

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**DOBLE INMUNIZACIÓN Y / O ADMINISTRACIÓN DE GLUTATIÓN  
MONOETIL ESTER PARA MEJORAR EL EFECTO NEUROPROTECTOR  
OBTENIDO CON EL PÉPTIDO NEURAL MODIFICADO A91.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
PRESENTA  
**SILVIA SUSANA MARTIÑÓN GUTIÉRREZ**

TUTOR:  
JOSÉ JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS  
COMITÉ TUTORAL:  
GABRIEL GUÍZAR SAHAGÚN  
MARÍA DOLORES CORREA BELTRÁN

MÉXICO

2006.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A Dios.

A Juan Armando, mi amado esposo, porque con su amor, su ternura y su paciencia me impulsa día a día a seguir adelante, y ser una mujer íntegra y una profesional comprometida con la sociedad en que vivimos.

A mis padres, Silvia y Gabriel, quienes han llenado mi vida de cariño y alegría y con sus consejos me han dirigido hasta aquí.

A la memoria de mi abuelita Leonor López Arrieta †, quien con amor y un exquisito sentido del humor me enseñó el valor que tienen el trabajo y la honestidad.

## AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. José Juan Antonio Ibarra Arias, por confiar en mí para llevar a cabo este proyecto.

A los miembros del H. Comité Tutorial, por su apoyo y recomendaciones.

A los miembros del H. Jurado, por su tiempo.

A las siguientes instituciones: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto Mexicano del Seguro Social, CONACYT ( ), Proyecto Camina A. C., Fundación Alberto y Dolores Andrade A. C.

A todas aquellas personas que colaboraron para la realización de esta tesis: Dr. Rodolfo Paredes, Dra. Lilia Roberts, Mtra. en C. Patricia Rojo, Lic. en C. Sonia Serena Martiñón Gutiérrez.

A mis compañeros: Isabel González, Elisa García, Rafael Reyes, Maribel Buenrostro, Judith Villegas, Héctor Avendaño y Elizabeth Díaz.

A los señores Guillermo González y su esposa Gude, Fidel López, Luis González y Laura Baldwin.

## RESUMEN

Después de una lesión en la médula espinal parte de la terapéutica deberá dirigirse a proteger el tejido neural sano adyacente al sitio de lesión. La estimulación de una respuesta inmune contra constituyentes del sistema nervioso central denominada “autorreactividad protectora” es una estrategia promisoría. En el presente trabajo se estimuló dicha respuesta mediante la inmunización con el péptido neural modificado A91 y se combinó con la administración de glutatión monoetil ester (GSH-MEE), un tripéptido con características antioxidantes e inmunoestimulantes. Se realizaron tres experimentos utilizando ratas Sprague Dawley. En el primero, se evaluó la eficacia neuroprotectora de dicha combinación inmunizando una sola vez con A91. Los resultados mostraron que la combinación originó una mejor recuperación motora, sobrevida de neuronas del núcleo rojo y preservación de axones mielinizados en el epicentro de la lesión. Estudios in vitro demostraron un incremento en la proliferación de linfocitos T anti-A91 en animales tratados con la combinación. Intentando estimular en forma más intensa la respuesta autoinmune protectora, en el segundo experimento se utilizó una doble inmunización (DI) con A91 más la administración de GSH-MEE. En este caso la doble inmunización inhibió el efecto benéfico de A91. Los estudios in vitro mostraron inhibición significativa de la proliferación de linfocitos T anti-A91. En el tercer experimento se demostró la inhibición del efecto benéfico en los animales con DI en comparación con aquellos tratados con inmunización simple. Mientras GSH-MEE potencia el efecto neuroprotector de A91 la DI lo inhibe.

Palabras clave: Neuroprotección, lesión traumática de médula espinal, autorreactividad protectora, A91, glutatión monoetil ester.

## ABSTRACT

After spinal cord injury one part of the treatment will be protect the healthy tissue around the injury. The stimulation of immunity with modificate self peptides is a new and promissory strategy called "protective autoimmunity". In this work was stimulated the protective autoimmunity with the neural modified peptide A91 and was combinated with monoethyl ester glutation, which is a tripeptide with antioxidant and immunostimulant characteristics. Three experiments was do it using Sprague Dawley rats. In the first experiment, the neuroprotective efficacy from the combination of monoethyl ester glutation with one application of A91 was showed. The results show better locomotion, more neurons live in the red nucleus and bigger number of mielinized axons. In vitro was demonstrate increment on the proliferation of T cells anti-A91 in animals with the combination treatment. Try to offer a bigger stimulation of the protective autoimmunity response, in the second experiment was used double immunization with A91 in combination of monoethyl ester glutation, but the benefic effect watched in the first experiment was inhibited in this case. In vitro, could be observed the significative inhibition on the proliferation of T cells anti-A91. In the third experiment was demonstrated the inhibition of neuroprotection in animals with double immunization with A91 against the simple immunization. In conclusion the combination of one immunization with A91 plus monoethyl ester glutation produce better neuroprotection, and the double immunization with A91 produce inhibition from the neuroprotection.

Key words: Neuroprotection, spinal cord injury, protective autoimmunity, monoethyl ester glutation.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>1. RESUMEN</b>	IV
<b>2. ABSTRACT</b>	V
<b>3. INDICE</b>	VI
<b>4. ÍNDICE DE CUADROS</b>	VIII
<b>5. ÍNDICE DE FIGURAS</b>	IX
<b>6. ANTECEDENTES</b>	1
✠ INTRODUCCIÓN	1
✠ ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA MÉDULA ESPINAL	4
✠ FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL.	11
✠ ESTRATEGIAS PARA OFRECER NEUROPROTECCIÓN.	18
✠ AUTORREACTIVIDAD Y AUTORREACTIVIDAD PROTECTORA	27
○ RESPUESTA INMUNE	27
○ SISTEMA INMUNE DESPUÉS DE UNA LESIÓN EN LA MÉDULA ESPINAL.	35
○ AUTORREACTIVIDAD Y AUTORREACTIVIDAD PROTECTORA	39
✠ A91: CARACTERÍSTICAS Y MECANISMOS DE ACCIÓN PROPUESTOS.	44
✠ GLUTATIÓN: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y FUNCIONES EN EL ORGANISMO.	48
✠ JUSTIFICACIÓN	51
✠ PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	52
✠ HIPÓTESIS	53
✠ OBJETIVO GENERAL	54
✠ OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	55
<b>8. RESULTADOS</b>	71
✠ EXPERIMENTO UNO: MEJORAMIENTO DEL EFECTO OBTENIDO MEDIANTE LA INMUNIZACIÓN CON UNA DOSIS DE A91 UTILIZANDO GLUTATIÓN.	71
✠ EXPERIMENTO DOS: MEJORAMIENTO DEL EFECTO OBTENIDO MEDIANTE LA INMUNIZACIÓN CON DOSIS REPETIDAS DE A91 UTILIZANDO GLUTATIÓN.	83

☒	EXPERIMENTO TRES: COMPARACIÓN DEL EFECTO OBTENIDO MEDIANTE LA INMUNIZACIÓN CON UNA DOSIS DE A91 CONTRA EL OBTENIDO CON DOSIS REPETIDAS.	88
9.	<b>DISCUSIÓN</b>	91
10.	<b>CONCLUSIONES</b>	97
11.	<b>PERSPECTIVAS</b>	98
12.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	99

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Características de las respuestas humorales primarias y secundarias	33
Cuadro 2: Esquema de inmunización utilizado para comprobar el desarrollo de EAE en ratas Lewis.	57
Cuadro 3: Diseño de experimento para proliferación celular	60
Cuadro 4: Aplicación de Glutatión monoetil ester.	62
Cuadro 5: Escala de evaluación locomotora a campo abierto (BBB)	63
Cuadro 6: Escala de evaluación clínica para determinar el desarrollo de EAE.	67
Cuadro 7: Procesamiento de datos.	70
Cuadro 8: Identificación de animales empleados en cada prueba, primer experimento.	73
Cuadro 9: Índices de proliferación de células de ganglios linfáticos inguinales de ratas con LTME, tratadas con dosis simple de A91. Cultivos realizados a los 12 días después de la inmunización.	81
Cuadro 10: Identificación de animales empleados en cada prueba, segundo experimento.	84
Cuadro 11: Índices de proliferación de células de ganglios linfáticos inguinales de ratas con LTME, tratadas con dosis doble y simple de A91. Cultivos realizados a los 18 días después de la inmunización.	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Fagocitosis.	31
Figura 2:	Evaluación motora mediante la prueba a campo abierto BBB.	72
Figura 3:	Capacidad para dar pasos.	74
Figura 4:	Deambulaci3n sobre reja de alambre.	75
Figura 5:	Sobrevida de neuronas en el n3cleo rojo.	76
Figura 6:	C3lulas de n3cleo rojo teñidas mediante marcaje retr3grado con Dextr3n rodamina.	77
Figura 7:	Correlaci3n entre las calificaciones obtenidas en la escala BBB y el n3mero de neuronas en el n3cleo rojo.	77
Figura 8:	N3mero de axones mielinizados en el epicentro de la lesi3n.	78
Figura 9:	Micrograf3a panor3mica (4x) representativa del epicentro de lesi3n.	79
Figura 10:	Micrograf3as de axones mielinizados en el epicentro de la lesi3n (40x).	80
Figura 11:	P3rdida/ Ganancia de peso corporal en ratas Lewis inmunizadas con una dosis de A91.	82
Figura 12:	Evaluaci3n motora mediante la prueba a campo abierto BBB. Segundo experimento.	83
Figura 13:	Capacidad para dar pasos.	85
Figura 14:	Sobrevida de neuronas motoras en el n3cleo rojo.	86
Figura 15:	Coefficiente de correlaci3n entre la calificaci3n obtenida en BBB y el n3mero de neuronas sobrevivientes en n3cleo rojo.	87
Figura16:	Evaluaci3n motora mediante la prueba a campo abierto BBB.	88
Figura 17:	P3rdida/ Ganancia de peso corporal en ratas Lewis tratadas con dos inmunizaciones de A91.	90

## ANTECEDENTES

### INTRODUCCIÓN

La lesión traumática de la médula espinal es considerada como un problema serio de salud pública, pues afecta tanto a pacientes como a familiares y amigos. Este padecimiento tiene repercusiones tanto emocionales como económicas pues los tratamientos son costosos y necesitan de recursos tecnológicos varios, además que el paciente ve limitada su capacidad para reintegrarse a su vida social y económica previa. En la actualidad, la lesión de la médula espinal es una de las causas de mortalidad más importantes, y posee una alta morbilidad, observándose un total de 28 a 55 millones de personas que son afectadas al año a nivel mundial. Las causas más comunes de lesión son generalmente por arma blanca y de fuego, accidentes automovilísticos e industriales y por accidentes deportivos. (Go, 1995). En un reporte emitido por el Hospital de Traumatología Magdalena de las Salinas de la Ciudad de México se cuantificaron 529 casos en un periodo de cinco años. (Romero, 1991)

La lesión traumática de médula espinal (LTME), ocasiona alteraciones estructurales y funcionales y ha sido catalogada como una enfermedad catastrófica, debido a las secuelas que se producen sobre las funciones neurológicas, mismas que son el resultado de una serie de alteraciones

funcionales a nivel neural, que pueden ser desde el bloqueo transitorio de la conducción eléctrica, hasta la falta total de la misma, dependiendo del grado de lesión (Schwab, 1996; Balentine, 1983). La incidencia de morbilidad y mortalidad sigue siendo considerablemente elevada, aún en los centros de atención especializados en este tipo de lesión (Bedbrook, 1987; Stover, 1987)

Los tratamientos para estos pacientes hasta antes de la Segunda Guerra Mundial estaban encaminados a la estabilización de la columna vertebral, sin considerar la lesión neurológica, afortunadamente la tendencia actual es ofrecer tratamientos que protejan el tejido que no resultó dañado con la lesión primaria, pero que por encontrarse adyacente es susceptible a sufrir degeneración secundaria. Además se buscan procedimientos terapéuticos que ofrezcan las condiciones necesarias para que el tejido regenere.

En el presente trabajo se evalúa una estrategia innovadora, que consiste en la estimulación del sistema inmune mediante un péptido neural derivado de la proteína básica de la mielina que ha sido modificado en su secuencia de aminoácidos, llamado A91, para generar una respuesta conocida como “autorreactividad protectora”, pues los linfocitos T responden de una manera especial ofreciendo neuroprotección al tejido. Se le empleó en combinación con una alternativa terapéutica que ofrece protección al tejido involucrado en una LTME, y consiste en la utilización de glutatión en su forma reducida, que es un agente que posee características antioxidantes, además de ser una molécula indispensable en gran cantidad de procesos metabólicos celulares, como la

fosforilación oxidativa, la replicación, diferenciación y maduración de células, incluyendo las del sistema inmune; es también un agente antitoxinas y funciona como cofactor enzimático (Kidd, 1997).

Este trabajo se realizó porque es una combinación que no ha sido utilizada con anterioridad, y existen reportes de que tanto glutatión como el A91 aplicados de manera individual ofrecen neuroprotección al tejido neural. (Santoscoy, 2002; Hauben, 2001)

## ✠ ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA MÉDULA ESPINAL.

La médula espinal es parte integral del sistema nervioso central (SNC). Es la responsable de la transmisión ascendente, así como del control de los reflejos y locomoción bajo ciertas circunstancias. Se encuentra protegida por los huesos de la columna vertebral, ubicándose en el interior del canal medular o conducto raquídeo. De ella se desprenden 30 pares de nervios medulares: 8 cervicales (C), 12 torácicos (T), 5 lumbares (L) y 5 sacros (S)(Snell, 2000; Romero, 1991; Decroor, 1993). En el individuo adulto mide de 42 a 45 cm. y algunas fibras se prolongan hacia la región caudal formando una estructura conocida como cola de caballo. (López, 1980)

La médula espinal se encuentra notablemente aplanada en sentido antero posterior formando engrosamientos fusiformes, el mayor es el cervical que se encuentra desde C3 hasta T2, el siguiente se localiza a nivel lumbar desde L1 hasta S3. Termina en el *filum terminale*, que avanza por en medio de la cauda equina hasta unirse al periostio del dorso del cóccix. La cauda equina está formada por las raíces dorsales y ventrales correspondientes a los segmentos lumbares, sacro y coccígeo que corren verticalmente bajo el cono medular (Snell,2000; Stephen,1963; Letarjet, 1999)

La médula espinal, está envuelta por las meninges: duramadre, aracnoides y piamadre:

La duramadre es la membrana más externa, es una hoja densa, fuerte y fibrosa que envuelve a la médula espinal y la cauda equina. Se encuentra separada de las paredes del canal ventral por el espacio epidural el cual es ocupado por tejido conjuntivo.

La aracnoides es una membrana delgada e impermeable que recubre totalmente a la médula espinal, se encuentra entre la piamadre (más profunda) y la duramadre (más superficial). Esta separada de la duramadre por el espacio subdural que contiene una película delgada de líquido tisular y se separa de la piamadre por el espacio subaracnoideo el cual se llena de líquido cerebroespinal.

La piamadre es una capa delgada de tipo vascular que adosa a la médula espinal. De esta parte corren extensiones membranosas las cuales se insertan en la duramadre y la aracnoides llamados ligamentos dentados, los cuales facilitan la suspensión de la médula espinal justo en medio del saco dural.

En la parte central de la médula se localiza un pequeño conducto que corresponde a lo que queda de la cavidad del tubo neural, cavidad que se abre a partir del cuarto ventrículo en su extremo superior y que termina en el conducto central del *filum terminale*. Se encuentra irrigada por tres arterias que corren longitudinalmente a todo lo largo, desde el extremo cefálico de la médula cervical, hasta el *filum terminale*. Estas arterias son: A) arterias espinales posteriores, que son ramas directas e indirectas de las arterias vertebrales las cuales se proyectan al lado de la médula espinal, cerca de las inserciones de las raíces espinales posteriores. B) Las arterias espinales anteriores, que son ramas de arterias

vertebrales que se unen para formar una sola arteria que corre dentro de la fisura medial anterior. C) Las arterias espinales anteriores y posteriores refuerzan mediante arterias radicales, las cuales entran en el conducto vertebral a través de agujeros intervertebrales. El sistema venoso está formado por dos grandes plexos: plexos vertebrales externo e interno, formando anillos definidos en torno a cada nivel vertebral. Los plexos vertebrales internos y externos forman una red venosa de gran capacidad con paredes delgadas y vasos que tienen válvulas insuficientes o no las tienen. De esta forma el cráneo, cuello, tórax, abdomen, pelvis y plexos vertebrales comparten una circulación venosa libre, cuya dirección depende de las diferencias de presión entre las regiones que haya en un momento determinado. El plexo vertebral interno se difunde dentro del conducto vertebral, pero fuera de la duramadre de la médula espinal, se encuentra inmerso en tejido areolar y es bañado por las venas basiventrals desde la médula espinal y las meninges; drena por medio de las venas intervertebrales, las cuales salen con los nervios espinales a través del agujero intervertebral. (López, 1980)

En un corte transversal se puede observar una capa externa de sustancia blanca y una masa gris interna en forma de "H". La sustancia blanca de la médula espinal está dividida en columnas compuestas de una gran cantidad de fibras nerviosas, microglía y vasos sanguíneos, su color se debe a la presencia de una gran proporción de fibras mielinizadas de conducción rápida que ascienden (sensitivas) y descienden (motoras) a diferentes distancias y que corren longitudinalmente aunque también existe una gran cantidad de fibras amielínicas

de conducción lenta formando haces no bien definidos en los márgenes de la sustancia blanca. Estas fibras se encargan de unir funcionalmente los segmentos medulares entre sí y de unir a la médula espinal con el encéfalo (Álvarez, 1988; Decroor, 1993) están constituidas por axones recubiertos de células de Schwann desde su origen hasta su final además, presentan una vaina de mielina interpuesta entre las células de Schwann. La vaina de mielina esta compuesta por capas concéntricas de lípidos mixtos alternados con capas finas de neuroqueratina, además entre las dos existen interrupciones formando los llamados nódulos de Ranvier, está vaina es sintetizada por las propias células de Schwann, pero existen otros axones que carecen de mielina (Romer, 1981; Bloom, 1995; Leeson, 1990).

La sustancia gris de la médula espinal está formada por un conjunto de somas neuronales multipolares, células gliales y vasos sanguíneos. Puede dividirse en tres regiones: el grupo lateral que inerva la musculatura de las extremidades, un grupo central que se encarga de algunos segmentos cervicales y lumbosacros y el grupo medial que se encuentra en la mayoría de los segmentos medulares e inerva músculos del cuello y del tronco incluyendo músculos intercostales y abdominales (Snell, 2000) .

La conducción de los impulsos nerviosos a través de neuronas aferentes permite que la información pueda ser llevada a los centros nerviosos donde se va a interpretar. En cuanto la información ha llegado a los centros, se somete a un complicado proceso de análisis y síntesis, tanto en el espacio como en el tiempo,

mediante el cual se interpreta y se utiliza para elaborar reacciones que varían desde la respuesta más simple hasta los más complejos mecanismos que hacen posible la memoria.

La conducción del impulso nervioso puede ser vía axónica (conducción que se aleja del cuerpo celular) o vía dendrítica (que se dirige hacia el cuerpo celular).

Cuando un impulso viaja a lo largo de un axón, de un nódulo de Ranvier a otro, la transmisión característica es eléctrica. Cuando el impulso es transmitido de neurona a neurona a través de una sinapsis, la transmisión típica es química.

La transmisión eléctrica, se produce mediante potenciales de acción, lo que consiste en la capacidad de permeabilidad selectiva de los iones a través de la membrana celular. Esta es la función celular nerviosa que permite el transporte activo de sodio, del axoplasma al líquido intersticial, donde la concentración de sodio en el axoplasma es diferente con respecto a la concentración de sodio en el líquido intersticial generando un déficit de iones sodio positivos dentro de la membrana. Por otra parte los iones potasio ( $K^+$ ), de manera normal tendrían que equilibrar el otro lado de la membrana celular y alcanzar iguales concentraciones en ambos lados de la misma. La bomba de sodio-potasio impide que los iones sodio entren a la célula para ayudar a neutralizar las cargas negativas, de ese modo los iones potasio están obligados electrostáticamente a concentrarse dentro de la célula. Estos iones solos en forma parcial compensan el déficit de carga positiva. El potencial electronegativo neto, creado dentro de la fibra a consecuencia de la acción de la bomba de sodio, es llamado potencial de

membrana. En estado de reposo de la fibra nerviosa, la carga es positiva por fuera de la membrana y negativa por dentro de la misma.

La disminución del potencial de membrana en reposo implica una ligera inversión de polaridad denominada despolarización de la fibra. La cual va seguida por una onda de repolarización, y el área total de movimiento en la que se realizan estas acciones es el impulso nervioso (Parker A.C, 1985)

Se trata en realidad de un cambio breve de voltaje negativo que se transmite por la fibra nerviosa en forma de saltos debido a la presencia de los nódulos de Ranvier, los cuales son espacios desnudos desmielinizados que se localizan a lo largo de la fibra axónica, permitiendo de esta forma que la propagación del impulso nervioso se realice con mayor rapidez.

Como se mencionó anteriormente, la comunicación de célula a célula es a través de sustancias químicas conocidas como neurotransmisores, entre ellos podemos mencionar a:

Acetilcolina, la cual actúa en uniones neuromusculares, terminaciones autónomas preganglionares, terminaciones parasimpáticas posganglionares, glándulas sudoríparas posganglionares simpáticas y terminaciones vasodilatadoras musculares.

Dopamina, sus sitios de acción son las células pequeñas intensamente fluorescentes (PIF) de los ganglios simpáticos, cuerpo estriado, eminencia media y

otras partes del hipotálamo, sistema límbico, partes de la neurocorteza y terminaciones de algunas interneuronas de la retina.

Noradrenalina, actúa sobre la mayor parte de las terminaciones sinápticas posganglionares, corteza cerebral, hipotálamo, tallo cerebral, cerebelo y médula espinal.

Adrenalina, con importancia en hipotálamo, tálamo, sustancia gris periacueductal y médula espinal.

Serotonina, actúa sobre las células del hipotálamo, sistema límbico, cerebelo, médula espinal y retina

Histamina, actúa principalmente en hipotálamo.

Glutamato, sus sitios de acción son la corteza cerebral y el tallo cerebral.

Aspartato, actúa en la médula espinal.

Glicina, activa neuronas mediadoras de la inhibición directa y de la retina.

Adenosina, actúa en la neurocorteza, corteza olfatoria, hipocampo y cerebelo.

Para cada uno de estos neurotransmisores existen receptores específicos para cada ligando pero que se encuentran en diversos subtipos, lo que los hace más selectivos y multiplica en cualquier célula los posibles efectos de un ligando determinado. (Ganong, 1992)

## **FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN EN LA MÉDULA ESPINAL.**

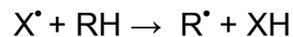
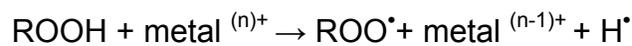
Después de una lesión en la médula espinal, se observan una serie de mecanismos autodestructivos, conocidos en conjunto como lesión secundaria, que son consecuencia de la lesión primaria. Estos se desarrollan desde los primeros segundos hasta años después de la lesión (Schwab ME, 1996), y se dividen en fase aguda, fase de pérdida secundaria del tejido y fase crónica (Hulsebosch CE 2002, Tator CH 1995). En la fase aguda, que comienza con el traumatismo y se prolonga por unos pocos días, la lesión mecánica induce daño inmediato al tracto neural; al momento del impacto se produce hemorragia, el flujo sanguíneo se ve disminuido y es común encontrar necrosis (Sandler A, Tator C, 1976; Koberne A, 1975). La lesión secundaria inicia con una onda centrífuga y cráneo-caudal de necrosis, la cual puede ser reversible durante las primeras ocho horas después de la lesión, y se puede extender hasta un área de dos vértebras craneales y caudales al sitio primario de lesión (Ropper, 2001). El tejido infartado propaga la necrosis a otras células del sistema nervioso central (SNC) a través de varios mecanismos. El daño ocasionado por la lesión primaria sobre vénulas, arteriolas y capilares limita el flujo de sangre hacia el tejido espinal (Young, 2002). Inmediatamente después de esto, el infarto se intensifica por mecanismos de daño secundario como son vasoespasmos (Koyanagi, 1993), trombosis (De la Torre, 1981) y choque neurogénico que causa bradicardia, hipotensión, disminución de la resistencia periférica y del rendimiento cardíaco (Guha y Tator, 1988), y que puede

producir la muerte de animales de experimentación en cuestión de horas a días y de seres humanos en unas pocas semanas. A nivel celular se manifiesta una pérdida de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa (Bach y Rita, 1993). Esto produce un déficit energético celular, lo que causa necrosis por la depleción del adenosin trifosfato (ATP). Esta depleción de ATP desencadena una serie de mecanismos necróticos, que incluyen la pérdida de la permeabilidad de la membrana celular, descarga del contenido de los lisosomas y activación de enzimas calcio-dependientes autodestructivas, que incluyen proteasas, fosfolipasas, ATPasas y endonucleasas que degradan la membrana citoplasmática y componentes del núcleo celular y citoesqueleto (Cotran, 1999; Tator 1995).

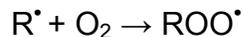
Minutos a horas después de la lesión (fase de pérdida secundaria del tejido) se genera una serie de alteraciones bioquímicas como son la lipoperoxidación y la acumulación de neurotransmisores en la zona de lesión y sus alrededores (Schnell, 1999). Durante la isquemia, la enzima xantina deshidrogenasa dentro de las células endoteliales, sufre una proteólisis limitada que da como resultado la modificación de la enzima a xantina oxidasa, la que, al contrario de su forma original, transfiere electrones a la molécula de oxígeno, lo que genera que las células endoteliales, al ser reexpuestas al oxígeno durante la reperfusión sanguínea, generen una reacción enzimática que dará por resultado especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés reactive oxygen species) (Cotran, 1999; Guth, 1999). Estas ROS, junto con las generadas por los neutrófilos (Carlson,

1998) y las células necróticas (Tator, 1995) son un potente estímulo para la muerte celular. Las ROS pueden inducir daño al SNC porque modifican sus lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. En las membranas tanto plasmáticas como las de los organelos, los radicales libres causan peroxidación de sus lípidos porque atacan las dobles ligaduras de sus ácidos grasos insaturados: los efectos deletéreos se consideran debidos a los radicales libres (ROO<sup>•</sup>, RO<sup>•</sup>, OH<sup>•</sup>) producidos durante la formación de peróxidos a partir de los ácidos grasos con enlaces dobles interrumpidos por metileno, como son los ácidos grasos poliinsaturados naturales. La lipoperoxidación es una reacción en cadena, la cual proporciona un suministro continuo de radicales libres, los que inician la lipoperoxidación subsiguiente. El proceso en su conjunto puede representarse de la siguiente manera:

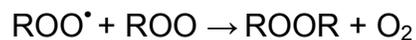
A) Inicio:



B) Propagación:



C) Terminación:



La lipoperoxidación es una reacción en cadena con efectos potencialmente devastadores (Murray, 2001). La modificación de proteínas es otro mecanismo de muerte celular ocasionado por radicales libres. Esto crea estragos dentro de las células por la oxidación de las cadenas de aminoácidos, causando fragmentación de proteínas por oxidación del esqueleto o formando uniones cruzadas entre proteínas. Finalmente los ROS pueden actuar tanto sobre el ácido desoxirribonucleico (DNA) nuclear como sobre el mitocondrial ocasionando la separación de sus cadenas (Cotran, 1999).

La liberación excesiva de neurotransmisores causa excitotoxicidad. Se observa un incremento continuo en las concentraciones de glutamato, esto debido a la autoamplificación de circuitos glutamatérgicos. Estos circuitos funcionan debido al reciclaje del glutamato, exocitosis de vesículas sinápticas calcio-dependientes y la descarga del glutamato intracelular como resultado de la lisis celular (Panter, 1990). Esta abundancia de glutamato, especialmente en un ambiente hipóxico, (Choi, 1996), sobre estimula sus receptores ionotrópicos, N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) y kainato, desencadenando la muerte celular por excitotoxicidad (Doble, 1999).

Inicialmente el glutamato se une a sus receptores y causa despolarización. Esto activa canales de sodio voltaje-dependientes, ocasionando una extensa despolarización y un marcado incremento en la concentración de sodio intracelular. La cronicidad de esta respuesta llevará a la liberación de los

receptores NMDA de su bloqueo por magnesio, dejándolos disponibles para su activación por glutamato, incrementándose el sodio intracelular. Este desbalance intracelular de iones, ocasionado por el flujo de sodio es corregido por un flujo de iones de cloruro. Además, este intento por restablecer el balance osmótico de la célula lleva un flujo de agua hacia el espacio intracelular ocasionando lisis (Doble, 1999). De manera alterna, la excitotoxicidad puede matar a las células neuronales por mecanismos calcio-dependientes. Lo que significa que la despolarización crónica lleva consigo un flujo de calcio intracelular vía canales calcio dependientes y la apertura de canales de los receptores NMDA, este flujo se ve incrementado por la movilización del calcio de sus reservorios intracelulares y la operación inversa de intercambio de sodio/ calcio de la membrana, como consecuencia se iniciará la activación de enzimas autodestructivas calcio-dependientes (Doble, 1999).

La muerte celular por excitotoxicidad también se observa en la glia, siendo los oligodendrocitos las células más susceptibles (McDonald, 1998), como estas células no poseen receptores NMDA, la excitotoxicidad de que son objeto se realiza vía receptores AMPA y kainato, receptores que en los oligodendrocitos son más permeables al calcio que en las neuronas, lo que produce una desestabilización de sus organelos más acelerada (Puchalski, 1994), aunado a que estas células poseen sistemas de amortiguación del calcio menos eficientes, lo que genera la muerte celular de una manera más precipitada (Mattson, 1991; Matute, 2001).

De horas a días tras la lesión se genera la reacción celular mediada por un incremento de macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y astroglia reactiva generando un proceso inflamatorio exacerbado y la generación de apoptosis en las células adyacentes a la lesión (Betea, 2002).

La apoptosis se puede encontrar en dos fases: la fase temprana es acompañada por necrosis causando la degeneración de múltiples tipos de células, y la fase tardía que se encuentra casi exclusivamente en la materia blanca e involucra a los oligodendrocitos y la microglía (Beattie, 2000). La apoptosis inicialmente ocurre 6 horas después de la lesión primaria en el centro de la misma y se mantiene por varios días, después de esto el número de células apoptóticas en esta región aumenta firmemente. Sin embargo, en una semana la cuenta de células apoptóticas disminuye en el sitio primario de lesión, pero se incrementa la muerte celular por apoptosis en lugares lejanos a este punto (Crowe, 1997). Bajo ciertas condiciones, como la isquemia y la excitotoxicidad, la apoptosis puede incrementarse como el paso de muerte celular emergente al mismo tiempo que la necrosis está ocurriendo como el proceso degenerativo predominante después de la lesión a la médula espinal (Zipfel, 2000).

Durante las semanas siguientes (fase crónica) continúan disturbios en la organización de las fibras como la fragmentación axonal, desmielinización, degeneración Valeriana, apoptosis de oligodendrocitos y la formación de una cicatriz glial. (Taoka, 1998). En los primeros 15 minutos tras la lesión el tejido periaxonal se hincha empujando las láminas de mielina. En este punto del tiempo

sólo se observa fractura de la mielina, pero a las veinticuatro horas el contenido axonal puede ser observado en el espacio extracelular. El axoplasma neuronal sufre una transición; primero se observa una apariencia granular con desarreglo de los neurofilamentos y en muchos axones se encuentra abundancia de organelos intracelulares inusuales en esta área. Conforme el tiempo progresa, otros efectos patogénicos dañan a los axones, por ejemplo, la extensa desmielinización y el aborto de conos de crecimiento se incrementan considerablemente, para las veinticuatro horas todos los axones mayores de 40  $\mu\text{m}$  han sido alcanzados por estas condiciones patológicas (Anthes, 1995).

Estos cambios en los axones son finalmente acompañados por degeneración Valeriana, que en roedores se encuentra durante varios meses, y en humanos durante años (David, 2002).

## ✠ ESTRATEGIAS PARA OFRECER NEUROPROTECCIÓN.

En un principio los tratamientos después de una lesión traumática en la médula espinal estaban encaminados a la reparación quirúrgica de las vértebras involucradas, los primeros reportes que se encuentran son de 1800 cuando Wilkins realizó una fusión directa con fijación de la fractura vertebral. Posteriormente Mc Donnell en 1864 realizó la primera laminectomía descompresiva cervical. Hadra en 1891 realizó la fijación con alambre en forma de “8” en torno a las apófisis espinosas para la estabilización de la columna cervical. Entre los años 20 y 30 del siglo pasado se introdujeron métodos de reducción de fracturas por hiperextensión con cabestrillos, férulas o hamacas. Pero fue durante la Segunda Guerra Mundial cuando se implementó un tratamiento global de los pacientes con lesión de médula espinal con la apertura del Centro de Lesiones Medulares en Stoke Mandeville, el primero de febrero de 1944. (Romero, 1991)

Desde entonces se ha buscado llevar a cabo un tratamiento integral del paciente, dentro de este tratamiento se incluye la búsqueda de neuroprotección al tejido nervioso lesionado mediante diversas estrategias pero, por tratarse de una patología multifactorial resulta difícil encontrar un método que brinde efectividad total.

Los trasplantes de células y tejidos al SNC están encaminados a reemplazar las células neurales que se han dañado, o ha proporcionar “puentes”, sin embargo se ha demostrado que pueden tener un efecto neuroprotector

después de una LTME al disminuir el grado de destrucción de la zona lesionada y aumentar la supervivencia de los animales (Guizar-Sahagún, 1994). Más recientemente se ha implementado el trasplante de macrófagos activados a la zona de lesión, estas células son importantes productoras de factores tróficos mismos que pueden favorecer el microambiente para obtener neuroprotección e incrementar el crecimiento axonal (Rapalino 1998). El uso de células madre neurales (neural stem cells, en inglés) es también un método relativamente reciente, se ha demostrado que estas células son capaces de producir factores neurotróficos en cantidades importantes *in vitro*, como factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF del inglés glial cell-line derived neurotrophic factor), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF del inglés brain-derived neurotrophic factor) y factor de crecimiento nervioso (NGF del inglés nerve growth factor), además de melatonina, una hormona pleiotrópica que se sugiere se encuentra fuertemente involucrada en el desarrollo del tejido neural (Niles, 2004)

Actualmente el estándar terapéutico después de una lesión traumática en la médula espinal es la administración sistémica del glucocorticoide sintético metilprednisolona. Esta terapia está basada en estudios donde se reporta que mejora la recuperación de animales de experimentación y humanos (Rabchevsky AG, 2002). Su mecanismo de acción no está bien determinado, pero principalmente reduce la producción de citocinas proinflamatorias (Xu et al., 1998) y la lipoperoxidación (LP) (Díaz-Ruiz, 2000; Limbourg, 2002); sin embargo, existe evidencia de que los efectos benéficos de la metilprednisolona van de mejoría

moderada a ningún cambio al compararlos con los testigos. Estas diferencias dependen de las especies y modelos de lesión en la médula espinal, del esquema de aplicación y dosificación, así como del tiempo poslesión en que se aplique (Amar, 1999). Resulta imprescindible evaluar el beneficio que se pueda obtener con la administración de metilprednisolona pues se sabe que a dosis altas ocasiona hipertensión, incremento en la susceptibilidad a infecciones, alteraciones conductuales y retraso en la cicatrización, entre otros efectos secundarios indeseables, (Goodman GA, 1990); además, se sabe que puede exacerbar la necrosis neuronal posisquémica e inhibir el crecimiento axonal (Bracken MB, 1993)

El tratamiento con inhibidores de la sintasa del óxido nítrico (SON) como NG-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) administrados durante la fase aguda de la LTME en modelos experimentales; promueven una recuperación clínica significativamente mayor en los animales que recibieron el tratamiento con respecto a los que no (Hamada, 1996). El empleo de un inhibidor relativamente específico para la sintasa del óxido nítrico inducible (SON 2), llamado aminoguanidina, ha dado buenos resultados como neuroprotector en diversos modelos como isquemia, sección y compresión de nervio óptico, e intoxicación neural con diversos fármacos, sin producir alteraciones sistémicas (Neufeld 1999). Resulta muy importante resaltar que el óxido nítrico es una molécula importante para la vasodilatación por lo que una inhibición total y no selectiva de su sintasa podría ocasionar daños mayores sobre el tejido lesionado (Sharma, 2005),

además tiene un efecto directo sobre los receptores NMDA, por lo que se reduce la excitotoxicidad, así se propone la búsqueda de inhibidores de la SON 2 y no la de la sintasa del óxido nítrico constitutiva (SON 1) (Bolanos, 1999).

El peroxinitrito es un agente reactivo que causa severo daño a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos; limpiadores prototipo del peroxinitrito son la penicilamina y el 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxyl (tempol); ambos han demostrado proporcionar neuroprotección al tejido tanto en células en cultivo como en modelos de LTME *in vivo* (Carroll, 2000; Hall, 1999). Otro antioxidante promisorio tanto para inhibir la lipoperoxidación como la sintasa del óxido nítrico es el BN-80933, que se ha reportado atenúa la degeneración postraumática y posisquémica en modelos de lesión de médula espinal *in vivo*. (Chabrier, 1999)

La aplicación de EPC-K1 una sustancia química que se une a la vitamina E (alfa-tocoferol) y vitamina C a través de uniones fosfodiéster, ha demostrado disminuir la LP y atenuar el daño en modelos experimentales de LTME (Fujimoto, 2000).

En un estudio de Bozbuga y cols. (1998) se administró por vía intraperitoneal alfa-tocoferol a ratas con lesión de médula espinal y se midió un metabolito conocido como malondialdehído, para cuantificar la lipoperoxidación de manera indirecta, y se observó que los animales tratados presentaron una disminución significativa de malondialdehído, lo que sugiere una disminución en la lipoperoxidación generada después de la lesión.

La influencia de la vitamina C sobre los cambios patológicos secundarios a una lesión por compresión fueron estudiados en ratas Wistar de una variedad mutante que es incapaz de sintetizar dicha vitamina, y se observó que los animales pertenecientes al grupo suplementado conservaron mayor cantidad de tejido en la zona de lesión. En este estudio también se midió la cantidad de vitamina E en ambos grupos, sin observarse diferencia entre ellos. (Kato D, 1996)

Un tratamiento que se ha sugerido recientemente es el uso de naloxona, un inhibidor de receptores opiáceos, que demostró proporcionar neuroprotección efectiva en gatos con lesión de médula espinal, además en la fase I de los experimentos resultó ser segura para la población al no presentarse daños sistémicos tras la administración del fármaco (Hall, 2004).

Diversos autores han propuesto que la liberación de adenosina después de una LTME probablemente tiene un efecto neuroprotector, al bloquear la liberación de aminoácidos excitatorios. Sin embargo MacAduo y cols. (2000) demostraron mediante el uso de antagonistas no específicos del receptor de adenosina, que después de una LTME, éste nucleósido no influye sobre la liberación de glutamato.

El glutamato como se sabe es altamente tóxico cuando se acumula en cantidades excesivas en el espacio sináptico. Esta acumulación es causada, entre otros motivos, por la incapacidad de la enzima glutamina sintasa (GS) para catalizar la transformación de este glutamato a glutamina, debido a una

disminución en la actividad y la cantidad de la enzima, por lo que Gorovitz y cols. incrementaron las concentraciones de GS en la zona de lesión en un modelo de toxicidad por glutamato en células retinales obteniendo resultados altamente satisfactorios (1997).

Los antagonistas de los receptores NMDA y AMPA/Kainato, se han propuesto como fármacos neuroprotectores. Li (2000) e Ikonomidow (2000) demostraron que el empleo de los fármacos MK-801, CCP, MPQX y NBQX, administrados directamente en el sitio de la lesión pueden atenuar el daño excitotóxico mediado por aminoácidos excitatorios. Sin embargo los antagonistas NMDA no puede ser utilizados en humanos debido a una serie de reacciones indeseables que suelen ocasionar, y los inhibidores para receptores AMPA son altamente tóxicos para los riñones debido a su insolubilidad. La opción que se ha reportado recientemente es un fármaco conocido como ZK200775 el cual actúa como inhibidor de los receptores AMPA, produciendo neuroprotección al tejido después de un proceso de isquemia o un traumatismo sin generar respuestas secundarias perjudiciales, ni nefrotoxicidad ya que es altamente soluble en agua (Turski, 1998)

El empleo de fármacos anti-excitotóxicos como el sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ) y el riluzol, funcionan como neuroprotectores. Lang-Lazdunski y cols. (2000) demostraron que el tratamiento con estos fármacos, previene y atenúa el fenómeno necrótico que se observa después de una LTME en modelos

experimentales, demostrando mayor efectividad el  $MgSO_4$  al prevenir la paraplejia originada por el daño en las neuronas motoras.

El citocromo C libre en citoplasma se encuentra íntimamente relacionado con la degeneración secundaria después de una LTME. En un estudio realizado por Teng y cols. (2004) demostraron que el uso de minociclina, una tetraciclina de segunda generación, inhibe el daño a mitocondrias ocasionado por citocromo C libre, mitigando así el deficit funcional por pérdida de neuronas motoras después de la lesión.

También se han empleado fármacos moduladores del metabolismo del ácido araquidónico, como el ibuprofeno que es un inhibidor de la ciclooxigenasa o el U63447A que inhibe la actividad de la sintasa de tromboxanos. El tratamiento con estos fármacos en modelos animales ha demostrado limitar el desarrollo de la isquemia poslesión y la recuperación neurológica en LTME. (Feden, 1992).

El fármaco clenbuterol también se ha propuesto como un agente que promueve neuroprotección, se ha descrito que tiene la capacidad de revertir la atrofia muscular después de una LTME cuando se administra a una concentración de 10mg/ Kg por día. El clenbuterol es un agonista del receptor  $\beta_2$  adrenérgico, que al ser estimulado promueve que se expresen diversos factores tróficos, además se ha observado que por medio de este mecanismo se promueve regeneración y neuroprotección (Zeman, 1999).

Una estrategia utilizada recientemente es el uso de eritropoyetina, una citosina protectora del tejido, ya que previene el vasoespasmo, la apoptosis y la

respuesta inflamatoria. En estudios hechos en modelos de lesión por compresión en médula espinal, se utilizó asialoeritropoyetina, una molécula con un alto potencial terapéutico como neuroprotector, la cual produjo resultados altamente satisfactorios en la lesión de médula espinal; se observó un mayor número de neuronas sobrevivientes en el sitio de lesión, menor área de tejido infartado y una mejor recuperación motora en los animales tratados sobre los animales que recibieron solución salina (Erbayraktar, 2003). Gorio (2002) utilizó eritropoyetina recombinante humana en modelos de LTME por contusión y compresión obteniendo resultados significativos en la recuperación motora y en el porcentaje de tejido preservado. Al igual que la eritropoyetina, el factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1, del inglés insuline-like growth factor 1) es una citocina inhibidora de la apoptosis neuronal. Ambos han dado resultados significativos cuando fueron aplicados en forma individual. Cuando Digicaylioglu (2004) las utilizó para proporcionar un tratamiento conjunto demostró que se mejora su efecto y reducen significativamente la apoptosis de las neuronas *in vitro* por inhibición de la vía de la caspasa 3.

A la fecha ninguna de las estrategias antes mencionadas ha logrado proveer resultados clínicos satisfactorios; es por ello que, siguen desarrollándose diferentes trabajos de investigación para encontrar una terapia neuroprotectora efectiva.

Una estrategia innovadora es en la que se propone la estimulación del sistema inmunológico (SI) para generar neuroprotección después de una lesión en

el sistema nervioso central. Existen varios estudios en esta línea, en los que mediante la utilización de péptidos neurales modificados como el A91 y Cop-1, en modelos de lesión traumática en médula espinal y en nervio óptico, y en un modelo de neurotoxicidad por aminoácidos excitatorios en nervio óptico, se observa reducción del daño neuronal. De esta forma la propuesta sugiere la existencia de una respuesta autoinmune con características muy especiales que se encarga de proteger, en este caso, el tejido neural. (Moalem, 1999; Hauben, 2000; Kipnis, 2000)

## ✠ AUTORREACTIVIDAD Y AUTORREACTIVIDAD PROTECTORA

Se conoce como autoinmunidad o autorreactividad a la activación del sistema inmune contra componentes del mismo organismo. El proceso desarrollado por el sistema inmune es similar al que se desarrolla cuando el organismo es invadido por algún agente extraño; el sistema inmune reacciona contra este desencadenando una respuesta inespecífica en la que intervienen factores de la inmunidad innata de manera inicial, posteriormente, y sólo en caso de que la respuesta inespecífica sea insuficiente se lleva a cabo una respuesta específica en la que intervienen tanto linfocitos B como linfocitos T.

### **RESPUESTA INMUNE**

#### Inmunidad innata:

La manera más sencilla de entender este proceso es utilizando a las bacterias como ejemplo, sin embargo el proceso es similar para cualquier sustancia extraña, con variantes muy ligeras, por ello se utilizará el ejemplo clásico: la bacteria.

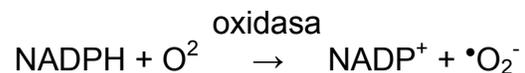
Los problemas para las bacterias comienzan con la fagocitosis por parte de células tanto polimorfonucleares como mononucleares. Con fines pedagógicos se ha dividido a este fenómeno en ocho fases (Roitt, 2000<sup>b</sup>) (Figura 1):

Iniciamos con la quimiotaxis: la célula es atraída hacia la zona infectada por las bacterias; intervienen tres fenómenos en los movimientos celulares: motilidad, que consiste en que la célula tenga la capacidad de moverse, locomoción, en que

la célula puede desplazarse de un sitio a otro, y quimiotaxis (paso 1 de la fagocitosis), donde el movimiento es unidireccional siguiendo un gradiente de atracción creciente. Los leucocitos polimorfonucleares responden a estímulos quimiotácticos derivados del sistema del complemento (C3a y C5a), así como a factores derivados de bacterias y linfocitos; los neutrófilos también intervienen directa o indirectamente en la producción de una sustancia de reacción lenta (SRS-A), ahora identificada como leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> y E<sub>4</sub>, factores capaces de provocar la contracción del músculo liso. Otros factores producidos por los granulocitos incluyen las quininas, pequeños polipéptidos vasoactivos, que son importantes mediadores de las reacciones de hipersensibilidad inmediata. Para monocitos y macrófagos se han descrito productos del complemento (C3a y C5a) como sustancias quimiotácticas, así como factores producidos por linfocitos, como el factor activador de macrófagos (MAF). Los eosinófilos pueden ser atraídos por una serie de productos del complemento, derivados de linfocitos como por ejemplo la linfocina, y un factor quimiotáctico eosinofílico de la anafilaxia (ECF-A) el cual es liberado por las células cebadas tisulares y por basófilos periféricos que tiene gran importancia en la patogenia de reacciones de hipersensibilidad inmediata (Bellanti, 1994).

La adherencia es el siguiente paso en el proceso de fagocitosis. En ésta, la bacteria se une a la membrana del fagocito; este es considerado como un proceso primitivo en el que parecen intervenir carbohidratos y receptores tipo "toll" (TLR's, del inglés Toll like receptor) en la célula.

Conforme se va uniendo la membrana bacteriana a la del fagocito por medio de los TLR's se lleva a cabo la activación de la membrana (paso 3); y a medida que los receptores adyacentes se van adhiriendo a su ligando bacteriano se activa un sistema contráctil de actina-miocina, generándose pseudópodos alrededor de la partícula bacteriana e iniciándose así la formación del fagosoma (paso 4). Cuando la bacteria está completamente rodeada y encerrada en una vacuola se dice que se ha formado el fagosoma (paso 5). Con la formación del fagosoma se activa de manera espectacular el disparo de las hexosas monofosfato generando nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato reducido (NADPH); los electrones pasan del NADPH a una flavoproteína de membrana que contiene flavina-adenina-dinucleótido (FAD) y de allí a un citocromo de la membrana plasmática, el cyt b<sub>558</sub>. Este posee un potencial redox bajísimo (-245 mV) lo que le permite reducir oxígeno molecular directamente a anión superóxido. Esto se expresa con la siguiente reacción:



El anión superóxido se convierte en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por la acción de la superóxido dismutasa y luego en radicales hidroxilo (•OH). Todos estos productos poseen una alta reactividad química, lo que los convierte en excelentes agentes microbicidas. Además la combinación de peróxido, mieloperoxidasa y iones haluro constituye un poderoso sistema halogenador capaz de destruir bacterias y virus. Aunque el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los compuestos halogenados no son tan activos como los radicales libres, son más estables y por lo tanto

difunden más lejos, lo que los hace tóxicos para los microorganismos en las cercanías extracelulares (Roitt, 2000a).

En seguida, se lleva a cabo la fusión de lisosomas con el fagosoma (pasos 6 y 7), estos lisosomas son ricos en gránulos cargados de sustancias antimicrobianas preformadas; para favorecer la función óptima de la familia de péptidos y proteínas catiónicas, la dismutación del superóxido consume iones de hidrógeno, con lo que se aumenta ligeramente el pH de la vacuola. Los péptidos mencionados se conocen como defensinas, son del orden de 3.5 a 4 kDa y son ricos en arginina, dentro del fagosoma alcanzan concentraciones desde 20 hasta 100 mg/ ml. Estos péptidos se insertan a las membranas bacterianas para formar canales iónicos desestabilizantes regulados por voltaje, por lo que tienen un gran espectro contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, muchos hongos y varios virus envueltos.

Las membranas son además lesionadas por la acción de una proteinasa neutra, la catepsina G, y por la transferencia directa a la superficie microbiana de la proteína BP1 que aumenta la permeabilidad de la bacteria.

El pH bajo, la lisozima y la lactoferrina son factores antibacterianos independientes de oxígeno por lo que pueden actuar en condiciones anaerobias. Finalmente los residuos de bacterias digeridas son arrojados al exterior de la célula (paso 8). (Roitt, 2000b)

En el caso de macrófagos, células dendríticas y linfocitos B (los cuales son conocidos en conjunto como células presentadoras de antígeno o CPA's) muchas

partículas peptídicas no son arrojadas de la célula, sino que son presentadas a los linfocitos T por medio de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II, lo que nos lleva al desarrollo de una respuesta inmune específica.

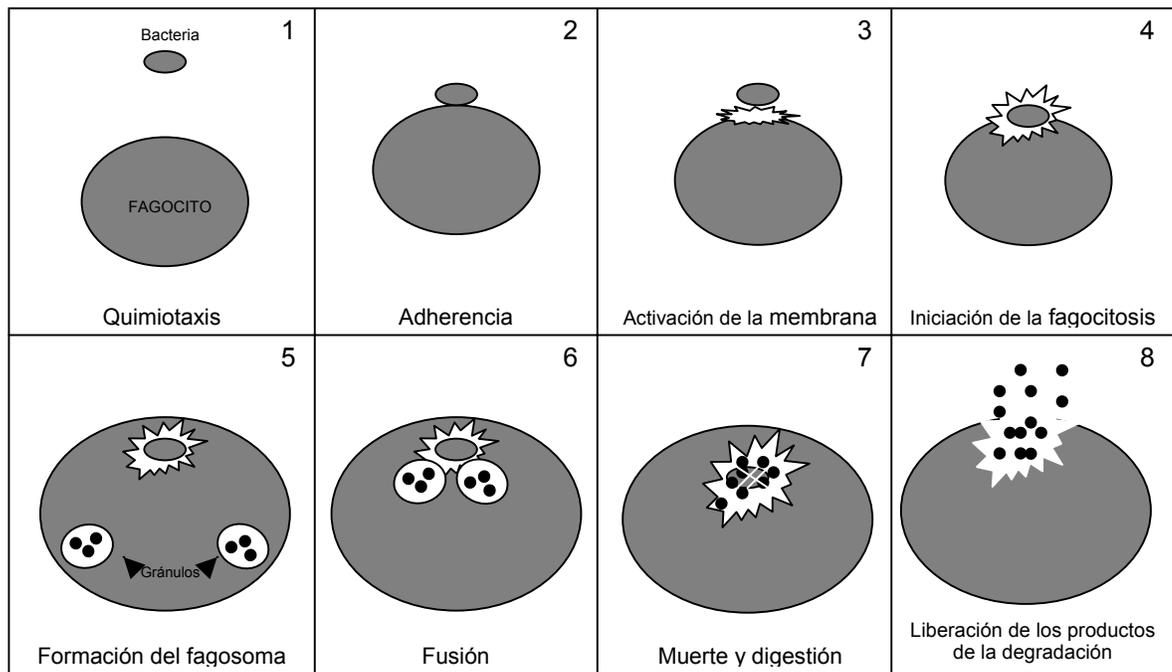


Figura 1: Fagocitosis.

Inmunidad específica o adquirida:

La respuesta inmune específica se divide en dos componentes, la respuesta humoral y la respuesta celular.

La respuesta humoral es mediada por los linfocitos B y, los protagonistas son los anticuerpos producidos por las células plasmáticas. Cuando no conocemos la especificidad de un anticuerpo se le llama inmunoglobulina (Ig). Las

inmunoglobulinas están formadas por cuatro cadenas polipeptídicas: dos pesadas (H) de entre 50 a 70 kDa y dos ligeras (L) de 23 kDa, que en conjunto constituyen un monómero de inmunoglobulina (Abbas, 2004). La respuesta inmunitaria humoral se inicia tras el reconocimiento del antígeno por los linfocitos B específicos para cada antígeno. El antígeno se une a los receptores IgM o IgD de membrana de los linfocitos B vírgenes y los activa. La activación de los linfocitos B depende de una serie de mecanismos que provocan su proliferación, o expansión de la clona de células específicas para ese antígeno, y diferenciación, lo que da lugar a la generación de células plasmáticas que secretan anticuerpos activamente y linfocitos B de memoria. Algunos linfocitos secretan anticuerpos diferentes a IgM e IgD en un proceso conocido como cambio de isotipo de la cadena pesada. Las células plasmáticas sintetizan anticuerpos que se unen a los antígenos con una afinidad cada vez mayor, gracias a un proceso denominado maduración de la afinidad. (Roitt, 2000<sup>a</sup>)

Una respuesta humoral (de anticuerpos) frente a antígenos protéicos requiere linfocitos T cooperadores ( $CD4^+$ ) que reconocen al antígeno y desempeñan una función esencial en la activación de linfocitos B; por ello los antígenos se clasifican en timo-dependientes o T dependientes y en timo-independientes (TI) como son los antígenos no proteicos como los polisacáridos y los lípidos. (Roitt, 2000<sup>a</sup>)

La respuesta humoral se clasifica en primaria y secundaria. La respuesta primaria se produce tras la activación de los linfocitos B vírgenes, mientras que la

secundaria es consecuencia de la estimulación de clonas previamente expandidas de linfocitos B de memoria. Es por ello que la respuesta secundaria es mucho más rápida que la primaria y con cantidades mucho mayores de anticuerpos producidos. El cambio de isotipo de la cadena pesada y la maduración de la afinidad también se incrementan con la exposición repetida a antígenos proteicos.

Las respuestas primaria y secundaria poseen características especiales las cuales se enuncian en la Cuadro 1.

Cuadro 1: Características de las respuestas humorales primarias y secundarias.

Característica	Respuesta primaria	Respuesta secundaria
Lapso de tiempo tras la inmunización	Habitualmente de 5 a 10 días.	Habitualmente de 1 a 3 días.
Respuesta máxima	Inferior	Superior
Isotipo del anticuerpo	Habitualmente IgM > IgG	Aumento relativo de IgG, y en determinadas situaciones, de IgA e IgE.
Afinidad del anticuerpo	Afinidad de media a menor, en general más variable.	Afinidad de media a mayor, como resultado de la maduración de la afinidad.
Inducida por	Todos los antígenos.	Solo antígenos proteicos.
Inmunización necesaria	Dosis relativamente elevadas de antígenos, mejor con adyuvantes (en el caso de antígenos proteicos).	Dosis bajas de antígenos, los adyuvantes pueden no ser imprescindibles.

La respuesta celular inicia con la activación del linfocito T: las CPA's procesan los péptidos en los fagosomas, por medio de enzimas como se explicó previamente (en inmunidad innata); de ahí son transportados en endosomas avanzados, donde se acoplan con las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad, a este endosoma se le conoce como MIIC (del inglés MHC class II enriched compartment). Una vez unidos son transportados hasta la membrana celular donde son expresados, de esta forma la CPA podrá exponer el antígeno a la célula T. (Roitt, 2000<sup>b</sup>)

Cuando la célula T reconoce a su antígeno específico lo liga a través de su receptor (TcR del inglés T cell receptor), el cual es un heterodímero transmembranoso integrado por dos cadenas llamadas  $\alpha$  y  $\beta$ , ambas cadenas son necesarias para la especificidad antigénica. Cada una se pliega en dos dominios similares a Ig's, uno con una estructura relativamente invariable y el otro con un alto grado de variabilidad semejante al fragmento Fab de las inmunoglobulinas. Existe también un TcR conformado por dos cadenas llamadas  $\gamma\delta$ , que como surge primero en la ontogenia tímica se le conoce como TcR1 mientras que al compuesto por  $\alpha\beta$  se le conoce como TcR2, el TcR1 representa del 0.5 al 15% de las células T en sangre periférica en humanos, mientras que en rumiantes representa entre el 30 y el 80%, lo que confirma que estas células también desempeñan un importante papel en las respuestas inmunitarias. En general las células T  $\gamma\delta$  parecen tener una marcada predilección para reconocer antígenos micobacterianos, en particular la muy conservada proteína de choque térmico

(HSP 65) que reacciona de manera cruzada con lo propio. Para que la activación del linfocito se lleve a cabo, es necesario que el TcR ligado a su antígeno envíe una señal al interior de la célula, esto lo hace a través de un complejo transmembranal formado por CD4, CD3, CD28, CTLA-4 y el mismo TcR, con lo que se instruye a la célula para que salga de su estado G0 latente y se active, convirtiéndose en una célula efectora. (Roitt, 2000<sup>b</sup>)

### **SISTEMA INMUNE DESPUÉS DE UNA LESIÓN TRAUMÁTICA EN LA MÉDULA ESPINAL**

El ambiente en el sistema nervioso central inmediatamente después de una lesión se encuentra dominado por citocinas proinflamatorias liberadas por la microglía, como el TNF- $\alpha$ , la IL-1 y la IL-6 (Allan y Rottwell, 2001). Durante los siguientes 15 minutos los niveles de mRNA para TNF- $\alpha$  e IL-6 aumentan en otras células del SNC (Yan et al. 2001). TNF- $\alpha$  e IL-1 son capaces de coestimular su producción y además estimular también la de IL-6; por tanto, los niveles de esta citocina se incrementan rápidamente (Pan et al. 2002). Las 3 citocinas alcanzan sus picos máximos varias horas después. Sin embargo, a las 24 horas son apenas detectables (Klusman y Shwab, 1997) aunque, de acuerdo a otros reportes, los niveles de TNF- $\alpha$  continúan incrementándose durante la primera semana después de la lesión (Tyor et al, 2002), como consecuencia de una intensa infiltración leucocitaria (Popovich y Jones, 2003). Mas allá, fortificando el incremento de citocinas, está la sobre regulación del sistema de transporte unidireccional de la barrera hematoencefálica que es específica para TNF- $\alpha$ . Esto permite que el TNF-

$\alpha$  producido por el trauma periférico entre y se acumule en el sistema nervioso central (Pan et al., 1999; Pan y Kastin, 2001).

Tanto el TNF- $\alpha$  como la IL-1 incrementan la respuesta inflamatoria por la vía del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (Allan y Rottwell, 2001) que se activa en neuronas, microglía y células endoteliales aproximadamente a los 30 minutos tras la lesión y persiste durante las siguientes 72 horas (Bethea et al., 1998). Esta activación es crucial, pues el NF $\kappa$ B estimula la producción de mediadores inflamatorios como especies reactivas de oxígeno, citocinas, la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) y prostaglandinas. (Allan y Rottwell, 2001; Bethea et al., 1998; Kim et al., 2001)

La lesión de la médula espinal también induce la expresión de la citocina anti-inflamatoria factor transformador de crecimiento  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (Tyor et al., 2002) que, a diferencia de las citocinas pro-inflamatorias, su expresión es tardía y se puede detectar a partir de las 24 horas poslesión, aunque el pico de su mRNA es hasta 7 días posteriores a la lesión (Semple-Rowland et al., 1995). TGF $\beta$  neutraliza los efectos de las citocinas proinflamatorias al regular a iNOS y disminuir las moléculas de adhesión de las células endoteliales (CAMs) (Hamada et al., 1996; Kitamura, 1997).

Con la sobre expresión de las CAMs endoteliales: (I)-CAM (del inglés intracelular-CAM), (V)-CAM (del inglés vascular-CAM), (PE)-CAM (del inglés platelet endothelial-CAM) y las selectinas P y E inicia el reclutamiento de leucocitos al sitio de la lesión (Lee et al., 2000b; McTigue et al., 1998; Schnell et

al., 1999). Además quimiocinas como la IL-8, CXC y CINC-1 (del inglés cytokine-induced neutrophil chemo-attractant 1) colaboran para inducir la migración y activación de los neutrófilos (Tonai et al., 2001).

Como consecuencia, los neutrófilos se adhieren a las vénulas poscapilares 6 a 12 horas poslesión y para las 24 horas ya migraron al sitio primario de lesión para fagocitar los detritus (Guth et al., 1999; Taoka et al., 1997). A su llegada, los mediadores pro-inflamatorios estimulan a los neutrófilos para generar sus propias citocinas así como la producción de proteasas (McDonald, 1997). Estos mediadores incluyen MMPs (del inglés matriz metaloproteinasas), particularmente la MMP-9 (Noble, 2002) y las citocinas IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  (Cassatella, 1995). Estos mediadores rompen la matriz extracelular para reforzar la extravasación de otros leucocitos, estimular su quimiotaxis, activar a la glía y acrecentar el daño neuronal (Carlson et al., 1998). Finalmente, la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular exacerba el daño por reperfusión y por eso da origen a las hemorragias petequiales que se observan macroscópicamente. La actividad de estas células es trascendente solo durante las primeras 48 horas y después declina (Guth, 1999; Taoka, 1997).

Cuando el número de neutrófilos disminuye, se observa un incremento en el número de monocitos en el parénquima dañado, que durante las siguientes 72 horas se diferenciarán en macrófagos. Su migración depende de IL-8, MIP- $\alpha$  y  $\beta$  (del inglés macrophage inflammatory proteins) y de las CAMs. Después de su llegada los macrófagos y la microglía son activados por el TNF- $\alpha$ , así como por los

ligandos de sus receptores de complemento 3 y manosa. (Fitch et al., 1999). De manera interesante, las células de la microglía son activadas en el sitio primario de lesión en un evento temprano, dentro de la primera hora tras la lesión (Dusart y Schwab, 1994). Esta activación da como resultado concentraciones elevadas de ATP extracelular que, vía un mecanismo calcio dependiente, agudiza la sobre producción de la proteína microglial AIF-1 (del inglés allograft inflammatory factor 1), que activa más células de la microglía (Schwab, 2001; Tanaka y Koinke, 2002). Adicionalmente a esta activación, la microglía puede seguir siendo activada en fases posteriores a la lesión (hasta cinco días) y en sitios distantes a la lesión primaria (Koshinaga, 1995; Watanabe, 1999). Esta activación se lleva a cabo principalmente en tractos de la materia blanca dando como resultado el inicio de la degeneración Valeriana (Frisen, 1994). La microglía puede tener una acción dual después de una lesión, ya que activada en una forma clásica (a través de sustancias químicas) produce una gran cantidad de compuestos tóxicos y contribuye al daño tisular. Sin embargo, cuando es activada directamente por la respuesta adaptativa, es capaz de amortiguar las concentraciones de glutamato extracelular y además producir factores neurotróficos como NGF y NT 4/5 (Shaked et al., 2004; Shaked et al., 2005) .

La activación de los macrófagos origina una liberación excesiva de glutamato, citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) y activación de la iNOS (Leskovar et al., 2000; Satake et al., 2000). Además, la activación de los macrófagos genera la producción de ciclooxigenasas, que son enzimas claves en

la conversión del ácido araquidónico a prostanoïdes. Los prostanoïdes tienen una amplia variedad de propiedades inmunomoduladoras y tienen el potencial de aumentar la lesión secundaria (Schwab et al., 2000).

La presencia de macrófagos en el área de la lesión puede durar hasta siete días, mientras que la microglía activa se puede encontrar en las ratas hasta por 2 a cuatro semanas (Popovich, 1997). Finalmente, la sobreactivación de estas células puede generar “células fantasma”, que pueden encontrarse aún meses a años después de la lesión (Popovich y Jones, 2003).

Después de la fagocitosis de detritus, los macrófagos inician su función como células presentadoras de antígenos (APC) ya que expresan en mayor cantidad moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II gracias a la acción del interferón- $\gamma$  (Popovich et al., 1993), adquiriendo con ello una mayor capacidad para interactuar con los linfocitos T CD4+, generando una respuesta celular caracterizada por citocinas proinflamatorias. Los linfocitos T empiezan a infiltrar el tejido medular de los 3 a los 7 días poslesión periodo durante el cual inicia su interacción con las APCs (Popovich et al., 1997), su activación y diferenciación hacia el fenotipo Th1 (Jones et al., 2004) con la consiguiente liberación de citocinas proinflamatorias.

#### **AUTORREACTIVIDAD Y AUTORREACTIVIDAD PROTECTORA**

Durante la ontogenia las células del sistema inmune desarrollan, en forma aleatoria, la capacidad para responder contra los antígenos, extraños o propios. La mayoría de los linfocitos T y B que reconocen antígenos propios son eliminados

inmediatamente después de su generación, o inactivados en la periferia. Así, se previene el desarrollo de enfermedad autoinmune en la mayoría de los casos. Sin embargo, los mecanismos que originan la tolerancia inmunológica son insuficientes para eliminar o inactivar todas las células autorreactivas ya que prácticamente todos los individuos sanos son capaces de producir autoanticuerpos. Además en individuos sanos también existen linfocitos T autorreactivos. La mayoría de los autoanticuerpos presentes en individuos sanos se dirigen contra antígenos comunes, pero habitualmente ocultos, especialmente intracelulares. De hecho, algunos autoanticuerpos semejan en especificidad a los de algunos pacientes con enfermedades autoinmunes y habitualmente reconocen un número limitado de epítomos. Normalmente los linfocitos B productores de dichos anticuerpos permanecen inactivados, y cuando llegan a secretarlos generalmente son del isotipo IgM con baja afinidad. Estos autoanticuerpos se conocen como “naturales” y se dice que cumplen funciones fisiológicas en el organismo. (Moreno, 1996)

La presencia de linfocitos T autorreactivos en individuos sanos es por falta de eliminación durante la ontogenia o de inactivación en la periferia por falta de exposición del antígeno, dosis insuficiente de éste o falta de interacción con las CPA que expresan dichos antígenos en sus moléculas. Dichos linfocitos permanecen “ignorantes” de la existencia del antígeno y, habitualmente no son activados *in vivo*, por lo que, su presencia no resulta en enfermedad. Sin embargo, cuando se rompe la tolerancia antigénica en el organismo, es decir, no se

reconoce algún componente como propio, se desarrolla una respuesta inmune similar a la descrita anteriormente. En esta respuesta se observa una abundante producción de autoanticuerpos de alta afinidad y con un cambio de isotipo a IgG, producto de la presentación de los antígenos propios por CPAs a los linfocitos T, originando a su vez, la expansión de dichas células por lo que al reconocer nuevamente estos epítomos se corre el riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune. (Moreno, 1996)

La presencia de células autorreactivas, es un proceso codificado genéticamente (Hauber, 2000), al que se le considera como fisiológico siempre y cuando exista una regulación adecuada de la respuesta. Entre las células involucradas en la generación de esta regulación se menciona a los linfocitos T reguladores (Treg) quienes expresan en su superficie los marcadores CD4 y CD25. Estas células juegan un importante papel en el control de la autorreactividad mediante la supresión de células autorreactivas (Schwartz, 2005; Cozzo, 2005; Kipnis, 2004).

A pesar de que la autorreactividad se relaciona inmediatamente con la generación de enfermedad, en la actualidad se han realizado diversos estudios en los que se ha observado que puede tener connotaciones benéficas bajo condiciones especiales, generando una respuesta conocida como “autorreactividad protectora”.

La autorreactividad protectora consiste en estimular al sistema inmune con moléculas propias como la MBP o con péptidos derivados de la MBP que se han

modificado en alguno de sus componentes. Estos péptidos tienen sutiles modificaciones en la secuencia de aminoácidos, lo que produce una respuesta protectora eliminando el riesgo de generar una enfermedad autoinmune como la esclerosis múltiple (EM) o la encefalomiелitis alérgica experimental (modelo animal de la EM).

La respuesta autoinmune protectora ha sido utilizada como una alternativa experimental en diversos modelos como por ejemplo, daño en nervio periféricos (Rutkowski MD, 2004), cardiopatías de origen inmunitario (Toubi E, 2005), lesiones en SNC, entre las que se incluye lesión de nervio óptico (Kipnis, 2002) y LTME (Yoles, 2001), observándose resultados esperanzadores en la búsqueda de solución para estas enfermedades.

Mediante la inmunización con autoantígenos, o bien citocinas como tal, se crea un ambiente protector en las zonas afectadas en los diversos modelos.

Como este trabajo se encuentra enfocado a la LTME, se profundizará un poco más en los estudios previos de autorreactividad protectora que se han llevado a cabo en este modelo de lesión. Así se pueden mencionar los trabajos realizados utilizando MBP en primer término, en los que se observó una mejoría significativamente superior en los animales tratados con esta proteína que en los pertenecientes al grupo testigo (Yoles, 2001).

Se cree que la respuesta autorreactiva protectora ejerce su efecto al capacitar a la microglía para movilizar glutamato libre en el espacio intersináptico, una tarea que le corresponde a los astrocitos, sin embargo con la lesión disminuye

el número de estas células en el epicentro de lesión, lo que genera citotoxicidad (Shaked, 2005).

Sin embargo, el uso de MBP puede generar, como se mencionó anteriormente, una enfermedad autoinmune; por ello, se realizaron ensayos con diversos péptidos derivados de la MBP a los que se le realizaron modificaciones en la secuencia de aminoácidos, surgiendo por ejemplo el G91, péptido que va del aminoácido 87 al 99 al que se le sustituyó una lisina por una glicina en la posición 91; el 96A al cual se le cambió un residuo de prolina por una alanina en la posición 96 (Gaur y cols. 1997), o bien el A91, al cual se le sustituyó una glicina por una alanina en la posición 91, siendo este último el que mejores resultados inmunoprotectores generó (Hauben y cols. 2001) y por ello fue el elegido para la realización del presente estudio, a continuación se amplía sobre las características del péptido y sus posibles mecanismos de acción.

## ✠ **A91: CARACTERÍSTICAS Y MECANISMOS DE ACCIÓN PROPUESTOS**

En estudios realizados por el equipo de investigadores de Schwartz (Hauben, 2001a; 2001b) se probaron diferentes secuencias de aminoácidos pertenecientes a MBP, los cuales fueron nombrados de acuerdo con la sustitución que se realizara como A96, G91 y A91, observándose los mejores resultados para proteger el tejido neural después de una lesión traumática, tanto en nervio óptico como en médula espinal con el péptido A91 consiguiendo resultados esperanzadores.

A91 es un derivado MBP, se trata de un péptido perteneciente a la secuencia de aminoácidos del 87 al 99 al que se le ha hecho una sustitución en la posición 91, cambiando una lisina (VHFFKNIVTPRTP) por una alanina (VHFFANIVTPRTP), en estudios anteriores a este se ha demostrado que es no encefalitogénico. Inicialmente se utilizó como terapia experimental en el modelo murino de la esclerosis múltiple, la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), dando como resultado la remisión de la enfermedad (Gaur, 1997).

### **MECANISMOS INMUNOREGULADORES ORIGINADOS POR A91**

La activación de los linfocitos T CD4+ depende en gran parte del conjunto de señales de transducción originadas por diferentes moléculas estimuladoras y

co-estimuladoras encontradas en la membrana celular. Entre ellas podemos mencionar a CD28, CD4, CD3, CTLA-4 y el mismo TcR entre otros. Todas estas moléculas originan un conjunto de señales que pueden culminar en la activación del linfocito T. De todas estas señales, la emitida por el TCR es un evento importante ya que de acuerdo a algunos estudios, cambios sutiles en la estructura del ligando del TCR resultan en efectos distintos sobre la activación del linfocito T (Nel AE, 2002). La presencia de aminoácidos diferentes en la región reconocida por el TcR (ligandos peptídicos alterados; APLs: del inglés altered peptide ligand), o bien, la presencia de secuencias repetidas formando copolímeros, sin que se modifique la capacidad de unión al MHC puede resultar en un cambio en el fenotipo, anergia o ausencia del reconocimiento. En el caso de los APLs, una pequeña variación en la secuencia primaria peptídica puede ejercer un efecto importante en su capacidad para interactuar ya sea con el MHC o con el mismo TcR, convirtiendo de esta forma a un péptido agonista en uno parcialmente agonista o incluso antagonista. Los péptidos agonistas llevan a cabo interacciones de gran afinidad con el TcR y originan una respuesta muy intensa de los linfocitos T, mientras que los parcialmente agonistas o antagonistas llevan a cabo interacciones de baja afinidad que originan alteración o incluso inhibición de la respuesta (Jameson SC, 1995; Kersh GJ, 1996; Hall FC, 2003; Huang Y, 2003). El APL originado de la secuencia 87-99 de la MBP (secuencia altamente inmunogénica) denominado A91 es un péptido que de acuerdo a estudios previos puede perfectamente funcionar como un agonista parcial. En modelos murinos de EAE, A91 ha sido capaz de disminuir importantemente la severidad de la

enfermedad. Dicha inhibición se ha demostrado que es antígeno específica y producto de un cambio en el perfil de citocinas liberadas. Los animales con EAE y tratados con A91 presentan una disminución importante de los niveles de citocinas derivadas de los linfocitos Th1 y un aumento en la liberación de las derivadas de los Th2. El APL A91 origina un cambio en el patrón de citocinas producidas por los linfocitos T reactivos contra la secuencia 87-99 de la MBP, de un fenotipo Th1 (proinflamatorio; INF-gama, TNF, IL-2) a uno TH2 (antiinflamatorio; IL-4, IL-10). De tal forma que la respuesta originada por A91 puede estar controlando la acción destructora de los linfocitos T autorreactivos anti-87-99 mediante la regulación de la liberación y actividad de las citocinas proinflamatorias, permitiendo con ello la preservación de un mayor substrato anatómico para la regeneración. Además la modulación inducida con A91 permitiría también activar a la microglía con un fenotipo productor de factores neurotróficos (Shaked, 2004), acción que en sinergia con la liberación de estos mismos factores por parte de otras células como los macrófagos (Rapalino et al., 1998) y los linfocitos T (Barouch, 2002; Moalem, 2000), podrán crear un microambiente favorable para la regeneración neural.

Es importante resaltar que la respuesta autorreactiva protectora tarda entre cuatro y siete días en desarrollarse. Durante este periodo los procesos degenerativos continúan sin una modulación, por ello es necesario buscar un tratamiento conjunto que ofrezca neuroprotección durante este periodo en que el tejido neural no recibe los beneficios de la autorreactividad protectora.

Como se describió en capítulos anteriores, la lipoperoxidación es uno de los procesos degenerativos más agresivos que se presentan después de una LTME, y en estudios previos se demostró que el glutatión monoetil ester (GSH-MEE) es un agente que evita el daño ocasionado por la lipoperoxidación (Santoscoy, 2002; Guizar-Sahagún, 2005) y además tiene un efecto inmunoestimulador; es por ello que se eligió este compuesto para utilizarse en combinación con A91, para de esta manera obtener una neuroprotección más temprana y por ello más efectiva en la recuperación de las funciones de los individuos de experimentación.

## ✠ GLUTATIÓN: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y FUNCIONES EN EL ORGANISMO.

Actualmente se han desarrollado agentes antioxidantes como el glutatión monoetil ester (GSH-MEE) (Grattagliano, 1999) que ha demostrado tener efecto importante sobre la inhibición de la lipoperoxidación incluso después de una LTME y ser eficientemente transportado hasta el líquido cefalorraquídeo. Dicho antioxidante, no comparte el efecto glucocorticoide de la MP pero si ha demostrado ser efectivo para inhibir el fenómeno de la lipoperoxidación (Santoscoy, 2002).

El glutatión, es el tiol más grande de las células de los mamíferos, está implicado en muchas funciones celulares. Este tripéptido (g-glutamyl-L-cisteyl-glicina) juega un papel central en la protección de las células frente a los radicales libres, especialmente frente a intermediarios reactivos del oxígeno. El glutatión existe en dos formas, reducido (GSH) y oxidado (GSSG). Como el GSH es fácilmente oxidado, la acetilación del grupo tiol estabiliza la molécula aumentando su biodisponibilidad *in vivo* (Meister, 1989).

La primera etapa de la síntesis del glutatión es la formación de un enlace peptídico entre el grupo R-carboxilo del glutamato y el grupo amino de la cisteína, mediante una reacción catalizada por la glutamylcisteína sintasa. La formación de este enlace peptídico requiere que se active un grupo R-carboxilo, lo que se consigue con ATP. El intermediario acil-fosfato posteriormente es atacado por el grupo amino de la cisteína. En la segunda etapa catalizada por glutatión sintasa, el

ATP activa el grupo carboxilo de la cisteína para permitir su condensación con el grupo amino de la glicina (Meister, 1989).

El glutatión, esta presente en elevadas concentraciones (-5mM) en las células de los animales, actúa como amortiguador de sulfhidrilos. Pasa cíclicamente de una forma de tiol reducida (GSH) a una forma oxidada (GSSG), en la cual los dos tripéptidos están unidos por un puente de disulfuro. El GSSG se reduce de nuevo a GSH por la glutatión reductasa, una flavoproteína que utiliza NADPH como donador de electrones (Meister, 1989).

El GSH-MEE es un compuesto que incrementa las concentraciones intracelulares del glutatión. El GSH-MEE es altamente permeable a la membrana celular. Una vez que se localiza en el citoplasma celular, este compuesto es hidrolizado por esterasas originando así un incremento en la concentración de glutatión, facilitando con ello la función antioxidante de la glutatión peroxidasa. El GSH-MEE ha sido utilizado en forma efectiva para proteger a las células en contra de agentes oxidantes (Wellner, 1984).

El glutatión juega un papel clave en la detoxificación por que reacciona con el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos, que son los subproductos dañinos de la vía aeróbica. Además juega un importante papel sobre el desarrollo de la respuesta inmune celular, pues bajas concentraciones intracelulares de GSH-MEE da como resultado una baja en la cantidad de linfocitos T CD4. El glutatión intracelular es necesario para la proliferación de los linfocitos T, pues es responsable de la estimulación mitogénica, de la activación de los linfocitos T

citotóxicos, de la síntesis de DNA para la replicación celular, así como del metabolismo de la interleucina 2. (Kidd, 1997)

## JUSTIFICACIÓN

La inmunización activa con péptidos no encefalitogénicos promueve una mejor recuperación motora después de una LTME. Sin embargo con esta estrategia, algunos de los fenómenos destructivos como la lipoperoxidación no están siendo inhibidos desde la fase aguda de la lesión. Por otra parte, el GSH-MEE ha demostrado ser un excelente antioxidante en modelos experimentales con LTME, sin presentar algún efecto deletéreo sobre la función del sistema inmunológico. La combinación de la vacuna protectora con la administración inmediata del GSH-MEE podría ofrecer una mejor recuperación neurológica que la observada en individuos tratados sólo con la inmunización protectora. De igual manera, una doble inmunización o la combinación de doble inmunización y GSH-MEE podrían mejorar aún más dicho efecto. Hasta el momento ninguna de estas posibilidades ha sido explorada. El establecimiento de una estrategia neuroprotectora que incluya la utilización de los mecanismos protectores propios del organismo en combinación con otras alternativas, será de gran utilidad no solo para los problemas de LTME sino también en otras patologías degenerativas de tipo agudo (trauma craneal, isquemia cerebral) o crónico (Alzheimer). En general los estudios relacionados con la estimulación de la autoinmunidad protectora, abren un panorama muy interesante e innovador para el tratamiento de diferentes patologías.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. ¿La administración simultánea de la inmunización activa con A91 y glutatión monoetil ester (estrategia de combinación), promoverá una mejor recuperación motora, sobrevida neuronal y preservación del tejido neural que aquella originada por la inmunización por si sola, después de una LTME?
2. ¿Los animales sometidos a una doble inmunización con A91 presentarán una mejor recuperación motora que aquella originada en los animales con una sola inmunización?
3. ¿La combinación de doble inmunización con A91 más glutatión monoetil ester promoverá una mejor recuperación motora que aquella originada por la doble inmunización por si sola?

## HIPÓTESIS

1. La combinación de la inmunización con A91 y la administración inmediata de glutatión monoetil ester promoverán una mejor recuperación motora, sobrevida de neuronas y preservación del tejido neural en comparación con la originada por la inmunización por si sola.
2. La inmunización con dos dosis de A91 promoverá la recuperación motora más eficientemente que la originada por la inmunización con una sola dosis.
3. La combinación de doble inmunización con A91 más glutatión monoetil ester promoverá una mejor recuperación motora que aquella originada por la doble inmunización por si sola

## **OBJETIVO GENERAL**

Demostrar que glutatión monoetil ester y/ o la inmunización con dosis doble mejora el efecto neuroprotector obtenido por la inmunización con una sola dosis de A91 después de una lesión traumática en la médula espinal.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Comparar el efecto neuroprotector de la inmunización con el péptido A91, con el de la estrategia de combinación en individuos con LTME.
2. Comparar el efecto neuroprotector de la doble inmunización con el de una sola en individuos con LTME.
3. Comparar el efecto neuroprotector de una doble inmunización, con el de la combinación de doble inmunización más glutatión monoetil ester en individuos con lesión traumática en la médula espinal.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

**POBLACIÓN OBJETIVO:** Ratas Sprague Dawley (ratas en las que la autoinmunidad protectora se desarrolla de manera más eficiente) (49).

**MUESTRA:** Ratas Sprague Dawley, hembras de 12 a 15 semanas de edad y con un peso entre 220- 280 g.

**TAMAÑO DE LA MUESTRA:** Se utilizaron 10 ratas por cada grupo.

El tamaño de la muestra se determinó mediante el método de Tang segunda variante. (Kuhel, 2001)

### **DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se realizaron 3 experimentos, para cada uno se formaron grupos de 10 ratas a las cuales se les realizó una LTME de intensidad moderada (LTME), y se asignaron a los tratamientos de la siguiente manera:

Experimento uno: Inmunización con una dosis de A91 en combinación con glutatión monoetil ester (GSH-MEE).

Grupo 1: vehículo

Grupo 2: inmunización con una dosis de A91

Grupo 3: administración de GSH-MEE

Grupo 4: inmunización con una dosis de A91 más administración de GSH-MEE

Experimento dos: Inmunización con dos dosis de A91 con siete días de diferencia entre cada una en combinación con GSH-MEE

Grupo 1: vehículo

Grupo 2: inmunización doble

Grupo 3: inmunización doble más administración de GSH-MEE

Experimento tres: Comparación del efecto obtenido mediante la inmunización con una dosis de A91 contra el obtenido con dos dosis aplicadas con siete días de diferencia entre cada una.

Grupo 1: vehículo

Grupo 2: inmunización simple

Grupo 3: doble inmunización

La razón por la que se realizaron experimentos con diferentes esquemas de inmunización radicó en evaluar el efecto sobre la inmunidad protectora que pudiera observarse por el estímulo repetido al sistema inmune.

En todos los casos los animales fueron estudiados por un periodo de 70-90 días, tiempo suficiente para conocer el efecto del tratamiento a nivel clínico y morfológico (Hauben, 2000).

Para comprobar la respuesta inmune contra A91 se realizaron estudios de proliferación celular empleando tres animales por grupo, para todos los experimentos.

## ✠ DESARROLLO DE ENCEFALOMIELITIS ALÉRGICA EXPERIMENTAL:

Para demostrar que el péptido neural modificado A91 no es encefalitogénico se realizaron dos experimentos con ratas hembras de la cepa Lewis (cepa susceptible a desarrollar encefalomiélitis alérgica experimental) de 200 a 220 gramos de peso, integrados por dos grupos de cuatro animales cada uno. En la Cuadro 2 se describe el esquema de inmunización que recibieron los diferentes grupos de los 2 experimentos.

Cuadro 2: Esquema de inmunización utilizado para comprobar el desarrollo de EAE en ratas Lewis.

Experimento	Grupo/Antígeno	Dosis por aplicación	No. de aplicaciones
Uno	A91 + adyuvante completo de Freund.	150 µg	1
	PBS + adyuvante completo de Freund.	150 µl	1
Dos	A91 + adyuvante completo de Freund.	150 µg	2 *
	PBS con adyuvante completo de Freund.	150 µl	2*

\* con un intervalo de 7 días entre cada una

## MÉTODOS DE EVALUACIÓN

### **EVALUACIÓN CLÍNICA**

Se realizó cada 7 días desde el inicio hasta el final del estudio, mediante la utilización de la prueba de habilidad locomotora a campo abierto (BBB) donde la recuperación se califica en una escala de 0 (parálisis completa) a 21 (movilidad completa) (Basso, 1995). Al final del estudio y sólo en aquellas ratas que presentaron una recuperación de igual o mayor a 10 en la escala de BBB, se evaluó también la recuperación motora mediante la prueba de ambulación sobre reja de alambre donde se evaluó la capacidad del animal para apoyar la planta del pie en la reja de alambre (Kunkel-Bagden, 1993).

### **EVALUACIÓN MORFOLÓGICA**

#### MARCAJE RETRÓGRADO DE CÉLULAS DEL NÚCLEO ROJO.

Se realizó al final del estudio. Se seleccionaron tres ratas por grupo, tomando la que tuviera la evaluación de BBB mejor, el promedio de grupo y la más baja. Se marcaron en forma retrógrada las neuronas del núcleo rojo (Hauben, 2000) mediante la aplicación del neurotrazador dextrán-rodamina por abajo del sitio de lesión (T12) y se comparó el número de células marcadas (vivas) entre los diferentes grupos. Se contaron las neuronas que sobrevivieron en cada núcleo rojo y se obtuvo el promedio por animal y por grupo. Por lo general, los resultados de esta prueba correlacionan con la recuperación motora del animal.

## **EVALUACIÓN DEL NÚMERO DE AXONES MIELINIZADOS EN EL EPICENTRO DE LA LESIÓN.**

Se realizó la cuantificación de axones mielinizados en el epicentro de la lesión de tres ratas por grupo, siguiendo el mismo criterio de selección que para sobrevida de núcleo rojo. Las muestras fueron cortadas en microtomo de un micrómetro de espesor y se tiñeron con azul de toluidina. Se identificó el corte correspondiente al epicentro de la lesión y se fotografió por medio de un microscopio Polyvar, conectado a una computadora en la que se utilizó el programa Matrox, se realizó la cuantificación de axones manualmente, considerando como axón mielinizado a todo aquel que se encontrara teñido de azul y tuviera la morfología correspondiente.

## **EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA AUTORREACTIVA PROTECTORA**

Se evaluó la respuesta contra el péptido A91 12 días después de la inmunización, en los animales con inmunización simple (experimento uno) y 18 días en los animales con doble inmunización (experimentos 2 y 3) mediante estudios de proliferación de células totales de nódulos linfáticos inguinales de acuerdo al siguiente diseño mostrado en la Cuadro 3.

Cuadro 3: Diseño de experimento para proliferación celular (n=3).

Inmunización	Tiempo de	Grupo
Simple	12 días	A91 + GSH-MEE
		A91
		PBS
Doble	18 días	A91 + GSH-MEE
		A91
		PBS
Simple	18 días	A91

### EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE EAE

Se emplearon ratas hembra de 200-220 gramos de peso vivo, de la cepa Lewis, cepa susceptible al desarrollo de encefalomiелitis alérgica experimental, y se inmunizaron con 150 µg de A91 emulsificado con adyuvante completo de Freund, o bien con PBS igualmente emulsificado con adyuvante completo de Freund, de acuerdo al diseño explicado en la Cuadro 2.

## **TÉCNICAS**

### **LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL.**

Las ratas fueron anestesiadas mediante la inyección intramuscular de una mezcla de clorhidrato de xilazina (10 mg/ Kg) y ketamina (50 mg/ Kg). Treinta minutos después de dicha inyección y previa asepsia de la región tóraco-lumbar, se realizó un corte longitudinal y se ejecutó una laminectomía a nivel de la 9ª vértebra torácica hasta exponer la médula espinal. Posteriormente se realizó la LTME mediante una contusión moderada, dejando caer un cilindro de 10 g de una altura de 25 mm sobre el sitio expuesto, utilizando el impactador de la Universidad de Nueva York (NYU), un aparato que ha demostrado infligir una lesión por contusión en la médula espinal bien calibrada (Young, 1996).

### **INMUNIZACIÓN**

Las ratas fueron inmunizadas mediante una inyección intradérmica, en la primera aplicación y en su caso la única se realizó la aplicación en la base de la cola, con 150 µg de A91 o PBS emulsificado en un volumen igual de Adyuvante completo de Freund (CFA) conteniendo 1mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*. La segunda aplicación se realizó siete días después en el área dorsal a nivel de las 7ª-8ª costillas.

**ADMINISTRACIÓN DE GLUTATIÓN MONOETIL ESTER:** Se aplicaron vía intraperitoneal 2.5 mg de GSH-MEE en total, diluidos en solución salina fisiológica estéril, divididos de la siguiente manera:

Cuadro 4: Aplicación de Glutati3n monoetil ester.

Tiempo poslesión	mg aplicados	Volumen ( $\mu$ l)
20 minutos	1 mg	200
4 horas	0.5 mg	200
10 horas	0.5 mg	200
20 horas	0.5 mg	200

**EVALUACI3N MOTORA A CAMPO ABIERTO MEDIANTE LA ESCALA BBB:**

Se realiz3 cada siete d3as desde el inicio del experimento hasta los noventa d3as, colocando al individuo sobre un caj3n de madera pintada de 1.2 m<sup>2</sup> con bordes de 20 cm de altura y se le observ3 por al menos cinco minutos para determinar que articulaci3n era capaz de mover adem3s de la amplitud del movimiento en cada miembro p3lvico y as3 calificarla de acuerdo con la escala BBB (Cuadro 5). Los resultados presentados son el promedio de ambos miembros p3lvicos de cada animal y posteriormente estos se promediaron de acuerdo al tratamiento recibido.

Cuadro 5: Escala de evaluación locomotora a campo abierto (BBB)

Calificación	Criterio de evaluación
0	No se observa movimiento en patas traseras (PT)
1	Movimiento limitado (arco < 50%) de una o dos articulaciones, usualmente cadera y/o rodilla
2	Movimiento amplio (arco > 50%) de una articulación con o sin movimiento limitado de la otra.
3	Movimiento amplio de dos articulaciones.
4	Movimiento limitado de las tres articulaciones de PT (cadera, rodilla y tobillo).
5	Movimiento limitado de dos articulaciones y amplio de la tercera.
6	Movimiento amplio de dos articulaciones y limitado de la tercera.
7	Movimiento amplio de las tres articulaciones de PT (cadera, rodilla y tobillo).
8	Movimiento rítmico (coordinado) de ambas PT sin soporte de peso o colocación de la planta pero sin soportar peso.
9	Colocación plantar con soporte de peso pero no esta caminando o pasos ocasionales (< ó = al 50%), frecuentes (51% a 94%), o constantes (95% a 100%), con soporte de peso dorsal, sin apoyo plantar.
10	Pasos ocasionales con soporte de peso plantar, sin coordinación entre patas delanteras (PD) y PT.
11	Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar, sin coordinación entre PD y PT.
12	Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar y coordinación ocasional entre PD y PT.
13	Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar y coordinación frecuente entre PD y PT.
14	Constantemente da pasos con soporte de peso plantar, coordinación constante entre PD y PT, y hay rotación interna o externa de la pata, principalmente al hacer contacto con el piso o al despegar. También pasos plantares frecuentes, coordinación constante entre PD y PT y pasos dorsales ocasionales.
15	Pasos plantares y coordinación entre PD y PT constantes. No separa los dedos o solo ocasionalmente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predominio la alineación paralela de la pata al cuerpo.
16	Pasos plantares y coordinación entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre frecuentemente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predominio la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero la rota al levantarla.
17	Lo mismo (num. 16) pero al levantar la pata la mantiene alineada (sin rotar).
18	La separación de los dedos es constante durante la marcha. Al hacer contacto con el piso predomina la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero la rota al levantarla.
19	Pasos plantares y coordinación entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre constantemente durante la marcha. Al hacer contacto con el piso y levantar, predominio la alineación paralela de la pata al cuerpo. Arrastra la cola parte o todo el tiempo.
20	Pasos plantares, marcha coordinada y separación de dedos constantes. Al hacer contacto con el piso y levantar, predominio la alineación paralela de la pata al cuerpo, cola levantada constantemente e inestabilidad del tronco.
21	Igual pero tronco constantemente estable (Basso , 1995)

## **EVALUACIÓN MOTORA FINA**

Previamente a la lesión se entrenó a los individuos para caminar sobre una rejilla de alambre de dos metros de largo elaborada con maya de alambón con espacios de 2 pulgadas entre alambres y se les grabó en video. Al final del estudio se seleccionó a los individuos que obtuvieron calificaciones de 10 y superiores en la escala BBB y se les volvió a grabar caminando sobre la rejilla. Se obtuvo el índice de error dividiendo el número de errores (considerándose como error a la introducción de la pata en el espacio entre alambres) después de la lesión entre el número de errores antes de la misma, se reportó el índice de error promedio por grupo.

## **MARCAJE RETRÓGRADO DE LAS NEURONAS DEL NÚCLEO ROJO:**

Tres meses después de la lesión, 3 animales de cada grupo (seleccionados de acuerdo con el promedio final obtenido en la BBB, el de mayor promedio, el que cayera dentro del promedio del grupo y el más bajo) fueron anestesiados, se realizó una sección completa de la médula espinal a nivel de T12 y se aplicaron en ese sitio 1 mg del marcador Dextrán-rodamina diluido en 10  $\mu$ L por núcleo rojo, mediante inyección con jeringa Hamilton. Después de 5 días, las ratas fueron nuevamente anestesiadas y decapitadas, el cerebro fue procesado para realizar cortes por congelación de 20 micras a nivel del núcleo rojo. Los cortes se analizaron para cuantificar el número total de neuronas de la región magnocelular (neuronas de mayor tamaño en el núcleo rojo). El promedio de ambos núcleos

rojos en cada animal fue el que se tomó en consideración para realizar las comparaciones entre los diferentes grupos.

#### **EVALUACIÓN DEL NÚMERO DE AXONES MIELINIZADOS EN EL EPICENTRO DE LA LESIÓN:**

Noventa días después de la lesión se seleccionaron tres animales por cada grupo de acuerdo al mismo criterio que para la evaluación de núcleo rojo, y se les extrajo la médula espinal de acuerdo con la siguiente metodología:

Perfusión cardiaca: se anestesió a cada animal con el protocolo antes descrito, se le aplicaron 1000 UI de heparina vía intraperitoneal, se esperaron 10 minutos para realizar la perfusión. Se abrió el tórax, localizado el corazón se realizó un corte a nivel del ápice y otro en la aurícula derecha con un tijera, se introdujo la cánula por la parte apical y se llevó hasta la arteria aorta, ahí se fijó la cánula con una pinza, por medio de una bomba de perfusión se lavó la totalidad de la sangre con 250 ml de solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.2-7.4, posteriormente se hizo transitar de 300 a 350 ml de paraformaldehído 4%, al mismo pH, ambas soluciones se movilizaron a una velocidad de 25-30 ml/ min. Con todos los tejidos de la rata fijos se procedió a extraer la médula espinal, la cual se colocó, debidamente identificada en paraformaldehído 4% durante 72 horas, posteriormente se colocó en glucosa 15% por 7 días y finalmente en glucosa 30% por 7 días más. Se cortaron fragmentos de médula tomando el epicentro de la lesión como referencia, de esta manera se obtuvieron piezas de 1

mm de largo aproximadamente, los cuales se procesaron con resina para microscopía electrónica, para obtener cortes mediante microtomo de 1 µg de espesor, los cuales se tiñeron con azul de toluidina y se analizaron en microscopio óptico a resolución 40x. Se identificó el epicentro de la lesión y se obtuvieron fotografías secuenciales hasta cubrir la totalidad del área del corte, con las fotografías se realizó una reconstrucción y se llevó a cabo la cuenta de axones mielinizados.

#### **ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR**

Bajo anestesia y en condiciones de asepsia y antisepsia se obtuvieron de cada animal los nódulos linfáticos inguinales. Una vez extraídos dichos órganos linfoides, se colocaron inmediatamente en RPMI más suero fetal bovino (SFB) al 20% para posteriormente ser macerados por separado (sin llegar a triturar) con el émbolo de una jeringa estéril, mediante centrifugado se lavaron las células obtenidas. Después de contar el número total de células, se colocaron 250,000 células/pozo en RPMI más SFB al 20% junto con el péptido A91, MBP, OVA y concanavalina-A. Se incubaron las placas durante 72 h a 37° C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>.

Posteriormente se agregó 1 µC de H<sup>3</sup>-timidina por pozo.

Veinticuatro horas después las células fueron lavadas y lisadas para obtener en filtros el DNA correspondiente. Finalmente las muestras se colocaron

en viales con líquido de centelleo para ser leídas en un contador de radioactividad beta, Beckman L5 6000 a TA y así obtener los valores correspondientes expresados en cuentas por minuto. Los resultados se reportaron como índice de proliferación, mismo que se obtuvo de dividir la proliferación promedio obtenida en cada quintuplicado entre la proliferación de las células incubadas sólo en medio.

### **EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE EAE:**

Diariamente se tomó el peso corporal y se observaron los individuos para detectar clínicamente la enfermedad mediante la escala de Fernández (2004) que se presenta a continuación:

Cuadro 6: Escala de evaluación clínica para determinar el desarrollo de EAE.

Calificación	Signos de enfermedad
1	Pérdida del tono muscular de la cola.
2	Debilidad en uno o ambos miembros pélvicos o ataxia central.
3	Ataxia o parálisis.
4	Parálisis severa de los miembros pélvicos.
5	Parálisis severa de los miembros pélvicos acompañada de incontinencia urinaria.

## ✠ DESCRIPCIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES

### VARIABLES INDEPENDIENTES

**LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL (LTME):** Daño en la médula espinal causado por el impacto con un cilindro de acero de 10 g de peso que se deja caer de una altura de 25 mm. El daño origina inflamación y destrucción del tejido de la médula espinal, así como pérdida parcial de la actividad motora en las extremidades posteriores del 100% de los animales.

**TRATAMIENTO CON GLUTATIÓN MONOETIL ESTER:** Se refiere a la administración de GSH–MEE después de la LTME. El glutatión monoetil ester se aplicará de acuerdo al esquema mencionado en la Cuadro 4.

**INMUNIZACIÓN:** Se trata de la inyección intradérmica del péptido A91 en CFA, dentro de los primeros 60 minutos después de la LTME. En los casos de doble inmunización se repetirá la dosis a los 7 días.

### VARIABLES DEPENDIENTES

**NEUROPROTECCIÓN:** Estrategia terapéutica que previene o disminuye la degeneración secundaria de una lesión en la médula espinal. Mientras mayor es la neuroprotección menor será la destrucción del tejido neural y por lo tanto menor la pérdida de funciones neurológicas. En el presente proyecto se evaluó la neuroprotección, mediante la cuantificación de: células neuronales sobrevivientes

en el núcleo rojo, el número de axones preservados en la zona de lesión y la recuperación de la función motora de los animales lesionados.

**RECUPERACIÓN MOTORA:** Capacidad que presentó el animal para mover y apoyar sus extremidades posteriores. Se calificó con la escala BBB y la prueba de ambulación sobre reja de alambre, la cual se reportó en porcentaje de eficiencia para desarrollar la prueba tomando como 100% la calificación promedio obtenida por las mismas ratas antes de la lesión de la médula espinal.

**CÉLULAS NEURONALES SOBREVIVIENTES EN EL NÚCLEO ROJO.** Se consideró como neurona que sobrevivió después de la lesión, a aquella que se tiñó y que presentó núcleo íntegro después de haber sido colocado el neurotrazador dextrán-rodamina en una región de la médula espinal caudal al sitio de lesión (T12).

**AXONES MIELINIZADOS.** Se consideró como axón mielinizado a todo aquel que estuviera rodeado de una membrana teñida con azul de toluidina y presentara forma esférica a ovoide.

## ✠ MANEJO DE DATOS Y PROCESO ESTADÍSTICO

Todos los datos se presentaron en forma de Figura o de Cuadro, y se procesaron estadísticamente de acuerdo con la Cuadro 7:

Cuadro 7: Procesamiento de datos.

<b>Evaluación</b>	<b>Criterio de selección de los animales</b>	<b>Presentación de los resultados</b>	<b>Proceso estadístico</b>
BBB.	Todos	Gráfica.	ANOVA de medidas repetidas.
Capacidad para dar pasos	Con calificaciones superiores a 10 en BBB	Gráfica	Exacta de Fisher.
Deambulación sobre reja de alambre.	Con calificaciones superiores a 10 en BBB	Gráfica	ANOVA
Neuronas sobrevivientes en núcleo rojo	El promedio más alto en BBB, el promedio del grupo y el más bajo.	Gráfica y fotografías	ANOVA, correlación con las calificaciones obtenidas en BBB.
Axones mielinizados en el epicentro de la lesión	El promedio más alto en BBB, el promedio del grupo y el más bajo.	Gráfica y fotografías	Kruskal Wallis seguida de U de Mann Whitney.
Proliferación celular	3 animales lesionados e inmunizados, bajo las mismas condiciones que los de seguimiento, para inmunización simple se esperaron 12 días después de la lesión y para inmunización doble 18 días.	Cuadro	ANOVA
Desarrollo de EAE	4 ratas cepa Lewis de 200 a 220 gramos de peso, con seguimiento por 30 días para inmunización simple, y 45 para inmunización doble.	Gráfica	ANOVA

## RESULTADOS

### EXPERIMENTO 1: INMUNIZACIÓN CON UNA DOSIS DE A91 EN COMBINACIÓN CON GSH-MEE.

En el Cuadro 8 se enlistan las calificaciones obtenidas en la evaluación BBB de cada animal, ordenados de acuerdo con el grupo correspondiente, así como la prueba morfométrica en que fueron empleados y el resultado obtenido

#### EVALUACIÓN CLÍNICA:

##### Evaluación motora mediante la prueba a campo abierto BBB

Los animales tratados con la combinación o con el GSH-MEE solo, presentaron una mejoría en forma más temprana (primera semana) en comparación con los animales tratados con A91 y los del grupo testigo; sin embargo, dicha diferencia fue estadísticamente significativa a partir del día 12 poslesión ( $p= 0.003$ ; ANOVA). Después del día 26, el comportamiento fue diferente entre los grupos tratados con GSH-MEE (combinación o GSH-MEE solo). Los animales tratados con la combinación fueron significativamente superiores a los tratados sólo con GSH-MEE. Al mismo tiempo, los tratados con A91 incrementaron su recuperación clínica hasta alcanzar a los tratados con GSH-MEE, superando ambos grupos a los integrantes del grupo testigo ( $p<0.001$ ). Este comportamiento de los grupos se mantuvo durante todo el seguimiento. La

calificación final de los diferentes grupos fue: Combinación:  $10.77 \pm 1.47$ , glutatión:  $9.77 \pm 1.75$ ; A91:  $10.45 \pm 1.40$  y testigo:  $8.00 \pm 2.84$

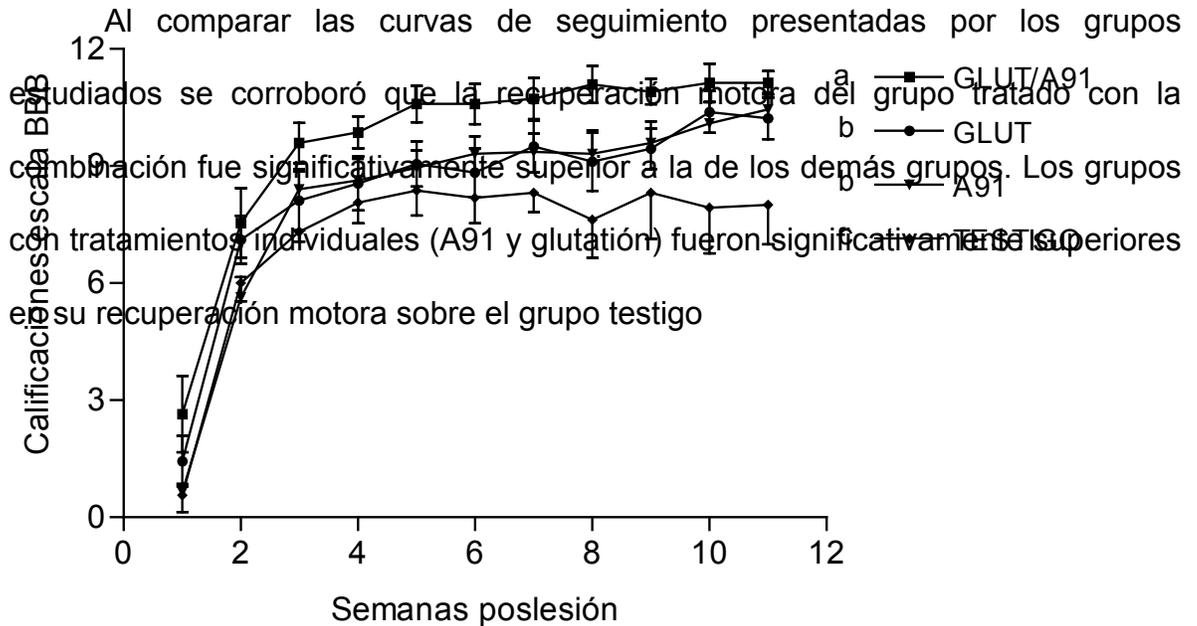


Figura 2: Evaluación motora mediante la prueba a campo abierto BBB. Donde <sup>a</sup> significativamente diferente de <sup>b</sup> y de <sup>c</sup>. ( $p < 0.001$  ANOVA de medidas repetidas)

Cuadro 8: Identificación de animales empleados en cada prueba.

Tratamiento	Prueba	Rata	BBB	Evaluación
Combinación	Axones mielinizados en el epicentro de la lesión	1	10.5	3812.0
		7	13.0	1358.0
		46	10.5	2388.0
		50	11.5	2469.0
	Sobrevida de neuronas en el núcleo rojo Núcleo rojo	26	10.5	178.0
		29	13	234.5
		39	10.5	165.5
		47	11	168.5
	Ninguna	64	10	
		66	9	
GSH-MEE	Axones mielinizados en el epicentro de la lesión	56	8.5	1131
		58	9	719
		60	12.5	2867
		65	10	1630
	Sobrevida de neuronas en el núcleo rojo	3	9.5	104
		16	11	171
		36	13	187.5
		30	8	48
	Ninguna	2	7.5	
		69	9	
49		9.5		
A91	Axones mielinizados en el epicentro de la lesión	8	9.5	1710
		11	11.5	922
		43	12	2125
		44	9	1625
	Sobrevida de neuronas en el núcleo rojo	24	9.5	117.5
		9	11.5	138.5
		37	9	101
		53	13	168.5
	Ninguna	25	9	
		33	10	
32		11		
Testigo	Axones mielinizados en el epicentro de la lesión	13	10.5	1681
		27	8.5	956
		63	8.5	840
		35	7	861
	Sobrevida de neuronas en el núcleo rojo Núcleo rojo	12	7.5	48.5
		42	8.5	73
		54	11.5	134
		48	2	8

### Capacidad para dar pasos

En la capacidad para dar pasos (calificación de 10 o superior en la escala BBB) observamos que los animales tratados con la combinación fueron significativamente superiores a los tratados de manera individual y estos sobre el testigo.

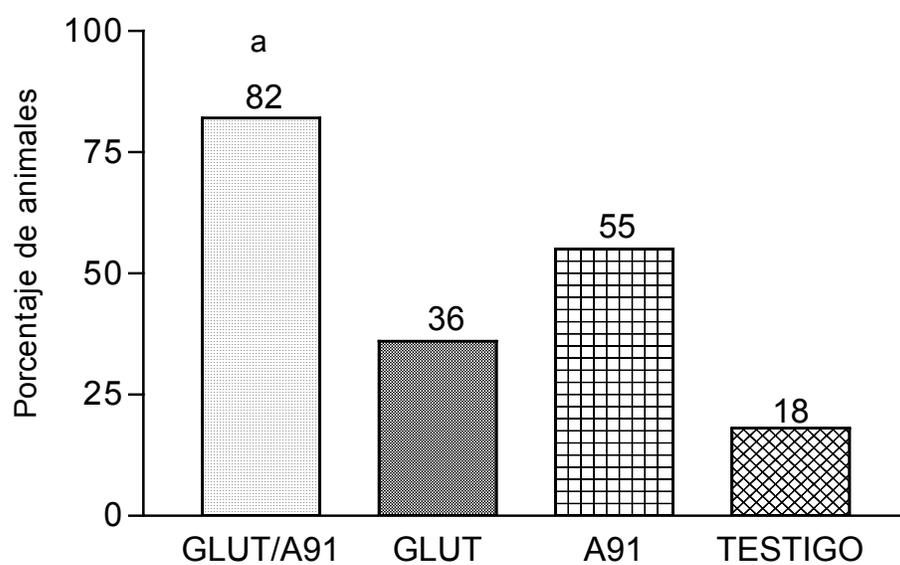


Figura 3: Capacidad para dar pasos. Donde: <sup>a</sup> significativamente diferente ( $p < 0.001$  Prueba exacta de Fisher)

Prueba de ambulación sobre reja de alambre:

Se observó un índice de error significativamente superior en los animales pertenecientes al grupo testigo. Entre los grupos tratados no se observó diferencia significativa.

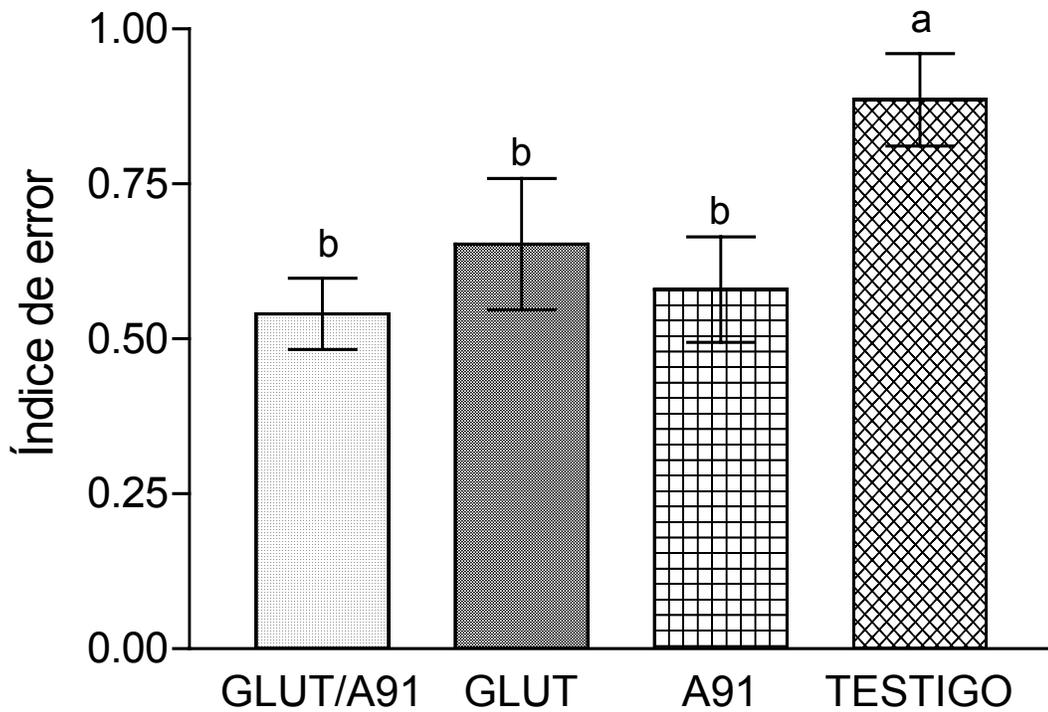


Figura 4: Deambulaci3n sobre reja de alambre. Donde: <sup>a</sup> significativamente diferente de <sup>b</sup> (p < 0.05 ANOVA de una vía)

## EVALUACIÓN MORFOLÓGICA

### Sobrevida de neuronas motoras en el núcleo rojo:

El grupo tratado con la combinación presentó una mayor sobrevida de neuronas que los grupos tratados individualmente. Estos últimos también fueron significativamente superiores al testigo. (Figuras 5 y 6). Lo cual correlacionó con las calificaciones obtenidas en la prueba BBB (Figura 7)

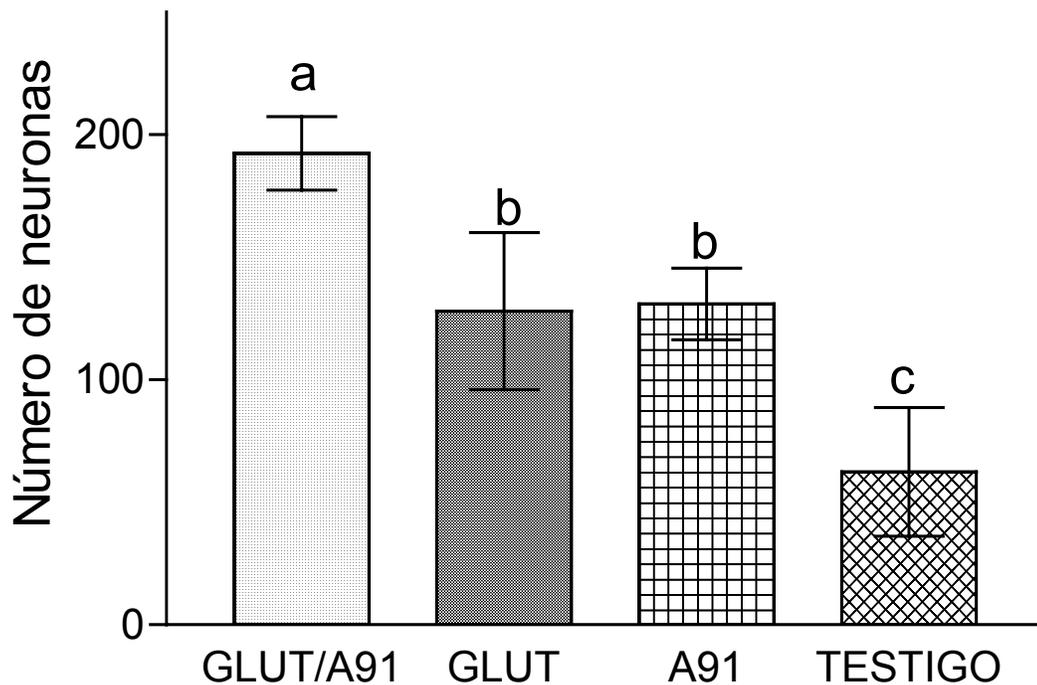


Figura 5: Sobrevida de neuronas en el núcleo rojo. Donde: <sup>a</sup> significativamente diferente de <sup>b</sup> y <sup>b</sup> significativamente diferente de <sup>c</sup>. ( $p < 0.05$  ANOVA de una vía)

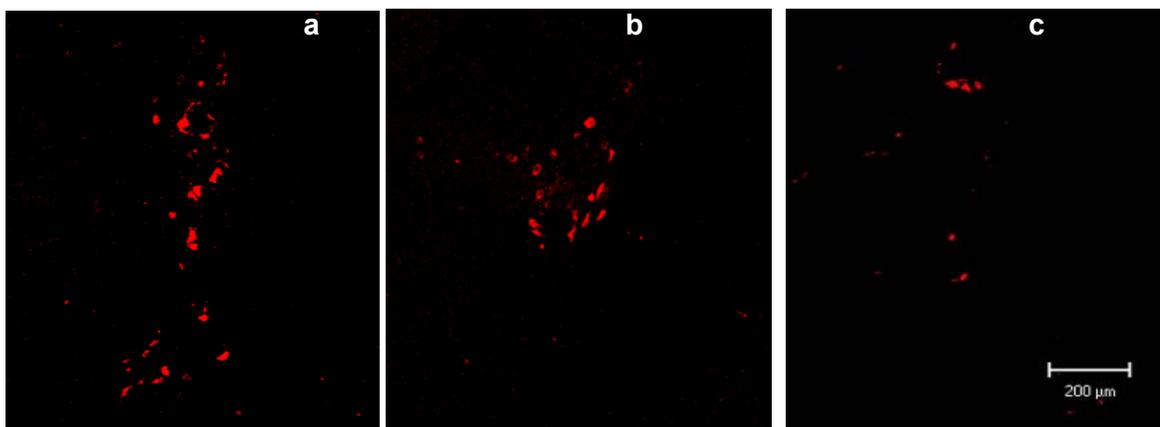


Figura 6: Células de núcleo rojo teñidas mediante marcaje retrógrado con Dextrán rodamina. a: glutatión más A91, b: A91; c: testigo.

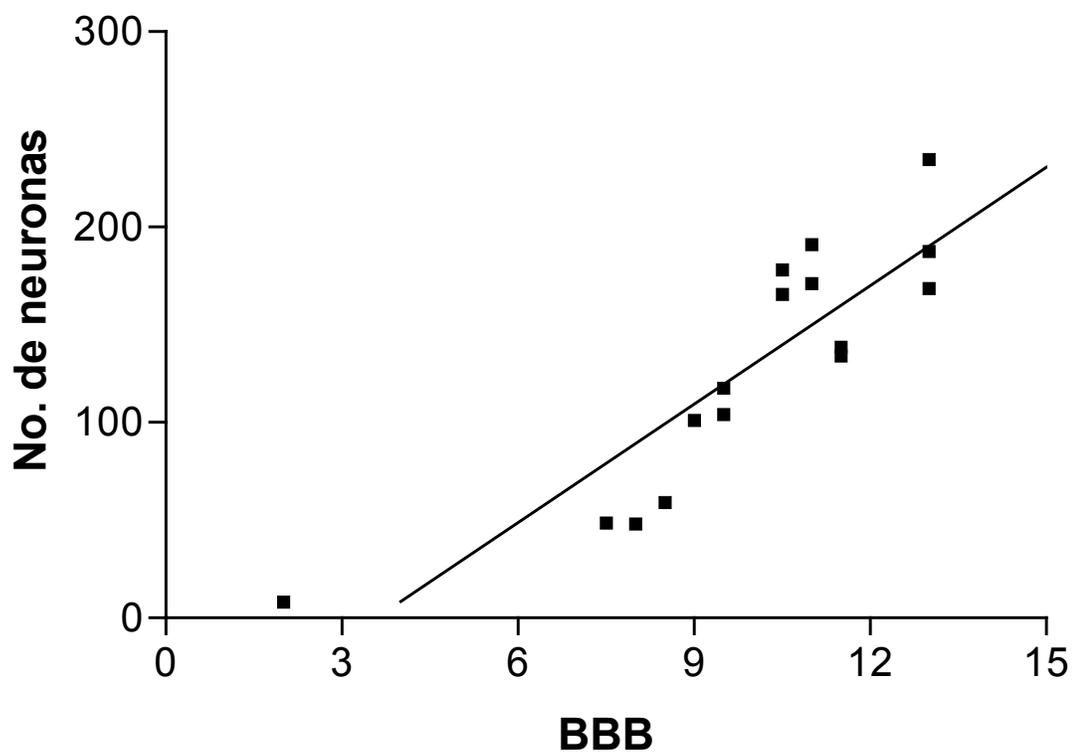


Figura 7: Correlación entre las calificaciones obtenidas en la escala BBB y el número de neuronas en el núcleo rojo. ( $r=0.76$ ;  $p < 0.0001$ )

Número de axones mielinizados en el epicentro de la lesión

En los animales tratados con la combinación se observó que el número de axones mielinizados en el epicentro de la lesión fue significativamente superior al presentado por los animales del grupo tratado con A91 y el testigo (Figuras 8 y 9).

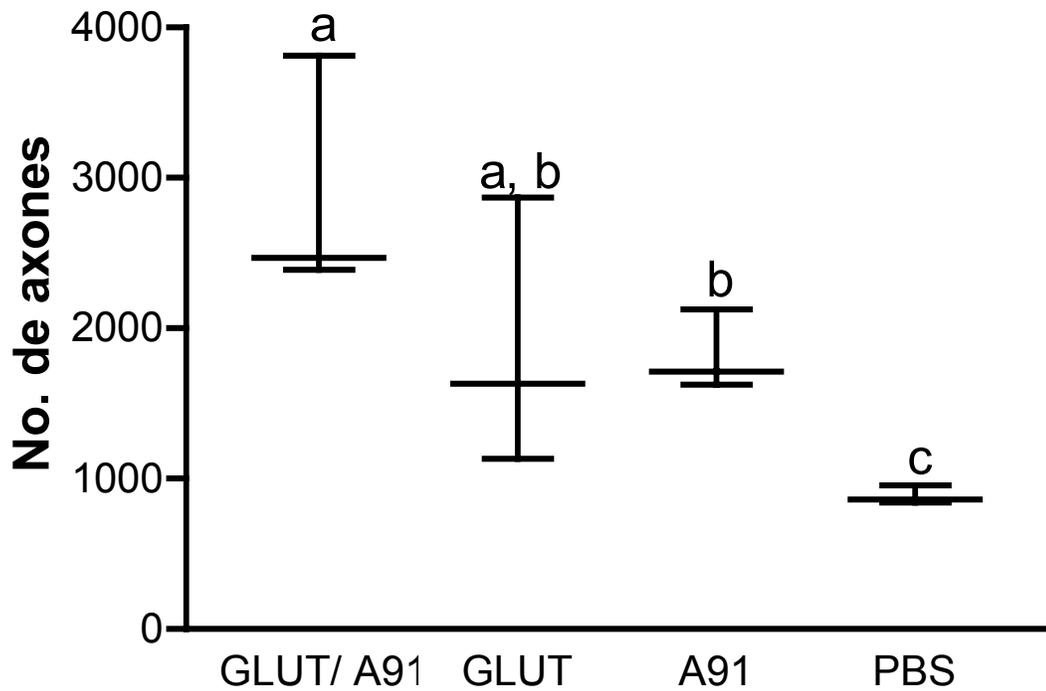


Figura 8: Número de axones mielinizados en el epicentro de la lesión. Donde <sup>a</sup> significativamente diferente de <sup>b</sup> ( $p=0.05$ , Kruskal Wallis seguida de la prueba U de Mann Whitney) y <sup>a</sup> significativamente diferente de <sup>c</sup> ( $p= 0.04$ )

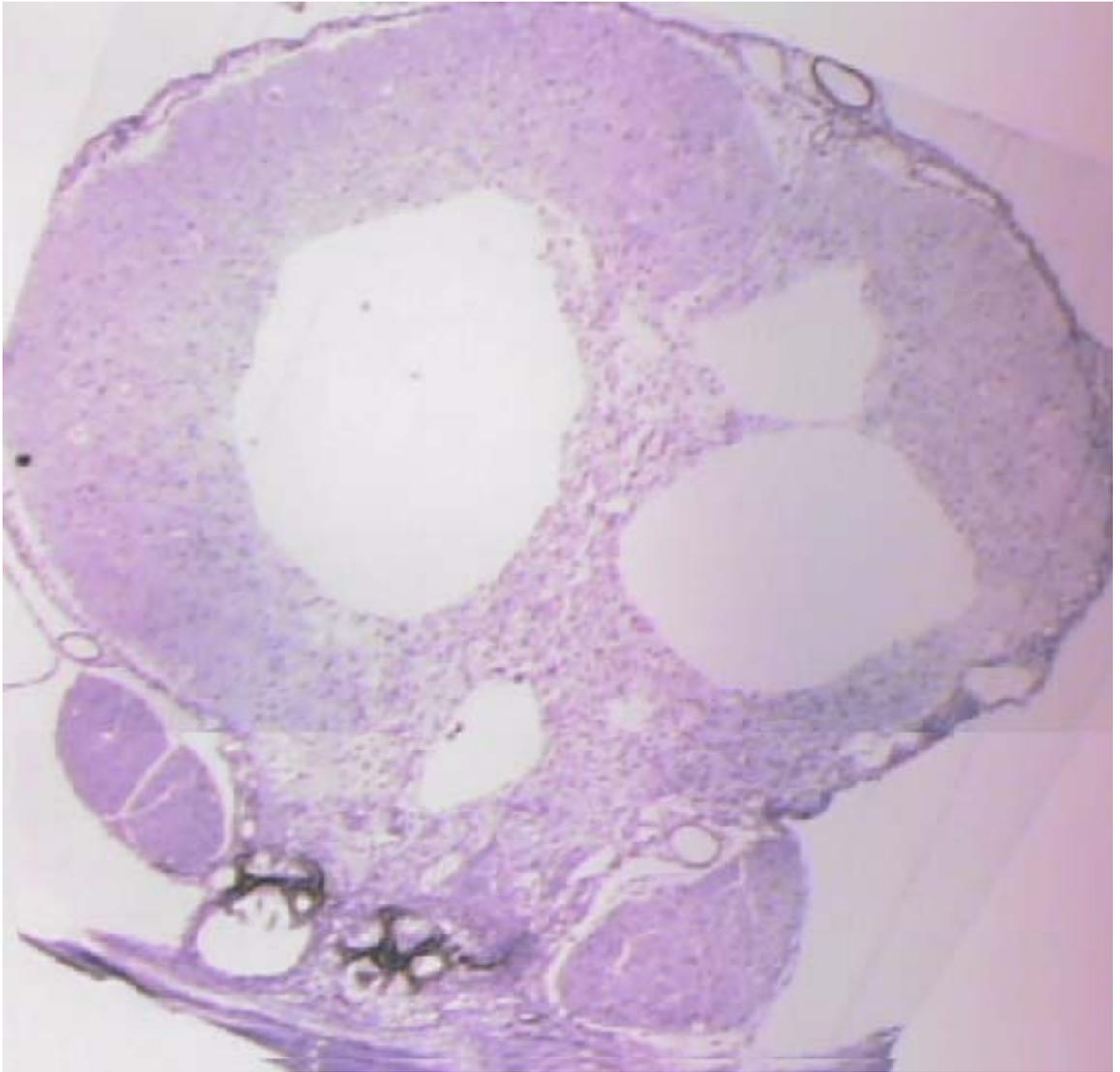


Figura 9: Micrografía panorámica (4x) representativa del epicentro de lesión.

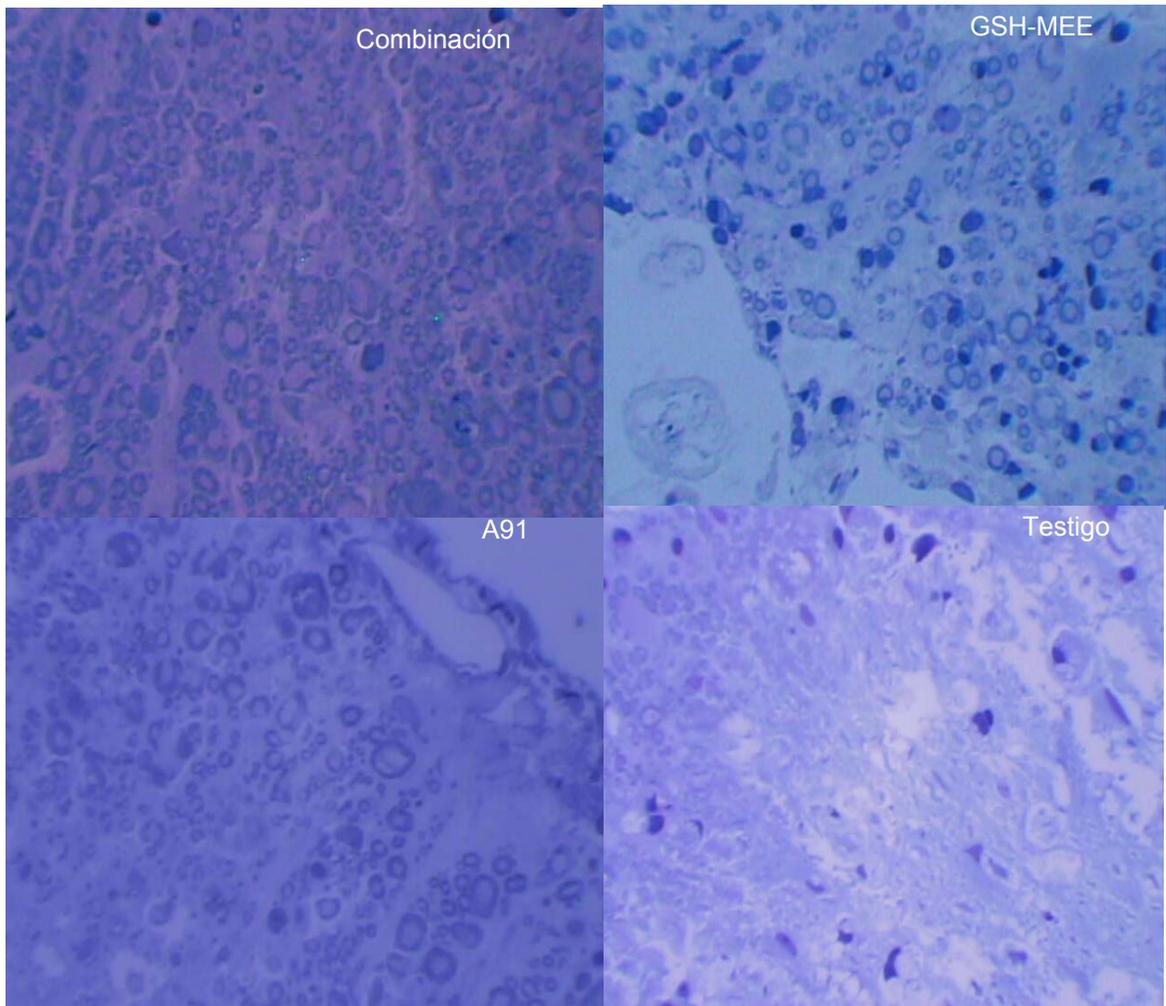


Figura 10: Micrografías de axones mielinizados en el epicentro de la lesión (40x).

PROLIFERACIÓN CELULAR.

En los estudios de proliferación celular se observó que las células obtenidas de animales tratados con la combinación presentaron una respuesta más intensa al ser estimuladas con A91, sin embargo dicha diferencia no fue estadísticamente significativa al compararse con la proliferación celular de los animales tratados con A91 (IP =  $2.8 \pm 0.3$ ) ( $p > 0.05$  ANOVA), pero si al testigo. (Cuadro 8).

Cuadro 9: Índices de proliferación de células de ganglios linfáticos inguinales de ratas con LTME, tratadas con dosis simple de A91

	A91 + Glu	A91	PBS
Antígeno	Indice de Proliferación	Indice de Proliferación	Indice de Prol.
Con A	$20.36 \pm 17.34$	$12.42 \pm 15.45$	$22.59 \pm 20.27$
Test neg	$1.00 \pm 0.00$	$1.00 \pm 0.00$	$1.00 \pm 0$
PBM	$0.85 \pm 0.29$	$1.09 \pm 0.08$	$0.35 \pm 0.26$
OVA	$1.06 \pm 0.24$	$1.09 \pm 0.13$	$1.54 \pm 0.53$
A91	$4.94 \pm 2.2^{(a)}$	$2.80 \pm 0.30^{(a)}$	$0.50 \pm 0.30$

Cultivos realizados a los 12 días después de la inmunización.  
Donde: <sup>a</sup> significativamente diferente ( $p < 0.05$  ANOVA)

## DESARROLLO DE EAE

De acuerdo con al escala de Fernández no se observó desarrollo de la enfermedad tanto en los animales tratados como en los pertenecientes al grupo testigo, obteniendo todos los animales calificaciones de cero a lo largo de todo el periodo de observación (datos no graficados) ( $p > 0.05$ ; ANOVA de medidas repetidas), así como tampoco hubo diferencia en pérdida/ganancia de peso (Figura 11).

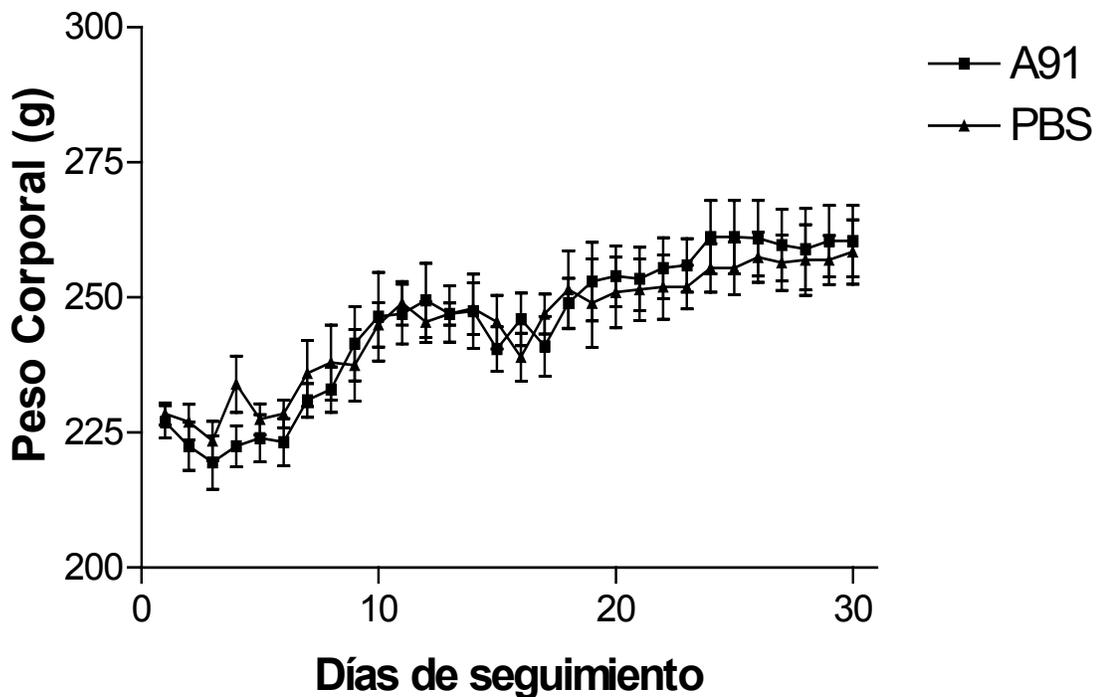


Figura 11: Pérdida/ Ganancia de peso corporal en ratas Lewis inmunizadas con una dosis de A91. ( $p > 0.05$ ; ANOVA de medidas repetidas).

**EXPERIMENTO 2: INMUNIZACIÓN CON DOS DOSIS DE A91 EN COMBINACIÓN CON GLUTATIÓN MONOETIL ESTER.**

En el Cuadro 10 se enlistan las calificaciones obtenidas en la evaluación BBB de cada animal, ordenados de acuerdo con el grupo correspondiente, así como la prueba morfométrica en que fueron empleados y el resultado obtenido

✠ **EVALUACIÓN CLÍNICA**

Evaluación motora mediante la prueba a campo abierto BBB

Al comparar las curvas obtenidas en cada tratamiento al final del estudio, no se observó diferencia significativa entre los diversos grupos (Figura 12)

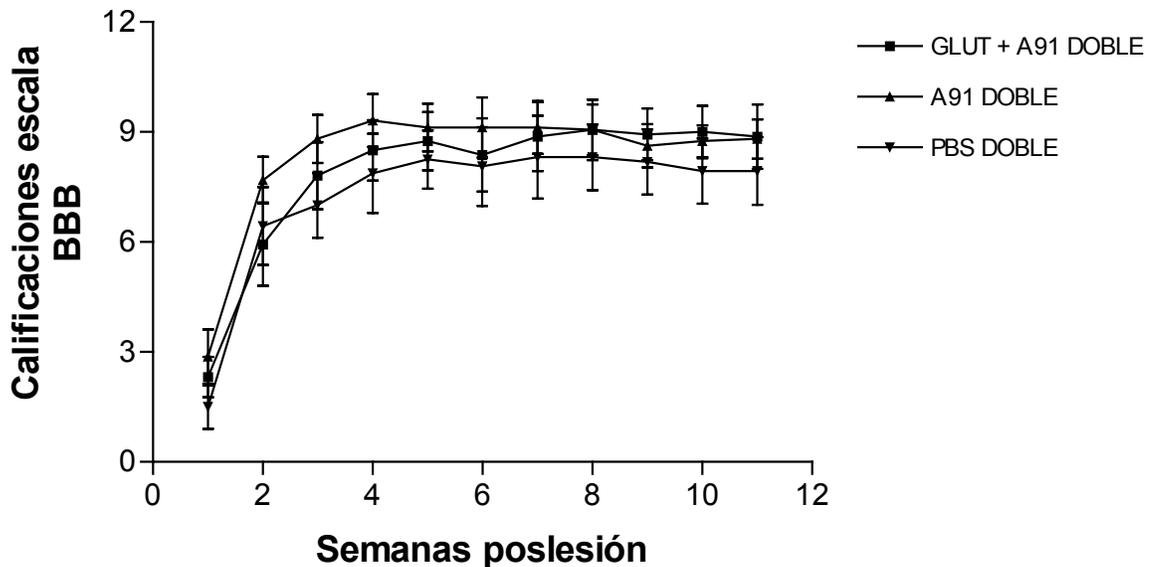


Figura 12: Evaluación motora mediante la prueba a campo abierto BBB. ( $p > 0.05$  ANOVA de medidas repetidas)

Cuadro 10: Identificación de animales empleados en cada prueba.

Tratamiento	Prueba	Rata	BBB	Evaluación
Combinación	Sobrevida de neuronas en núcleo rojo	5	9	136
		16	9	145
		68	11	249
	Ninguna	14	5	
		29	8	
		60	7	
		98	12.5	
		93	11	
		92	7.5	
	A91 doble	Sobrevida de neuronas en núcleo rojo	12	10.5
78			9	136
82			11.5	123
Ninguna		32	8	
		40	7.5	
		64	9	
		74	7.5	
		72	7.5	
Testigo	Sobrevida de neuronas en núcleo rojo	2	10	273
		63	8	39.5
		79	8	12
	Ninguna	20	4.5	
		9	7.5	
		15	11	
		24	10.5	
		73	4	
84	7.5			

### Capacidad para dar pasos

En la capacidad para dar pasos el grupo tratado con la combinación presentó un porcentaje mayor (33%) al observado en los animales doblemente inmunizados con A91 (25%) y los que recibieron solo PBS (22%) (Figura 13).

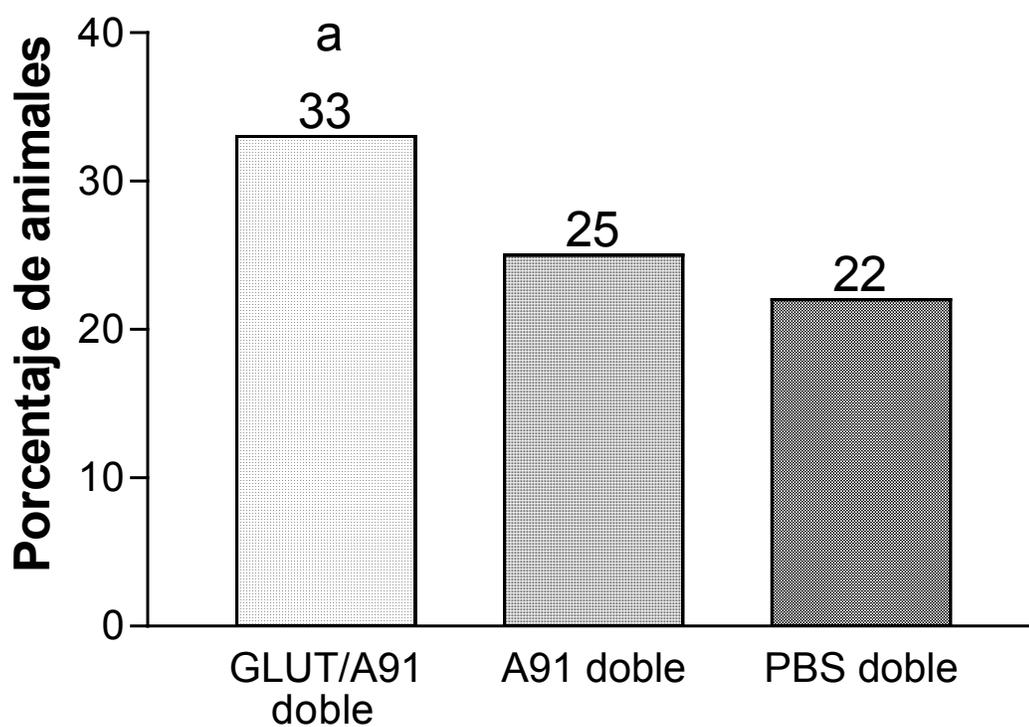


Figura 13: Capacidad para dar pasos. Donde: <sup>a</sup> significativamente diferente ( $p=0.05$ , prueba exacta de Fisher).

## EVALUACIÓN MORFOLÓGICA

### Sobrevida de neuronas motoras en el núcleo rojo:

En la evaluación del número de neuronas sobrevivientes después de la lesión, no se observó diferencia significativa entre los tres grupos estudiados (Figura 14). Sin embargo, si presentó una correlación significativa entre el número de neuronas sobrevivientes y las calificaciones obtenidas en la BBB (Figura 15)

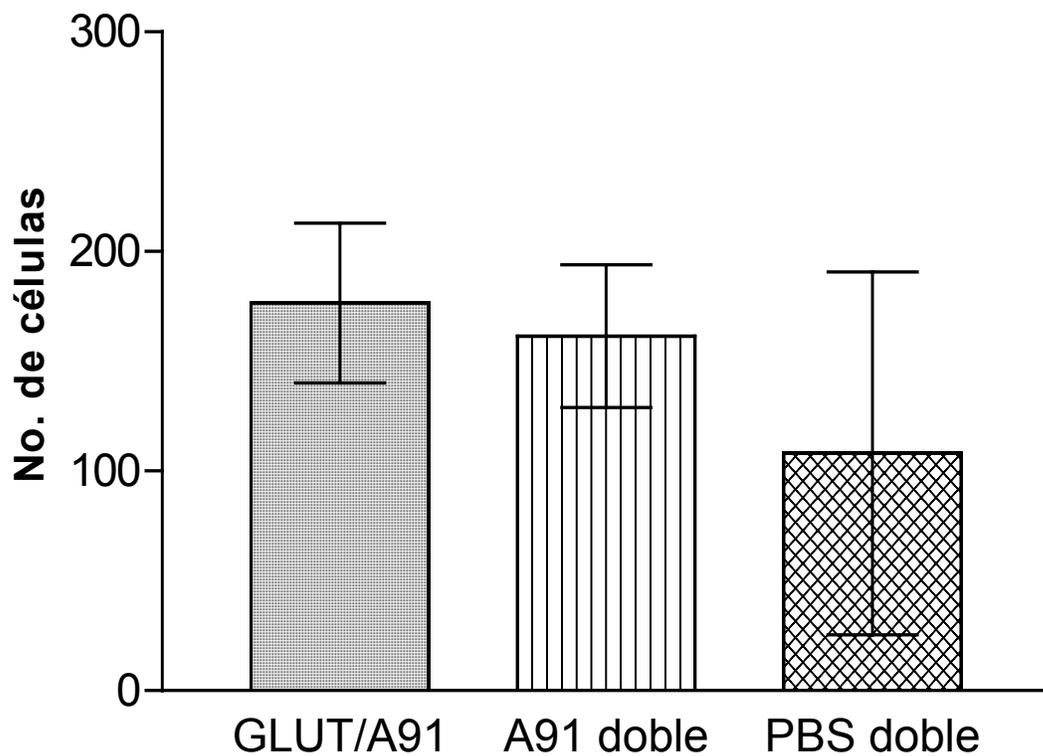


Figura 14: Sobrevida de neuronas motoras en el núcleo rojo. ( $p > 0.05$ ; ANOVA)

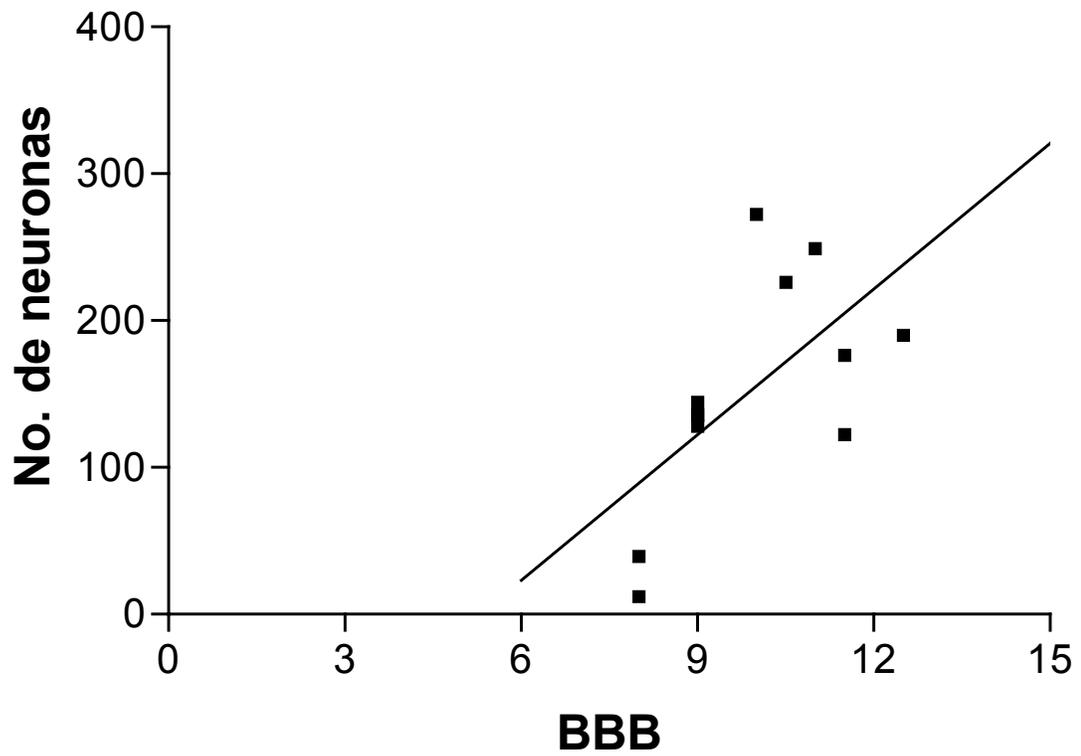


Figura 15: Coeficiente de correlación entre la calificación obtenida en BBB y el número de neuronas sobrevivientes en núcleo rojo. ( $r= 0.39$ ;  $p= 0.02$ )

**EXPERIMENTO TRES: COMPARACIÓN DEL EFECTO OBTENIDO MEDIANTE LA INMUNIZACIÓN CON UNA DOSIS DE A91 CONTRA EL OBTENIDO CON DOSIS REPETIDAS.**

Evaluación motora mediante la prueba a campo abierto BBB

Durante las primeras 2 semanas posteriores a la lesión, los animales tratados con la doble inmunización presentaron una recuperación motora muy similar a la observada en los animales con inmunización simple. Sin embargo después del día 21, los animales con doble inmunización se mantuvieron con valores similares a los presentados por el grupo testigo mientras que los inmunizados una sola vez incrementaron en forma significativa su capacidad de locomoción ( $p < 0.05$  ANOVA). Al final del seguimiento los animales tratados con inmunización simple presentaron una recuperación significativamente mayor a la de los otros grupos ( $p < 0.001$  ANOVA de medidas repetidas) (Figura 16).

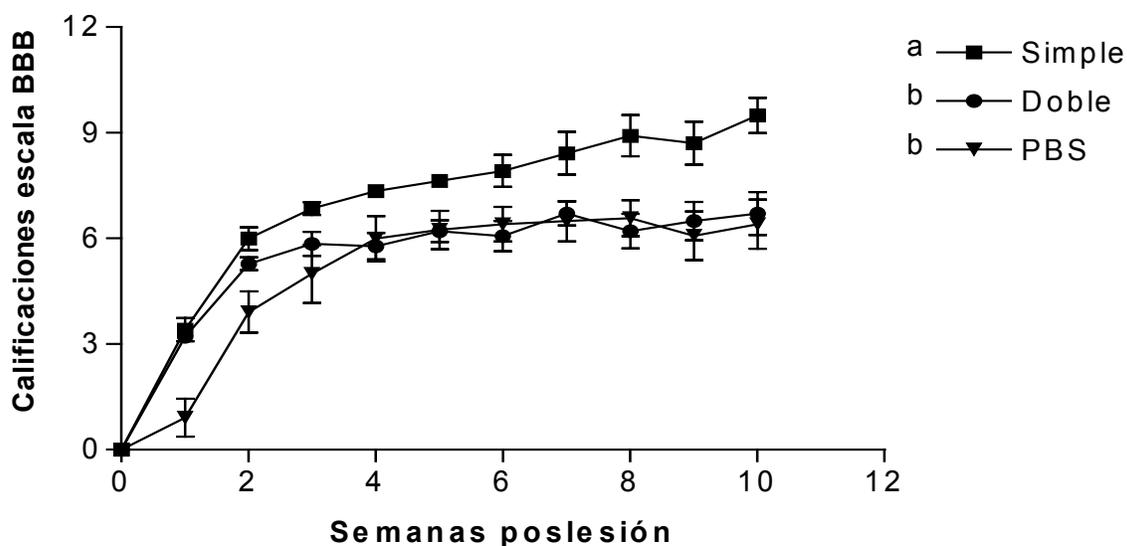


Figura16: Evaluación motora mediante la prueba a campo abierto BBB. Donde: <sup>a</sup> significativamente diferente de <sup>b</sup> ( $p < 0.001$  ANOVA de medidas repetidas)

Puesto que las condiciones para el segundo y tercer experimento fueron similares, se realizaron los estudios de proliferación celular en forma conjunta.

La doble inmunización disminuyó en forma significativa la proliferación de linfocitos T. Los animales tratados con doble inmunización más GSH-MEE, doble inmunización y los testigo (PBS en doble aplicación) presentaron valores similares ( $p > 0.05$  ANOVA) mientras que los linfocitos de animales tratados con inmunización simple presentaron un índice de proliferación significativamente superior ( $IP= 19.43 \pm 5.20$   $p<0.001$  ANOVA) (Cuadro 11).

Cuadro 11: Índices de proliferación de células de ganglios linfáticos inguinales de ratas con LTME, tratadas con dosis doble y simple de A91.

	A91 doble + GSH-MEE	A91 simple	A91 doble	PBS
Antígeno	Índice de Proliferación	Índice de Proliferación	Índice de Proliferación	Índice de Proliferación
Con A	$142.15 \pm 49.64$	$34.02 \pm 7.22$	$113.97 \pm 26.91$	$170.99 \pm 7.67$
PBM	$1.33 \pm 0.51$	$2.85 \pm 2.02$	$0.99 \pm 0.30$	$1.91 \pm 1.07$
OVA	$1.10 \pm 0.32$	$2.73 \pm 1.63$	$0.85 \pm 0.09$	$2.17 \pm 1.24$
A91	$1.72 \pm 0.92$	$19.43 \pm 5.20^{(a)}$	$0.94 \pm 0.01$	$1.60 \pm 0.85$

Cultivos realizados a los 18 días después de la inmunización. Donde: <sup>a</sup> significativamente diferente al resto de los grupos ( $p<0.001$ ; ANOVA).

## DESARROLLO DE EAE EN ANIMALES TRATADOS CON DOBLE INMUNIZACIÓN.

De acuerdo con la escala de Fernández no se observó desarrollo de la enfermedad tanto en los animales tratados como en los pertenecientes al grupo testigo, obteniendo todos los animales calificaciones de cero a lo largo del periodo de observación (datos no graficados) ( $p > 0.05$ ; ANOVA de medidas repetidas), así como tampoco hubo diferencia en pérdida/ganancia de peso (Figura 17).

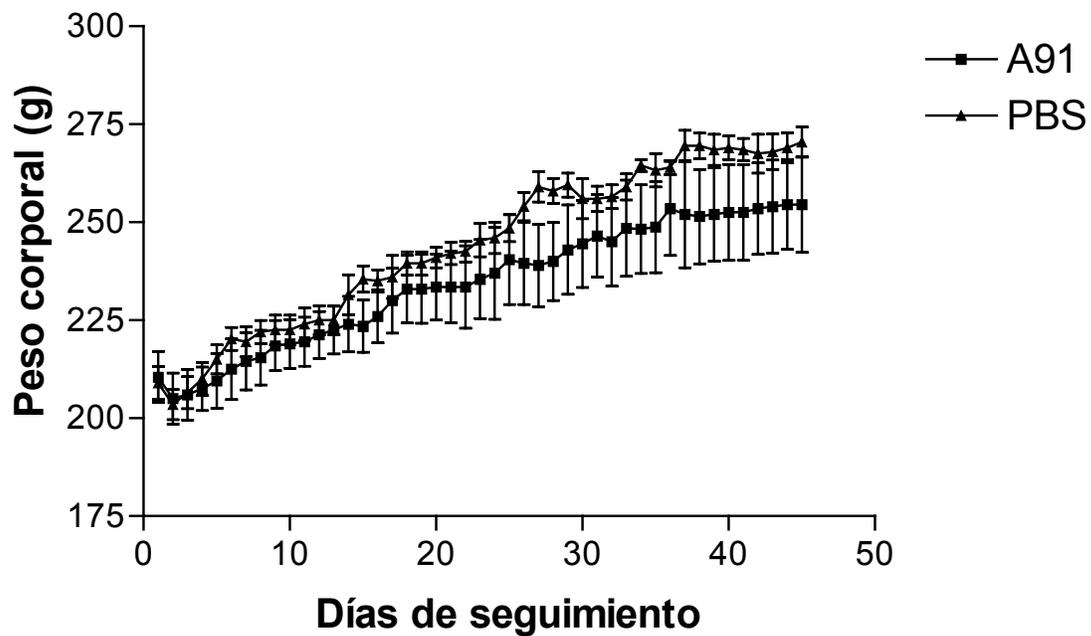


Figura 17: Pérdida/ Ganancia de peso corporal en ratas Lewis tratadas con dos inmunizaciones de A91. ( $p > 0.05$ ; ANOVA de medidas repetidas)

## DISCUSIÓN

En este trabajo se buscó demostrar que glutatión monoetil ester y la inmunización con dosis doble mejora el efecto neuroprotector obtenido por la inmunización con una sola dosis de A91 después de una lesión traumática en la médula espinal; así como comparar el efecto neuroprotector de la inmunización con el péptido A91, con el de la estrategia de combinación; comparar el efecto neuroprotector de la doble inmunización con el de una sola y comparar el efecto neuroprotector de una doble inmunización, con el de la combinación de doble inmunización más glutatión monoetil ester en individuos con lesión traumática en la médula espinal.

### **LA INMUNIZACIÓN DE A91 EN COMBINACIÓN CON GSH-MEE MEJORA EL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LOS TRATAMIENTOS INDIVIDUALES.**

Los resultados obtenidos en el primer experimento donde se compara el efecto de la inmunización con una dosis de A91 en combinación con GSH-MEE, contra los tratamientos aplicados de manera individual, muestran que la terapia de combinación generó una neuroprotección más temprana y efectiva comparada con la observada en los tratados por separado. Esto indica que se generó una complementación entre los 2 tratamientos. La respuesta autorreactiva protectora, en forma similar a toda respuesta inmune, comienza su actividad aproximadamente a partir del cuarto día tras la estimulación (Roitt, 2000a), tiempo durante el cual otros fenómenos deletéreos podrían originar una mayor destrucción del tejido neural, sin embargo con el uso conjunto de GSH-MEE, se aportó protección al tejido lesionado desde un principio. El efecto antioxidante de GSH-MEE ha sido ya reportado incluso en modelos de LTME. En estos casos este

compuesto ha originado una disminución significativa del fenómeno de lipoperoxidación (Santoscoy 2001) misma que correlacionó con una mejor recuperación motora (Guizar-Sahagún 2005). En el presente trabajo, la recuperación motora de los animales tratados con GSH-MEE (grupo tratado de manera individual o grupo tratado con la combinación) fue muy similar durante la primera semana de observación, misma que resultó aún mejor que la presentada por el grupo tratado solo con A91. Este efecto benéfico inicial fue sin duda proporcionado por el GSH-MEE el cual evitó la pérdida de axones y en consecuencia de neuronas por fenómenos ligados a la lipoperoxidación (Santoscoy, 2001). Sin embargo, después de este periodo, los animales tratados con la combinación incrementaron aún más su recuperación en comparación con el resto de los grupos. Dicho incremento se originó al mismo tiempo en que el grupo tratado sólo con A91 incrementó su capacidad motora, lo que nos sugiere el inicio del efecto benéfico inducido por la autorreactividad protectora, mismo que se manifestó más favorablemente en los animales tratados con la combinación, esto como resultado muy probablemente del efecto previo ejercido por el GSH-MEE.

Estos resultados nos sugieren que la autorreactividad protectora es un proceso que brinda neuroprotección, pero resulta necesario proteger al tejido de manera temprana, dando tiempo suficiente para que el sistema inmunológico pueda activarse y con ello logre ejercer el efecto deseado. Con el uso de GSH-MEE, se logró brindar esta protección temprana. Sin embargo, además de este efecto, debemos tomar en consideración la acción directa que este compuesto tiene sobre el sistema inmunológico. Ya en apartados previos se mencionó el efecto inmunoestimulante que posee el GSH-MEE, mismo que se ve reflejado en

la tendencia que presentaron las células de animales tratados con la combinación para proliferar contra el péptido A-91 en mayor medida que las células del resto de los animales. De esta manera, la mejor neuroprotección observada en los animales tratados con la combinación se puede atribuir al efecto antioxidante del GSH-MEE y a la acción de la respuesta anti-A91 (autorreactividad protectora) misma que se vio potenciada por el efecto inmunoestimulante de GSH-MEE.

Uno de los principales hallazgos de este trabajo es que un mayor porcentaje de los animales que recibieron la combinación, mostraron capacidad para dar pasos ( $BBB \geq 10$ ). Esta es una ventaja importante con respecto a los otros tratamientos en los que el individuo gana movilidad y fuerza para sostener el tren posterior pero en muy pocos casos gana capacidad para desplazarse en cuadripedestación. La ausencia de este tipo de desplazamiento es una limitante que impide el desarrollo de las funciones básicas del individuo. Los animales tratados con la combinación presentaron una mayor sobrevida de neuronas en núcleo rojo (vía relacionada con la motilidad), y una mayor cantidad de axones mielinizados en el epicentro de la lesión. Estos 2 factores pueden ser la razón por la que estos animales presentaron una mayor capacidad para dar pasos. Una mejor mielinización axonal representa la posibilidad para transmitir en forma más eficiente el estímulo eléctrico a través de las fibras neurales (Ibarra y cols. 2003), mientras mayor cantidad de mielina envuelve a la fibra la transmisión del estímulo es más rápida (Williams y Chalupa; 1983). Por otra parte, la sobrevida de neuronas relacionadas con vías motoras es también parte importante para una mejor recuperación. Los impulsos motores importantes de diversos orígenes se dirigen al núcleo rojo, donde hacen relevo en su camino hacia las neuronas

motoras bajas por medio de conexiones rubrorreticulares y rubroespinales (Paxinos, 2004); de aquí la importancia de las neuronas rubroespinales en la recuperación motora.

Vale la pena mencionar que en estudios de neuroprotección los hallazgos morfológicos no siempre correlacionan con los hallazgos clínicos (Jakeman, 1998; Rabchevsky, 2000); sin embargo, en el presente trabajo los hallazgos morfológicos tuvieron una importante correlación con los clínicos.

#### **LA DOBLE INMUNIZACIÓN CON A91 INHIBE LA NEUROPROTECCIÓN.**

Observando los resultados obtenidos en este primer experimento, se planteó una siguiente pregunta: ¿Será más efectiva la neuroprotección si se realizan dos aplicaciones de A91 para potenciar aún más la actividad de la autorreactividad protectora? Esto, tomando en cuenta que una característica de la respuesta inmune específica es la memoria, y que cuando se reinmuniza con un antígeno la respuesta es más rápida, más específica y por lo tanto más eficiente. Así se procedió a realizar el segundo experimento en el que se aplicaron dos dosis de A91 en combinación con GSH-MEE. En este caso los resultados no fueron los esperados ya que la doble inmunización anuló el efecto positivo de la autorreactividad protectora, aún en los animales tratados con la doble inmunización más GSH-MEE. Este resultado negativo inducido por la doble inmunización se comprobó en el tercer experimento. Para explicar este resultado inicialmente se pensó que la doble inmunización había cambiado la especificidad de los linfocitos T dirigiéndolos hacia el reconocimiento de un péptido agonista y no al de un agonista parcial, cambiando entonces su activación hacia un fenotipo Th1, lo que ocasionaría un efecto deletéreo. Se sabe que después de un primer

encuentro con el antígeno, la afinidad del TCR por el determinante antigénico se incrementa como consecuencia de la mutación somática que experimenta la clona de linfocitos T para mejorar el reconocimiento antigénico (Abbas, 2004). Dicho incremento en la afinidad puede estar aumentando la intensidad de las señales al interior de la célula provocando con esto la activación del linfocito hacia el fenotipo Th1. Como se comentó en los antecedentes, el A91 es un péptido modificado derivado de la MBP, que actúa como agonista parcial, un agonista parcial envía señales al interior de la célula T cualitativa y cuantitativamente diferentes a las inducidas por un agonista. Por ejemplo, las señales de un ligando agonista en timocitos doble positivos induce apoptosis, mientras que las señales de un ligando agonista parcial a la misma célula induce selección positiva y diferenciación (Xi y Kersh; 2003). Los ligandos agonistas parciales presentan una falla en la fosforilación de la cadena  $\zeta$ , seguida por una falta de activación de ZAP 70, débil cantidad de calcio ionizado intracelular, pobre movilización de ERK, y bajos niveles de activación de c-Jun cinasa (JNK); estos cambios en la señalización del TCR son generalmente insuficientes para sostener la producción de IL-2, lo que nos lleva a que la célula entre en un estado de anergia, o bien a una activación con fenotipo Th2 (Nel y Slaughter; 2002).

Al cambiar la afinidad y con ello la señalización hacia el interior de la célula se podría activar al linfocito T hacia un fenotipo Th1 que como ya se ha mencionado intensifica la respuesta inflamatoria y originaria daño al tejido neural como sucede en la EAE.

En el presente trabajo, al inmunizar animales susceptibles a desarrollar EAE, tanto con dosis simples como dobles, no se demostró el desarrollo de dicha

enfermedad, por lo que se descartó una posible conversión de los linfocitos T hacia un fenotipo destructor.

La otra posibilidad para explicar la falta de protección en los animales doblemente inmunizados es la anergia o bien la delección clonal por agotamiento de la clona secundario a una sobrestimulación con el mismo antígeno (Roitt 2000, Abbas, 2004). En ninguno de los dos casos nos sería posible ofrecer neuroprotección. Para comprobar esta posibilidad se realizaron también estudios de proliferación de linfocitos T y se demostró que en los animales con doble inmunización se inhibió la proliferación contra A91 lo que sugiere la eliminación o pérdida de la función de la clona contra A91. Se requerirán otros estudios para poder determinar cual de las 2 posibilidades es la causante de la inhibición del efecto neuroprotector de A91.

La aportación principal de este trabajo es que proporciona evidencia del efecto positivo de la combinación de GSH-MEE más una inmunización con A91 y del efecto negativo de la doble inmunización con el mismo péptido sobre la recuperación motora, la preservación de axones mielinizados en el epicentro de la lesión y la sobrevivencia de neuronas en el núcleo rojo después de una LTME, en ratas Sprague Dawley. Se requerirá de estudios posteriores para conocer mejor los mecanismos que originaron estos resultados.

## CONCLUSIONES

1. Se demostró el efecto neuroprotector de A91 y de glutatión monoetil ester, así como un efecto sinérgico cuando se aplican en combinación.
2. La doble inmunización inhibió el efecto neuroprotector de A91, probablemente a causa de delección o bien de anergia clonal.
3. El péptido A91 no es encefalitogénico, ya que su aplicación en dosis tanto simple como doble no generó encefalomiелitis alérgica experimental en ratas susceptibles a la enfermedad.

## **PERSPECTIVAS**

1. Determinar la ventana terapéutica en que la aplicación del tratamiento de combinación será efectivo para proporcionar neuroprotección.
2. Analizar los posibles efectos secundarios que genere el tratamiento con la combinación.
3. Demostrar si la inmunización con A91 favorece los mecanismos de regeneración en el tejido dañado.
4. Demostrar si la combinación de GSH-MEE más A91 favorece e incrementa los mecanismos de regeneración en el tejido dañado.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Schwab ME and Bartholdi D. (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol. Rev.*, 76, 319–370
2. Go BK, Devivo MJ, Richards JS. (1995). The epidemiology of spinal cord injury., in: *Spinal cord injury: clinical outcomes from the model systems*. Strover S.I., De Lisa J.A., and Whiteneck G.C. (eds), Gartherburg: Aspen Publishers
3. Romero. F. G. M. C. (1991). Procedimientos Quirúrgicos empleados en el Tratamiento de la Columna Vertebral Traumática. Tesis de Posgrado Fac. de Medicina, U.N.A.M. México. 1991.
4. Balentine J.D. (1983) Calcium toxicity as a factor in spinal cord injury. *Surv Synth Path Res.*; 2: 184-193.
5. Bedbrook GM. (1987) The development and care of spinal cord paralysis (1918-1986). *Paraplegia*;25: 172-184.
6. Stover SL, Fine PR. (1987) The epidemiology and economics of spinal cord injury. *Paraplegia*;25: 225-228
7. Kidd P. (1997) Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative Medicine Review*, 2: 155-176.
8. Santoscoy, C., et al. (2002) Lipid peroxidation by nitric oxide supplements after spinal cord injury: effect of antioxidants in rats. *Neurosci. Lett.* ; 330: 94-98.
9. Hauben E, Agranov E, Gothilf A, Nevo U, Cohen A, Smirnov I, Steinman L, and Schwartz M. (2001) Posttraumatic therapeutic vaccination with modified

- myelin self-antigen prevents complete paralysis while avoiding autoimmune disease. *J Clin Invest*; 108: 591-599.
10. Snell S.R. (2000). *Anatomía clínica* 6ª ed. Edt. Mc-Graw-Hill Interamericana 897pp .
  11. Decroor Jack. (1993). *Neuroanatomía Correlativa*. 9a ed. Ed. Manual Moderno. México.
  12. López Antunes Luis. (1980). *Anatomía Funcional del Sistema Nervioso*. Ed. LIMUSA.
  13. Stephen Waltwer Ranson. (1963). *Anatomía del sistema nervioso*. Ed. Interamericana. México.
  14. Letarjet M., Ruiz Liard A. (1999). *Anatomía Humana*. Ed. Panamericana. México.
  15. Alvarez del Villar Jose. (1988). *Anatomía Comparada Básica*. Ed. Trillas. México.
  16. Romer- Parson. (1991). *Anatomía Comparada*. 5a ed. Ed. Interamericana. México.
  17. Bloom-Fawcett. (1995). *Tratado de Histología* 12a ed. Edt. Interamericana-Mc-Graw-Hill. México.
  18. Leeson, Leeson. Paparo. (1990). *Texto Atlas de Histología*. Nueva Editorial Interamericana. México.
  19. Ganong , W. F. (1992). *Fisiología Médica*. 13a. Edición. Ed. Manual Moderno. México.
  20. Hulsebosch, C.E. (2002) Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv. Physiol. Educ.* 26, 238–255

21. Sandler, A.N. and Tator, C.H. (1976) Review of the effect of spinal cord trauma on the vessels and blood flow in the spinal cord. *J. Neurosurg.*45, 638–646
22. Tator C. H and Sandler A N. (1976) Effect of acute spinal cord compression injury on regional spinal cord blood flow in primates. *J.Neurosurg.* 45 (6):660-676
23. Koberne, A.I. (1975) The neuronal theory of experimental traumatic spinal cord dysfunction. *Surg. Neurol.* 3, 261–264
24. Ropper A. H, Gorson K. C., Ropper, Weinberg D. H, and Weinstein R. (2001) Treatment experience in patients with anti-myelin-associated glycoprotein neuropathy. *Muscle Nerve* 24 (6):778-786.
25. Young W (2002). Spinal cord contusion models. *Prog Brain Res.* 137:231-55.
26. Koyanagi I, Iwasaki Y, Isu T, Abe H, Akino M, and Kuroda S. (1993) Spinal cord evoked potential monitoring after spinal cord stimulation during surgery of spinal cord tumors. *Neurosurgery* 33 (3):451-459, 1993.
27. De la Torre J. C. (1981) Spinal cord injury. Review of basic and applied research. *Spine* 6 (4):315-335.
28. Guha A , Tator CH (1988) Acute cardiovascular effects of experimental spinal cord injury. *J.Trauma* 28 (4):481-490.
29. Bach-y-Rita, P. and Illis, L.S. (1993) Spinal shock: possible role of receptor plasticity and non synaptic transmission. *Paraplegia* 31, 82–87
30. Cotran RS, Mayadas-Norton T. (1999). Endothelial adhesion molecules in health and disease. *Pathol Biol (Paris)*. Mar;46(3):164-70.

31. Tator, C.H. (1995) Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol.* 5, 407–413
32. Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH. (1999) Acute inflammatory responses to mechanical lesion in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 11: 3648-3658.
33. Guth L, Zhang Z, Steward O. (1999) The unique histopathological responses of the injured spinal cord. Implications for neuroprotection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 890: 366-384.
34. Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dosset L. (1998) Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp. Neurol.* 151: 77-88.
35. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. (2001) *Bioquímica de Harper*. 15a. Edición, Ed. Manual Moderno, México.
36. Panter SS, Yum SW, Faden AL. (1990) Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. *Ann Neurol*; 27: 96-99.
37. Choi DW. (1996) Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr.Opin.Neurobiol.* 6 (5):667-672.
38. Doble A. (1999) The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol.Ther.* 81 (3):163-221
39. McDonald PP, Bald A, Casstella MA. (1997) Activation of NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* 89: 3421-3433.

40. Puchalski RB, Louis JC, Brose N, Traynelis SF, Egebjerg J, Kukekov V, Wenthold RJ, Rogers SW, Lin F, Moran T. (1994) Selective RNA editing and subunit assembly of native glutamate receptors. *Neuron* 13 (1):131-147.
41. Mattson MP, Rychlik B, You JS, Siskin JE. Sensitivity of cultured human embryonic cerebral cortical neurons to excitatory amino acid-induced calcium influx and neurotoxicity. *Brain Res.* 542 (1):97-106, 1991.
42. Matute C, Alberdi E, Domercq M, Pérez-Cerdá P, Pérez-Samartín A, Sánchez-Gómez V. (2001) The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *TRENDS in Neurosciences* 24: 224-230.
43. Bethea, J.R. and Dietrich, W.D. (2002) Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. *Curr. Opin. Neurol.* 15, 355–360
44. Taoka, Y. and Okajima, K. (1998) Spinal cord injury in the rat. *Prog. Neurobiol.* 56, 341–358
45. Anthes DL, Theriault E, and Tator CH. (1995) Characterization of axonal ultrastructural pathology following experimental spinal cord compression injury. *Brain Res.* 702 (1-2):1-16.
46. David S. (2002). Recruiting the immune response to promote long distance axon regeneration after spinal cord injury. *Prog Brain Res*;137:407-14.
47. G. Guizar-Sahagun, I. Grijalva, I. Madrazo, R. Franco-Bourland, H. Salgado-Ceballos, A. Ibarra, and J. Larriba-Shad. Neuroprotection of completely lacerated spinal cord of adult rats by homotopic and heterotopic transplantation. *Restor Neurol Neurosci* 7:61-70, 1994.

48. Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E. (1998) Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 4, 814-821.
49. Niles LP, Armstrong KJ, Rincon Castro LM, Dao CV, Sharma R, McMillan CR, Doering LC, Kirkham DL.( 2004) Neural stem cells express melatonin receptors and neurotrophic factors: colocalization of the MT1 receptor with neuronal and glial markers. *BMC.Neurosci.* 5 (1):41.
50. Rabchevsky AG, Fugaccia I, Sullivan PG, Blades DA, Scheff SW.( 2002) Efficacy of methylprednisolone therapy for the injured rat spinal cord. *J.Neurosci.Res.* 68 (1):7-18.
51. Xu ZP, Saunders GF. (1998). PAX6 intronic sequence targets expression to the spinal cord. *Dev Genet*;23(4):259-63.
52. Díaz-Ruiz A, Rios C, Duarte I, Correa D, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I, Ibarra A. (2000) Lipid peroxidation inhibition in spinal cord injury: cyclosporin-A vs methylprednisolone. *Neuroreport* 11 (8):1765-1767
53. Limbourg FP, Huang Z, Plumier JC, Simoncini T, Fujioka M, Tuckermann J, Schutz G, Moskowitz MA, Liao JK. (2002) Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids. *J.Clin.Invest* 110 (11):1729-1738.
54. Amar AP, Levy M. L. (1999)Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 44 (5):1027-1039.

55. Goodman GA. (1990) The pharmacological basis of the therapeutics. McGraw-Hill, New York.
56. Bracken MB, Holford TR. (1993) Effect of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NACIS 2 J. Neurosurg; 79:500-507.
57. Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Katoh K, Niwa M, Tsutsumishita Y, Fukuzawa K. (1996) Effects of exogenous transforming growth factor beta-1 on spinal cord injury in rats. Neurosci. Lett. 203: 97-100.
58. Neufeld AH, Sawada A, Becker B. (1999) Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96 (17):9944-9948.
59. Sharma HS, Badgaiyan RD, Alm P, Mohanty S, Wiklund L (2005) Neuroprotective effects of nitric oxide synthase inhibitors in spinal cord injury-induced pathophysiology and motor functions: an experimental study in the rat. Ann N Y Acad Sci. Aug;1053:422-34
60. Bolanos JP, Almeida A. (1999) Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. Biochem Biophys Acta. 5; 1411(2-3):415-436
61. Carroll RT, Galatsis P, Borosky S, Kopec KK, Kumar V, Althaus JS et al. (2000) 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration. Chem Res Toxicol 13:294–300.
62. Hall ED, Kupina NC, Althaus JS. (1999) Peroxynitrite scavengers for the acute treatment of traumatic brain injury. Ann NY Acad Sci 890: 462–468.

63. Chabrier PE, Auguet M, Spinnewyn B, Auvin S, Cornet S, Demerle-Pallardy C et al. (1999) BN 80933, a dual inhibitor of neuronal nitric oxide synthase and lipid peroxidation: a promising neuroprotective strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10824–10829.
64. Fujimoto T, Nakamura T, Ikeda T, Taoka Y, Takagi K. (2000) Effects of EPC-K1 on lipid peroxidation in experimental cord injury. *Spine*. 25(1):24-29.
65. Bozbuga M, Izgi N, Canbolat A. (1998) The effects of chronic alpha-tocopherol administration on lipid peroxidation in an experimental model of acute spinal cord injury. *Neurosurg Rev.*; 21(1):36-42.
66. Katoh D, Ikata T, Katoh S, Hamada Y, Fukuzawa K. (1996) Effect of dietary vitamin C on compression injury of the spinal cord in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid and its correlation with that of vitamin E. *Spinal Cord*. 1996 Apr;34(4):234-8
67. Hall ED, Springer JE. (2004) Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx*; 1(1):80-100.
68. McAdoo DJ, Robak G, Xu GY, Hughes MG. (2000) Adenosine release upon spinal cord injury. *Brain Res.*; 854(1-2):152-157.
69. Li S, Tator CH. (2000) Action of locally administered NMDA and AMPA/Kainate receptor antagonists in spinal cord injury. *Neurol Res.*; 22(2): 171-180.
70. Ikonomidou C, Stefovskaja V, Turski L. (2000) Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 7; 97(23):12885-90.

71. Turski L, Huth A, Sheardown M, McDonald F, Neuhaus R, Schneider HH, Dirnagl U, Wiegand F, Jacobsen P, Ottow E. (1998) ZK200775: a phosphonate quinoxalinedione AMPA antagonist for neuroprotection in stroke and trauma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 (18):10960-10965.
72. Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Dupont H, Widmann C, Lazdunski M. (2000) Prevention of ischemic spinal cord injury: comparative effect of magnesium sulfate and riluzole. *J.Vasc Surg.*; 32(1):179-189
73. Teng D, Choi H, Onario RC, Zhu S, Desilets FC, Lan S, Woodard EJ, Snyder EY, Eichler ME, Friedlander RM. Minocycline inhibits contusion-triggered mitochondrial cytochrome c release and mitigates functional deficits after spinal cord injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101 (9):3071-3076, 2004.
74. Feden AI, Salzman S. Pharmacological strategies in CNS trauma. *TIPS*. 1992; 13:29-35.
75. Zeman RJ, FengY, PengH, Etlinger JD. Clenbuterol, a 2-Adrenoceptor agonist, improves locomotor and histological outcomes after spinal cord contusion in rats. *Exp. Neurol*. 1999; 159:267-273.
76. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz T, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LO, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M. (2003) Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (11):6741-6746.

77. Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C, Di Giulio A, Vardar E, Cerami A, Brines M. (2002) Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. PNAS; 99 (14): 9450–9455.
78. Digicaylioglu M, Garden G, Timberlake S, Fletcher L, Lipton SA. (2004) Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 101 (26):9855-9860.
79. Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. (1999) Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. Nat. Med. 5: 49-55
80. Hauben E et al. (2000) Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. J. Neurosci.; 20: 6421–6430
81. Kipnis J, Yoles E, Porat Z, Cohen A, Mor F, Sela M, Cohen IR, Schwartz M. (2000) T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 97 (13):7446-7451.
82. Roitt I. (2000<sup>a</sup>) Inmunología fundamentos. 9a edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
83. Bellanti JA (1994) Inmunología. 3<sup>a</sup> edición. Ed. Interamericana. México, D.F.
84. Roitt I. (2000<sup>b</sup>) Inmunología. 5a edición. Ed. Harcourt. Madrid.

85. Allan SM, Rottwell NJ, (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 734-744.
86. Yan P, Li Q, Kim GM, Xu J, Hsu CY, Xu XM. (2001) Cellular localization of tumor necrosis factor-alpha following acute spinal cord injury in adult rats. *J. Neurotrauma* 18: 563-568.
87. Pan JZ, Ni L, Sodhi A, Aguanno A, Young W, Hart RP. (2002) Cytokine activity contributes to induction of inflammatory cytokines mRNAs in spinal cord followin contusion. *J. Neurosci. Res.* 68: 315-322.
88. Klusman I, Schwab ME, (1997) Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res.* 762: 173-184.
89. Tyor WR, Avgertopoulos N, Ohlandt G, Hogan EL. (2002) Treatment of spinal cord impact injury in the rat with transforming growth factor-beta. *J. Neurl. Sci* 200: 33-41.
90. Popovich PG, Jones TB. (2003) Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spianl cord: back to basics. *Trens Pharmacol. Sci.* 24: 13-17.
91. Pan W, Kastin AJ, Bell RL, Olson RD. (1999) Upregulation of tumor necrosis factor alpha transport across the blood-brain barrier after acute compressive spinal cord injury. *J. Neurosci.* 19: 3649-3655.
92. Pan W, Kastin.AJ. (2001) Increase in TNF-alpha transporter after SCI is specific for time, region and type of lesion. *Exp. Neurol.* 170: 357-363.
93. Bethea JR, Castro M, Keane RW, Lee TT, Dietrich WD, Yesierski RP. (1998) Truamtic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation. *J. Neurosci.* 18: 3251-3260.

94. Kim GM, Xu J, Song SK, Yan P, Ku G, Xu XM, Hsu XM. (2001) Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* 21: 6617-6625.
95. Semple-Rowland SL, Mahatme A, Popovich PG, Green DA, Hassler Jr. G, Stokes BT, Streit WJ. (1995) Analysis of TGF-beta 1 gene expression in contused rat spinal cord using quantitative RT-PCR. *J. Neurotrauma* 12; 1003-1014.
96. Kitamura M. (1997) Identification of an inhibitor targeting macrophage production of monocyte chemoattract protein-1 as TGF-beta 1. *J. Immunol.* 159: 1404-1411.
97. Lee YL, Shih ML, Bao P, Ghirnikar RS, Eng LF. (2000) Cytokine chemokine expression in contused rat spinal cord. *Neurochem. Int.* 36: 417-425.
98. McTigue DM, Tani M, Krivacic K, Chernosky A, Kelner GS, Maciejewski D, Maki R, Ransohoff RM, Stokes BT. (1998) *J. Neurosci. Res.* 53: 368-376.
99. Tonai T, Shiba K, Taketani Y, Ohmoto Y, Murata K, Maraguchi M, Ohsaki H, Takeda E, Nishisho T. (2001) A neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) reduces neurologic damage after spinal cord injury in rats. *J. Neurochem.* 78: 1064-1072.
100. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, Nauro M, Okabe H, Takatsuki K. (1997) Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 79: 1177-1182.

101. McDonald PP, Bald A, Casstella MA. (1997) Activation of NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* 89: 3421-3433.
102. Cassatella MA. (1995). The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today* 16: 21-26.
103. Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE, Silver J. (1999) Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation induced secondary injury after CNS trauma. *J. Neurosci.* 19: 8182-8198.
104. Dusart I, Schwab ME. (1994) Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 6: 712-724.
105. Schwab JM, Frei E, Klusman I, Schnell L, Schuab ME, Schluesener HJ. (2001) AIF-1 expression defines a proliferating and alert microglial/macrophage phenotype following spinal cord injury in rats. *J. Neuroimmunol.* 119: 214-222.
106. Tanaka S, Koinke T. (2002) Selective inflammatory stimulations enhance release of microglial response factor (MRF)-1 from cultured microglia. *Glia* 40: 360-371.
107. Koshinaga M, Whittemore SR. (1995) The temporal and spacial activation of microglia in fiber tracts undergoing anterograde and retrograde degeneration following spinal cord lesion. *J. Neurotrauma* 12: 209-222.

108. Watanabe T, Yamamoto T, Abe Y, Saito N, Kumagai T, Kayama H. (1999) Differential activation of microglia after experimental spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 16: 255-265.
109. Frisen J, Haegerstrand A, Fried K, Piehl F, Cullheim S, Risling M. (1994) Adhesive/ repulsive properties in the injured spinal cord: relation to myelin phagocytosis by invading macrophages. *Exp. Neurol.* 129: 183-193.
110. Shaked I, Porat Z, Gersner R, Kipnis J, Schwartz M. (2004). Early activation of microglia as antigen-presenting cells correlates with T cell-mediated protection and repair of the injured central nervous system. *J Neuroimmunol* 146, 84-93.
111. Shaked I, Tchoresh D, Gersner R. (2005). Protective autoimmunity: interferon-gamma enables microglia to remove glutamate without evoking inflammatory mediators. *J Neurochem.* 92, 997-1009
112. Leskovaara A, Moriarty LJ, Turek JJ, Schoenlei IA, Borgens RB. (2000) The macrophage in acute neural injury: changes in cell numbers over time and levels of cytokine production in mammalian central and peripheral nervous system. *J. Exp. Biol.* 203: 1783-1795.
113. Satake K, Matsuyama Y, Kamiya M, Kawakami H, Iwata H, Adachi K, Kiuchi K. Nitric oxide via macrophage iNOS induces apoptosis following traumatic spinal cord injury. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 85 (1-2):114-122, 2000.
114. Schwab JM, Brechtel K, Nguyen TD, Schluesener HJ. (2000) Persistent accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) expressing microglia/ macrophages and upregulation by endothelium following spinal cord injury. *J. Neuroimmunol.* 111: 122-130.

115. Popovich PG, Wei P, Stokes BT. (1997). Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol.* 377, 443-464.
116. Popovich PG, Streit WJ, Stokes BT. (1993) Differential expression of MHC class II antigen in the contused rat spinal cord. *J. Neurotrauma* 10: 37-46.
117. Jones TB, Ankeny DP, Guan Z. (2004). Passive or active immunization with myelin basic protein impairs neurological function and exacerbates neuropathology after spinal cord injury in rats. *J Neurosci* 24, 3752-3761
118. Moreno, J. (1996) Mecanismos de autoinmunidad. En: Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. 1a edición, Ed. Limusa, S. A. de C. V. México D. F.
119. Schwartz M, Kipnis J. (2005) Protective autoimmunity and neuroprotection in inflammatory and noninflammatory neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci.* Jun 15;233(1-2):163-6.
120. Cozzo C, Lerman MA, Boesteanu A, Larkin J, Jordan MS, Caton AJ. (2005) Selection of CD4+CD25+ regulatory T cells by self-peptides. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 293:3-23.
121. Kipnis J, Avidan H, Markovich Y, Mizrahi T, Hauben E, Prigozhina TB, Slavin S, Schwartz M. (2004) Low-dose gamma-irradiation promotes survival of injured neurons in the central nervous system via homeostasis-driven proliferation of T cells. *Eur J Neurosci.* Mar; 19 (5):1191-8.
122. Rutkowski MD, Lambert F, Raghavendra V, DeLeo JA. (2004) Presence of spinal B7.2 (CD86) but not B7.1 (CD80) co-stimulatory molecules following

- peripheral nerve injury: role of nondestructive immunity in neuropathic pain. *J Neuroimmunol.* Jan;146(1-2):94-8.
123. Toubi E, Shoenfeld Y (2005) Predictive and protective autoimmunity in cardiovascular diseases: is vaccination therapy a reality? *Lupus.*; 14 (9):665-9.
  124. Yoles, E. et al. (2001) Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *J. Neurosci.*; 21: 3740–3748 1998
  125. Shaked I, Tchoresh D, Gersner R, Meiri G, Mordechai S, Xiao X, Hart RP, Schwartz M (2005) Protective autoimmunity: interferon-gamma enables microglia to remove glutamate without evoking inflammatory mediators.
  126. Gaur A, Boehme SA, Chalmers D, Crowe PD, Pahuja A, Ling N, Brocke S, Steinman L, and Conlon PJ. (1997) Amelioration of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with altered myelin basic protein peptides involves different cellular mechanisms. *J Neuroimmunol*; 74: 149-158.
  127. Nel AE, Slaughter N. (2002) T-cell activation through the antigen receptor. Part 2: Role of signaling cascades in T-cell differentiation, anergy, immune senescence, and development of immunotherapy. *J Allergy Clin immunol*; 109: 901-915
  128. Jameson SC, Bevan MJ. (1995) T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity*; 2
  129. Kersh GJ, Allen PM. (1996) Essential flexibility in the T cell recognition of antigen. *Nature*; 380: 495-498.

130. Hall FC, Visconti KC, Ahmad RC, Parry SL, Miltenburg AM, McConell HM, Mellins ED, Sonderstrup G. (2003) Cytokines elicited by T cell epitopes from a synovial autoantigen: altered peptide ligands can reduce interferon-gamma and interleukin-10 production. *Arthritis Rheum*; 48: 2375-2385
131. Huang Y, Anderson R. (2003) A single amino acid substitution in a recombinant G protein vaccine drastically curtails protective immunity against respiratory syncytial virus (RSV). *Vaccine*; 21: 2500-2505
132. Rapalino, O. et al. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat. Med.* 1998; 4: 814–821.
133. Barouch R, Schwartz M. (2002). Autoreactive T cells induce neurotrophin production by immune and neural cells in injured rat optic nerve: implications for protective autoimmunity. *FASEB J.* 16: 1304-1306.
134. Guizar-Sahagun G, Ibarra A, Espitia A, Martinez A, Madrazo I, Franco-Bourland RE. (2005) Glutathione monoethyl ester improves functional recovery, enhances neuron survival, and stabilizes spinal cord blood flow after spinal cord injury in rats. *Neuroscience* 130 (3):639-649,
135. Grattagliano, I., Vendemiale, G., & Lauterburg, B.H. (1999) Reperfusion injury of the liver: role of mitochondria and protection by glutathione ester. *J. Surg. Res.*; 86: 2-8.
136. Meister A. Metabolism and function of glutathione. (1989) En: Dolphin D, Poulson R, Avramovic O (Eds.). *Glutathione: Chemical, biochemical and medical aspects.* John Wiley and Sons Inc. New York,; 367-474

137. Wellner, V.P., et al. (1984) Radioprotection by glutathione ester: transport of glutathione ester into human lymphoid cells and fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A ; 81: 4732-5.
138. Kuehl R. Diseño de experimentos. 2ª Ed. México, Thompson learning, 2001.
139. Basso, D.M., Beattie, M.S. & Bresnahan, J.C. (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J. Neurotrauma; 12: 1–21.
140. Kunkel-Bagden, E., Dai, H.N., and Bregman, B.S. (1993) Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. Exp. Neurol.; 119: 153-164.
141. Young, W. (1996) Spinal cord regeneration. Science; 273: 451
142. Fernandez O. (2004) Interferons in relapsing-remitting multiple sclerosis: are there benefits from long-term use? CNS.Drugs 18 (15):1057-1070
143. Ibarra A, Correa D, Willms K, Merchant MT, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, and Madrazo I. (2003) Effects of cyclosporin-A on immune response, tissue protection and motor function of rats subjected to spinal cord injury. Brain Res 25-7; 979: 165-178.
144. Williams RW and Chalupa LM. (1983) An analysis of axon caliber within the optic nerve of the cat: evidence of size groupings and regional organization. J Neurosci; 3: 1554-1564.
145. Paxinos
146. Abbas A, Lichtman A. (2004) Inmunología celular y molecular. 5ª Edición, Ed. Elsevier España, S. A., Madrid.

147. Xi H and Kersh GJ. (2003) Induction of the Early Growth Response Gene 1 Promoter by TCR Agonists and Partial Agonists: Ligand Potency Is Related to Sustained Phosphorylation of Extracellular Signal-Related Kinase Substrates. *J Immunol* 1 (1); 170: 315-324.

## BIBLIOGRAFIA

- Gaur A, Boehme SA, Chalmers D, Crowe PD, Pahuja A, Ling N, Brocke S, Steinman L, and Conlon PJ. Amelioration of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with altered myelin basic protein peptides involves different cellular mechanisms. *J Neuroimmunol* 1997; 74: 149-158.
- Hauben E, Agranov E, Gothilf A, Nevo U, Cohen A, Smirnov I, Steinman L, and Schwartz M. Posttraumatic therapeutic vaccination with modified myelin self-antigen prevents complete paralysis while avoiding autoimmune disease. *J Clin Invest* 2001; 108: 591-599.
- Ibarra A, Correa D, Willms K, Merchant MT, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, and Madrazo I. Effects of cyclosporin-A on immune response, tissue protection and motor function of rats subjected to spinal cord injury. *Brain Res* 25-7-2003; 979: 165-178.
- Nel AE and Slaughter N. T-cell activation through the antigen receptor. Part 2: role of signaling cascades in T-cell differentiation, anergy, immune senescence, and development of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 901-915.
- Williams RW and Chalupa LM. An analysis of axon caliber within the optic nerve of the cat: evidence of size groupings and regional organization. *J Neurosci* 1983; 3: 1554-1564.
- Xi H and Kersh GJ. Induction of the Early Growth Response Gene 1 Promoter by TCR Agonists and Partial Agonists: Ligand Potency Is Related to Sustained Phosphorylation of Extracellular Signal-Related Kinase Substrates. *J Immunol* 1-1-2003; 170: 315-324.