este trabajo es estudiar el grado de envejecimiento del compartimento linfocitario T de pacientes con LME, y para ello se estudiará la expresión del marcador CD28 en el compartimento linfocitario T, se medirá la tasa de apoptosis, y la respuesta autorreactiva de estos linfocitos, a través de la determinación de la producción de IFN γ en respuesta a la proteína básica de mielina (MBP).

Material y métodos

Población de estudio y obtención de las muestras

La población de estudio incluye un total de 17 pacientes diagnosticados de lesión de médula espinal (LME) (con un año o más de duración de la enfermedad), que acuden anualmente a una revisión al Hospital de parapléjicos de Toledo, y donde se han dividido en dos grupos, pacientes de más de 15 años de evolución de la enfermedad y pacientes con menos de 15 años, y un total de 7 pacientes sanos, sin LME. Para llevar a cabo el estudio de la población, esta debe de cumplir una serie de características, que son: 1) Poseer una edad superior a los 18 años o inferior a los 55. 2) No padecer afectaciones graves a nivel renal, cardíaca o hepática. 3) No haber padecido una enfermedad autoinmune sistémica u órgano específico. 4) No haber sufrido una neoplasia. 5) No tener antecedentes familiares directos con enfermedades desmielinizante. 6) No padecer un deterioro general del organismo por factores independientes de la LME. 7) No haber sido medicado con esteroides, inmunosupresores o cualquier tipo de droga con actividad sobre el sistema inmunológico, durante el año previo a la inclusión al estudio. 8) No estar embarazada. 9) No padecer en el momento de inclusión una enfermedad crónica o activa independiente de la LME.

Las muestras de ambos grupos se extrajeron por venopunción antecubital, en tubos de heparina-litio, y se conservaron a 4°C hasta su entrega, en el laboratorio de Medicina individualizada trasnacional en inflamación y cáncer, situado en el departamento de medicina y especialidades médicas de la facultad de medicina de la Universidad de Alcalá, en un tiempo inferior a 4h, para evitar su deterioro. En el caso del grupo de personas con LME esta extracción se realizó en el hospital de parapléjicos de Toledo, mientras que en el caso del grupo de controles voluntarios la extracción se realizó en el hospital Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares.

Reactivos y anticuerpos

- a) Reactivos.- Estaurosporina S5921 (Sigma-Aldrich), T cell expander (Invitrogen), proteína básica de mielina (MBP), anti-CD28 (Novus), IFN γ Catch Reagent e IFN γ Detection Antibody-FITC (Miltenyi Biotec), 7AAD, Hepes (BioWhittaker)
- b) Anticuerpos.- CD3-PerCP, CCR7-PE-Cy7, CD45RA-APC, IL-17A-FITC, IL-2-FITC, TNF α -PE, IL-9-PerCP-Cy5.5, IFN α -A700, CD56-PE, CD27-PE, CD4-PerCP, CD4-APC, CD19-APC, CD3-APC (BD Bioscience), CD27-A780, Anexina V-FITC (eBioscience), CD25-PE, CD4-PE (Invitrogen), IL-10-PE (BioLegend) y la sonda de exclusión vital Aqua-560/20 (Invitrogen).

Separación y conteo de la población de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Se lleva a cabo mediante el uso de Ficoll-Hypaque (LymphoprepTM, Axis-Shield, Oslo, Noruega), añadiendo 10 ml a 30ml de sangre extraída a través de una centrifugación por gradiente de densidad durante 45', con el fin de separar eritrocitos de las células mononucleares. Una vez obtenidas las células se resuspenden en medio RPMI 1640 (BioWhittaker), suplementado con 25 mM Hepes (BioWhittaker) y los antibióticos penicilina-estreptomina al 1% (Lonza). Además se le suplementa con suero, diferenciando entre suero fetal bovino (FBS) al 10% y suero humano (SAB, H5667, Sigma-Aldrich) al 5% (obteniendo dos medios RPMI diferentes).

Una vez resuspendidas se realiza el conteo celular para conocer la concentración, mediante microscopía óptica convencional, a través de una cámara de Neubauer. Para poder además observar la viabilidad celular se realiza una dilución previa con Azul de Tripán 0.1 % (incluyendo solo aquellas células sin

colorante azul). Una vez obtenida la concentración de células vivas/viables estas se conservan en nevera y en oscuridad a 4°C hasta su uso.

Detección del porcentaje de células apoptóticas

Para medir el porcentaje de células en un estado de muerte celular programada se lleva a cabo el uso de Anexina V-FITC, analizando el porcentaje de células marcadas con esta proteína. El porcentaje de muerte celular se mide en cuatro condiciones diferentes, por un lado a tiempo cero (en estado basal), y por otro lado tras 18h de incubación, en condiciones de: Sin estimulación, es decir apoptosis espontánea, apoptosis inducida con estaurosporina 0,5 mM, y linfocitos estimulados con T cell expander (TCE). En todas las condiciones se utiliza una concentración de 1×10^6 céls/ml.

La condición basal a tiempo cero se realiza el mismo día de la obtención de las células, mientras que para las otras tres condiciones se prepara una placa de 96 microwells con las células a la concentración indicada, y se incuba durante 18h a 37°C, 5% CO₂ en la estufa.

Para poder llevar a cabo la medición se realiza primero un marcaje con anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes tipos de fluorocromos, como son PerCP, APC y FITC (como se muestra en la tabla 1). Tras ello se deja en oscuridad durante 20 min en nevera, se lava (sin PBS), se decanta y se resuspende en 200 microlitros de hepes (BioWhittaker) y se le añade 2 microlitros de Anexina V-FITC (eBioscience). Tras ello se incuba 10 min a 4°C en nevera, estando ya listo para adquirir en el citómetro FACScalibur. A las 18h de incubación se sigue los mismos pasos de apoptosis basal para las otras tres condiciones, que son medio, estaurosporina y TCE.

Tubos	FITC	PE	PerCP	APC
1	Anexina V	CD25	CD3	CD4
2	Anexina V	CD56	CD3	CD19
3	Anexina V	CD27	CD4	CD45RA
4	Anexina V	CD27	CD8	CD45RA

Tabla 1.- Tabla de anticuerpos utilizados para la detección de células apoptóticas.

Análisis de la senescencia linfocitaria T

Para el estudio del fenotipo de linfocitos T se utilizaron 0.5 millones de células. Para poder llevar a cabo el análisis se realiza primero un marcaje con anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes tipos de fluorocromos, como son PerCP, PECy7, APC, PE, y Alexa (como se muestra en la tabla 2). Tras ello se deja en oscuridad durante 20 min en nevera, y finalmente se lava, resuspende en buffer y se adquiere en el citómetro FACSAria con el programa FACSDIVA.

0,5 M céls	PerCP	PECy7	APC	Alexa 700	APC-ALEXA 700	Alexa 405
Anticuerpo	CD4	CD 28	CD 45 RA	CD 3	CD 27	CD 8
microlitros	10	2,5	10	7,5	3,5	5

Tabla 2.- Tabla de anticuerpos utilizados para la detección de senescencia de linfocitos T

Cuantificación de linfocitos T reactivos frente a la proteína básica de mielina

Para la cuantificación de linfocitos T reactivos frente a MBP se utilizaron PBMCs a una concentración de 1×10^6 céls/ml, resuspendidas en medio y suplementado con suero SAB (suero humano AB) al 5%. El porcentaje de secreción de IFN γ con el que se ve la reacción frente a MBP se analiza en 5 condiciones diferentes: sin estímulo, con la proteína MBP (10 mg/ml), con el estimulador de LT ,T cell expander, con la señal coestimuladora CD28 (1 mg/ml) y con ambas señales juntas (MBP+CD28). Para ello se prepara una placa macrowell de 48 pocillos, se utiliza en cada condición 1 millón de células y se deja incubando 18 horas a 37°C, 5% de CO₂.

Tras las 18 horas se realiza el análisis, mediante un ensayo de medición de citoquinas denominado IFN γ Secretion Assay (Miltenyi Biotec, Detection kit).

En primer lugar se utiliza un anticuerpo de captura (IFN γ Catch Reagent), y se incuba en rotación continua y lenta en la maquina MACSmix, durante 45 min a 37°C, 5% de CO $_2$ en el incubador (período en el que se produce la secreción de IFN γ). Tras esta incubación se lava y se incuba con IFN γ Detection Antibody (FITC) y CD4-PE, CD3-APC en frío y en oscuridad durante 10 min. Finalmente se lava, se resuspende en buffer frío y se le añade 100 microlitros de 7AAD (para detectar las células muertas), dejando incubar 2 minutos. Finalmente se adquiere en el citómetro FACSCalibur.

Análisis de datos

Los datos se adquieren por citometría de flujo y se analizan a través del programa informático Flowj (Tree Star, Inc., Ashland, OR, EEUU). Con todos los datos se lleva a cabo la creación de una base de datos a través del programa Excel (2013). Para la representación gráfica de los datos se utiliza el programa SigmaPlot (versión 11.0) y para todo el análisis estadístico se utiliza el paquete estadístico IBM SPSS Statistics (versión 23). Para observar significación al comparar datos se utiliza el test estadístico no paramétrico U de Mann Whitney, y se considera significativo aquellos resultados en los que la probabilidad aleatoria (p) es menor de 0.05.

Resultados

Análisis de la senescencia linfocitaria T

En primer lugar, se realizó un estudio de la senescencia celular en el compartimento linfocítico T, mediante el análisis de la distribución de las diferentes subpoblaciones de linfocitos CD4 $^+$ y CD8 $^+$, gracias a los marcadores de superficie CD27 y CD45RA. No se observaron diferencias significativas en la distribución de linfocitos CD4 $^+$ y CD8 $^+$, entre controles y pacientes con LME (datos no mostrados).

Tras este análisis de diferenciación celular, se estudió este proceso de senescencia en función del grado de expresión del marcador de coestimulación CD28, en linfocitos CD4 $^+$ y CD8 $^+$. Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células CD8 $^+$ CD28 $^+$ entre el grupo control y el grupo de pacientes <15 años (Figura 1).

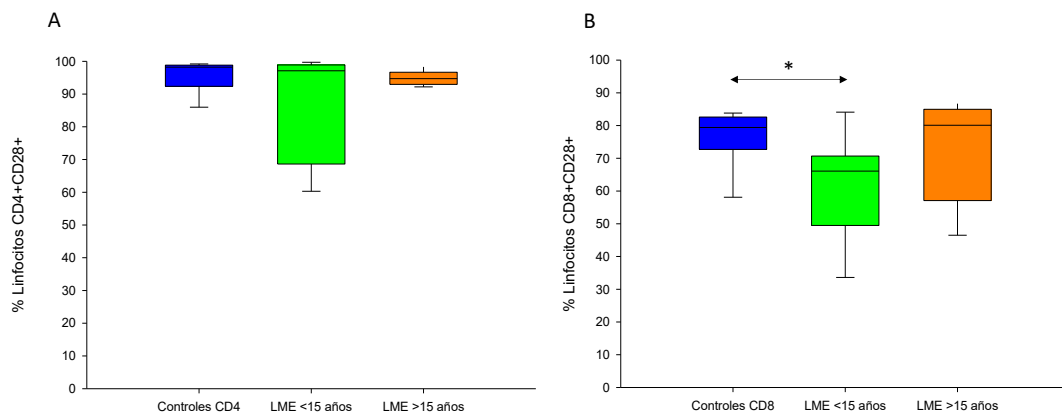


Figura 1.- Porcentaje de linfocitos cooperadores CD4 $^+$ CD28 $^+$ y linfocitos citotóxicos CD8 $^+$ CD28 $^+$. Se muestran los controles sanos (Controles, n=5) en azul, los pacientes de lesión medular <15 años en verde (LME <15, n=5) y pacientes de lesión medular >15 años en naranja (LME >15, n=5). A) Linfocitos CD4 $^+$. B) Linfocitos CD8 $^+$. * p<0,05 ** p<0,02 *** <0,01 (indica una diferencia estadísticamente significativa).

Finalmente se realizó un estudio del porcentaje de las subpoblaciones Memoria Efectora EM3-EM4 (CD27-CD45RA $^-$) y EMRA pE (CD27-CD45RA $^+$), en linfocitos CD4 $^+$ y CD8 $^+$. Se observaron diferencias significativas en el caso de las células T cooperadoras (CD4 $^+$), observándose un aumento del porcentaje de la subpoblación EM3(CD28 $^-$) en el grupo de pacientes <15 años con respecto al grupo control, una disminución del porcentaje de la subpoblación EM4 (CD28 $^+$), en el grupo de pacientes <15 años frente al grupo control, y un aumento de la subpoblación EMRA pE (CD28 $^-$), en el grupo de pacientes >15 años frente al grupo control (Figuras 2A,2B,2C). En linfocitos citotóxicos (CD8 $^+$) se observaron diferencias significativas, observándose un aumento del porcentaje de la subpoblación EM3 (CD28 $^-$) en el grupo de pacientes <15 años con respecto al grupo control, y una disminución del porcentaje de la subpoblación EM4 (CD28 $^+$) (Figura 2D, 2E).

Estudio de la apoptosis en linfocitos T

En este trabajo se ha realizado un análisis del porcentaje de células apoptóticas en condiciones de apoptosis espontánea (sin estímulo) e inducida por activación (TCE), en linfocitos Th y Tc, activados (CD25 $^+$) o no activados (CD25 $^-$), y en función de su patrón de diferenciación, mediante la combinación de los marcadores CD27 y CD45RA.

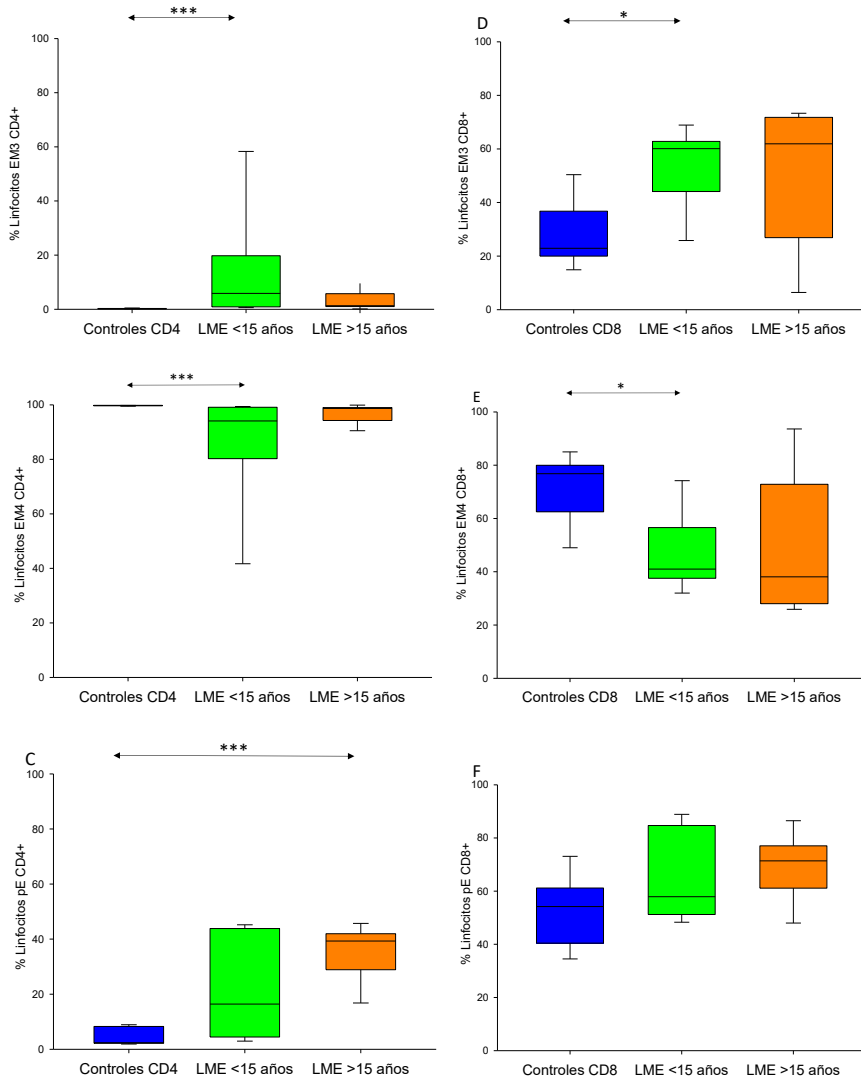


Figura 2: Análisis del porcentaje de la subpoblación EM3, EM4 y pE en Linfocitos CD4+CD8+. A) EM3 en linfocitos T CD4+. B) EM4 en linfocitos T CD4+. C) pE en linfocitos T CD4+. D) EM3 en linfocitos T CD8+. E) EM4 en linfocitos T CD8+. F) pE en linfocitos T CD8+. Se muestran los controles sanos (Controles, n=5) en azul, los pacientes de lesión medular <15 años en verde (LME <15, n=5) y pacientes de lesión medular >15 años en naranja (LME >15, n=5). * p<0,05 ** p<0,02 *** <0,01 (indica una diferencia estadísticamente significativa).

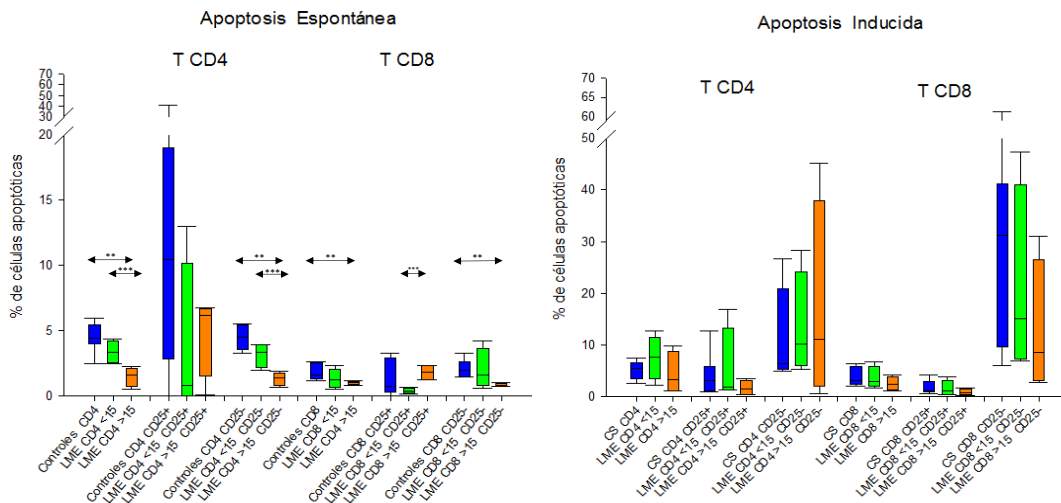


Figura 3: Análisis del porcentaje de células apoptóticas. En la figura se representa el porcentaje de células apoptóticas T CD4 (Th), TCD4+CD25+ y TCD4+CD25- en condición espontánea (Figura a derecha) e inducida (figura b derecha) y de igual manera en la población CD8+ (Tc), en condición espontánea (figura a izquierda) e inducida (figura b izquierda). Se muestran el grupo control en color azul (n=6), los pacientes con LME <15 años en color verde (n=5) y pacientes con LME >15 en color naranja (n=5). * p<0,05 ** p<0,02 *** <0,01 (indica una diferencia estadísticamente significativa).

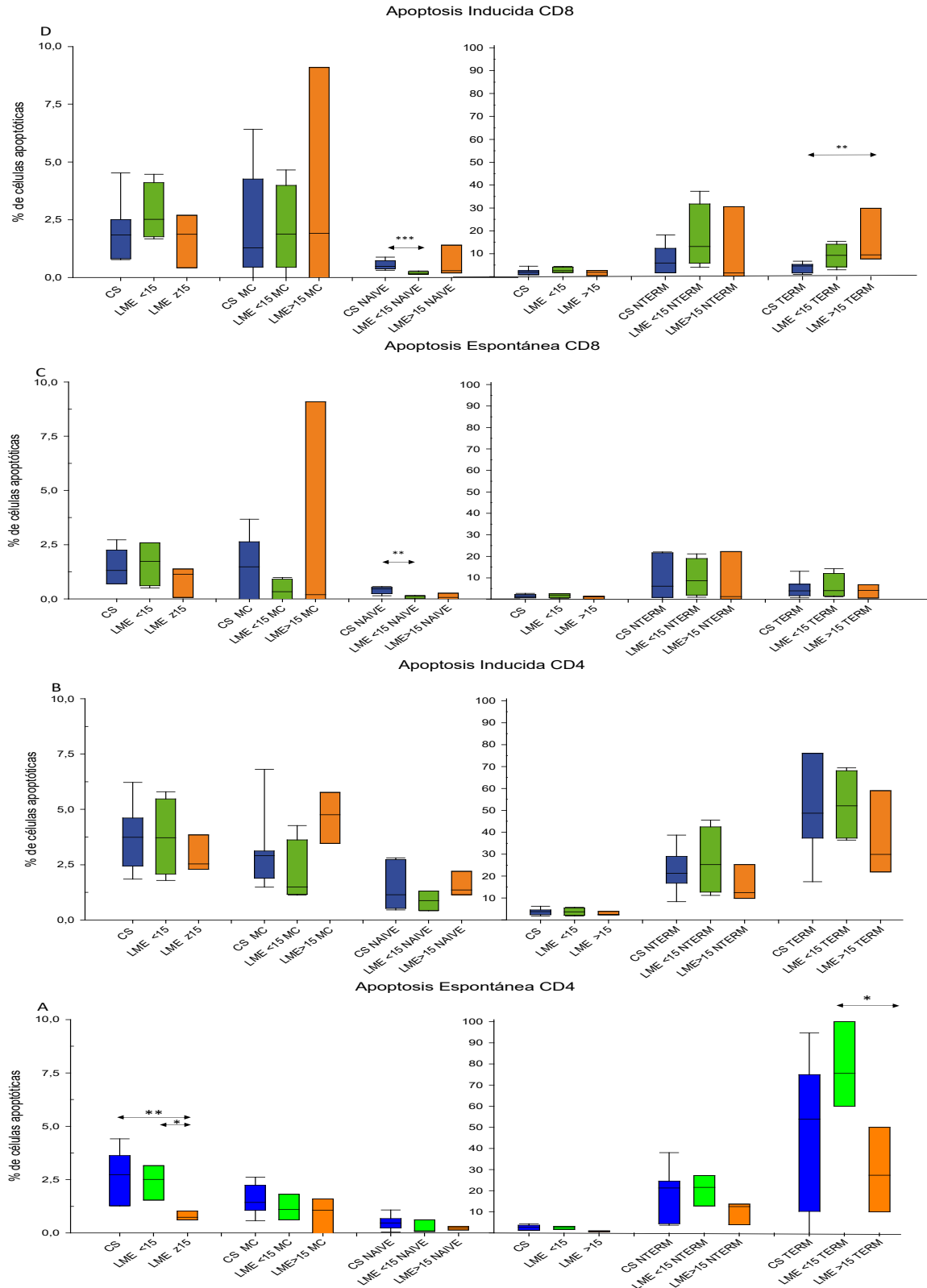


Figura 4: Análisis del porcentaje de células apoptóticas en los diferentes estados de diferenciación en linfocitos T CD4+ y T CD8+. En cada apartado se muestran dos gráficos en una, a la izquierda dos subpoblaciones linfocitarias con su correspondiente escala, mientras que a la derecha se representan otras dos subpoblaciones linfocitarias con su correspondiente escala. En ambos casos se comparan estas subpoblaciones con el porcentaje total de células apoptóticas. A) Células apoptóticas CD4 en condición espontánea. B) Células apoptóticas CD4 en condición inducida. C) Células apoptóticas CD8 en condición espontánea. D) Células apoptóticas CD8 en condición inducida. * p<0,05 ** p<0,02 *** <0,01 (indica una diferencia estadísticamente significativa).

En este primer análisis en función del marcador CD25, observamos en la condición espontánea una disminución significativa en el porcentaje total de linfocitos Tc y Th apoptóticos, en pacientes con LME y controles sanos, así como entre pacientes con menos de 15 y más de 15 años de evolución de la enfermedad. Además se observaron también sin estímulo diferencias significativas en células Th

inactivadas (CD25-), entre el grupo control y ambos grupos de pacientes, y también diferencias significativas en Tc activados (CD25+), entre ambos grupos de pacientes con LME (Figura 3).

En el estudio del proceso de apoptosis en los diferentes estados de diferenciación de linfocitos T, se observó diferencias significativas en condición sin estímulo en la población total de CD4+, entre el grupo control y ambos grupos de pacientes y entre los grupos de pacientes en la subpoblación de linfocitos no terminada (Figura 4A). También se observaron datos significativos en CD8+, con y sin estímulo, en la subpoblación naive entre el grupo control y el grupo de menos años de evolución de la enfermedad y en inducida en la subpoblación TERM entre ambos grupos de pacientes (Figura 4C, 4D)

Cuantificación de linfocitos T reactivos frente a la proteína básica de mielina

Para llevar a cabo la cuantificación de los linfocitos T reactivos frente a MBP se analizó el porcentaje de células productoras de IFN γ mediante el kit IFN γ Secretion Assay (Miltenyi Biotec, Detection kit), partiendo de PBMCs. A partir de estas células se analizaron las subpoblaciones de linfocitos Tc y Th, en condiciones detalladas en los métodos.

Se calculó el porcentaje de linfocitos T específicos para MBP, restando la condición de coestimulación con CD28 a la condición de respuesta específica MBP+CD28. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de células CD4+IFN γ + entre pacientes de >15 y < 15 años, observándose además una tendencia a un aumento del porcentaje de esta población de linfocitos T CD4+ entre ambos grupos de pacientes (figura 5).

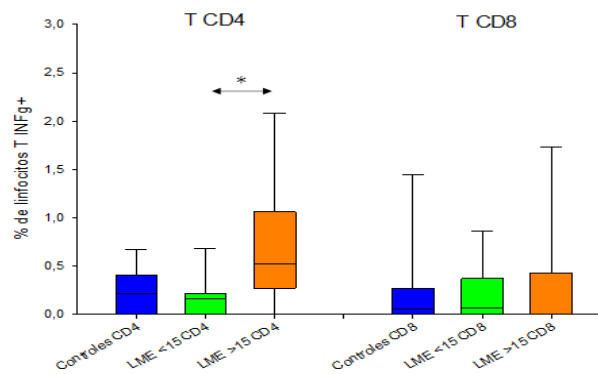


Figura 5: Porcentaje de linfocitos T respondedores a MBP. En la gráfica se representan los linfocitos Tc (derecha) y Th (izquierda) productores de IFN γ , restando a la condición de coestimulación CD28+MBP el valor del control negativo (CD28). Se muestran los controles sanos (Controles, n=7) en azul, los pacientes de lesión medular <15 años en verde (LME <15, n=6) y pacientes de lesión medular >15 años en naranja (LME >15, n=5). * p<0,05 ** p<0,02 *** <0,01(indica una diferencia estadísticamente significativa).

Discusión

En este trabajo en pacientes con LME crónica hemos encontrado un SI con un envejecimiento precoz caracterizado por alteraciones en el compartimento linfocitario T, tal y como evidencia la disminución del coestimulador CD28, la existencia de un compartimento linfocitario T altamente diferenciado, alteraciones a nivel de la apoptosis y la existencia de un proceso de autorreactividad.

En este trabajo llevamos a cabo el estudio del compartimento linfocítico T en personas que padecen una lesión de medula espinal crónica, ya que distintos investigadores han estudiado la posible existencia de un proceso de envejecimiento prematuro en este tipo celular, que afecta al funcionamiento normal del SI, comprometiendo con ello aún más la salud de estos pacientes, lo que ha permitido a diferentes investigadores demostrar porque muchos de los pacientes con esta enfermedad mueren debido a infecciones bacterianas a nivel de vejiga, intestino o pulmones [12]. Este estudio se ha llevado a cabo en linfocitos T, puesto que tienen una gran importancia a nivel de la respuesta adaptativa, y se ha visto que se ven alterados en diferentes tipos de patologías desmielinizantes como es la MS o la propia LME, lo que hace que se pueda considerar como una posible diana terapéutica para el tratamiento de algunas enfermedades desmielinizantes como es la LME [13]. El conocimiento actual sobre el SI innato y los procesos que siguen a este daño primario en la LME ha sido bastante estudiado, sobre todo en modelos murinos y algún estudio en humanos, sabiendo que tras el daño inicial se produce una infiltración del SI innato en la zona afectada, se produce una activación de la microglía y se inicia un proceso de muerte neuronal debida a una alta tasa de apoptosis en oligodendrocitos e incluso astrocitos [1,3]. Sin embargo, el conocimiento sobre el SI adaptativo es bastante limitado, al igual que los procesos que ocurren durante la fase crónica de la enfermedad. Para la activación de la respuesta inmune adaptativa es necesaria la presentación de antígenos por parte de una célula presentadora. Diferentes investigadores han determinado que tras el daño inicial y durante la fase crónica de la enfermedad se produce una

extravasación linfocitaria hacia la zona afectada, y diferentes tipos celulares como los macrófagos, incluso la microglía y células dendríticas son capaces de procesar y acabar activando a LT, gracias al reconocimiento TCR-MHC y la ocupación de receptores de coestimulación, como CD28. Debido a la activación del LT se acaba generando una distribución de diferenciación celular en linfocitos T CD4+ y CD8+, que difieren en función y estado de diferenciación. El que se desarrolle esta respuesta adaptativa tiene gran importancia, puesto que algunos autores han relacionado por un lado esta respuesta inmune adaptativa con daños en el organismo, mientras que otros autores lo han relacionado con un proceso de protección frente al daño que causa el desarrollo de la enfermedad [14]. Para ello es necesario que todos los componentes de esta respuesta se encuentren funcionales, como CD25, CD28, TCR... así como la señalización intracelular de los diferentes tipos celulares que intervienen en el proceso.

En este trabajo hemos analizado la distribución subpoblacional de linfocitos T CD8+ y CD4+, en función de los marcadores CD28, CD27 y CD45RA. Los hallazgos han mostrado por un lado una disminución en pacientes con LME de linfocitos CD8+CD28+, y una tendencia conforme más años de evolución de enfermedad de una disminución de la subpoblación EM4 y aumento de las subpoblaciones EM3 y pE con respecto al grupo control tanto en CD4+ y CD8+, que muestra un SI altamente diferenciado, que podría ser consecuencia del estado inflamatorio crónico, como han observado de forma similar otros investigadores en infecciones víricas crónicas (citomegalovirus, Estein Bar virus, HIV...)[15]. Varios autores han demostrado que como consecuencia del envejecimiento se producen alteraciones en el sistema inmunológico, como una disminución del receptor de coestimulación CD28, que afecta más a linfocitos CD8+ que a CD4+ [16,7] o una elevada senescencia, que ocasiona una redistribución subpoblacional hacia una acumulación de linfocitos T altamente diferenciados [7].

Estos hallazgos encontrados en pacientes que padecen LME crónica pueden indicar una disfunción de su SI, como consecuencia de un proceso de envejecimiento prematuro. Como consecuencia de esta disminución del coestimulador CD28 en células CD8+, esto puede hacer que la respuesta inmunológica con respecto a antígenos externos sea parcial e incluso anérgica [7], lo que hace que sean mucho más propensos a padecer infecciones, pero además a esto se le suma una distribución subpoblacional de tipo diferenciada, (debido a la existencia de una población linfocitaria pE y EM3 elevada, que tienen carácter efector, y una población EM4 baja, con función memoria), dato que puede estar relacionado con un estado activado del SI y la posterior desmielinización y la aparición de reacciones de autoinmunidad (como ocurre en otros tipos de enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple), debido a la desregulación en procesos de proliferación, tolerancia y apoptosis [13].

Varios autores han observado que el proceso de apoptosis tiene gran importancia en la fisiopatología de la LME. Por un lado se ha visto que tiene gran importancia durante la fase aguda, debido a que se ha demostrado la existencia de una alta tasa de apoptosis a nivel neuronal, como consecuencia del ambiente proinflamatorio que se genera tras el daño inicial, y que se denomina daño secundario [1]. Por otro lado diferentes investigadores han establecido la idea del proceso de apoptosis como proceso regulador de la homeostasis del SI, pero que se ve alterado como consecuencia del envejecimiento, lo que afecta al funcionamiento de los LT [4]. En este estudio se ha observado en pacientes con LME crónica una resistencia a la apoptosis tanto en células CD4+ como en CD8+, con respecto al grupo control, y además se ha visto un porcentaje elevado de células activadas en estado de apoptosis (en células CD8+CD25+), y un porcentaje bajo de células inactivadas en estado de apoptosis (en células CD4+CD25-), en pacientes con respecto al grupo control. También hemos observado, aunque no de forma significativa, un elevado porcentaje de células efectoras en estado de apoptosis, con respecto al resto de subpoblaciones linfocitarias, tanto en CD4+ como en CD8+, coincidiendo tanto con investigaciones previas en el laboratorio como de otros autores, donde se ha observado que en enfermedades desmielinizantes (como la esclerosis múltiple o la leucoencefalopatía multifocal progresiva) se produce una disminución del proceso de apoptosis tanto en linfocitos Th como en Tc [13], además de un aumento de los niveles de PD-1 (marcador apoptótico) en células efectoras T, regulando de forma negativa su función [4].

Todos estos hallazgos muestran en estos pacientes con LME crónica un estado inmunológico envejecido, con una tendencia a un mayor envejecimiento conforme evoluciona la enfermedad. Todo esto se traduce en alteraciones a nivel de la respuesta inmunológica adaptativa tanto citotóxica como cooperadora, puesto que en el caso de CD4+ este aumento del porcentaje de células apoptóticas inactivadas y la resistencia a la apoptosis del resto de la población puede provocar una sobreexcitación de esta actividad cooperadora, haciendo que se mantenga la inflamación, lo que puede que explique este proceso de inflamación crónica en pacientes con LME e incluso la aparición de procesos de autoinmunidad [3,4,12]. En el caso de CD8+ este aumento del porcentaje de células apoptóticas activadas y la resistencia a la apoptosis del resto de la población puede provocar una inmunodeficiencia de esta actividad citotóxica, lo que sumado al elevado porcentaje de células efectoras en apoptosis provoca como ya se ha comentado que estos pacientes sean más propensos a infecciones, puesto que su SI es incapaz de combatir a estos patógenos [8].

La proteína MBP es un componente principal de estructuras del sistema nervioso central (SNC), como son los axones, y gracias a ella es posible la transmisión de los potenciales de acción a velocidades adecuadas, siendo además una de las proteínas más abundantes en el SNC [11]. Como consecuencia del

daño a nivel de la medula espinal, se cree que puede producirse una rotura de la barrera hematoencefálica, que permite la extravasación de las células del SI y el inicio del proceso inflamatorio. Debido a este ambiente inflamatorio y de destrucción neuronal es posible que se produzca la liberación de esta proteína MBP al medio, que puede ser fagocitada y presentada por células especializadas, como son las células dendríticas, e incluso por macrófagos y la microglía, como han visto algunos autores [3,12], lo que desencadena la activación de los LT. Este proceso ha sido estudiado en pacientes sin muchos años de enfermedad, pero apenas ha sido estudiado en pacientes con más de 10 años de evolución, por ello el conocimiento de este proceso en pacientes con LME crónica es bastante reducido [2]. En nuestro estudio hemos determinado una respuesta autorreactiva en Th (CD4+) contra MBP. Esto implica que en un estado crónico de la enfermedad, los pacientes podrían desarrollar un proceso de autoinmunidad frente a la proteína del SNC MBP, aportando nuevos conocimientos sobre el proceso de autorreactividad en un estado crónico de la enfermedad. Esto a priori conduce a pensar que puede agravar los síntomas de la enfermedad en estado crónico, puesto que puede contribuir a la inflamación crónica y al proceso de desmielinización [3], sin embargo como muestran otros autores, podría contribuir a la neuroprotección y neuroregeneración, ya que se ha visto en estudios con murinos que un aumento de linfocitos autorreactivos contra MBP ayuda a la remielinización, combinado con precursores neuronales [14].

Con todos los resultados obtenidos podemos concluir: La existencia en pacientes con LME crónica de un sistema inmunológico envejecido, que afecta al compartimento T, lo que causa senescencia linfocitaria y con ello diferentes alteraciones en sus funciones. Existe un proceso de resistencia a la apoptosis propia de la senescencia celular, pero este proceso se ve aumentado en subpoblaciones concretas de linfocitos T CD8+ y CD4. Existe autorreactividad en la LME crónica contra la proteína MBP, en linfocitos T cooperadores. Para poder afianzar todos estos resultados sería necesario en posibles investigaciones futuras repetir todos estos resultados con un número de población mucho mayor, y estudiar otros marcadores de senescencia celular como pueden ser CD57, PD-1 o CD127 [7].

Bibliografía

1. Nuno A. Silva, Nuno Sousa, Rui L. Reis, António J. Salgado. 2014. From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury *Progress in Neurobiology* 114: 25–57
2. Zajarías-Fainsod, J. Carrillo-Ruiz, H. Mestre, I. Grijalva, I. Madrazo, A. Ibarra. 2012. Autoreactivity against myelin basic protein in patients with chronic paraplegia. *Eur Spine J.* 21: 964–970
3. Kasinathan N., Vanathi M.B., Subrahmanyam V.M., Rao J.V. 2015. A review on response of immune system in spinal cord injury and therapeutic agents useful in treatment. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 16: 26-34.
4. Zha J., Smith A., Andreansky S., Bracchi-Ricard V., Bethea J.R. 2014. Chronic thoracic spinal cord injury impairs CD8+ T-cell function by up-regulating programmed cell death-1 expression. *Journal of Neuroinflammation.* 1: 11-65.
5. Monahan R, Stein A, Gibbs K, Bank M, Bloom O. 2015. Circulating T cell subsets are altered in individuals with chronic spinal cord injury. *Immunol Res.* 63: 3-10
6. A.Prieto Martin, J. Barbarroja Escudero, S. Haro Girón, J. Monserrat Sanz. 2017. Respuesta inmune adaptativa y sus implicaciones fisiopatológicas. *Medicine.* 12, 1398-1407
7. Moro-García, M. A., Alonso-Arias, R., & López-Larrea, C. (2013). When Aging Reaches CD4+ T-Cells: Phenotypic and Functional Changes. *Frontiers in Immunology*, 4, 107
8. Deleidi M, Jäggle M, Rubino G. 2015. Immune aging, dysmetabolism, and inflammation in neurological diseases. *Front Neurosci.* 3: 1-14
9. Janet M. Lord. 2013. The effect of aging of the immune system on vaccination responses. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 9:6, 1364–1367
10. Boggs J.M. 2006. Myelin basic protein: a multifunctional protein. Review. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS.* 64, 1945-1961.
11. Kisoo Kil, Ying C.Q Zang, Deye Yang, Jon Markowski, Glenn S Fuoco, Gina C Vendetti, Victor M Rivera, Jingwu Z Zhang. 1999. T cell responses to myelin basic protein in patients with spinal cord injury and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 98(2): 201-207
12. Jan M. Schwab, Yi Zhang, Marcel A. Kopp, a Benedikt Brommer, a and Phillip G. Popovich. 2014. The paradox of chronic neuroinflammation, systemic immune suppression, autoimmunity after traumatic chronic spinal cord injury *Experimental Neurology* 258:121–129.
13. Saresella M1, Marventano I, Guerini FR, Zanzottera M, Delbue S, Marchioni E, Maserati R, Longhi R, Ferrante P, Clerici M. 2009. Myelin basic protein-specific T lymphocytes proliferation and programmed cell death in demyelinating diseases. *Clin Immunol* 129(3): 509–517
14. Laliberte, M.G. Fehlings. 2013. The immunological response to spinal cord injury: Helpful or harmful?. *Experimental Neurology* 247: 282–285.

15. Appay, V., Dunbar, P. R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G. M. A., Papagno, L. Rowland-Jones, S. L. (2002). Memory CD8 (+) T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature Medicine*, 8(4), 379 - 385.
16. Jorg J. Goronzy and Cornelia M. Weyand. 2017. Successful and Maladaptive T Cell Aging. *Immunity* 46: 364-378.