



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

---

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN QUE  
CODIFICA PARA LA SINTASA INDUCIBLE DEL  
ÓXIDO NÍTRICO (iNOS), EN ANIMALES CON  
LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL  
INMUNIZADOS O NO CON PÉPTIDOS  
NEURALES

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS

**P R E S E N T A:**  
**EDNA ELISA GARCIA VENCES**

**TUTOR:**  
**JOSE JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS**

**COMITÉ TUTORAL:**  
**SARA CABALLERO CHACÓN**  
**CARLOS GERARDO GARCIA TOVAR**

MÉXICO, D.F.

2008



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*

*por permitirme llegar hasta aquí  
y ayudarme a lograr mis metas*

*A mis padres*

*por darme la vida, enseñarme a enfrentarla y con amor y consejos apoyarme en  
todo*

*A mis abuelos*

*Evelia y Trinidad por su amor y comprensión*

*A mi hermano*

*Erick por su apoyo*

*A la familia Vences en especial a Estela Vences y familia  
que con su apoyo y cariño pude realizar muchas cosas de este proyecto*

*A mis amigos y compañeros que me apoyaron en el proyecto:*

*Nayeli, Susana, Elizabeth, Jose Luis Sauer, Marcial, Yolanda.*

*Al hombre que con su amor y comprensión me ha ayudado a crecer en estos  
últimos meses, gracias por creer en mí Dr. Marco A. G. G*

*A todos los animales que dan su vida para realizar los avances en la ciencia y  
poder llegar a lo que somos como seres humanos*

## **AGRADEZCO:**

Al Dr. J.Juan Antonio Ibarra por la oportunidad de realizar este proyecto, por su confianza y consejos.

Al Dr. Raúl Silva por su apoyo incondicional para sacar adelante este proyecto

Al Instituto Camina y gente que labora ahí por su apoyo para realizar este proyecto.

A los docentes del programa de posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por brindarme los conocimientos ahora aprendidos.

Al programa de becas CONACYT



<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>50</b>
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>57</b>
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
<b>10. CONCLUSIÓN</b>	<b>65</b>
<b>11. PERSPECTIVAS</b>	<b>65</b>
<b>12. ANEXOS</b>	<b>66</b>
<b>12.1 ANEXO I. EVALUACIÓN CUANTITATIVA Y CUALITATIVA DEL RNA</b>	
<b>12.2 ANEXO II. RETROTRANSCRIPCIÓN</b>	<b>68</b>
<b>12.3 ANEXO III. DISEÑO DE LOS INICIADORES</b>	<b>70</b>
<b>12.4 ANEXO IV. COLOCACIÓN DE MUESTRAS EN GEL DE AGAROSA PARA ELECTROFORESIS Y ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO</b>	<b>72</b>
<b>12.5 ANEXO V. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO</b>	<b>74</b>
<b>13. REFERENCIAS</b>	<b>76</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b>	<b>pags</b>
<b>Cuadro 1.</b> Sistemas de fibras descendentes de la médula espinal	<b>15</b>
<b>Cuadro 2.</b> Sistemas de fibras ascendentes en la médula espinal	<b>15</b>
<b>Cuadro 3.</b> Sintomas del oxido nítrico	<b>32</b>
<b>Cuadro 4.</b> Número y distribución por grupos de las ratas que se utilizarón de la cepa Fischer 344 en los estudios para el análisis de la expresión de iNOS.	<b>51</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>Figura 1.</b> Inmunomodulación inducida por A91 y Cop-1	<b>46</b>
<b>Figura 2.</b> Expresión de iNOS un día después de la LTME	<b>57</b>
<b>Figura 3.</b> Expresión de iNOS 3 días después de la LTME	<b>58</b>
<b>Figura 4.</b> Expresión de iNOS 3 días después de la LTME	<b>59</b>
<b>Figura 5.</b> Expresión de iNOS a los 7 días después de la LTME	<b>60</b>
<b>Figura 6.</b> Evaluación de la integridad del RNA	<b>67</b>
<b>Figura 7.</b> Comprobación de cDNA por RT-PCR de Actina	<b>69</b>
<b>Figura 8.</b> Colocación de muestras en gel de agarosa	<b>73</b>
<b>Figura 9.</b> Análisis densitométrico con el programa Image J.	<b>74</b>

## RESUMEN

La lesión traumática de médula espinal (LTME), se asocia con una serie de mecanismos autodestructivos, dentro de los que la liberación excesiva de óxido nítrico por la sintasa inducible (iNOS), se ha relacionado con los fenómenos autodestructivos y de lipoperoxidación que llevan a la destrucción neural. Se han desarrollado una serie de estrategias neuroprotectoras para controlar estos fenómenos, sin embargo en ninguno de los casos se han logrado obtener beneficios importantes. Actualmente una estrategia innovadora y que ha ofrecido efectos interesantes es la llamada “autorreactividad protectora”, basada en la modulación de la respuesta inflamatoria por medio de la inmunización con péptidos neurales modificados como A91 y Cop-1. Dicha modulación podría ser a través de la regulación de la expresión de genes proinflamatorios, como el de la iNOS. Al momento no existe ningún estudio que analice el efecto de la respuesta autorreactiva sobre la expresión del gen iNOS.

En este estudio se analizó la expresión de iNOS por RT-PCR después de una LTME en ratas Fischer 344, inmunizadas o no con A91 y Cop-1. Realizando dos experimentos basados en los picos de expresión de esta enzima, estableciéndolos de la siguiente manera: 1) inmunización 7 días antes de LTME, analizando la expresión del gen iNOS a las 24 y 72 hrs.; 2) inmunización 60 minutos después de LTME, analizando la expresión del gen iNOS a los 3 y 7 días. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron un incremento significativo de la expresión del gen después de la LTME en todos los grupos. Sin embargo, no se logró mostrar una disminución significativa de dicha expresión en los grupos inmunizados con los péptidos neurales. Bajo las condiciones de este estudio se puede concluir que: la inmunización con los péptidos A91 y Cop-1 al parecer no tiene un efecto significativo sobre la expresión del gen iNOS, no obstante no se descarta la posibilidad de que el efecto de éstos sea a niveles post-transcripcionales.

**Palabras Claves:** iNOS, neuroprotección, A91, Cop-1, lesión en médula espinal, autorreactividad protectora

## **ABSTRACT**

As a consequence of spinal cord injury (SCI), a number of autodestructive mechanisms develop. Among them, the excessive release of nitric oxide (NO) from the inducible nitric oxide synthase (iNOS) plays an important role in neural destruction. At present, several strategies have been explored in order to control the harmful effect of this phenomenon. Protective autoimmunity is a recent innovative strategy based on the modulation of inflammatory response by immunizing with neural derived peptides such as A91 and Cop-1. Although the use of this therapy has provided interesting neuroprotective effects, at the moment, the mechanisms by which protective autoimmunity is exerting its beneficial effects are not completely clear. Since immunization with A91 or Cop-1 induces an anti-inflammatory Th2-type response, we envisioned that a possible mechanism of action could be through the down-regulation of proinflammatory genes such as the iNOS gene.

In order to test this hypothesis, the expression of iNOS at mRNA level was explored in SCI rats by RT-PCR. Animals were immunized or not with A91 or Cop-1 peptides either 7 days before (experiment 1) or 60 min after (experiment 2) SCI. mRNA-iNOS expression was evaluated 24 and 72h (experiment 1) or 3 and 7 days (experiment 2) after injury. The results showed no significant differences among studied groups. Immunization either with A91 or Cop-1 peptides did not have any effect on mRNA-iNOS expression. Although the present results do not support any effect of protective autoimmunity on mRNA-iNOS expression, it is imperative to explore the effect of this therapy on other mechanisms involved either in stability or translation of the mRNA. As well, it is important to elucidate the effect of protective autoimmunity on iNOS-enzyme activity.

Key words: inducible nitric oxide synthase, neuroprotection, A91, Cop-1, Spinal Cord Injury, protective autoreactivity.



# 1. INTRODUCCIÓN

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) origina la pérdida de la función sensorial y motora, llevando a déficit neurológico para el individuo que la sufre. La LTME constituye también un problema económico - social importante pues tan solo en el 2001, la incidencia anual en Estados Unidos de America fue de 15 a 40 casos por millón, siendo las causas principales los accidentes de tráfico y violencia. Diversos estudios en los últimos 30 a 40 años se han enfocado a describir y entender los mecanismos autodestructivos que se llevan a cabo después de la LTME. Entre dichos mecanismos se encuentran: la pérdida de la regulación iónica, una liberación excesiva de  $Ca^{+2}$  intracelular, la producción de radicales libres (RL), una respuesta inflamatoria exagerada, la producción de óxido nítrico (NO, del inglés nitric oxide) y la respuesta autoinmune contra constituyentes propios del sistema nervioso (Berkowitz M et al., 1992; Dumont et al., 2001).

Las estrategias terapéuticas que se han desarrollado, intentan impedir el avance de los mecanismos destructores desarrollados después de una LTME, para poder preservar y proteger el tejido neural, no afectado directamente por la lesión. A esta serie de medidas protectoras se le han denominado “neuroprotección”. El objetivo de la neuroprotección es disminuir el daño al sistema nervioso central (SNC) después de una agresión, neutralizando los mediadores tóxicos o incrementando la resistencia del tejido a la toxicidad (Aguayo et al., 1990; Gelderd and Quarles, 1990; Stokes and Reier, 1992; Jakeman L and Reier PJ., 1987). Al momento se han explorado diversas estrategias neuroprotectoras, sin embargo, ninguna de ellas ha logrado resultados clínicos satisfactorios. Es por ello, que siguen desarrollándose nuevas ideas para generar una terapia efectiva neuroprotectora.

Una estrategia innovadora es la llamada “autorreactividad protectora” la cual esta basada en modular la respuesta inflamatoria, estimulando el sistema inmunológico (SI) para promover protección del tejido neural (Moalem et al., 1999a; Shaked et al., 2004). En este rubro, diversos trabajos han demostrado que la estimulación del SI mediante inmunización activa o pasiva con auto-antígenos neurales como la proteína básica de la mielina (MBP; del inglés

myelin basic protein), reduce el daño neuronal después de una LTME (Hauben et al., 2000a). Lo anterior sugiere la existencia de una respuesta autoinmune que se encarga de proteger el tejido neural (Moalem et al., 1999a; Schwartz and Cohen, 2000). Más aún, la inmunización con péptidos neurales modificados como el A91 ha mostrado también promover los efectos benéficos de la autorreactividad protectora después de una LTME sin el riesgo de inducir una enfermedad autoinmunitaria (Ibarra et al., 2004). El Cop-1, otro péptido neural modificado, inhibe en forma importante la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) y el daño al tejido neural después de un trauma craneal (Kipnis and Schwartz, 2002), en modelos murinos y en humanos ha mostrado disminuir la severidad de la esclerosis múltiple (MS) (Teitelbaum et al., 1997). Al momento no se conocen con exactitud los mecanismos por medio de los cuales la inmunización con péptidos neurales modificados ejerce su acción neuroprotectora. Se sabe que dicha inmunización induce una respuesta inmune con predominio del fenotipo anti-inflamatorio Th2 misma que de acuerdo al tipo de citocinas predominantes podría tener un efecto inhibitor sobre la expresión del gen que codifica para la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS).

Después de una LTME se ha observado que la actividad de iNOS está fuertemente involucrada en la modulación de la respuesta inflamatoria (Heba et al., 2001), además la producción de NO por esta enzima ha sido vinculada de manera importante con la destrucción del tejido neural (Diaz-Ruiz A et al., 2002; Nakahara et al., 2002). La inhibición de la expresión del gen iNOS a través de la respuesta autorreactiva protectora podría ser uno de los mecanismos importantes por medio del cual, dicha respuesta ejerce su efecto protector sobre el tejido neural. Cabe mencionar, que no existen estudios que hayan analizado dicho efecto.

Basándonos en estos antecedentes se llegó a la hipótesis de este trabajo la cual es: Si la inmunización con A91 o Cop-1 inducen una respuesta de células T con fenotipo predominante Th2 y las citocinas liberadas por estas células tienen un efecto supresor sobre la expresión del gen que codifica para iNOS entonces la inmunización con estos péptidos causará una disminución en la expresión de dicho gen en el sitio de lesión de ratas con LTME por lo que el presente estudio tuvo como objetivo analizar la expresión del gen que codifica para iNOS en el sitio de lesión de ratas con LTME inmunizadas o no con A91 o Cop-1.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 SISTEMA NERVIOSO**

El sistema nervioso (SN) ha sido considerado hasta en la actualidad como el centro de regulación y la red de comunicación del cuerpo; generalmente junto con otros sistemas del organismo (principalmente el endocrino), lleva a cabo tres funciones elementales que ayudan al organismo a mantener la homeostasis, estas funciones son: la función perceptiva (percepción de los estímulos interiores y exteriores), la integradora (interpretación de los estímulos, aprendizaje) y la motora (respuesta mediante acciones motoras o secreciones glandulares).

Se divide anatómicamente en dos partes principales, el SNC y el sistema nervioso periférico (SNP). El SNC es el centro de regulación de todo el tejido nervioso y consiste en el encéfalo y médula espinal. El estímulo es recibido por diversas prolongaciones del tejido nervioso que conectan al encéfalo y la médula espinal con receptores, músculos y glándulas, constituyendo el SNP. Cada estímulo que recibe el organismo por medio de receptores específicos tiene un efecto ya sea causando la contracción de un músculo o la secreción en glándulas (Tortora G. and Derrickson B., 2006).

#### **2.1.1 CARACTERÍSTICAS DEL SN.**

Fundamentalmente la organización del SN, se basa en dos tipos principales de células: neuronas y neuroglia.

##### **2.1.1.1 Neuronas:**

Su función principal es la transmisión de impulsos de una parte del cuerpo a la otra. Son la unidad estructural y funcional del SN.

### 2.1.1.2 Fisiología neuronal

**2.1.1.2.1. Sinápsis.** Las **sinápsis** (del *σύναψις*, "enlace") son uniones especializadas mediante las cuales las células del SN envían señales de unas a otras y a células no neuronales como las musculares o glandulares.

Existen varios tipos de sinápsis: por una parte las llamadas químicas y las sinápsis eléctricas. Las sinápsis eléctricas funcionan permitiendo que la corriente eléctrica fluya pasivamente a través de los poros de la unión en hendidura desde una neurona hasta la otra. La fuente habitual de corriente es la diferencia de potencial generada localmente por el potencial de acción. La transmisión en este tipo de sinápsis es extraordinariamente rápida: dado que el flujo pasivo de corriente a través de la unión en hendidura es casi instantáneo, la comunicación se puede desarrollar rápidamente (Purves D., 2001; Micheli F., 2000)

En la sinápsis química la separación entre las neuronas presinápticas y postsinápticas es sustancialmente mayor que en las sinápsis eléctricas y se denomina hendidura sináptica de aproximadamente 20 nm. La característica clave de todas las sinápsis químicas es la presencia de pequeñas organelas limitadas por una membrana, denominadas vesículas sinápticas en el interior de la terminación presináptica. Estas organelas esféricas están llenas de uno o más neurotransmisores (Micheli F., 2000).

Entre los neurotransmisores se encuentran las aminas: adrenalina, dopamina y serotonina; los aminoácidos: glutamato, aspartato, el ácido gammaaminobutírico (GABA) y la glicina; moléculas pequeñas como noradrenalina e histamina (Purves D., 2001).

### 2.1.1.3. Células de la neuroglia.

Las neuronas del SNC están sostenidas por algunas variedades de células no excitables denominadas en conjunto **neuroglia** de origen ectodérmico; estas son generalmente más pequeñas que las neuronas y las superan en número unas 5 a 10 veces constituyendo aproximadamente la mitad del volumen total del encéfalo y la médula espinal. Estas células intervienen en la actividad bioquímica de las neuronas. La neuroglia se divide a su vez en macroglia y microglia. La macroglia está constituida por: 1) los astrocitos llamados así por sus

prolongaciones en forma de estrella y cuya función es dar sostén estructural y nutricio al SNC; 2) los oligodendrocitos (gr *oligos*: pocos) poseen menos prolongaciones ramificadas que los astrocitos, ayudan a mantener unidas las fibras nerviosas y producen mielina que envuelven las fibras nerviosas localizadas en el SNC y 3) del epéndimo. Las células de Schwann forman una vaina completa alrededor de los axones de mielina en el SNP a excepción de las terminales. (Geneser Finn., 2000; Snell S.R, 1994)

**2.1.1.3.1. Microglía.** Las células microgliales son las más pequeñas de las células neurogliales y se hallan dispersas en todo el SNC. Poseen prolongaciones onduladas ramificadas semejantes a espinas.

Las células microgliales del encéfalo y la médula espinal normales parecen ser inactivas y a veces se les denomina células de la microglía en reposo. En caso de daño al tejido nervioso, las células residentes de la microglía se pueden transformar en microglía activa, con actividad fagocítica, que actúan como células presentadoras de antígenos profesionales. La microglía son las primeras células que reaccionan ante una lesión del SNC, con divisiones, modificaciones morfológicas y liberación de sustancias de señal (citocinas) y RL como el NO, llevan a cabo el proceso de fagocitosis y suelen emigrar al área de lesión. Reaccionan con los astrocitos y oligodendrocitos, quizás inducidas por las sustancias señal de la microglía. (Geneser Finn., 2000; Snell S.R, 1994)

## **2.1.2. MÉDULA ESPINAL**

La médula espinal (ME) se extiende desde el foramen magno del occipital, dónde se continúa con la médula oblongada, que corresponde en el esqueleto a la parte media del arco inferior del atlas, hasta el borde inferior de la primera o segunda vértebra lumbar en donde la parte inferior de la médula se halla situada en el vértice del cono medular. El cono medular se continúa por una porción adelgazada y larga que se prolonga hasta el coxis y que recibe el nombre de *filum terminale*, dicho filamento corresponde a la médula coccígea rudimentaria (Guyton A., 1994).

La ME está compuesta por 31 segmentos en el humano y son: ocho cervicales, doce torácicos, cinco lumbares, cinco sacros y uno coccígeo. El primer nervio cervical surge entre el atlas y el occipital. La octava raíz cervical emerge del foramen intervertebral situado entre CVII y TI; los demás nervios raquídeos emergen de los forámenes intervertebrales situados por debajo de la vértebra correspondiente al mismo número (Carpenter BM., 1994).

Cada raíz nerviosa dorsal contiene fibras aferentes de las neuronas en su ganglio. Contienen una variedad de fibras de las estructuras cutáneas y profundas. Las fibras más grandes proceden de los músculos y participan en los reflejos de la médula espinal. Las fibras de tamaño medio conducen impulsos de los mecanorreceptores en la piel y articulaciones. Pero la mayor parte de los axones en las raíces dorsales son pequeños y conducen información acerca de los estímulos nociceptivos (dolor) y térmicos.

La ME se halla protegida por tres membranas que la envuelven denominadas meninges y son:

- La piamadre: es un delgado revestimiento fibroso y vascular del encéfalo y la médula, fijado con firmeza a su superficie e incluso penetra en todas las fisuras y surcos.
- La aracnoides: es una estructura delicada, con fijación laxa en la superficie interna de la duramadre; queda separada de la piamadre por un espacio tabicado lleno de líquido cefalorraquídeo (rodea el encéfalo y la médula) llamado espacio subaracnoideo. Este espacio está penetrado por gran número de trabéculas que forman parte de la aracnoides.
- La duramadre: es un fuerte revestimiento fibroso que rodea todo el SNC, está unida con firmeza a la superficie interna del cráneo, pero sólo laxamente al canal vertebral, donde existe un espacio de tejido conectivo denominado espacio epidural (Guyton, 1994).

A cualquier altura de la ME que se haga un corte transversal, se observa que está dividida en dos partes laterales simétricas e iguales por el surco medio anterior, que penetra hasta la tercera parte del diámetro anteroposterior y por el surco medio posterior, muy poco profundo y continuado por el tabique medio posterior, que se prolonga hasta el centro de la médula espinal. El surco medio anterior y el tabique anterior quedan separados en el centro de la médula por una porción de sustancia gris que recibe el nombre de comisura gris, ésta lleva

en su centro un orificio que corresponde al corte del canal central de la médula espinal (De Groot J, 1993).

### 2.1.2.1. Sustancia Gris.

Ocupa la parte central de la ME y en conjunto presenta la forma de una H o de dos medias lunas, unidas entre sí al nivel de la parte media de su convexidad por la comisura gris. En esta se encuentran las neuronas que reciben y responden a los estímulos nociceptivos. (Carpenter BM., 1994; Guyton A., 1994; Hiernan M.B., 1998)

### 2.1.2.2. Sustancia blanca.

Está formada por dos tipos de fibras nerviosas, las mielinizadas y las amielínicas. Las fibras mielinizadas de conducción rápida forman haces (fascículos) que ascienden o descienden a diferentes distancias. El conjunto de fibras con una función común se denominan haces.

La sustancia blanca se encuentra constituida por dos vías: el sistema de fibras descendentes y el sistema de fibras ascendente. (Cuadros 1 y 2)

**Cuadro 1. Sistemas de fibras descendentes de la ME**

Nombre	Función	Origen	Terminación	Localización en la Médula
Vía piramidal corticoespinal	Origen de la función motora; modulación de las funciones sensitivas	Corteza	Células del asta anterior, interneuronas	Cordón lateral, cordón anterior
Haz vestibuloespinal	Reflejos posturales	Núcleo vestibular lateral	Motoneuronas del asta anterior (para los extensores)	Cordón anterior
Haz rubroespinal	Función motora	Núcleo rojo	Interneuronas del asta anterior	Cordón lateral
Haz reticuloespinal	Modulación de transmisiones sensitivas (dolor); reflejos espinales (fibras)	Formación reticular del tallo encefálico	Asta anterior y posterior	Fascículo propio (cordón anterior)
Sistemas autónomos	Modulación de las funciones autónomas	Hipotálamo; núcleos del tallo	Neuronas autónomas preganglionares	Fascículo propio

descendentes		encefálico		
Haz tectoespinal	Reflejo de rotación de la cabeza	Mesencéfalo	Interneuronas del asta anterior	Cordón anterior
Fascículo longitudinal medio	Coordinación de los movimientos de la cabeza y de los ojos	Núcleos vestibulares	Sustancia gris cervical	Fascículo propio

**Cuadro 2. Sistemas de fibras ascendentes en la ME**

Nombre	Función	Origen	Terminación	Localización en la Médula
Sistema del cordón posterior	Propiocepción, tacto fino, discriminación de 2 puntos	Piel, articulaciones, tendones	Núcleos de la columna posterior, tallo encefálico	Cordón posterior
Haz espinotalámico	Dolor localizado, temperatura, tacto	Piel	Asta posterior, de ahí al tálamo contralateral	Cordón ventrolateral
Haz espinocerebelos o dorsal	Mecanismos de movimiento y posición	Articulaciones y tendones	Paleocorteza cerebelosa	Cordón lateral
Haz espinocerebelos o ventral	Mecanismos de movimiento y posición	Articulaciones y tendones	Paleocorteza cerebelosa	Cordón lateral
Haz espinoreticular	Dolor profundo y crónico	Estructuras somáticas profundas	Función reticular del tallo encefálico	Difusa en el fascículo propio

(De Groot J, 1993)

### **2.1.3. LESIÓN EN MÉDULA ESPINAL**

La ME se encuentra protegida por el líquido cefalorraquídeo, meninges y por los huesos de la columna vertebral, sin embargo, si la fuerza es de suficiente magnitud, estas estructuras protectoras pueden verse superadas. La lesión en médula espinal (LME) es un término amplio que se refiere al daño causado en la ME debido a innumerables causas que llevan al individuo a la paraplejía o cuadraplejía dependiendo del sitio y el grado de lesión pudiendo culminar con la muerte del mismo (Newman W, 2003).

#### **2.1.3.1. Antecedentes**

Hace 5000 años los egipcios realizaron la primera descripción de una LME y sus efectos, desde entonces y hasta mediados de los años cuarenta, la mayoría de los pacientes morían durante las primeras semanas a consecuencia del trauma inicial, por infecciones y otras



complicaciones sistémicas. (Newman W, 2003) Posteriormente, con el avance de distintas disciplinas científicas y clínicas se mejoró notablemente la posibilidad de sobrevivir. A pesar de ello, las incidencias de morbi-mortalidad siguen siendo considerablemente elevadas, aún en centros especializados en este tipo de lesión. El tratamiento médico y la recuperación del individuo tienen un alto costo debido a los recursos tecnológicos que se necesitan y las limitaciones que se observan para reintegrar al individuo en sus actividades productivas (Stover and Fine, 1987; Berkowitz M et al., 1992). En México, a diferencia de otros países, no se cuenta con un estudio epidemiológico que describa la incidencia, mortalidad, evolución postraumática y el costo de atención médica de este tipo de lesiones. Se sabe que actualmente en Estados Unidos de América existen aproximadamente 400,000 pacientes con lesiones en la ME. La incidencia anual es 1 por cada 1000 personas siendo más hombres en una relación 4:1 con respecto a las mujeres. Las principales causas han sido los accidentes automovilísticos (47%), accidentes relacionados a los deportes (24%), caídas (12%) y violencia (7%) (Lali H.S. et al., 2001).

En 1966 la expectativa de vida para los individuos con LTME era de 20 años y los problemas renales contribuían a ser la causa principal de muerte. En la actualidad los pacientes con LTME tienen una expectativa de vida de 25 a 30 años siendo la causa principal de muerte las disfunciones cardíacas y respiratorias (Bunge R.P et al., 1993).

### **2.1.3.2. Tipos de LTME.**

Con respecto al daño tisular las LME se agrupan en cuatro que son:

- 1.- Maceración de la médula en la cual la morfología es severamente distorsionada
- 2.- Laceraciones medulares
- 3.- Contusiones que llevan a un hematoma central que involucra un centro necrótico
- 4.- Contusiones expandidas en las cuales no tienen un centro necrótico en el sitio de lesión (Bunge R.P et al., 1993; Bunge R.P et al., 1997).

De estos cuatro tipos de lesión, la de contusión representa del 25 al 40% de los casos y es una lesión progresiva que aumenta con respecto al tiempo (Basso et al., 1996).

Con respecto a la localización de la LME, se caracterizan en:

- 1.-Lesión central pequeña casi siempre afecta al haz espinotalámico en ambos lados.
- 2.-Lesión central grande implica además de las vías del dolor, a las porciones de los haces adyacentes, la sustancia gris adyacente o ambas (De Groot J, 1993).
- 3.-Lesión periférica irregular (herida penetrante o compresión de la medula) incluye a las vías largas y la sustancia gris, de manera que se anulan las funciones por debajo del nivel de la lesión. Ocurre de manera temprana una alteración de la función motora. El compromiso de las células motoras de las astas grises anteriores a nivel de la lesión da lugar a una parálisis parcial o total de los músculos, con pérdida del tono muscular (De Groot J, 1993;Snell S.R, 1994).
- 4.- La hemisección de la ME causa el síndrome de Brown – Séquard que puede ser resultado de siringomielina, tumor medular hematomielia, heridas por balas o puñaladas.Los signos y síntomas son parálisis ipsilateral de la motoneurona inferior en el segmento de la lesión, pérdida contralateral de las sensaciones de dolor y temperatura por debajo de la lesión.
- 5.-La sección medular completa, da como resultado una pérdida completa de toda la sensibilidad y los movimientos voluntarios por debajo del nivel de la lesión (De Groot J, 1993).

### **2.1.3.3. Fisiopatología de la LTME.**

Después de una LTME se presenta lo que se conoce con el término de “CHOQUE ESPINAL”, definido en 1850 por Marshall Hall, el cual describe la supresión de las funciones nerviosas en la ME. Este es causado por la interrupción de la continuidad de las fibras ascendentes y descendentes (motoras, sensitivas y autónomas) (Snell S.R, 1994;Newman W, 2003).

La LTME, ocasiona alteraciones estructurales y funcionales que van desde el bloqueo transitorio de la conducción eléctrica, hasta la falta total de la misma, dependiendo del grado de lesión (Goodkin R. and Cambell J.B., 1979;Balentine JD., 1983). Después de producirse una lesión medular se desencadenan una serie de mecanismos autodestructivos que originan una disrupción del parénquima medular con secuelas a largo plazo (Goodkin R. and Cambell J.B., 1979;Balentine JD., 1983;Lemke et al., 1987). El daño después de la lesión mecánica se propaga de

horas a días, lo cual ha permitido dividir la fisiopatología de la LTME en lesión primaria y lesión secundaria.

La lesión primaria es el resultado directo del trauma inicial y sus consecuencias varían de acuerdo al tipo, lugar e intensidad del mismo. La lesión secundaria es producida por una secuencia de eventos que siguen a la lesión primaria. Los estudios experimentales y las observaciones clínicas han establecido que la lesión secundaria de la LTME es originada por una serie de cambios fisiopatológicos dependientes del tiempo, que inician en los primeros minutos de la lesión y continúan durante los siguientes días e incluso meses. Las alteraciones que ocurren en el tejido nervioso generan una cascada de eventos que originan una mayor destrucción del parénquima medular y daño neuronal irreversible (Goodkin R. and Cambell J.B., 1979; Balentine JD., 1983).

El propio mecanismo de lesión, así como la intensidad del mismo, podría originar condiciones diferentes en el desarrollo de los eventos secundarios a la lesión (Goodkin R. and Cambell J.B., 1979; Braughler and Hall, 1992). Esto podría repercutir en mayor forma sobre la sobrevivencia neuronal. Por otra parte la intensidad de la lesión también es un factor que puede influir directamente sobre el resultado de algunos fenómenos secundarios, dentro de los cuales se encuentran la pérdida de regulación iónica, la intensidad de la respuesta inflamatoria, la peroxidación de lípidos (lipoperoxidación); siendo todos estos fenómenos altamente relacionados influyendo unos en otros. Además la producción de RL y peroxidación de lípidos, la acumulación de lactato, liberación de neurotransmisores con efecto tóxico tales como aminoácidos excitatorios, monoaminas y neuropéptidos son mecanismos que también contribuyen a la lesión y muchos de ellos originan la alteración del flujo sanguíneo, isquemia local, formación de edema, necrosis del tejido, desmielinización e inflamación (Braughler and Hall, 1992).

**2.1.3.3.1. Pérdida de regulación iónica.** Es el primer mecanismo secundario que aparece después de la LTME, se da cuando se incrementa la concentración de los iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares y disminución de los iones de  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ; esto lleva a una despolarización de la membrana neuronal y al acarreo de moléculas de agua asociadas con los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  lo que produce edema (Lemke et al., 1987; Young and Koreh, 1986). El exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  libre

intracelular inhibe las funciones mitocondriales y activa las proteasas neutras que destruyen los neurofilamentos, parte fundamental del citoesqueleto axonal, observándose en las primeras horas o días poslesión un colapso y fragmentación axonales (Siegel G.J et al., 1998). Además de llevarse a cabo la activación de las fosfolipasas, las cuales favorecen la liberación de ácidos grasos a partir de los fosfolípidos de membrana y dan lugar a la formación de productos propios de la desintegración de la membrana (ácido araquidónico, leucotrienos y tromboxanos), originando la pérdida estructural y funcional de los constituyentes de la membrana, cabe mencionar que principalmente actúan destruyendo la mielina (Balentine, 1988).

Por otra parte se observa liberación de glutamato y aspartato en grandes cantidades (15 minutos después de la LTME) 6 veces más que los niveles fisiológicos (Christensen M.D et al., 1996), debido a una sobreestimulación de los receptores ionotróficos de glutamato (GluRs), el resultado es la entrada masiva de  $Ca^{2+}$  y del flujo de  $Na^+$ , este último se ha visto que puede provocar un incremento secundario de  $Ca^{2+}$  intracelular, llevando a una sobreexcitación de las neuronas viables y muerte neuronal; este efecto tóxico se conoce como excitotoxicidad (Faden and Simon, 1988). El concepto de excitotoxicidad se refleja principalmente en la glía del CNS. Dentro de las células gliales o neuroglia se encuentran los astrocitos, oligodendrocitos y la microglía. Sin embargo las células más susceptibles al fenómeno de excitotoxicidad son los oligodendrocitos los cuales son los encargados de mielinizar a los axones debido a que estos son altamente vulnerables a la sobre activación de GluRs, las señales de excitotoxicidad están regulados por los receptores de glutamato tipo AMPA y kainato. Estos receptores en los oligodendrocitos son activados por glutamato, en adición estas células contribuyen al control de los niveles de glutamato extracelular. Una alteración aguda o crónica en la homeostasis del glutamato puede resultar en una sobre activación de los receptores AMPA y kainato y con ello a una muerte celular de los oligodendrocitos y una consecuente desmielinización (Matute C. et al., 2001).

**2.1.3.3.2. Respuesta inflamatoria.** La respuesta inflamatoria es un fenómeno característico de la inmunidad innata, este tipo de inmunidad se refiere a todas las medidas de resistencia congénitas que se activan y operan desde la primera vez que el cuerpo se enfrenta a un patógeno; no requiere de un encuentro o exposición previa a tal agente, ni tampoco se modifica significativamente con exposiciones repetidas al patógeno durante toda la vida de un

individuo, ésta es débil o ausente, pero se incrementa sustancialmente con las exposiciones subsecuentes volviéndose altamente específica y directa.

Los sistemas inmunes innato y adquirido se componen cada uno de numerosos elementos que tienen la capacidad de llevar a cabo diversas funciones protectoras. Algunos de estos elementos son células especializadas que tienen la habilidad para reconocer, secuestrar y eliminar varios tipos de microorganismos o sustancias dañinas: fenómeno conocido como inmunidad celular o mediada por células; el resto de los componentes son macromoléculas solubles que circulan por la sangre y en el líquido extracelular, que actúan sobre el patógeno, la defensa de este tipo se le conoce como inmunidad humoral (Parslow G.T et al., 2001).

Los macrófagos son considerados las células claves de la respuesta inmune ya que cuando son activados por reconocimiento antigénico no solo funcionan como fagocitos, sino también secretan de manera específica una variedad de sustancias biológicamente activas dentro de los tejidos circundantes. Algunos de estos productos se liberan de forma individual en respuesta a estímulos específicos, mientras que otros se liberan de manera combinada para una respuesta más generalizada. Ciertos productos como la lisozima, los componentes del complemento y el peróxido de hidrógeno poseen actividad antimicrobiana; otros como las elastasas y colagenasas actúan produciendo licuefacción y remodelación de la matriz extracelular. Este proceso facilita la migración celular y contribuye a limpiar la zona para el proceso de regeneración. Los macrófagos también secretan numerosas citocinas que influyen sobre el crecimiento y las actividades de otros tipos celulares, como el factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF), el cual prolonga la supervivencia de los neutrófilos en los tejidos al suprimir su apoptosis, interleucina 6 (IL6) que induce la respuesta de fase aguda, factores de crecimiento de fibroblastos, prostaglandinas y quimiocinas que atraen linfocitos y otros leucocitos vecinos. Un punto importante, es el NO secretado por los macrófagos activados que no sólo ejerce una actividad antimicrobiana de amplio espectro, sino también actúa como mensajero para regular las funciones de otras células vecinas; por ejemplo NO desencadena la liberación de histamina y otros mediadores vasoactivos por parte de las células cebadas y plaquetas, de modo que promueve la respuesta vascular de la inflamación (Roitt I et al., 1996).

**3.1.3.3.2.1. Respuesta inflamatoria después de una LTME.** Inmediatamente después del traumatismo que lleva a la ruptura de la barrera hematoencefálica, ocurre una reacción inflamatoria que involucra la acción de mediadores químicos y la participación de células inflamatorias lo que origina la activación de células inmunológicas residentes (astrocitos y microglía) y de las reclutadas desde la periferia: macrófagos, linfocitos, etc (Popovich et al., 1997b).

En esta respuesta se han caracterizado dos ondas de infiltración celular: La primera dominada por células polimorfonucleares (PMN) que predomina durante las primeras horas, los neutrófilos aparecen en la pared de venas y vénulas adyacentes a la lesión en las primeras 3 o 4 horas, siendo observados en el tejido de las 8 a 24 horas posteriores a la lesión. La respuesta inflamatoria se ve reflejada por el aumento de leucocitos en el líquido cefalorraquídeo, la infiltración de PMN en el sitio de lesión, el incremento en los niveles de leucotrienos (principalmente  $LTB_4$ ), así como en la actividad de la mieloperoxidasa. Además se presenta un aumento significativo de la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la cual favorece la infiltración tisular de los neutrófilos entre las 3 y las 12 horas posteriores a la lesión.

La segunda infiltración se caracteriza por la presencia de macrófagos, mismos que se observan en los primeros dos días y alcanzan un pico de los 5 a 7 días poslesión. Después de dos días poslesión existe proliferación y reclutamiento de macrófagos y microglía; además de una infiltración linfocitaria de los 3 a los 7 días poslesión. Todas estas alteraciones y fenómenos que ocurren en el ámbito molecular tienen relación con la degeneración gradual del tejido destruyendo el sustrato anatómico necesario para la recuperación neurológica (Ikeda and Long, 1990).

La microglía activada y los macrófagos sanguíneos extravasados constituyen la mayoría de células inflamatorias presentes en el sitio de lesión. Estos son morfológicamente distintos y responden diferente a señales moduladoras (Popovich et al., 1999). La presencia de estos dos tipos celulares forman parte de una respuesta temprana del sistema inmune innato a lesiones del SNC originadas por diversos mecanismos, incluyendo entre estos la isquemia y traumatismos mecánicos (Mueller et al., 2003). Los macrófagos y las células de la microglía participan de manera

importante en los procesos desarrollados después de la lesión liberando citocinas y neurotoxinas (Bethea et al., 1998).

Ya que en el cerebro y la ME existe una considerable heterogeneidad de macrófagos; la contribución relativa de una población particular, en la reacción inflamatoria local puede dictar si una cascada de eventos inicia como un proceso regenerativo o destructor, todo depende del fenotipo en el cual se activen los macrófagos, esto se ha enfatizado sobretodo en el caso de la microglía. Por lo tanto no es sorprendente que varias neuronas y axones mielinizados se preserven en el sitio de una lesión (Popovich and Jones, 2003).

Otro elemento que participa en el proceso de infiltración leucocitaria son las quimiocinas, una subfamilia de citocinas que juegan un papel principal en el reclutamiento de leucocitos específicos a los sitios de inflamación. La IL- 8 es una quimiocina humana de la subfamilia CXC ELR+. La contraparte de esta quimiocina en el roedor no ha sido identificada sin embargo la proteína 2 inflamatoria secretada por macrófagos (MIP-2) y KC que son quimiocinas ELR+-CXC que actúan como sus homólogos funcionales. El efecto sinérgico de estas dos ultimas involucra la producción de otras citocinas producidas localmente en el CNS por astrocitos, microglía, células endoteliales que pueden inducir una cascada de citocinas proinflamatorias (Zwijnenburg et al., 2003).

A pesar de que se le han conferido efectos benéficos a la respuesta inflamatoria, después de una LTME (Lotan and Schwartz, 1994), dicha respuesta puede ser la responsable de la necrosis del tejido lesionado y circundante (Rothwell and Relton, 1993; Lotan and Schwartz, 1994; Zhang et al., 1997), ya que juega un papel muy importante en la generación de RL, mismos que dañan al tejido neural. Por lo anterior la función exacta de las células inflamatorias en el sitio de lesión ha sido y continúa siendo un tema a discusión y que a la fecha no se ha aclarado del todo.

**2.1.3.3.2.2. Respuesta inflamatoria y tejido neural.** La producción y liberación de citocinas proinflamatorias y quimiocinas es uno de los primeros eventos inflamatorios que se desencadenan después de una LTME.

Citocinas como IL1, IL6 y TNF $\alpha$  (del inglés, tumor necrosis factor) son conocidas como mediadores de respuestas inflamatorias periféricas, y son sintetizadas y liberadas por varias células en el SNC. TNF $\alpha$  se encarga inmediatamente de reclutar neutrófilos al sitio de lesión al inducir la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 (del inglés, endothelial cell intercellular adhesion molecule-1) y VCAM-1 (del inglés, vascular cell adhesion molecule 1). También estimula la liberación de IL8, que es un importante factor quimiotáctico para neutrófilos. De esta manera TNF $\alpha$  afecta la permeabilidad de las células endoteliales y como consecuencia daña la barrera hematoencefálica. Esta citocina posee también actividad citotóxica en contra de los oligodendrocitos pudiendo contribuir con ello a la desmielinización. TNF $\alpha$  estimula también la proliferación e hipertrofia de astrocitos promoviendo con esto la formación de la cicatriz glial misma que funciona como barrera a una posible regeneración (Camand et al., 2004; McPhail LT et al., 2005; Wang et al., 2002).

En diversos estudios se ha reportado que el reclutamiento de leucocitos en la ME lesionada es una respuesta fisiológica asociada con la producción de citocinas y proteincinasas que están involucradas en la reparación del tejido lesionado. Los neutrófilos, por ejemplo, son las primeras células reclutadas con el objetivo de limpiar el sitio de posibles patógenos y restos celulares a través del proceso de fagocitosis (primeras fases de reparación) sin embargo al estar activados también dan inicio a la liberación de una cantidad importante de neurotoxinas tales como: especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés, reactive oxygen species) y radicales de nitrógeno (RN), así como también quimiocinas y una variedad de enzimas que de alguna forma promueven la destrucción tisular (Bethea et al., 1998; Popovich and Jones, 2003; Taoka et al., 1997). Una prueba de ello es el reporte de Taoka (1997) quien demuestra que después de una lesión en la ME, el pico máximo de migración de neutrófilos correlaciona perfectamente con la magnitud del daño y las alteraciones motoras observadas después de una lesión.

En lo referente a los macrófagos, su activación se acompaña de la liberación de factores microbicidas como la mieloperoxidasa y elastasa mismas que contribuyen indudablemente a la lesión tisular (Giulian et al., 1993), de hecho algunos estudios han demostrado que el bloqueo farmacológico de los productos de estas células promueve una mejor preservación anatómica y funcional después de una LTME (Blight, 1994; Popovich and Jones, 2003). A pesar de lo antes mencionado, la participación que tienen individualmente los macrófagos en la respuesta



iniciada después de LTME no es muy clara. La prueba de ello es que la señalización a través de los mismos receptores CR3 y Toll-like también inicia las fases tempranas de reparación tisular (Li et al., 2002). La infiltración de monocitos y macrófagos después de una LTME tiene como objetivo remover los restos celulares y estimular la infiltración de nuevos vasos sanguíneos y células parenquimales. La infiltración de estas células, ayuda a la interacción con los linfocitos T, ya que actúan como células presentadoras de antígenos (CPA) regulando así la activación y proliferación de estos (Popovich and Jones, 2003).

La microglía por otro lado, son células pluripotenciales capaces de desarrollar diferentes fenotipos. La severidad de la lesión determina la intensidad de la respuesta inflamatoria y por lo tanto la cantidad de células reclutadas en el sitio de lesión y la magnitud de la respuesta inmunológica debido a la interacción de la microglía con las células T, llevando a estas a una especificidad antigénica que va a regular la respuesta inmunológica y las fases subsecuentes (Shaked et al., 2004). La microglía libera factores neurotóxicos incluyendo óxido nítrico (NO, del inglés nitric oxide) y citocinas proinflamatorias como son  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$  (Woo et al., 2004).

En condiciones normales la microglía se encuentra en estado de reposo (Resting) su forma es ramificada con largas y finas ramas y no es fagocítica. Cuando esta célula es activada muestra hipertrofia y retracción de sus procesos dando como resultado una configuración robusta. Finalmente y después de diversos estímulos, la microglía se puede diferenciar hacia una célula reactiva o fagocítica, misma que se caracteriza por mostrar extensiones cortas y a diferencia de la microglía ramificada, estas células además de ser fagocíticas son capaces de funcionar como células presentadoras de antígenos y de secretar citocinas, factores de crecimiento y RL de oxígeno. Generalmente la expresión de MHC II (del inglés, major histocompatibility complex) o CD4 indica que se trata de una población de microglía activada fagocíticamente. Después de una LME en el epicentro de la lesión se puede observar microglía activada en la materia blanca y gris a partir del tercer día y hasta la cuarta semana principalmente en la parte ventral y caudal al epicentro de la lesión (Popovich et al., 1997a).

Numerosos factores asociados con el proceso de lesión pueden afectar el fenotipo de la microglía en la materia gris. Por ejemplo, en el epicentro de la lesión el daño a la

microvasculatura dispuesta entre la materia gris y la materia blanca puede facilitar la entrada de citocinas al parénquima espinal, pudiendo activar subsecuentemente a las células de la microglía. También el daño a la materia gris y la subsecuente degeneración neuronal pueden resultar en una acumulación pasajera de neurotransmisores, neuropéptidos y flujos iónicos que pueden llevar a una rápida activación de la microglía y macrófagos por vía específica de receptores o canales iónicos (Popovich et al., 1997a).

Con la salida excesiva de glutamato después de una LTME, la microglía adquiere un fenotipo (microglía reactiva) que expresa muy bajas cantidades de moléculas MHC II y es incapaz de mantener una buena interacción con los linfocitos T (Shaked et al., 2004). Este fenotipo se caracteriza por la liberación excesiva de NO y TNF $\alpha$  llevando a la toxicidad. En estas condiciones los astrocitos y las neuronas postsinápticas muestran signos de daño, manifestados por la expresión de ROS, estas células en ausencia de alguna intervención pueden llegar a la apoptosis (Hao et al., 2002).

Por otra parte la microglía activada, al igual que los macrófagos, remueve los despojos celulares después de la lesión y es capaz también de promover la neovascularización en el área de lesión facilitando así la liberación de factores tróficos y nutrientes para la supervivencia y la proliferación de las células migrantes en el área dañada (Shaked et al., 2004). Además, la microglía, es capaz de expresar transportadores para glutamato (Nakajima et al., 2001; van Landeghem et al., 2001) lo cual aparentemente contribuye a amortiguar las concentraciones de glutamato y con ello a proteger a las células de la toxicidad originada por éste.

Los linfocitos son las células que modulan la intensidad de la respuesta inflamatoria. Su participación después de una LTME ha sido también relacionada con el daño al tejido neural (Popovich et al., 1996). Sin embargo, en diversos estudios se ha reportado que la presencia de linfocitos T en el sitio de lesión favorece la recuperación funcional (Hauben et al., 2000b; Hauben et al., 2000a; Moalem et al., 1999a). Los linfocitos T son capaces de sintetizar factor neurotrófico de crecimiento (NGF del inglés, Neurotrophic growth factor), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés Brain Derived Neurotrophic Factor) y diversas neurotrofinas (NT3, NT4 y NT5) (Santambrogio et al., 1994; Moalem et al., 1999b). Además un gran número de células inflamatorias (linfocitos B, macrófagos, microglía, mastocitos, eosinófilos y basófilos) pueden

ser estimuladas también por los linfocitos T para liberar NGF (Torcia et al., 1996). Estos factores neurotróficos pueden desempeñar una función neuroprotectora (por ejemplo el BDNF, que bloquea la expresión de iNOS y promueve hasta un 40% la supervivencia de las motoneuronas) (Barouch and Schwartz, 2002) o bien regeneradora (Novikov et al., 1997).

Después de una LTME se desencadena una respuesta autoinmune contra constituyentes neurales (Popovich et al., 1996; Ibarra et al., 2003; Hauben et al., 2000b). Esta respuesta puede ser capaz de incrementar el daño al tejido nervioso, o bien promover protección (Schwartz, 2001; Ibarra et al., 2004; Kipnis et al., 2002a; Kipnis et al., 2002b; Schwartz et al., 1999) e incluso restauración (Lazarov-Spiegler et al., 1996; Lotan and Schwartz, 1994; Schwartz et al., 1999; Rapalino et al., 1998; Bomstein et al., 2003) del tejido lesionado. Los linfocitos T contra antígenos neurales, pueden directa o indirectamente promover protección axonal disminuyendo los efectos de la degeneración secundaria a través de múltiples mecanismos (Moalem et al., 1999a; Moalem et al., 2004). Estas células pueden actuar en forma positiva sobre el tejido nervioso ya sea mediante la liberación de citocinas y factores neurotróficos o bien mediante la liberación de quimiocinas para promover la migración de otros elementos del sistema inmune como los neutrófilos y los macrófagos que participan en los procesos de protección y regeneración axonal.

Como podemos observar las células inflamatorias son capaces de promover daño, protección o incluso restauración del tejido neural después de una lesión. Cuando la respuesta se da en forma desmedida y sin control alguno ésta puede ser capaz de promover una mayor destrucción del tejido sano de la misma forma en que lo haría una respuesta de hipersensibilidad celular. El desafío entonces es definir las formas para manipular las vías de señalización de estas células para maximizar su potencial de reparación y simultáneamente minimizar su capacidad destructora inherente.

**2.1.3.3.3. Lipoperoxidación (LP).** Cuando ocurre una LTME, los RL también atacan a otras biomoléculas como proteínas, DNA (del inglés, desoxyribunocleic acid) y RNA (del inglés, ribunocleic acid) provocando mutaciones o daños irreversibles que llevan a la muerte celular (de Zwart et al., 1999). La respuesta inflamatoria, es parcialmente responsable de la producción de RL después de una LTME, dichas moléculas reactivas dañan las células

nerviosas y endoteliales, originando el fenómeno conocido como lipoperoxidación (interacción de los RL con los ácidos grasos).

El organismo genera RL en bajas concentraciones como consecuencia del metabolismo realizado en muchos procesos fisiológicos, sin embargo cuando su producción no es controlada, como sucede en muchas condiciones patológicas, los RL se convierten en moléculas demasiado reactivas que llegan a ser destructivas para células y tejidos.

Los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de membrana y el colesterol son las estructuras celulares más susceptibles de ser atacados por los RL. Los ácidos grasos son los constituyentes más comunes de los lípidos y las sustancias que confieren a estos últimos su característica polar. (Garnier-Suillerot A. et al., 1984).

La definición de los RL como tales es que son moléculas altamente reactivas que tienen uno o más electrones desapareados ya sea por pérdida o ganancia de ellos. Los RL conocidos incluyen el delta y sigma del oxígeno ( $O_2$ ), el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el radical hidroxilo (OH) y su principal precursor el peróxido de hidrógeno ( $H_2 O_2$ ). Otros RL son el azufre (S), nitrógeno (N), cloro (Cl), carbono (C), estos radicales son susceptibles de asociarse con el oxígeno y formar otros radicales como el óxido nítrico (NO). Los metales como el Fe, Mn, Co, Ni y Cu que pueden tener electrones sin aparear también pueden considerarse RL (Gutteridge, 1995).

**2.1.3.3.4. Reacciones de la neuroglia ante una lesión.** La reacción de la neuroglia ante una lesión, ya sea causada por un traumatismo físico o por una obstrucción vascular, se caracteriza por la migración de las células microgliales al sitio de lesión, en donde proliferan y son activamente fagocíticas, su citoplasma se llena de lípidos y restos celulares. Acompañadas en su actividad de limpieza por monocitos que migran de los vasos sanguíneos fagocitando los residuos de células muertas y otros desechos.

Otro fenómeno se caracteriza por una proliferación de astrocitos, también llamada gliosis y la hiperplasia e hipertrofia de estos, los cuales se tornan fibrosos. La pérdida de tejido neuronal no se compensa en volumen por la hipertrofia glial. La densa malla de prolongaciones

astrocíticas que se forma en las áreas de degeneración neuronal produce la llamada cicatriz gliótica.

Al responder a una lesión, los oligodendrocitos se expanden y muestran vacuolización de su citoplasma, los núcleos tienden a tornarse picnóticos (característica de apoptosis). Una grave lesión de los oligodendrocitos da lugar a desmielinización (Hiernan M.B., 1998; Snell S.R, 1994).

Las células de la microglía, están distribuidas en el CNS, sirviendo como un sensor patológico y comienza a activarse en respuesta a un estímulo dañino (Kreutzberg, 1996). La microglía activada migra hacia los sitios de lesión invadido por patógenos y se transforma desde el fenotipo resting (células ramificadas) a células ameboides (fagocíticas) (Kim and de, 2005). En adición existe una sobre- regulación de receptores de superficie, como son el CR3 (del inglés, complement receptor type 3) y MHC II, esta microglía activada puede liberar una serie de citocinas, quimiocinas y enzimas incluyendo IL1-  $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 (transformation growth factor- $\beta$ 1) , M-CSF (del inglés, macrophage-colony stimulating factors) (Hao et al.,2002); iNOS (Brown and Bal-Price, 2003), NGF (del inglés, neural growth factor), NT-3 (del inglés, neurotrophin-3) y BDNF (del inglés, brain neuronal derived factor) (Nakajima et al 2001). Por todos estas funciones es aceptado el concepto que la microglía juega un papel importante en lo que se refiere a la patogénesis en el CNS. Más aún el NO liberado por ésta ha sido relacionada con el daño al tejido nervioso después de una LME.

**2.1.3.3.5. Producción de óxido nítrico (NO).** La comprensión de los mecanismos moleculares de este potente compuesto, su distribución y sus relaciones con otros agentes importantes del organismo han proporcionado pistas que pueden ser decisivas en la investigación sobre la memoria y en la búsqueda de tratamientos de algunas enfermedades degenerativas del sistema nervioso (Snyder H.S . and Bredt S.D, 1992).

La vida media del oxido nítrico es entre seis y diez segundos y como consecuencia de su reacción con el oxígeno y el agua se convierte en nitritos y nitratos Esta molécula es producida por diferentes tipos celulares después de una LTME y puede dañar el parénquima

médular (Hamada et al., 1996). Las neuronas liberan NO cuando el glutamato se une al receptor de NMDA. Esta unión provoca la entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a la neurona; los iones se unen a la calmodulina y se activa la sintasa constitutiva de NO (cNOS, del inglés, constitutive nitric oxide synthase), este proceso se lleva a cabo en cuestión de milisegundos. Actualmente se sabe que el NO no se almacena en las vesículas, ya que por medio de microscopía electrónica se ha localizado a la sintasa del NO (NOS, del inglés, nitric oxide synthase) en el citoplasma de las neuronas del plexo mioentérico, lo cual implicaría que éste se sintetiza en el momento que se necesita. Su liberación depende de una simple difusión desde la terminación nerviosa, ya que en vez de actuar sobre una proteína receptora de membrana, el NO se difunde hasta una neurona adyacente. El receptor es el hierro del centro activo de la enzima que sintetiza GMP cíclico (cGMP). Para enlazarse con el hierro se requieren de dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Friebe A, 2003), inicia por un cambio tridimensional en la disposición espacial de la enzima que se torna más activa y aumenta la producción de GMP cíclico. Por este modo de acción tan peculiar el NO representa un tipo de mensajero neuronal totalmente nuevo, implicándolo así en el aprendizaje y la memoria ya que en éstos existen aumentos o descensos prolongados de la transmisión a través de las sinápsis después de la estimulación repetitiva de neuronas.

Al comparar la NOS con otras enzimas se han encontrado semejanzas solo con P-450 reductasa, siendo la función de transferencia de electrones de esta enzima mediada por tres cofactores que participan en esta canalización electrónica. Se comprende que la secuencia de aminoácidos en la enzima tenga lugares de reconocimiento para cada uno de estos tres cofactores: NADPH, flavina adenina dinucleótido y flavina mononucleótido. Cabe mencionar que además de estos sitios de unión la NOS posee otros sitios de los cuales carece la P450 reductasa como son: para la calmodulina y otro para la fosforilación (proteín quinasa), siendo esta uno de los principales mecanismos de señalización del interior de las células. Las sintasas constitutivas producen NO en cantidades picomolares por tiempo corto. La iNOS normalmente no se encuentra expresada para hacerlo necesita un estímulo inmunológico/inflamatorio, es decir, la presencia de LPS o de citocinas inflamatorias como  $\text{TNF}\alpha$ , IL6, IL-1 e IFN  $\gamma$ , produce NO en cantidades nanomolares, por períodos prolongados (Lopez Jaramillo P., 2001).

Una vez sintetizado el NO se difunde fácilmente a los tejidos vecinos donde se une a la guanilato ciclasa soluble para activarla y catalizar entonces la transformación de guanosin trifosfato (GTP) en guanosin monofosfato cíclico (GMPc). El NO puede unirse también a las proteínas de la cadena respiratorio mitocondrial de forma reversible o irreversible, dependiendo de su concentración y puede ocasionar la muerte celular (Lopez Jaramillo P., 2001).

En algunos estudios se ha observado que el NO reacciona con el anión súperoxido para formar peroxinitrito ( $O_2^- + NO = ONOO^-$ ). A pH fisiológico el peroxinitrito reacciona con las proteínas, los fosfolípidos, etc., o bien se descompone en productos citotóxicos como ion ( $NO_2^+$ ), bióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) y radical OH, así que parte de la toxicidad del NO desacopla la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, produciendo RL (Siegel G.J et al., 1998). Además el NO tiene un efecto directo sobre aquellas enzimas en cuyos centros catalíticos existe hierro/sulfuro, como la ribonucleótido-reductasa, en la síntesis del ADN, y en la succinato-ubiquinona en la cadena transportadora de electrones (Schweizer and Richter, 1994). Por otro lado, el NO juega un papel importante sobre la respuesta inflamatoria, por estimulación de la ciclooxigenasa, aumentando la producción de prostaglandinas y tromboxanos (Vladutiu, 1995).

**2.1.3.3.5.1 Participación del óxido nítrico y de sus sintasas en la modulación del sistema inmune.** El NO puede virtualmente jugar un papel regulador en cualquier etapa del desarrollo de la respuesta inflamatoria. Su efecto parece depender en gran parte a la concentración del mismo, el microambiente celular y el estado de activación de las células sobre las cuales ejerza su acción. Las concentraciones bajas de NO, que son producidas por las sintasas del óxido nítrico constitutivas endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS), inhiben la expresión de moléculas de adhesión, la síntesis de citocinas y quimiocinas así como la adhesión y migración de los leucocitos. Las concentraciones altas, que son producidas primordialmente por la iNOS son tóxicas y especialmente pro-inflamatorias (Guzik et al., 2003).

El NO es generado enzimáticamente por dichas sintasas, las cuales oxidan L- arginina a L-citrulina. Cada isoforma se expresa en diferentes células del organismo, la nNOS primordialmente en neuronas, la iNOS, en varios tipos de células después de estimulación

inflamatoria (macrófagos) y la constitutiva eNOS primordialmente en el endotelio vascular. (West et al., 2001; Ignarro, 2002) **(Cuadro 3)**

**Cuadro 3. Sintetas del óxido nítrico**

Sintetas	eNOS	nNOS	iNOS
<b>Clonadas originalmente de</b>	Células endoteliales	Células Neuronales	Macrófagos
<b>Expresión</b>	Miocitos, plaquetas, neuronas	Músculo esquelético, neutrófilos, neuronas	Miocitos, células gliales, endotelio y neuronas
<b>Gen que codifica y su posición</b>	NOS 3 7q 35-36	NOS 1 12q24.2-31	NOS 2 17q 11.2-12
<b>Mecanismo regulador principal</b>	Ca <sup>+2</sup> dependiente (Ca-calmodulina)	Ca <sup>+2</sup> dependiente	Ca <sup>+2</sup> independiente; regulación transcripcional principalmente por NFkB (del inglés, nuclear factor kappa β)
<b>Localización subcelular</b>	Aparato de Golgi	Citosol Retículo endoplásmico Sarcolema	Fagosomas

(Guzik et al., 2003)

En el SNC se expresan las tres isoformas de la NOS. En los astrocitos por ejemplo se han reportado las 3 isoformas (Caggiano and Kraig, 1998), mientras que en la microglía y los oligodendrocitos sólo se ha reportado la expresión de iNOS (De Groot et al., 1997).

Las tres isoformas tienen estructuras moleculares similares, son flavoproteínas y actúan como dioxigenasas usando el oxígeno molecular y NADPH para transformar L- arginina a L- citrulina y NO (Vladutiu, 1995; Guzik et al., 2003). Una molécula importante en su constitución es la tetrahidrobiopterina (BH4) que es un factor clave para todas, ya que en la ausencia de ésta NOS produce superóxido, en lugar de NO (Guzik et al., 2003). La nNOS y eNOS son activadas por la unión de la proteína reguladora de calcio, calmodulina y tienen una cinética del NO muy similar (West et al., 2001). La iNOS es regulada principalmente a nivel transcripcional y no es dependiente de los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup>.

El NO formado por la eNOS es responsable del mantenimiento del tono vascular y prevenir la adhesión de leucocitos y plaquetas a la pared vascular. El NO formado por la



nNOS actúa como un modulador o neuromediador en algunas neuronas centrales y en terminaciones nerviosas periféricas no-adrenérgicas o no-acetilcolinérgicas. A diferencia de las sintetas constitutivas iNOS produce NO en mayores cantidades y por un tiempo mucho más prolongado (Guzik et al., 2003) es por ello que el NO producido por iNOS, por sus altas concentraciones, ha sido relacionado con procesos inflamatorios. En microglía, macrófagos, monocitos y otras células, la inducción de iNOS y la presencia de L-arginina son suficientes para iniciar la generación de NO. La inducción de iNOS puede ser iniciada por citocinas inflamatorias como IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  o IL-1 (Heba et al., 2001), sin embargo cabe mencionar que su mejor inductor son los lipopolisacáridos (LPS).

iNOS fue descubierta por Michael A. Marletta, el cual al estimular cultivos de macrófagos con IFN- $\gamma$ , empezaron a producir nitratos. Los macrófagos no producían nitratos si no había arginina, de esta manera estableció que este aminoácido era un sustrato esencial para la conversión a óxido nítrico, el cuál rápidamente se transforma en nitritos y nitratos. Con la ayuda de Hibbs se observó que la arginina se convertía, no solo en nitratos, sino también en el aminoácido citrulina. Con los experimentos de Hibbs además se demostró que el NO destruye las células tumorales al inhibir la síntesis de ADN y la actividad del ciclo de Krebs, dejando a la célula sin posibilidades de aprovechar la energía metabólica (Snyder H.S. and Bredt S.D, 1992).

La iNOS tiene un peso molecular de 130 kDa y es codificada en el cromosoma 17 (humano). El factor NF $\kappa$ B activado es el responsable de la transcripción del mRNA de la iNOS. Los glucocorticoides y algunas citocinas, como TGF- $\beta$ , IL4 o IL10, inhiben la inducción de iNOS (Guzik et al., 2003). De la misma manera grandes cantidades de NO formadas localmente pueden inhibir a la misma iNOS e incluso a la COX2.

El NO y ONOO en grandes concentraciones, pueden actuar directamente sobre diferentes moléculas que intervienen en los procesos de señalización de las citocinas tales como JAK, STAT, NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B, MAPK, algunas proteínas G y otros factores de transcripción. Esto lo pueden hacer a través de la nitración de cisteínas en estas proteínas lo cual puede originar su activación o inactivación (Guzik et al., 2003).

El NO derivado de la iNOS se ha relacionado también con la regulación de la liberación de hormonas que controlan el proceso inflamatorio. Por ejemplo el NO juega un papel importante en la liberación de ACTH e inhibe la liberación de corticosterona (Givalois et al., 2002). También se sabe que es capaz de incrementar la proliferación celular, mediar la acción citotóxica de las células asesinas naturales (NK, del inglés, natural killer) o activar los neutrófilos. Estudios realizados en animales knockout para iNOS revelaron un papel importante de esta molécula en la inhibición de la producción de citocinas Th1 (INF $\gamma$ ) por los linfocitos T cooperadores (Taylor-Robinson et al., 1994) .

El NO ha sido relacionado con procesos autoinmunes (Vladutiu, 1995), especialmente aquel producido por la iNOS. Se ha sugerido que no participa en la fase de inducción pero si en la fase efectora de las enfermedades autoinmunes, ya que producido en exceso tiene un papel patológico, en asociación con otros radicales, en la cadena de eventos que llevan a la muerte celular (Vladutiu, 1995). Varios estudios han reportado una importante correlación entre la presentación de EAE y el incremento en la expresión y en la actividad de iNOS (Ahn et al., 2001; Kim et al., 2000; Okuda et al., 1997; Cross et al., 1996), más aún la mejoría clínica de esta enfermedad también correlaciona con una disminución en la expresión de esta molécula (Moon et al., 2004). La inhibición farmacológica de la actividad de iNOS aminora la severidad de la enfermedad (Pozza et al., 2000) sin embargo, la depleción total de la misma la exacerba (Fenyk-Melody et al., 1998; Kahl et al., 2004; Sahrbacher et al., 1998). Todo parece indicar que iNOS desempeña una función importante en el control de la respuesta autoinmune, esta función al parecer la realiza limitando de alguna forma la expansión de las células T autorreactivas (Shi et al., 2001).

La iNOS también ha sido involucrada de forma importante en los eventos desarrollados después de una LME. La actividad de esta molécula se ha detectado 4 horas después de la lesión y su pico máximo se ha reportado de 24 (Liu et al., 2002; Liu et al., 2001) a 72 horas (Diaz-Ruiz A et al., 2002; Nakahara et al., 2002) o incluso 7 días (Xu et al., 2001) poslesión. La expresión y la actividad de esta enzima después de una LME es el resultado de la activación de la respuesta inflamatoria y del subsecuente reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y células de la microglía al sitio de lesión, reflejándose esto en el tiempo de actividad máxima de la iNOS (Diaz-Ruiz A et al., 2002; Nakahara et al., 2002). Las altas concentraciones de NO generado por iNOS favorecen la formación de peroxinitrito (ONOO), un compuesto altamente neurotóxico. De

hecho, después de una LME las concentraciones del ONOO son de 3 a 5 veces mayores a la normal llegando a tener su pico máximo a las 12 horas poslesión (Xu et al., 2000). Por otra parte el mismo NO en grandes cantidades puede actuar como un RL y así inducir daño celular al promover el desequilibrio de la permeabilidad celular o bien de la microvasculatura. Un incremento en la permeabilidad vascular puede llevar a un edema vasogénico y con ello a cambios celulares (Sharma et al., 1996). El NO influye también en forma directa en la liberación de neurotransmisores, al estar incrementadas sus concentraciones puede estimular la liberación en exceso de glutamato, mismo que en estas circunstancias actúa primeramente hacia receptores NMDA promoviendo excitotoxicidad por el incremento intracelular de las concentraciones de  $Ca^{2+}$  (Dawson and Snyder, 1994).

#### **2.1.3.3.6. Autoinmunidad**

**2.1.3.3.6.1 Autoinmunidad y LTME.** El fenómeno de autoinmunidad es característico de una respuesta inmune específica, siendo los linfocitos las únicas células capaces de reconocer específicamente a los agentes patógenos u antígenos, y por tanto, son los encargados de iniciar la respuesta inmunitaria adaptativa.

**2.1.3.3.6.4. Respuesta autorreactiva.** Algunas células T autorreactivas escapan de los procesos tímicos de selección y aparecen en la circulación periférica, de forma que se pueden obtener con facilidad linfocitos T autorreactivos frente a péptidos derivados de antígenos tisulares específicos, como la proteína básica de la mielina, en la sangre periférica de personas sanas. Los linfocitos T pueden escapar de la destrucción tímica debido a que:

- ❖ No todos los antígenos propios se expresan en el timo
- ❖ No todos los epítomos propios se unen con la suficiente afinidad como para producir los complejos péptido- MHC estables necesarios para la eliminación de las células T
- ❖ No todos los TCR se unen a sus respectivos ligandos con la suficiente afinidad como para que se eliminen las células T.

Las células T sólo reconocen un antígeno cuando es presentado en forma de péptido asociado a MHC I o II. El repertorio de células T periféricas depende tanto del rango de autoantígenos como de su capacidad para unirse a los diversos antígenos MHC. La capacidad

de los péptidos para unirse al MHC depende de las secuencias de aminoácidos de los puntos de unión de las moléculas MHC. Sabemos que la mayoría de aminoácidos polimórficos de las moléculas MHC se encuentran situados en el surco de unión con el péptido. Por lo tanto, el gran polimorfismo de secuencia que presentan las moléculas MHC ejerce una poderosa influencia sobre la unión a los péptidos y en consecuencia, sobre la activación de las células T (Parslow G.T et al., 2001).

La autorreactividad se impide mediante procesos que ocurren durante el desarrollo celular, y no esta programada genéticamente, es decir, la aptitud para distinguir entre lo propio y lo no propio se adquiere durante el desarrollo; desde un punto de vista inmunológico, lo propio incluye todos los epítomos (determinantes antigénicos) codificados por el ADN de cada individuo, mientras que cualquier otro epítomo es considerado ajeno. Sin embargo, no es solo la estructura de una molécula *per se* lo que determina si será considerada propia o ajena. Existen otras características no estructurales de un epítomo como son:

- ❖ El momento en que los linfocitos son expuestos al epítomo por primera vez
- ❖ El lugar en el que se produce la exposición
- ❖ La naturaleza de las células que presentan los epítomos
- ❖ El número de linfocitos que responden a los epítomos

Así como también existen tres sistemas para impedir que los linfocitos autorreactivos respondan a los autoantígenos:

- ❖ Eliminación clonal: eliminación física de las células del repertorio en alguna fase de su proceso de maduración
- ❖ Anergia clonal: regulación negativa de los mecanismos intrínsecos de la respuesta inmunitaria
- ❖ Supresión: inhibición de la actividad celular mediante la interacción con otras células, como las que producen citocinas inhibitoras o los linfocitos anti-idiotípicos, que reconocen al propio receptor de antígeno (Roitt I et al., 1996; Parslow G.T et al., 2001).

Estos sistemas dependen de numerosos factores que determinan cual de estos mecanismos se aplica a cada linfocito autorreactivo concreto. Entre ellos se encuentran: 1) el

grado de madurez de la célula que se pretende silenciar, 2) la afinidad del receptor por el autoantígeno, 3) la naturaleza del antígeno, 4) su concentración, 5) su distribución tisular, 6) su patrón de expresión y 7) la disponibilidad de señales coestimulantes. En ausencia de señales coestimulantes es más frecuente que los antígenos pasen desapercibidos para la respuesta inmunitaria.

Algunas veces las células T potencialmente autorreactivas ignoran a su autoantígeno, este fenómeno de ignorancia de los autoantígenos se considera una forma pasiva de tolerancia inmunológica y se produce en las siguientes situaciones:

- ❖ Cuando las células T autorreactivas no son capaces de penetrar a través de una barrera endotelial tras la que se encuentran confinadas las células portadoras del autoantígeno.

- ❖ Cuando a pesar de haber atravesado dicha barrera, las células no pueden ser activadas debido a que:

- ✓ La cantidad de autoantígeno es demasiado pequeña como para ser detectada
- ✓ El autoantígeno se encuentra situado en células tisulares que no expresan moléculas de MHC o expresan muy poca cantidad de las mismas

- ✓ No hay suficientes células T como para organizar una respuesta inmunitaria eficaz

- ✓ El antígeno se presenta en ausencia de coestimulación, mediada por varias moléculas de superficie, dentro de las cuales la más importante es la vía B7-CD28/CTLA-4. La expresión de B7 en las CPA es necesaria para la presentación de muchos antígenos y la subsecuente interacción con CD28 localizada en la superficie celular de la célula T, así como la expresión de CTLA-4 dependiente del TCR, determinan la activación de la célula T: al no expresarse alguna de estas o expresarse a bajos niveles, el linfocito no se activa o se energiza (Roitt et al., 1996).

**2.1.3.3.6.3. Autorreactividad y SNC.** A pesar de que existen mecanismos por medio de los cuales estas células autorreactivas son eliminadas o inactivadas, estos son insuficientes y por ello prácticamente en todos los individuos sanos podemos encontrar células autorreactivas.

Esta autorreactividad o autoinmunidad se considera normal, no es patogénica y es perfectamente compatible con la homeostasis. La autoinmunidad puede ser parte de una respuesta inmune normal originada durante algunas enfermedades infecciosas e inflamatorias, sin embargo cuando es excesiva y ocasiona un estado patológico el resultado es una enfermedad autoinmune (Carroll and Holers, 2005; Grimaldi et al., 2005; Milner et al., 2005; Subudhi et al., 2005). Existen diversas enfermedades consideradas como autoinmunes o al menos con un componente de tipo autoinmune, tal es el caso del lupus eritematoso sistémico (LES), la enfermedad de Graves, la miastenia gravis o la esclerosis múltiple entre otras. La esclerosis múltiple es una afección inflamatoria desmielinizante del SNC en la que se ha reportado la existencia de una respuesta autoinmune contra el principal constituyente de la mielina, la MBP (Revesz et al., 1994). La EAE es uno de los modelos experimentales de la esclerosis múltiple en ratas y ratones. Esta enfermedad neuro-inflamatoria puede ser inducida en estos animales, sensibilizando al sistema inmunológico (SI) con tejido o proteínas del SNC capaces de inducir dicha enfermedad (proteínas encefalitogénicas) como la MBP en adyuvante completo de Freund (Fuller et al., 2004; Pal and Tabira, 2002; Rao and Segal, 2004).

#### **2.1.4. NEUROPROTECCIÓN DE LA ME**

Para mitigar en lo posible la aparición de cambios fisiopatológicos capaces de incrementar secundariamente la lesión medular, la mayoría de las investigaciones de los últimos años, apuntan a la necesidad de comenzar el tratamiento, lo más precozmente posible, siendo el intervalo óptimo, alrededor de las 4 horas tras producirse la lesión; debido a que en este tiempo, comienza el infarto de la sustancia gris, y el edema se extiende a la sustancia blanca. Las estrategias desarrolladas se basan en evitar o contrarrestar los mecanismos secundarios

desarrollados después de una LTME, para poder preservar y regenerar el tejido neural, creando el concepto de neuroprotección (Hall and Springer, 2004; Lewitus et al., 2001; Lewitus et al., 2001).

La neuroprotección es la prevención o disminución de la degeneración del tejido neural que acompaña a una lesión en el SNC. Esta estrategia busca disminuir el daño infligido al SNC por un trauma, neutralizando los mediadores tóxicos o incrementando la resistencia del tejido a la toxicidad (Aguayo et al., 1990; Gelderd and Quarles, 1990; Stokes and Reier, 1992; Jakeman L and Reier PJ., 1987), este proceso ha demostrado tener efecto después de una LTME al disminuir el grado de destrucción en la zona lesionada y aumentar la supervivencia de los animales (Guizar-Sahagun G et al., 1994). Muchos agentes farmacológicos están siendo evaluados por su eficiencia en pacientes con LTME, ya que en modelos animales han mostrado resultados prometedores (Rhoney et al., 1996). El uso de glucocorticoides como metilprednisolona iniciado dentro de las primeras 8 horas posteriores a la LTME y administrado a dosis altas durante 24 horas, mejora la recuperación motora de los pacientes (Bracken et al., 1990).

En lo que se refiere a la administración de agentes anti-inflamatorios podemos mencionar al compuesto antiangiogénico CM 101 el cual administrándolo una hora después de la lesión en ratones se observó recuperación en la locomoción (Wamil A W et al., 1998).

El papel de materiales de la matrix extracelular ha sido también explorado, descubriendo una serie de moléculas usadas como estrategia neuroprotectora como las integrinas y una variedad de proteoglicanos, incluyendo el condroitín sulfato (CSPG). Sin embargo un descubrimiento reciente es la condroitinasa ABC, que elimina un glucosaminoglicano del CSPG, promoviendo una mayor recuperación funcional motora en ratas con lesión medular (Bradbury E.J et al., 2002).

El tratamiento con inhibidores de la oxido nítrico sintasa como NG- nitro- L arginina metilester (L-NAME) administrados durante la fase aguda de la lesión en ME en modelos experimentales, promueven una recuperación clínica significativamente mayor en ratones que recibieron el tratamiento con respecto a los que no. Sin embargo la inhibición no selectiva de NO resultaría tener efectos negativos en lo que se refiere a la eNOS y nNOS (Hamada et al., 1996).

Otros compuestos disminuyen la excitotoxicidad provocada por el glutamato. Entre ellos podemos mencionar el bloqueador de canales iónicos MK-801, así como el antagonista de AMPA, NBQX; los cuales han demostrado neuroprotección en modelos de contusión, en lo que se refiere al NBQX promueve principalmente supervivencia de oligodendrocitos (Rosenberg et al., 1999).

El uso de fármacos anti-excitatorios como el sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ) y el ribuzol, funcionan también como neuroprotectores, el tratamiento con estos previene y atenúa el fenómeno necrótico que se observa de una LME en modelos experimentales (Lang-Lazdunski et al., 2000).

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

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 et al., 1999). No obstante se sabe que la presencia de factores tróficos aumenta la gliosis durante un daño medular, disminuyendo la posibilidad de nuevos contactos sinápticos.

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 mejor terapia neuroprotectora.

Actualmente, una estrategia innovadora es la que propone estimular el propio SI para promover protección del tejido neural (Moalem et al., 1999a). En ella, diversos trabajos han



demostrado que la estimulación del SI mediante inmunización activa o pasiva con auto-antígenos neurales como la MBP, reduce el daño neuronal después de una lesión incompleta de la ME (LTME) (Hauben et al., 2000a), lo cual sugiere la existencia de una respuesta autoinmune que se encarga de proteger en este caso el tejido neural (Moalem et al., 1999a; Schwartz and Cohen, 2000). Los resultados de estos experimentos abren un campo nuevo en la investigación de LTME donde el control de la respuesta autoinmune puede ser benéfico bajo ciertas condiciones.

#### **2.1.4.1. Autorreactividad protectora.**

La interacción entre el sistema inmune y SNC es única, en parte porque este último se caracteriza por ser un sitio inmunológicamente privilegiado. Dicha interacción se hace probablemente más evidente después de una lesión en el SNC ya que se pone de manifiesto el importante papel de la actividad inmunológica en el mantenimiento y la reparación del tejido neural. Existe clara evidencia, por ejemplo, de la habilidad de la respuesta inflamatoria para promover la reparación del SNC después de una lesión (Lazarov-Spiegler et al., 1996; Rapalino et al., 1998). Adicionalmente, estudios recientes han demostrado el papel importante que desempeña también la respuesta inmune específica en la recuperación del SNC lesionado (Moalem et al., 1999a).

Después de una lesión en el SNC las células T migran hacia el sitio dañado y ahí se acumulan en cantidades que son incluso mayores a las observadas en el SNC no lesionado (Schwartz et al., 1999; Moalem et al., 1999b). Para saber si la mayor acumulación de células T es benéfica ó dañina en el SNC lesionado, se han utilizado modelos experimentales de lesión parcial en nervio óptico de ratas. En este modelo, la lesión axonal fue seguida por una transitoria acumulación de células T endógenas en el sitio de lesión (Hirschberg et al., 1998).

Recientemente se ha demostrado que el SI juega también un papel muy importante en los procesos de cicatrización, producción de tejido conectivo, angiogénesis y regeneración de tejidos vulnerables. Por lo tanto la función primaria del SI no es solamente el defender el organismo contra ataques externos sino también participar en el mantenimiento y reparación del mismo (Schwartz et al., 1999). Algunas evidencias indican que algunas formas de intervención

del sistema inmune pueden ayudar a proteger o restaurar la integridad del SNC. Se ha demostrado que el sistema inmune innato, representado por macrófagos activados, puede facilitar el proceso de regeneración del SNC, así como las células T que son específicas contra la MBP pueden proteger a las neuronas del SNC de la degeneración que se extiende del sitio de lesión a áreas adyacentes. (Schwartz et al., 1999;Hauben et al., 2000b) En algunos estudios han demostrado que la transferencia pasiva de células T específicas para el auto-antígeno MBP reduce el daño neuronal y una mejor actividad motora después de una LTME en roedores (Hauben et al., 2001b).

Estas investigaciones apuntan la posibilidad de que las células T autoinmunes, puedan directa o indirectamente promover protección axonal disminuyendo los efectos de la degeneración secundaria a través de múltiples mecanismos, ya sea por la secreción de citocinas, factores neurotróficos y/ o por la producción de quimiocinas las cuales puedan atraer a otros elementos del sistema inmune como neutrófilos y macrófagos que se sabe pueden participar en la regeneración axonal. También es conocido que la inmunización activa con péptidos neurales modificados puede favorecer la protección del tejido nervioso después de una lesión (Hauben et al., 2000b;Yoles et al., 2001;Kipnis et al., 2001), y que puede ser observada como una segunda línea de defensa del cuerpo cuando los mecanismos locales son insuficientes. La degeneración secundaria asociada con algunos desordenes en el SNC puede ser mediada en parte por compuestos fisiológicos como el glutamato, los cuales pueden amortiguar los mecanismos específicos de regulación local, que contribuye a la primera línea de defensa. Estudios recientes sugieren que en situaciones donde los mecanismos locales hemostáticos no pueden hacer frente adecuadamente al estrés oxidativo que se genera como consecuencia de una lesión, el organismo necesita reclutar un mecanismo de mantenimiento adaptativo alternativo que le permita aminorar este evento destructivo. Tal mecanismo podría ser desencadenado por el propio sistema inmune dirigido contra componentes propios (Schwartz et al., 1999).

La inmunización activa con derivados no encefalitogénicos de péptidos asociados a la mielina como el péptido alterado denominado “A91” [derivado de la MBP (aminoácidos 87-99) pero con un reemplazo en la posición 91 de una lisina por una alanina] o el copolímero-1 [cop-1; polímero sintético compuesto por: L-alanina, L-lisina, L-ácido glutámico y L-tirosina (6:2:5:1) llamado también acetato de glatiramer (Copaxona)] (Kipnis et al., 2000;Schori et al.,

2001;Kipnis et al., 2003) puede similarmente reducir la degeneración secundaria de neuronas y promover una mejor recuperación motora en animales con LTME (Moalem et al., 1999a;Hauben et al., 2000a). Más aún, estudios recientes han demostrado que esta autoinmunidad protectora es un fenómeno fisiológico (Yoles et al., 2001) que esta controlado genéticamente (Kipnis et al., 2001).

La inmunización activa con péptidos no-encefalitogénicos ha originado resultados muy alentadores en ratas con LTME (Hauben et al., 2001a;Ibarra et al., 2004) sin embargo hasta la fecha no se conoce con exactitud el efecto que la respuesta originada por estos péptidos ejerce sobre la expresión de genes fuertemente relacionados con la respuesta inflamatoria. Las células inflamatorias desempeñan una función importante en el fenómeno protector inducido por la inmunización con péptidos no encefalitogénicos, dicha función depende de la intensidad con que se desarrolle la respuesta inflamatoria misma que depende a su vez de la expresión de algunos genes que codifican para moléculas proinflamatorias como: el NFkB, iNOS, AP-1, TNF, IL-1, entre otros. Al parecer la autorreactividad protectora modula de alguna forma la respuesta inflamatoria después de una LTME. Dicha modulación podría ser a través de la regulación de la expresión de algunos de estos genes proinflamatorios. Entre las moléculas que se encuentran más íntimamente relacionadas con la modulación del sistema inmunológico, incluso con fenómenos de autoinmunidad, es la iNOS (Xu et al., 2001;Wong and Billiar, 1995;Mendez et al., 2004;Tada et al., 1997;Cross et al., 1996). Al momento no existe ningún estudio que analice el efecto de la respuesta autoinmune protectora sobre la expresión del gen que codifica para la iNOS.

#### **2.1.4.2. Mecanismos inmunoreguladores originados por A91 y Cop-1.**

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 o no 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 and Slaughter, 2002). La presencia de aminoácidos diferentes en la región reconocida por el

TCR (ligandos peptídicos alterados; APLs del inglés altered peptidic ligands) o bien la presencia de secuencias repetidas formando co-polímeros, 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 muy robusta respuesta 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 and Bevan, 1995; Kersh and Allen, 1996; Hall et al., 2003; Huang and Anderson, 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 de manera importante 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 substancial 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-gamma, TNF, IL-2) a uno Th2 (regulador; IL-4, IL-10) (Gaur et al., 1997). De tal forma que la respuesta originada por A91 puede estar controlando la acción destructora de los linfocitos T autorreactivos anti-MBP 87-99 mediante la regulación de la liberación de las citocinas proinflamatorias. Esto a su vez promueve la modulación de la respuesta inflamatoria misma que, como antes ya se mencionó, si se desarrolla en forma intensa (no modulada) es capaz de originar la destrucción del tejido neural.

El Cop-1 es un co-polímero sintético de 4 amino ácidos que se une en forma muy eficiente y promiscua a diversas moléculas del MHC clase II (HLA DR) sin necesidad de ser procesado (Fridkis-Hareli et al., 1999) Se ha demostrado que actúa en las células dendríticas (DC) reduciendo la producción de IL-12, la cual es una citocina clave para el control de las respuestas de Th1/Th2, y suprime CD1a una molécula de expresión en DC la cual es una molécula HLA responsable de la presentación de antígenos gluco-lípidos a las células T

descubriendo esto en el desarrollo de MS. Estudios *in vitro* en humanos sugieren que Cop-1 se une al MHC con alta afinidad e inhibe la proliferación de células T específicas para MBP (Putheti et al., 2003) es un TCR-antagonista del epítipo 82-100 de la MBP (Aharoni et al., 1999), que presenta una fuerte reacción cruzada con esta molécula (Armon et al., 1996) compitiendo así con la MBP por el sitio de unión en el MHC y al correspondiente TCR. Cop-1 inhibe en forma importante la EAE en modelos murinos y en humanos ha demostrado disminuir la severidad de la esclerosis múltiple (MS) (Teitelbaum et al., 1997). Es un importante inductor de linfocitos Th2 reguladores mismos que liberan grandes cantidades de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y TGF beta. Reportando que al aumentar los niveles de IL-10 *in vivo* en el suero de pacientes con MS se suprimen las respuestas inmunes autoreactivas. Estos linfocitos ingresan al SNC donde pueden ser estimulados por la MBP (por reacción cruzada) y así ejercer sus efectos terapéuticos al regular la liberación de citocinas pro-inflamatorias provenientes de los linfocitos Th1 (Aharoni et al., 2000). De esta forma Cop-1 tiene un efecto benéfico sobre el desarrollo de la EAE que está asociado a una regulación negativa de los linfocitos T anti-MBP (Th1) y que es mediado por la acción de linfocitos Th2 reguladores (Teitelbaum et al., 1999).

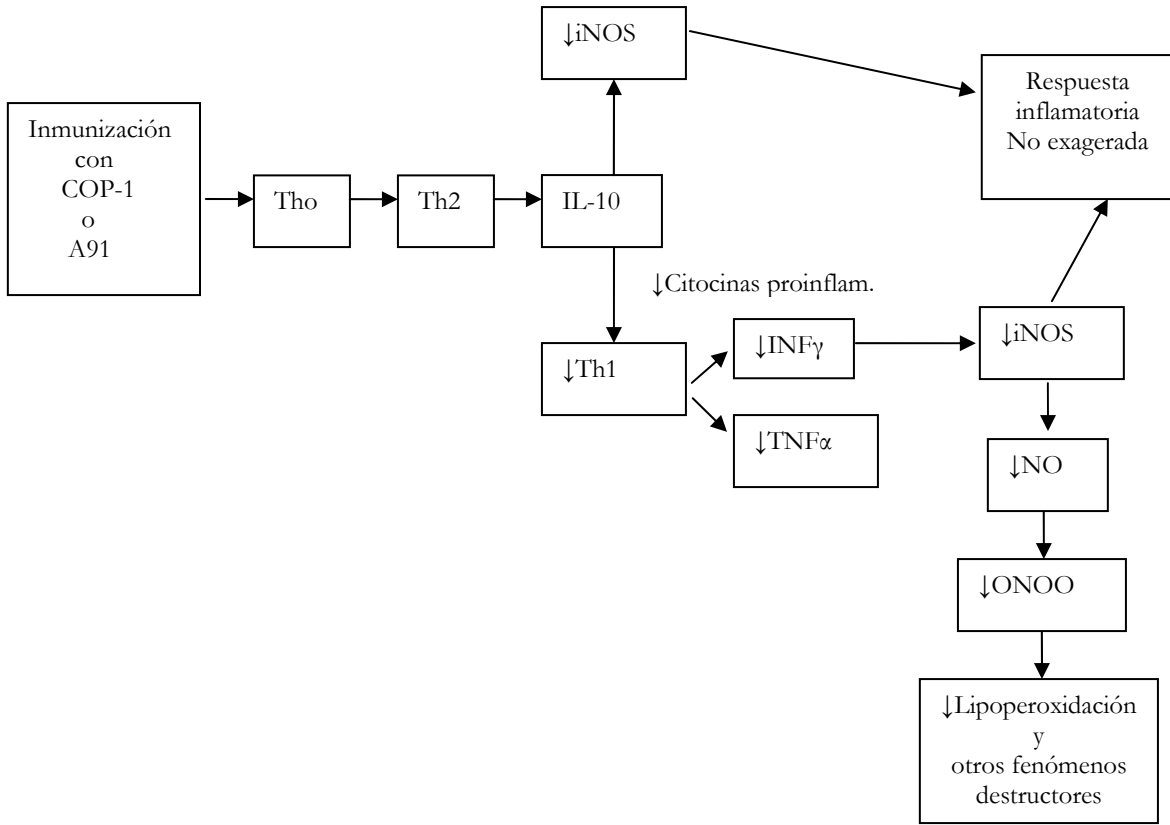
Así pues, la acción básica de A91 y Cop-1 es modular la liberación de citocinas pro-inflamatorias y con ello el efecto dañino de los linfocitos T contra MBP. Después de una lesión al SNC se ha observado que se desencadena una respuesta contra la MBP misma que de acuerdo a algunos estudios es predominantemente Th1 (Jones et al., 2002) y de no ser modulada es capaz de originar una gran destrucción al tejido nervioso (Jones et al., 2004; Jones et al., 2002). Sin embargo otros autores han demostrado que la presencia de dicho fenotipo no es solo importante sino esencial para que la autoinmunidad protectora ejerza su efecto benéfico (Kipnis et al., 2002b) ya que son estas células las que liberan el INF  $\gamma$ , citocina que estimula la expresión de moléculas del MHC clase II (moléculas indispensables para la comunicación y modulación de las células de la microglía por parte de los Th1). Aunque pareciera paradójico, la presencia de las células Th1 y de células inflamatorias parecen ser pieza clave para el funcionamiento óptimo de la autorreactividad protectora después de una lesión al SNC (Schwartz et al., 2003). La modulación de dichos elementos a través de la inmunización con A91 o Cop-1 puede ser una gran alternativa terapéutica en lesiones al SNC, ya que al permitir solo la acción necesaria y no exagerada de dichas células (Th1 y células inflamatorias), permitiría obtener los posibles beneficios que puede proveer el sistema inmunológico: factores de crecimiento y

neuroprotectores, amortiguación de sustancias excitotóxicas etc (Barouch and Schwartz, 2002; Schwartz et al., 2003).

La respuesta de linfocitos T inducida por la inmunización con A91 o COP-1 es una respuesta con fenotipo predominantemente Th2. De tal forma que este perfil de citocinas (prácticamente anti-inflamatorias) podría tener un efecto importante sobre la expresión de iNOS ya que al disminuir la liberación de citocinas como TNF $\alpha$  e INF $\gamma$  (proinflamatorias) se disminuye también la posibilidad de expresión de iNOS. Así mismo, al predominar un perfil Th2 con la liberación de IL-10 se estaría inhibiendo la expresión de iNOS. La modulación de esta enzima podría traer consecuencias muy interesantes especialmente si se disminuye su expresión ya que tanto la expresión como la actividad de esta enzima se han relacionado importantemente con la sobreproducción de NO y ésta a su vez con citotoxicidad y destrucción tisular. Además iNOS se ha vinculado importantemente con la modulación de la respuesta inflamatoria (Guzik et al., 2003) y respuestas autoinmunitarias (Isaksson et al., 2004; Shi et al., 2001; Ahn et al., 2001; Ding et al., 1998; Fenyk-Melody et al., 1998; Kim et al., 2000; Okuda et al., 1995) de tal forma que su modulación podría ser uno de los mecanismos por medio de los cuales la respuesta autoinmune protectora promueve protección al tejido neural.

Algunos estudios han sugerido que la participación del NO producido por iNOS en el deterioro del tejido neural después de una LTME es muy importante ya que la inhibición farmacológica de la actividad de ésta molécula (Yu et al., 2004) o la anulación del gen correspondiente (Isaksson et al., 2004) promueven una mejor recuperación motora en animales lesionados. Así pues, la modulación de iNOS después de una LTME podría ser una estrategia interesante para brindar protección al tejido lesionado. Dicha modulación podría ser uno de los mecanismos por medio de los cuales la inmunización con péptidos neurales modificados estaría propiciando su efecto protector sobre el tejido neural. **(Figura 1)**

**Figura 1. Propuesta de la inmunomodulación inducida por A91 y COP-1.**



**Fig 1. Probable explicación del efecto benéfico de la inmunización con estos péptidos sobre algunos de los eventos autodestructivos que se originan después de una LTME.**

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Hasta el momento no se han descrito los mecanismos exactos por medio de los cuales la autorreactividad protectora modula la respuesta inflamatoria desarrollada después de una LTME. Ya que la molécula iNOS esta fuertemente involucrada en la modulación de la respuesta inflamatoria y que a su vez la producción de NO por esta enzima ha sido vinculada con la destrucción del tejido neural, la inhibición de la expresión de iNOS a través de la respuesta autoinmune protectora podría ser uno de los mecanismos importantes por medio del cual dicha respuesta esta ejerciendo su efecto protector sobre el tejido neural. Actualmente no existen estudios que analicen el efecto de la inmunización con péptidos neurales sobre la expresión del gen que codifica para iNOS en modelos con LTME. La modulación de la autorreactividad protectora es una terapia que puede tener una amplia aplicación a nivel clínico y que podrá brindar una importante terapia a gran parte de los pacientes con enfermedades neurodegenerativas. Las perspectivas de esta terapia son muy alentadoras ya que puede ofrecer grandes beneficios en enfermedades neurodegenerativas agudas (lesión de nervio óptico y de ME) o crónicas (Alzheimer, Parkinson, Esclerosis lateral amiotrófica etc.). El mejor conocimiento de los mecanismos por medio de los cuales esta terapia esta funcionando nos llevará a una más rápida aplicación a nivel clínico.

### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿La inmunización con A91 o con Cop-1 disminuirá la expresión del gen que codifica para iNOS en el sitio de lesión de animales con LTME?



## **5. HIPÓTESIS**

Si la inmunización con A91 o Cop-1 inducen una respuesta de células T con fenotipo predominante Th2 y las citocinas liberadas por estas células tienen un efecto supresor sobre la expresión del gen que codifica para iNOS, entonces la inmunización con estos péptidos causará una disminución en la expresión de dicho gen en el sitio de lesión de ratas con LTME.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

Analizar la expresión del gen que codifica para iNOS en el sitio de lesión de ratas con LTME inmunizadas o no con A91 o Cop-1.

### **6.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Analizar la expresión del gen que codifica para iNOS en ME de ratas no sujetas a LTME
2. Analizar la expresión del gen que codifica para iNOS en el sitio de lesión de ratas sujetas a LTME e inmunizadas con A91.
3. Analizar la expresión del gen que codifica para iNOS en el sitio de lesión de ratas sujetas a LTME e inmunizadas con Cop-1.
4. Analizar la expresión del gen que codifica para iNOS en el sitio de lesión de ratas sujetas a LTME e inmunizadas con ovalbúmina.
5. Analizar la expresión del gen que codifica para iNOS en el sitio de lesión de ratas sujetas a LTME y no inmunizadas (PBS).
6. Comparar la expresión del gen que codifica para iNOS en el sitio de lesión de los cinco grupos anteriores.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

**Población objetivo:** Los experimentos se realizaron en ratas Fischer 344 consideradas resistentes a la EAE (Kipnis et al., 2001).

**Muestra:** Ratas Fischer 344, hembras de 12 a 15 semanas de edad y con un peso aproximado entre 200- 230g.

**Consideraciones éticas.** Para la realización del presente proyecto, se tomaron en cuenta los lineamientos establecidos por el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud (Título séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación) (1990).

**Tamaño de la muestra:** Para los dos experimentos de análisis de expresión de iNOS, se utilizaron 76 ratas, 8 ratas por cada grupo experimental (ratas con LTME) y 6 ratas laminectomizadas, sin LTME por cada experimento. **(Cuadro 4)**

El tamaño de la muestra se determinó mediante la fórmula (Young et al., 1983):

$$Z\alpha / 2 \sqrt{2P(1-P)} + Z\beta (\sqrt{P1(1-P1)} + \sqrt{P0(1-P0)})$$

---

$$P1-P0$$

En donde se tomaron en cuenta los siguientes valores  $\alpha = 0.05$  ( $Z\alpha = 1.96$ );  $\beta = 0.1$  ( $Z\beta = 1.28$ ) y una diferencia entre los grupos inmunizados con los péptidos neurales y los grupos testigo (inmunizado con ovalbúmina y no inmunizado) del 30%.

## Diseño experimental

Se realizaron 2 experimentos y en cada uno, se formaron 4 grupos de 8 ratas:

(Cuadro 4)

Grupo 1: Ratas con LTME + vehículo

Grupo 2: Ratas con LTME + inmunización con OVA

Grupo 3: Ratas con LTME + inmunización con A91

Grupo 4: Ratas con LTME + inmunización con Cop-1

**Cuadro 4. Número y distribución por grupos de las ratas que se utilizaron de la cepa Fischer 344 en los estudios para el análisis de la expresión de iNOS.**

Experimento	1er experimento Inmunización Pre-lesión		2do experimento Inmunización Post-lesión		TOTAL
	24h	72h	3d	7d	
<b>Grupo</b>					
<b>1. LTME + vehículo</b>	4	4	4	4	16
<b>2. LTME + OVA</b>	4	4	4	4	16
<b>3. LTME + A91</b>	4	4	4	4	16
<b>4. LTME + Cop-1</b>	4	4	4	4	16
<b>Sin lesión</b>	3	3	3	3	12
<b>TOTAL</b>	38		38		76

**Nota:** La variante que se manejo en cada experimento fue la inmunización. En el primer experimento las ratas se inmunizaron 7 días antes de la LTME, mientras que en el segundo experimento fue dentro de los 60 min. posteriores a la LTME. Estos tiempos se establecieron tomando como base estudios anteriores, en los que se observó el efecto

neuroprotector de A91 y Cop-1 en modelos de LTME y traumatismo craneo encefálico en los que se realizó la inmunización a estos tiempos (Martinon et al., 2007; Kipnis et al., 2003).

Los animales del grupo 1 de los experimentos anteriormente mencionados recibieron el vehículo en que están disueltos los péptidos (solución amortiguadora de fosfatos, PBS) más adyuvante completo de Freund (CFA, del inglés complete Freund adjuvant).

### **Consideraciones del diseño experimental**

#### **Expresión de iNOS**

1. En el primer experimento los animales se sacrificaron a las 24 (n=4 por grupo) y a las 72 h (n=4 por grupo) posteriores a la LTME para evaluar la expresión del gen para iNOS.
2. En el segundo experimento, los animales se sacrificaron a los 3 (n=4 por grupo) y a los 7 días (n=4 por grupo) posteriores a la LTME.
3. En cada experimento se analizó también la expresión del gen en animales sin LTME (n= 6 por cada experimento).
4. De cada ME se analizó la expresión del gen que codifica para iNOS en el epicentro de la lesión y en los segmentos localizados desde el epicentro de la lesión hasta 1.25 cm. caudales y craneales del sitio de lesión. En todos los casos se estudiaron 2.5 cm. de tejido, esta cantidad de tejido nos permitió estudiar el sitio de lesión y el tejido hasta donde esta se extendió.

## **Técnicas**

### **a) LTME.**

Las ratas fueron anestesiadas mediante la inyección intramuscular de una mezcla de clorhidrato de xilazina (10mg/kg) y ketamina (50 mg/kg). Treinta minutos después de dicha inyección y previa asepsia de la región toraco-lumbar, se realizó una incisión en la piel a este nivel. Posteriormente se hizo una incisión muscular al lado derecho e izquierdo del canal vertebral desde la 5ª (T V) hasta la 12ª (T XII) vértebra torácica, retrayendo después el músculo a nivel de la 9ª vértebra torácica (T IX), con el fin de descubrir la apófisis espinosa. La apófisis espinosa fue sustraída con ayuda de una gubia y se realizó con pinzas finas una laminectomía hasta exponer la ME.

Una vez descubierta la ME se llevó a cabo la LTME por una contusión severa dejando caer un cilindro de 10 g de una altura de 50 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 bien calibrada en la ME (Young, 1996).

### **b) Inmunización activa**

Las ratas fueron inmunizadas mediante una inyección intradérmica, en la base de la cola, con 150 µg de A91, COP-1, OVA emulsificado en un volumen igual de CFA conteniendo 1mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*. La inmunización se realizó en los tiempos previamente explicados.

### **c) Obtención y purificación de RNA total**

Se obtuvo RNA total a partir de 2.5 cm de tejido médular (100 µg) por la técnica de TRIZOL, la cual se llevó a cabo de la siguiente manera:

➤ Se maceró el tejido con ayuda de un pistilo en el tubo ependorf, sometiénolo después a lisis con ayuda de una solución caotrópica (500 µl de Trizol) (GIBCO).

➤ Posteriormente se realizaron extracciones con cloroformo e isopropanol, para separar el RNA de los restos celulares.

➤ Una vez aislado y precipitado, se determinó la cantidad de RNA total y la pureza por espectrofotometría (UV) leyendo a una longitud de onda de 260 nm y obteniendo la relación 280/260 nm.

➤ Posteriormente se hizo la evaluación de su integridad y aspecto en geles de agarosa 1.5%, corriendo la muestra en la cámara de electroforesis a 80 voltios. **(ANEXO I)**

#### **d) Retrotranscripción**

Una vez obtenido el RNA, se obtuvo el cDNA al retrotranscribir 2 µg de RNA total, utilizando iniciadores oligo dT (12), y el protocolo para la enzima transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogene). **(ANEXO II)**

#### **e) Reacción en cadena de la polimerasa**

Con los cDNAs que se obtuvieron de la reacción anterior, se amplificaron el gen problema y el control utilizando iniciadores diseñados para tal efecto. A partir del cDNA se amplificaron fragmentos de DNA con iniciadores que incluyen secuencias de uniones exónicas con el fin de evitar las amplificaciones artefactuales del DNA genómico contaminante. Se realizó una mezcla de reacción que incluye el cDNA, un par de iniciadores para cada gen (15 pM), buffer de reacción 10 X, dNTPs 10 mM, 0.5 U de enzima Taq polimerasa (Invitrogen), en un volumen total de 10 µL. la reacción se incubó en un termociclador marca Techne, programado para cumplir con las temperaturas y tiempos necesarios para la desnaturalización, alineamiento y polimerización; con el siguiente protocolo:

95°C – 5 minutos	} 35 ciclos
94°C – 30 segundos	
59°C – 30 segundos	
72°C – 30 segundos	
72°C – 10 minutos	
4°C	

Finalmente las amplificaciones se evaluaron en geles de agarosa al 1.0%, tiñéndolos con bromuro de etidio, realizando cada amplificación por triplicado o cuadruplicado (en caso necesario). Los resultados se registraron con fotodocumentador para captar imágenes de las que posteriormente se obtuvo por densitometría, para cada banda amplificada misma que se comparó con los controles para evaluar semicuantitativamente el aumento o disminución de la expresión de cada gen.

#### **f) Diseño de los iniciadores**

Se diseñaron dos pares de iniciadores a partir de la secuencia del cDNA de genes de rata reportados en el GENE BANK del NCBI. Los criterios del diseño son: un tamaño máximo de 20 nt, que incluyo una secuencia de unión exónica, con una  $T_m$  de 58 a 64°C, con un equilibrio de bases AT y GC, con secuencias que no fueron complementarias entre sí y que no forman estructuras secundarias, que amplifiquen fragmentos de 150 a 600 pb (lo que puede permitirnos realizar PCR múltiplex). **(ANEXO III)**

#### **g) Electroforesis en geles de agarosa**

Se realizaron electroforesis que incluyeron controles y marcadores de tamaño molecular, el buffer para la electroforesis fue TAE 1X (Tris, ácido acético y EDTA) y las electroforesis se corrieron a 80 Volts. Colocando una muestra por grupo y permitir la comparación de la expresión de iNOS. **(ANEXO IV)**

#### **h) Análisis densitométrico**

Se realizó una medición de cada una de las bandas con ayuda del software imageJ obteniendo los valores totales, comparando la amplificación de iNOS de cada grupo con respecto a su control (Actina). **(ANEXO V)**

## **i) Descripción operativa de las variables**

### **Variables independientes**

**LTME:** Daño en la ME causado por el impacto con un cilindro de acero de 10g de peso que se deja caer de una altura de 50 mm. El daño origina inflamación y destrucción del tejido de la ME, así como pérdida parcial de la actividad motora en las extremidades posteriores del 100% de los animales.

**Inmunización activa:** fue la inyección subcutánea del péptido A91 o Cop-1 en CFA, 7 días antes o bien dentro de los primeros 60 minutos después de la LTME. El péptido A91 es un derivado no-encefalitogénico de la MBP y el Cop-1 es un copolímero sintético de 4 aminoácidos, ambos péptidos han mostrado importantes beneficios en enfermedades neurodegenerativas.

### **Variables dependientes**

**Expresión del gen que codifica para la iNOS:** Se analizó mediante la evaluación densitométrica de cada banda misma que se comparó con los controles para evaluar semicuantitativamente el aumento o disminución de la expresión de cada gen.

## **i) Método estadístico**

Se realizó un análisis descriptivo de todos los grupos y se verificó la distribución de los datos bajo la curva de normalidad. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis pues los datos no tuvieron una distribución normal.



## 8. RESULTADOS

### Experimento 1. Inmunización 7 días antes de la LTME

En este estudio la inmunización se realizó 7 días antes de la LTME. Al analizar los valores densitométricos un día después de la LTME, no se logró comprobar alguna diferencia significativa ( $p > 0.05$ , Kruskal Wallis) en la expresión del gen iNOS entre los grupos inmunizados con diferentes antígenos (OVA, A91, COP-1) y el grupo solo con PBS. (Figura 2)

Figura 2. Expresión de iNOS un día después de la LTME.

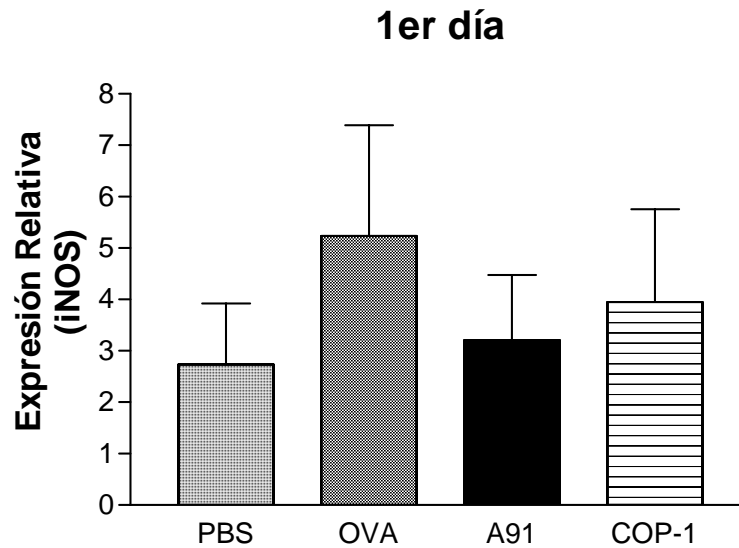


Fig. 2. Gráfica de barras en donde se muestra la expresión de iNOS un día después de la LTME. En la gráfica se presenta la media +/- la desviación estándar de 4 animales por grupo. Los datos fueron analizados con una prueba de Kruskal Wallis. Los resultados no reportaron diferencias significativas entre los grupos ( $p > 0.05$ ).

En lo referente a la expresión de iNOS 3 días después de la LTME, tampoco se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$  Kruskal Wallis) entre los grupos inmunizados con los diferentes antígenos y aquel solo con PBS (Figura 3).

Figura 3. Expresión de iNOS 3 días después de la LTME.

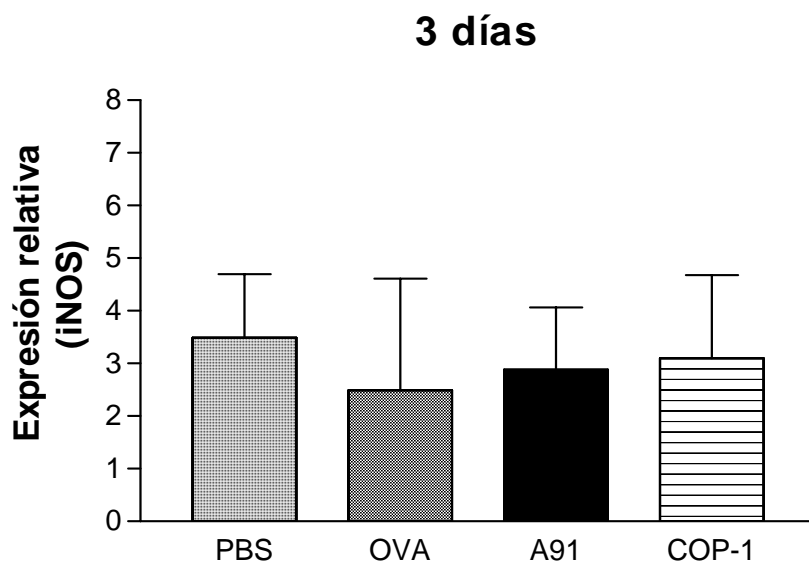


Fig. 3. Gráfica de barras en donde se muestra la expresión de iNOS 3 días después de la LTME. En las gráficas se representa la media  $\pm$  desviación estándar de 4 animales / grupo. Los datos fueron analizados con la prueba de Kruskal Wallis sin encontrarse alguna diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

## Experimento 2. Inmunización 60 minutos después de la LTME

En lo que respecta al segundo experimento, 3 días después de la LTME tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos inmunizados con los antígenos y el grupo de PBS ( $p > 0.05$ , Kruskal Wallis). (Figura 4)

Figura 4. Análisis de la expresión de iNOS 3 días después de la LTME.

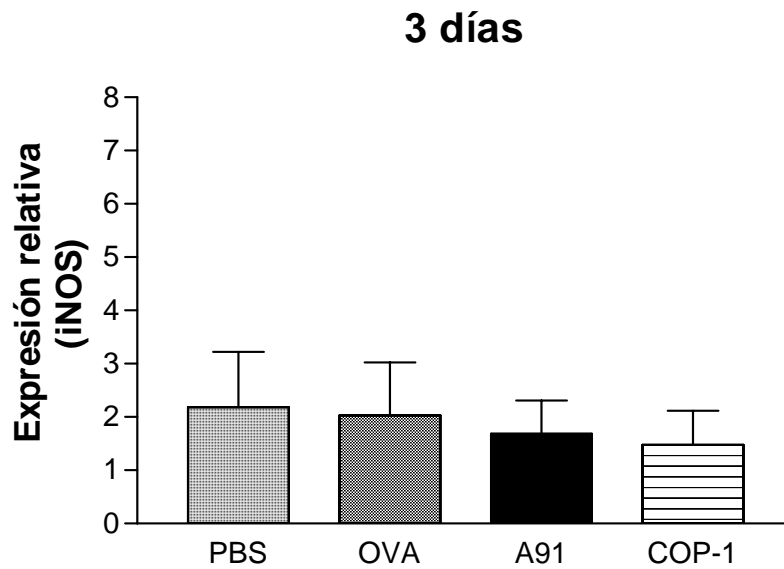


Fig. 4. Gráfica de barras en donde se muestra la expresión de iNOS 3 días después de la LTME

En la gráfica se representa la media +/- desviación estándar de 4 ratas por grupo.

Los resultados se analizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis. No se encontró diferencia significativa entre los grupos ( $p > 0.05$ )

A los 7 días después de la LTME, tampoco se observó diferencia significativa en los niveles de expresión de iNOS entre los grupos estudiados. Sin embargo vale la pena mencionar que los animales inmunizados con los diferentes antígenos presentaron niveles menores en la expresión de iNOS con respecto al grupo tratado con PBS, aunque estos valores no fueron estadísticamente significativos ( $p > 0.05$ , Kruskal Wallis). (Figura 5)

Figura 5. Análisis de la expresión de iNOS 7 días después de la LTME.

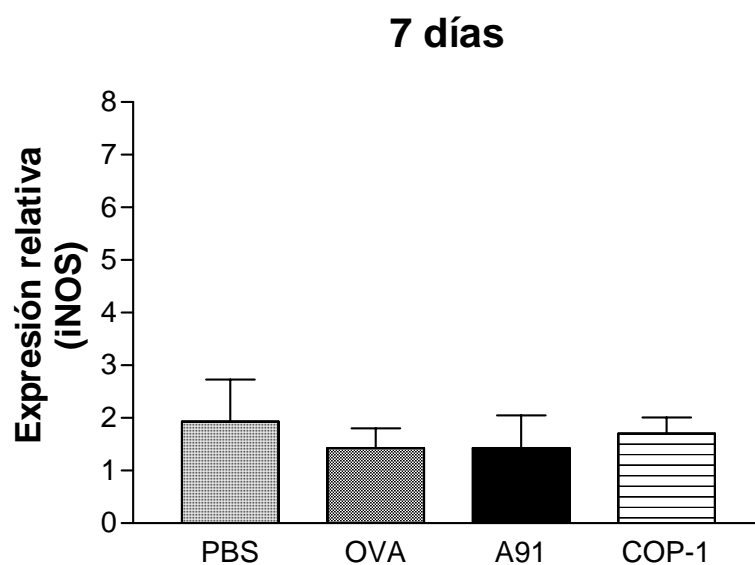


Fig. 5. Gráfica de barras en donde se muestra la expresión de iNOS 7 días después de la LTME. En la gráfica se representa la media +/- desviación estándar de 4 ratas por grupo. Los resultados se analizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis. No se encontró diferencia significativa entre los grupos ( $p > 0.05$ )

## 9. DISCUSIÓN

En este estudio se hizo la evaluación del efecto de la inmunización con péptidos neurales modificados sobre la expresión del gen que codifica para iNOS, en un modelo de lesión severa de la ME. De acuerdo a estudios previos, la inmunización con los péptidos A91 o Cop-1, origina una respuesta Th2 misma que se caracteriza por ser una respuesta anti-inflamatoria y que podría incidir en forma benéfica sobre algunos o varios de los elementos pro-inflamatorios que participan en la respuesta inmune observada después de una lesión en la ME. Uno de los principales elementos en la respuesta inflamatoria pos-lesión, que se ha correlacionado importantemente con el daño al tejido neural, es precisamente la expresión y la actividad de la enzima iNOS y por consecuencia, la abundante producción de NO. En los experimentos realizados en el presente trabajo, no se logró demostrar un efecto directo de la inmunización con los péptidos neurales modificados sobre la expresión del gen que codifica para dicha enzima. La falta de efecto significativo de los péptidos en la expresión de iNOS en la presente tesis podría deberse a diferentes factores, el primero de ellos, la administración de una cantidad no adecuada del antígeno en la inmunización. A este respecto se sabe que la concentración del antígeno es fundamental para la activación del linfocito T, ya que si ésta se encuentra por arriba o por debajo de las concentraciones ideales para la inducción de la respuesta, el linfocito T no se activa o bien se anergiza o sufre delección clonal (Roitt I et al., 1996). En lo referente a la concentración utilizada en el presente trabajo, algunos estudios han mostrado un efecto neuroprotector cuando se administraron 150µg de A91 (Martinon et al., 2007) y otros en los que 200 µg de Cop-1 son suficientes para promover neuroprotección en animales con lesión al SNC (Miller et al., 1998). Dichas concentraciones son las mismas que se utilizaron para inmunizar a los animales del presente estudio. Por esta razón es difícil pensar que la concentración de los péptidos utilizados pudiera ser la causa de la falta de efecto observada en el presente trabajo. Sin embargo vale la pena mencionar que las concentraciones antes mencionadas pueden ser capaces de inducir el ambiente propicio para promover neuroprotección por otros mecanismos, pero no para inhibir la expresión de la enzima. Por esta razón consideramos pertinente que en futuros estudios se explore el efecto de la inmunización con diferentes concentraciones de estos péptidos sobre la expresión de iNOS.

Por otra parte no se pudo demostrar una diferencia significativa en la expresión de dicho gen cuando se inmunizó 7 días antes de la lesión en la ME. En relación a esto último, se esperaba que existiera un efecto importante de A91 y Cop-1 cuando éstos eran aplicados antes de la lesión, esto debido a que la respuesta autorreactiva protectora podría tener el tiempo suficiente para desarrollarse. Tomando en consideración que la respuesta inmunológica empieza a desarrollarse a partir de los cuatro días y tiene su pico máximo de los catorce a los dieciséis días después del contacto con el antígeno, podríamos pensar que tal vez al haber hecho coincidir este pico con el de expresión máxima de la iNOS, se podría haber observado un mejor efecto de nuestra terapia ya que estaríamos evaluando el efecto de la respuesta en su mayor expresión. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la inmunización 8 a 10 días después de haberse desarrollado. De acuerdo a lo que se menciona anteriormente sobre el desarrollo de la respuesta inmune, en esta tesis no se llegó a evaluar el efecto de la respuesta autorreactiva en su pico máximo (14 a 16 días pos-inmunización). Por tal razón también se sugiere que para estudios posteriores, se diseñe un estudio en el que se haga coincidir el pico máximo de la respuesta autorreactiva con el de la expresión de iNOS.

En este trabajo, se inmunizó a los animales 7 días antes de la lesión tomando como referencia estudios previos en los que con esta misma estrategia, se observó un efecto neuroprotector inducido por la inmunización con péptidos neurales modificados en modelos de lesión al SNC (Kipnis et al., 2003). Siguiendo esta misma estrategia e intentando hacer coincidir el pico del desarrollo de la respuesta autorreactiva con el de la expresión de iNOS, sería interesante evaluar en estudios posteriores el efecto de la inmunización 7 días después de la lesión o bien inmunizar a los animales catorce y doce días antes de la lesión para poder evaluar su efecto a las 24 y 72 h después de la misma. Vale la pena mencionar que este nuevo diseño sólo nos ayudaría a esclarecer si existe o no en forma definitiva algún efecto de nuestra inmunización sobre la expresión de la iNOS. Pensando en la aplicación clínica de nuestra terapia, sería muy difícil hacer coincidir los picos antes mencionados.

Por otra parte, no debemos descartar la posibilidad de que el efecto más importante de la modulación originada por la inmunización con A91 y Cop-1 se lleve a cabo a otro nivel diferente a la expresión del gen iNOS. El efecto de ésta terapia podría estar incidiendo sobre

fenómenos pos-transcripcionales, ya sea en la estabilidad del mRNA recién producido, la correcta traducción del mismo o bien en la actividad misma de la enzima.

La producción de NO por cada una de las tres isoformas, nNOS, eNOS e iNOS, está sujeta a una variedad de controles transcripcionales, transduccionales y postransduccionales (Kone et al., 2003).

Existen algunos mecanismos sobre los cuales las citocinas generadas por la inmunización con dichos péptidos podrían estar incidiendo. Sabemos que las citocinas generadas por el fenotipo Th2, en este caso la IL4, IL 13 y la IL-10, además de tener efectos sobre las células del sistema inmune (diferenciación de las células T hacia el fenotipo Th2, inhibición de la producción de IL12, entre otros) también pueden actuar sobre la actividad de la iNOS. IL-4 e IL-13 constituyen una vía de activación alternativa para los macrófagos, inducen cambios fenotípicos diferentes a los inducidos por IFN $\gamma$  y provocan un incremento en la expresión del receptor de manosa y de las moléculas de MHC clase II. Estos efectos estimulan la endocitosis y la presentación de antígenos respectivamente pero además promueven la liberación de quimiocinas como CCL22 y CCL7 y la expresión de enzimas intracelulares como la arginasa. La enzima arginasa cataliza la hidrólisis de arginina a ornitina y compete con NOS por su sustrato, la L- arginina (Vercelli, 2003). En modelos *in vitro* estas citocinas han demostrado disminuir la síntesis de la enzima iNOS en poblaciones de macrófagos (Gordon, 2003), sin embargo solo la IL-13 parece tener un efecto directo sobre la actividad de dicha enzima ya que suprime la producción de NO, al regular la inducción de arginasa en macrófagos, incrementándose los niveles de ésta e involucrándola así con la inhibición del NO (Narayan R.Bhat et al., 1998; Gordon, 2003).

Otra citocina clásica del fenotipo Th2 es la IL-10, que tiene un receptor diferente al de IL 4 e IL-13 en macrófagos, y sus efectos en la expresión génica son distintos. La IL10 es un activador de la molécula STAT3 (del inglés, signal transducer and activator of transcription 3), considerada un inhibidor de citocinas proinflamatorias y de la liberación de óxido nítrico. Por otra parte se sabe que tanto IL 10 e IL 13 inhiben la expresión de IL1  $\beta$ , la cual es considerada como inductora de la expresión del gen iNOS (Wong et al., 1997). A nivel de la actividad de la

enzima, la IL10 incrementa la cantidad de arginasa en macrófagos por muchos caminos, interviniendo con la acción de iNOS.

Se sabe que la regulación de iNOS a nivel de transcripción y/o estabilidad del mRNA depende de la activación de p38 MAPK (del inglés, mitogen activated protein kinase). La señalización de p38 MAPK en la activación transcripcional del gen iNOS en células gliales de ratas involucra los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y ATF2 (del inglés, activating transcription factor - 2). Se ha reportado que después de la activación transcripcional, la expresión del gen iNOS es regulada también a nivel de la estabilidad del mRNA. Entre los principales determinantes cis y trans que controlan la estabilidad del mRNA están los elementos ARE que son ricos en secuencias AUUUA encontradas en una región no codificante 3' (3'UTR). El camino de regulación de estos elementos es dependiente de p38 MAPK y se han encontrado en el mRNA de iNOS de astrocitos y macrófagos murinos (Narayan R.Bhat et al., 1998). Existe un gran número de proteínas unidas a ARE entre las ya identificadas podemos mencionar a AUF-1, los miembros de la familia ELAV (el mas importante es HuR), KSRP y tristetraprolina. HuR es conocida por estabilizar varias regiones ARE contenidas en los mRNAs, ésta tiene una alta afinidad por iNOS (Fechir et al., 2005). La IL 10 actúa inhibiendo la vía p38 MAPK bloqueando la transcripción de NF- $\kappa$ B por este camino e interfiriendo también con la estabilidad al mRNA a nivel postranscripcional (Narayan R.Bhat et al., 1998).

Por lo anteriormente citado se recomienda realizar estudios donde se evalúe directamente el efecto de la inmunización con péptidos neurales modificados sobre los diversos fenómenos postranscripcionales ya mencionados para poder entonces, dilucidar los probables mecanismos efectores de dicha terapia.



## 10. CONCLUSIÓN

❖ En los experimentos realizados en el presente trabajo, no se logró demostrar un efecto directo de la inmunización con los péptidos neurales modificados sobre la expresión del gen que codifica para iNOS.

## 11. PERSPECTIVAS

❖ Analizar el efecto de la inmunización con péptidos neurales modificados sobre la expresión de la proteína iNOS.

❖ Analizar el efecto de la inmunización con péptidos neurales modificados sobre la actividad de la enzima iNOS.

❖ Realizar estudios *in vitro* para analizar el efecto de las citocinas anti-inflamatorias (IL-10, IL 4 e IL 13) sobre la expresión proteica y la actividad de la enzima iNOS.

❖ Analizar el efecto dosis-respuesta de A91 y Cop-1 sobre la expresión del gen iNOS.

## 12. ANEXOS

### 12.1 ANEXO I. EVALUACIÓN CUANTITATIVA Y CUALITATIVA DEL RNA

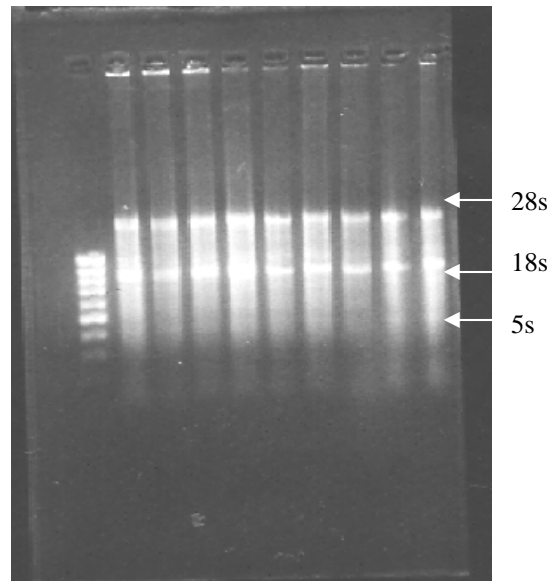
Una vez obtenido el RNA se obtuvo la cantidad en nanogramos de RNA por espectrofotometría y se leyó a una dilución 1:50 el RNA.

Se tomaron de cada muestra los siguientes parámetros:

- Longitud 260 nm
- Longitud 280 nm
- Relación 260/ 280 nm. Se procesaron muestras con una relación de 1.8 a 2.0
- Nanogramos/ microlitro

Se evaluó la integridad del RNA colocando 1 microgramo en los geles de agarosa al 1.5%, observando el RNA ribosomal (rRNA), las dos bandas de 28s, 18s y en algunos casos se observa los rRNA 5s, además de que no existiera degradación de este. **(Figura 6)**

**Figura 6. Evaluación de la integridad del RNA**



**Fig. 6 Evaluación de la integridad del RNA, observando en el gel las bandas de rRNA 28s, 18s y 5s lo que indica que el RNA obtenido no se encuentra degradado, el barrido al fondo de cada carril se trata del mRNA el cual representa el 10% de la cantidad total obtenida.**

Los geles se tiñeron por 5 minutos con bromuro de etidio. Las fotos fueron tomadas por el analizador de imágenes Alphaimagen.

## 12.2 ANEXO II. RETROTRANSCRIPCIÓN

La retrotranscripción se realizó de acuerdo al protocolo de la enzima Thermo Script Reverse Transcriptasa de Invitrogen, que consistió en:

**PASO 1.** A cada muestra se agregó:

- 1  $\mu$ l de oligo dt
- 2  $\mu$ l de DNTPs
- 2  $\mu$ g de RNA, lo proporcional en  $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O DEPC para completar 12  $\mu$ l

Se incubó la mezcla anterior a 65<sup>0</sup>C / 5 minutos e inmediatamente se neutralizó la reacción poniéndolo 2 minutos en hielo.

**PASO 2.** A cada reacción anterior se le agregó la siguiente mezcla.

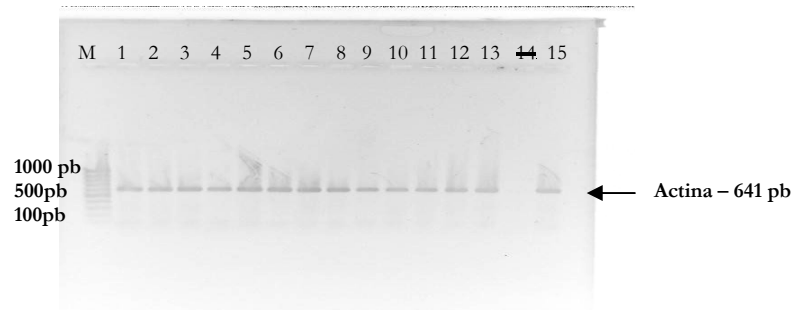
- Buffer 5x            4 $\mu$ l
- 0.1 M DTT        1 $\mu$ l
- DEPC              1 $\mu$ l
- RNAsa OUT      1 $\mu$ l
- Thermo Script   1 $\mu$ l

**PASO 3.** Teniendo como resultado por cada muestra un total de 20 $\mu$ l, los cuales se incubaron a 55<sup>0</sup>C / 1 hora.

**PASO 4.** Continuando después por 85<sup>0</sup>C / 5 minutos para posteriormente agregarle a cada muestra 1 $\mu$ l de RNAsa H, para finalizar el protocolo con una temperatura de incubación de 37<sup>0</sup>C / 20 minutos. El cDNA se conservó a -20<sup>0</sup>C, hasta que se utilizó.

Antes de realizar la amplificación de iNOS, ya obtenidos los cDNA se utilizaron para la RT-PCR de actina, comprobando así la técnica de retrotranscripción. (Figura 7)

**Figura 7. Comprobación de cDNA por RT-PCR de Actina**



**Fig 7. Comprobación de los cDNAs obtenidos con ayuda de la técnica de PCR, amplificando el gen constitutivo Actina.**

## 12.3 ANEXO III. DISEÑO DE LOS INICIADORES

Se consultaron y diseñaron con ayuda de BLAST obteniendo la siguiente información:

### SECUENCIA DISEÑADA PARA iNOS (inducible synthase nitric oxide)

FORWARD iNOS RAT  
5'\_ACG AGG TGT TCA GCG TGC TCC ACG\_3'  
REWARD iNOS RAT  
5'\_CCA CAA TAG TAC AAT ACT ACT TGG\_3

LOCUS RATNWUT 3614 bp mRNA linear ROD 10-JAN-2003

DEFINITION Rattus norvegicus mRNA for inducible nitric oxide synthase, complete cds.

ACCESSION D44591

VERSION D44591.1 GI:624916

SOURCE Rattus norvegicus (Norway rat)

#### ORIGIN

3001 ctccatgact ctcagcgcag agggctcaaa ggaggccgca tgaccttggg gtttgggtgc  
3061 aggcaccag agggagacca cctctatcag gaagaaatgc aggagatggt ccgcaaggga  
3121 gtgtgtttcc aggtgcacac aggtactacc cggctgccc gaaaacccaa ggtctacgtt  
3181 caagatcc tcagaaaaga gctggccgac gagtggttca gctgtctcca cggggagcag  
3241 *ggccacct atgtttgtgg cgalgtgcgc atggtcggg atgtggctac cacttgaag*  
3301 *aagctgggg ccgcaagct gaactgagt gaggagcagg ttgaggatta ctcttcag*  
3361 *ctcaagacc agaaaactta tcatgaggat atcttcggt cgtctttc ctatggagt*  
3421 *aaaaaggcca acgcttga ggagccaaa ggcacaagac tctgaccc agaagatta*  
3481 *cagcatctgg cctaataa atgacagtt gaggggttg gagagacaga agtccatcc*  
3541 *ccccaaacc ctcacatca tctcctct ctacctacc aagtagtatt gtactattgt*  
3601 ggactactga atct

**Pares de bases:** 346 pb + 24 pb de primer forward+24 pb de primer reward= amplifica un producto para iNOS de 394pb

### SECUENCIA DISEÑADA PARA ACTINA

**FORWARD ACTINA**  
**5'\_TGC CCA TCT ATG AGG GTT ACG\_3'**  
**REWARD ACTINA**  
**5'\_TAG AAG CAT TTG CGG TGC ACG\_3'**

LOCUS NM\_031144 1296 bp mRNA linear ROD 19-FEB-2006

DEFINITION *Rattus norvegicus* actin, beta (Actb), mRNA.

ACCESSION NM\_031144

VERSION NM\_031144.2 GI:42475962

SOURCE *Rattus norvegicus* (Norway rat)

#### ORIGIN

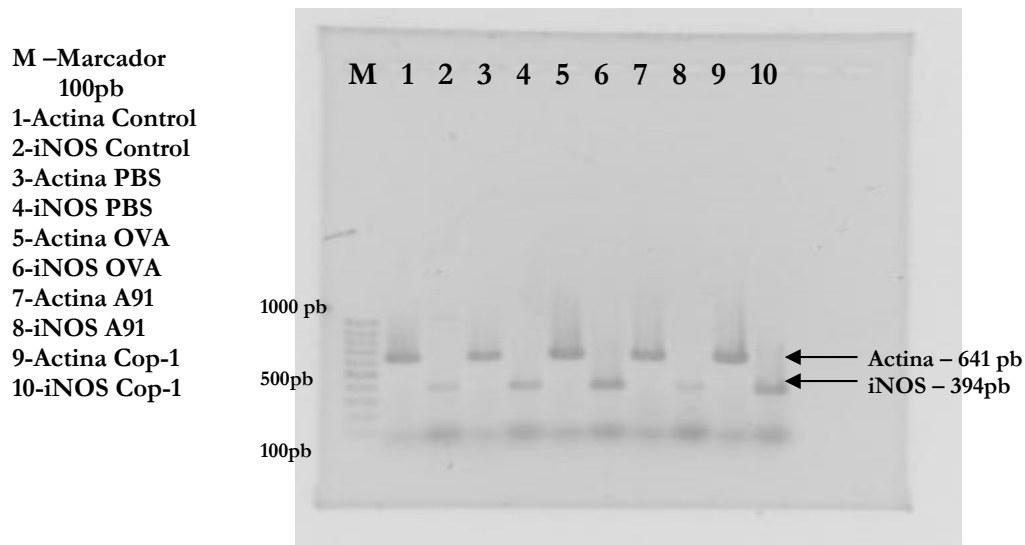
```
1 ggggtcagtg ccgctccac ccgagtagc aacctcttg cagctcctc gtcgccggtc
61 cacaccgcc accagttcgc catggatgac gatatcgtg cgctcgtcgt cgacaacggc
121 tccggcatgt gcaaggccgg cttecggggc gacgatgctc cccgggccgt ctcccctcc
181 atcgtgggcc gccctaggca ccagggtgtg atggtgggta tgggtcagaa ggactcctac
241 gtggcgacg aggccagag caagagaggc atcctgacct tgaagtacc cattgaacac
301 ggcattgtca ccaactggga cgatatggag aagatttggc accacacttt ctacaatgag
361 ctgctgtgag cccctaggga gcacctgtg ctgctaccg aggccctct gaaccctaag
421 gccaacctg aaaagatgac ccagatcatg ttgagacct tcaacaccc agccatgac
481 gtagccatc aggtctgtt gtcctgtat gcctctggtc gtaccactgg cattgtgatg
541 gactccggag acgggtgac ccaactgtg cccatctatg aggttacgc gtcctccat
601 gccatctgc gctggacct gctggccgg gactgacg actacctat gaagatctg
661 accagctg gctacagct caccaccaca gctgagagg aatctgctg tgacattaa
721 gagaagctg gctatgtgc cctagactc gagcaagaga tggcaactgc gcatctct
781 tctctctg agaagagcta tgagctcct gacggtagg tcatcactat cggcaatgag
841 cggttccat gccccaggg tctctccag ctctcttc tgggtatgga atctgtggc
901 atccatgaaa ctacattcaa tccatcatg aagttgacg tgcacatcc taaagacct
961 tatccaaca cagctctgc tggggcaac accatgacc caggcattgc tgacaggatg
1021 cagaaggaga ttactgctt gctctctag accatgaaga tcaagatcat tctctctt
1081 gagcgcaagt actctgtg gattgtggc tctatctgg cctactgtc cacttccag
1141 cagatgtgga ttagcaagca ggaftagat gactcggcc ctccatcgt gcaccgcaaa
1201 tcttctagg cggactgta ctgactgctg ttttacacc tttcttgac aaaacctaac
1261 ttgcgcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa
```

**Pares de bases:** 599 pb + 21 pb de primer forward+21 pb de primer reward= amplifica un producto para Actina de 641pb

## 12.4 ANEXO IV. COLOCACIÓN DE MUESTRAS EN GEL DE AGAROSA PARA ELECTROFORESIS Y ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO

En cada gel de agarosa al 1% se presentan 10 muestras, mismas que corresponden a la amplificación del gen de actina e iNOS de un animal de cada grupo estudiado. Se realizó una electroforesis a 80 voltios/1hr, para posteriormente teñir los geles con bromuro de etidio y fotodocumentar las imágenes. (Figura 8)

**Figura 8. Colocación de muestras en gel de agarosa para electroforesis y análisis densitométrico**



**Fig. 8. Colocación de las muestras obtenidas por la técnica de PCR, para realizar la electroforesis y posteriormente el análisis densitométrico. En el gel se muestra que para grupo se amplificó el gen Actina e iNOS, para su análisis y comparación.**

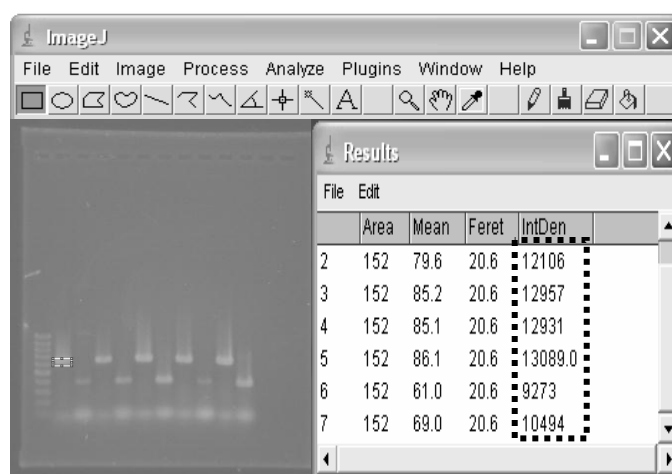
Después de realizar el análisis densitométrico comparando la expresión de iNOS de cada rata con la amplificación de su gen control (Actina) se obtuvo la expresión de iNOS de cada animal. Tomando como referencia los valores presentados por las ratas control (sin lesión, Sham) se obtuvo el valor de expresión relativa de iNOS correspondientes en los animales de los grupos experimentales. La PCR de cada rata se realizó por triplicado, obteniendo el promedio y tomando este valor para llegar al promedio final de cada grupo experimental.



## 12.5. ANEXO V. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO

Se llevó a cabo el análisis con ayuda del programa **Image J**, con el cual se seleccionó un área específica que abarcara la banda de amplificación y eliminando el residuo de amplificación para obtener los valores de densidad del fondo (valor de densidad que el gel emite por la tinción propiamente dicha). Este procedimiento se realizó para cada amplificación. (Figura 9)

**Figura 9. Análisis densitométrico con el programa ImageJ**



Se llevó a cabo el análisis de los datos para poder obtener los valores de expresión relativa. Para tal efecto, primero se restó a cada banda su fondo de tinción (valor tomado de un área fuera de las bandas, de la misma dimensión que estas), lo que nos proporcionó el valor neto. Posteriormente se dividió el valor neto de cada banda de amplificación de iNOS entre el de la banda de actina. De esta manera se obtuvo la expresión de iNOS de cada animal/ grupo. Finalmente se tomó como expresión basal de iNOS el valor presentado por la rata no lesionada (Sham) y de ahí se estableció mediante una regla de tres el número de veces más que se expresó iNOS en los grupos con LTME. Este último valor se consideró como expresión relativa del gen.

Los cálculos de expresión relativa se realizaron individualmente por amplificación; obteniendo un total de 3 valores de expresión relativa por cada animal, los cuales se promediaron para las gráficas.

## 13. REFERENCIAS

1. (1990) Ley general de Salud. Título Séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. pp 430-431. Editorial Porrúa 6ª. México,D.F..
2. Aguayo AJ, Bray GM, Rasminsky M, Zwimpfer T, Carter D, Vidal-Sanz M (1990) Synaptic connections made by axons regenerating in the central nervous system of adult mammals. *J Exp Biol* 153:199-224.
3. Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M (1999) Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:634-639.
4. Aharoni R, Teitelbaum D, Leitner O, Meshorer A, Sela M, Arnon R (2000) Specific Th2 cells accumulate in the central nervous system of mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis by copolymer 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11472-11477.
5. Ahn M, Kang J, Lee Y, Riu K, Kim Y, Jee Y, Matsumoto Y, Shin T (2001) Pertussis toxin-induced hyperacute autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats is correlated with increased expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor alpha. *Neurosci Lett* 308:41-44.
6. Arnon R, Sela M, Teitelbaum D (1996) New insights into the mechanism of action of copolymer 1 in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neurol* 243:S8-13.

7. Balentine JD. (1983) Calcium toxicity as a factor in spinal cord injury. *Surv Synth Path Res* 2:184-193.
8. Balentine JD (1988) Spinal cord trauma: in search of the meaning of granular axoplasm and vesicular myelin. *J Neuropathol Exp Neurol* 47:77-92.
9. 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.
10. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1996) Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol* 139:244-256.
11. Berkowitz M, Harvey C, Greene C, Wilson SE (1992) *The Economic Consequences of Traumatic Spinal Cord Injury*. New York. Demos Publication: 1-120
12. Bethea JR, Castro M, Keane RW, Lee TT, Dietrich WD, Yezierski RP (1998) Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation. *J Neurosci* 18:3251-3260.
13. Blight AR (1994) Effects of silica on the outcome from experimental spinal cord injury: implication of macrophages in secondary tissue damage. *Neuroscience* 60:263-273.
14. Bomstein Y, Marder JB, Vitner K, Smirnov I, Lisaey G, Butovsky O, Fulga V, Yoles E (2003) Features of skin-coincubated macrophages that promote recovery from spinal cord injury. *J Neuroimmunol* 142:10-16.

15. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon J (1990) A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med* 322:1405-1411.
16. Bradbury EJ, Moon LDF, Popat RJ, King VR, Bennett GS (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416:636-640.
17. Braughler JM, Hall ED (1992) Involvement of lipid peroxidation in CNS injury. *J Neurotrauma* 9 Suppl 1:S1-S7.
18. Brown GC, Bal-Price A (2003) Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol* 27:325-355.
19. Bunge RP, Puckett WR, Becerra JL, Marcillo A, Quencer RM (1993) Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Adv Neurol* 59:75-89.
20. Bunge RP, Puckett WR, Hiester ED (1997) Observations on the pathology of several types of human spinal cord injury with emphasis on the astrocyte response to penetrating injuries. *Adv Neurol* 72:305-315.
21. Caggiano AO, Kraig RP (1998) Neuronal nitric oxide synthase expression is induced in neocortical astrocytes after spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:75-87.

22. Camand E, Morel MP, Faissner A, Sotelo C, Dusart I (2004) Long-term changes in the molecular composition of the glial scar and progressive increase of serotonergic fibre sprouting after hemisection of the mouse spinal cord. *Eur J Neurosci* 20:1161-1176.
23. Carpenter BM (1994) *Neuroanatomía*. Panamericana. pp 488. Buenos Aires. Argentina.
24. Carroll MC, Holers VM (2005) Innate autoimmunity. *Adv Immunol* 86:137-157.
25. Christensen MD, Everhart AW, Pickelman JT, Hulsebosch CE (1996) Mechanical and thermal allodynia in chronic central pain following spinal cord injury. *Pain* 68:97-107.
26. Cross AH, Keeling RM, Goorha S, San M, Rodi C, Wyatt PS, Manning PT, Misko TP (1996) Inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity correlate with disease activity in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 71:145-153.
27. Dawson TM, Snyder SH (1994) Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14:5147-5159.
28. De Groot J (1993) *Neuroanatomía Correlativa*. pp.100-130 Ed. Manual Moderno. México.
29. De Groot CJ, Ruuls SR, Theeuwes JW, Dijkstra CD, Van (1997) Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:10-20.

30. De Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 26:202-226.
31. Diaz-Ruiz A, Ibarra A, Perez-Severiano F, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Rios C (2002) Constitutive and inducible nitric oxide synthase activities after spinal cord contusion in rats. *Neurosci Lett* 319:129-132.
32. Ding M, Zhang M, Wong JL, Rogers NE, Ignarro LJ, Voskuhl RR (1998) Antisense knockdown of inducible nitric oxide synthase inhibits induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *J Immunol* 160:2560-2564.
33. Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert RJ, Boulos PT, Ellegala DB, Dumont AS (2001) Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin Neuropharmacol* 24:254-264.
34. Faden AI, Simon RP (1988) A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol* 23:623-626.
35. Fechir M, Linker K, Pautz A, Hubrich T, Kleinert H (2005) The RNA binding protein TIAR is involved in the regulation of human iNOS expression. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 51:299-305.
36. Fenyk-Melody JE, Garrison AE, Brunnert SR, Weidner JR, Shen F, Shelton BA, Mudgett JS (1998) Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated in mice lacking the NOS2 gene. *J Immunol* 160:2940-2946.

37. Fridkis-Hareli M, Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M, Strominger JL (1999) Binding of random copolymers of three amino acids to class II MHC molecules. *Int Immunol* 11:635-641.
38. Friebe A, KD (2003) Regulation of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase. *Circulation Research*. 93-96.
39. Fujimoto T, Nakamura T, Ikeda T, Taoka Y, Takagi K (2000) Effects of EPC-K1 on lipid peroxidation in experimental spinal cord injury. *Spine* 25:24-29.
40. Fuller KG, Olson JK, Howard LM, Croxford JL, Miller SD (2004) Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Methods Mol Med* 102:339-361.
41. Garnier-Suillerot A., Tose L., Paniago E. (1984) Kinetic and mechanism of vesicle lipoperoxide decomposition by Fe (II). *Biochim Biophys Acta* 794:307-312.
42. Gaur A, Boehme SA, Chalmers D, Crowe PD, Pahuja A, Ling N, Brocke S, Steinman L, Conlon PJ (1997) Amelioration of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with altered myelin basic protein peptides involves different cellular mechanisms. *J Neuroimmunol* 74:149-158.
43. Gelderd JB, Quarles JE (1990) A preliminary study of homotopic fetal cortical and spinal cotransplants in adult rats. *Brain Res Bull* 25:35-48.
44. Geneser Finn. (2000) *Histologia Panamericana*. pp 813. Buenos Aires. Argentina.
45. Giulian D, Corpuz M, Chapman S, Mansouri M, Robertson C (1993) Reactive mononuclear phagocytes release neurotoxins after ischemic and traumatic injury to the central nervous system. *J Neurosci Res* 36:681-693.

46. Givalois L, Li S, Pelletier G (2002) Central nitric oxide regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adult male rats. *Brain Res Mol Brain Res* 102:1-8.
47. Goodkin R, Cambell JB (1979) Sequential pathologic changes in spinal cord injury. *Arch Neurol* 30:197-201.
48. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3:23-35.
49. Grimaldi CM, Hicks R, Diamond B (2005) B cell selection and susceptibility to autoimmunity. *J Immunol* 174:1775-1781.
50. Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I, Ceballos H, Ibarra A, Larriva S (1994) Neuroprotection of completely lacerated spinal cord of adult rats by homotopic and heterotopic transplantation. *Restorat Neuro Neurosc* 7:61-70.
51. Gutteridge JM (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41:1819-1828.
52. Guyton A (1994) *Tratado de Fisiología Médica* 7ª edición. Interamericana McGraw Hill. pp 613-614. México.
53. Guzik TJ, Korbut R, Mck-Guzik T (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54:469-487.
54. Hall ED, Springer JE (2004) Neuroprotection and acute spinal cord injury: A reappraisal. *NeuroRx* 1:80-100.
55. Hall FC, Visconti KC, Ahmad RC, Parry SL, Miltenburg AM, McConnell 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.

56. Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Nakauchi K, Niwa M, Kawai Y, Fukuzawa K (1996) Involvement of an intercellular adhesion molecule 1-dependent pathway in the pathogenesis of secondary changes after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 66:1525-1531.
57. Hauben E, Agranov E, Gothilf A, Nevo U, Cohen A, Smirnov I, Steinman L, Schwartz M (2001a) Posttraumatic therapeutic vaccination with modified myelin self-antigen prevents complete paralysis while avoiding autoimmune disease. *J Clin Invest* 108:591-599.
58. Hauben E, Butovsky O, Nevo U, Yoles E, Moalem G, Agranov E, Mor F, Leibowitz-Amit R, Pevsner E, Akselrod S, Neeman M, Cohen IR, Schwartz M (2000a) Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. *J Neurosci* 20:6421-6430.
59. Hauben E, Ibarra A, Mizrahi T, Barouch R, Agranov E, Schwartz M (2001b) Vaccination with a Nogo-A-derived peptide after incomplete spinal-cord injury promotes recovery via a T-cell-mediated neuroprotective response: comparison with other myelin antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15173-15178.
60. Hauben E, Nevo U, Yoles E, Moalem G, Agranov E, Mor F, Akselrod S, Neeman M, Cohen IR, Schwartz M (2000b) Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury. *Lancet* 355:286-287.
61. Heba G, Krzeminski T, Porc M, Grzyb J, Mbinska-Kiec A (2001) Relation between expression of TNF alpha, iNOS, VEGF mRNA and development of heart

failure after experimental myocardial infarction in rats. *J Physiol Pharmacol* 52:39-52.

62. Hiernan M.B. (1998) *El Sistema Nervioso Humano*. Ed. Mc Graw- Hill. Interamericana. México.
63. Hirschberg DL, Moalem G, He J, Mor F, Cohen IR, Schwartz M (1998) Accumulation of passively transferred primed T cells independently of their antigen specificity following central nervous system trauma. *J Neuroimmunol* 89:88-96.
64. 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.
65. Ibarra A, Correa D, Willms K, Merchant MT, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I (2003) Effects of cyclosporin-A on immune response, tissue protection and motor function of rats subjected to spinal cord injury. *Brain Res* 979:165-178.
66. Ibarra A, Hauben E, Butovsky O, Schwartz M (2004) The therapeutic window after spinal cord injury can accommodate T cell-based vaccination and methylprednisolone in rats. *Eur J Neurosci* 19:2984-2990.
67. Ignarro LJ (2002) Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 53:503-514.
68. Ikeda Y, Long DM (1990) The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* 27:1-11.

69. Isaksson J, Farooque M, Olsson Y (2004) Improved functional outcome after spinal cord injury in iNOS-deficient mice. *Spinal Cord*. 28-32
70. Jakeman L, Reier PJ (1987) The response of corticospinal tract fibers following injury and transplantation in the adult rat spinal cord. *Soc Neurosci Abstr* 13:750.
71. Jameson SC, Bevan MJ (1995) T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity* 2:1-11.
72. Jones TB, Ankeny DP, Guan Z, McGaughy V, Fisher LC, Basso DM, Popovich PG (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.
73. Jones TB, Basso DM, Sodhi A, Pan JZ, Hart RP, MacCallum RC, Lee S, Whitacre CC, Popovich PG (2002) Pathological CNS autoimmune disease triggered by traumatic spinal cord injury: implications for autoimmune vaccine therapy. *J Neurosci* 22:2690-2700.
74. Kahl KG, Schmidt HH, Jung S, Sherman P, Toyka KV, Zielasek J (2004) Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice with a targeted deletion of the inducible nitric oxide synthase gene: increased T-helper 1 response. *Neurosci Lett* 358:58-62.
75. Kersh GJ, Allen PM (1996) Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. *Nature* 380:495-498.

76. Kim S, Moon C, Wie MB, Kim H, Tanuma N, Matsumoto Y, Shin T (2000) Enhanced expression of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in autoimmune encephalomyelitis. *J Vet Sci* 1:11-17.
77. Kim SU, De VJ (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81:302-313.
78. Kipnis J, Mizrahi T, Hauben E, Shaked I, Shevach E, Schwartz M (2002a) Neuroprotective autoimmunity: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15620-15625.
79. Kipnis J, Mizrahi T, Yoles E, Ben-Nun A, Schwartz M (2002b) Myelin specific Th1 cells are necessary for post-traumatic protective autoimmunity. *J Neuroimmunol* 130:78-85.
80. Kipnis J, Nevo U, Panikashvili D, Alexandrovich A, Yoles E, Akselrod S, Shohami E, Schwartz M (2003) Therapeutic vaccination for closed head injury. *J Neurotrauma* 20:559-569.
81. Kipnis J, Schwartz M (2002) Dual action of glatiramer acetate (Cop-1) in the treatment of CNS autoimmune and neurodegenerative disorders. *Trends Mol Med* 8:319-323.
82. 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* 97:7446-7451.

83. Kipnis J, Yoles E, Schori H, Hauben E, Shaked I, Schwartz M (2001) Neuronal survival after CNS insult is determined by a genetically encoded autoimmune response. *J Neurosci* 21:4564-4571.
84. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY (2003) Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F178-F190.
85. Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
86. Lali HS, Sekhon LH, Fehlings MG (2001) Epidemiology demographics and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* 26:s2-s12.
87. Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Dupont H, Widmann C, Lazdunski M (2000) Prevention of ischemic spinal cord injury: comparative effects of magnesium sulfate and riluzole. *J Vasc Surg* 32:179-189.
88. Lazarov-Spiegler O, Solomon AS, Zeev-Brann AB, Hirschberg DL, Lavie V, Schwartz M (1996) Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. *FASEB J* 10:1296-1302.
89. Lemke M, Demediuk P, McIntosh TK, Vink R, Faden AI (1987) Alterations in tissue Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> and spinal cord edema following impact trauma in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 147:1170-1175.
90. Lewitus GM, Kipnis J, Avidan H, Ben-Nun A, Schwartz M (2001) Neuroprotection induced by mucosal tolerance is epitope-dependent: Conflicting effects in different strains. *Journal of Neuroimmunology*. 175, 1-2: 31-38

91. Li H, Wallerath T, Forstermann U (2002) Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 7:132-147.
92. Liu C, Jin A, Zhou C, Chen B (2001) Gene expression of inducible nitric oxide synthase in injured spinal cord tissue. *Chin J Traumatol* 4:231-233.
93. Liu C, Jin A, Zhou C, Chen B (2002) Nitric oxide synthase gene expression in injured spinal cord tissue. *Chin Med J (Engl)* 115:740-742.
94. Lopez Jaramillo P. (2001) Oxido Nitrico y Dolor. *MedUNAB*.4(10): 31-37
95. Lotan M, Schwartz M (1994) Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. *FASEB J* 8:1026-1033.
96. Martinon S, Garcia E, Flores N, Gonzalez I, Ortega T, Buenrostro M, Reyes R, Fernandez-Presas AM, Guizar-Sahagun G, Correa D, Ibarra A (2007) Vaccination with a neural-derived peptide plus administration of glutathione improves the performance of paraplegic rats. *European Journal of Neuroscience* 26:403-412.
97. Matute C, Alberdi E, Domercq M, Pérez- Cerdá F, Pérez- Samartin A, Sanchez-Gómez M.V. (2001) The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends in Neurosciences* 24:224-229.
98. McPhail LT, Plunet WT, Das P, Ramer MS (2005) The astrocytic barrier to axonal regeneration at the dorsal root entry zone is induced by rhizotomy. *Eur J Neurosci* 21:267-270.

99. Mendez II, Chung YH, Jun HS, Yoon JW (2004) Immunoregulatory role of nitric oxide in Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in DR-BB rats. *J Immunol* 173:1327-1335.
100. Micheli F. (2000) *Neurología. Panamericana*. Buenos Aires. Argentina
101. Miller A, Shapiro S, Gershtein R, Kinarty A, Rawashdeh H, Honigman S, Lahat N (1998) Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. *J Neuroimmunol* 92:113-121.
102. Milner EC, Anolik J, Cappione A, Sanz I (2005) Human innate B cells: a link between host defense and autoimmunity? *Springer Semin Immunopathol.* 2005 March; 26 (4): 433-452
103. Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M (1999a) Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 5:49-55.
104. Moalem G, Monsonogo A, Shani Y, Cohen IR, Schwartz M (1999b) Differential T cell response in central and peripheral nerve injury: connection with immune privilege. *FASEB J* 13:1207-1217.
105. Moalem G, Xu K, Yu L (2004) T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience* 129:767-777.
106. Moon C, Ahn M, Jee Y, Heo S, Kim S, Kim H, Sim KB, Koh CS, Shin YG, Shin T (2004) Sodium salicylate-induced amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats is associated with the suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenases. *Neurosci Lett* 356:123-126.

107. Mueller CA, Schluesener HJ, Conrad S, Meyermann R, Schwab JM (2003) Spinal cord injury induces lesional expression of the proinflammatory and antiangiogenic cytokine EMAP II. *J Neurotrauma* 20:1007-1015.
108. Nakahara S, Yone K, Setoguchi T, Yamaura I, Arishima Y, Yoshino S, Komiya S (2002) Changes in nitric oxide and expression of nitric oxide synthase in spinal cord after acute traumatic injury in rats. *J Neurotrauma* 19:1467-1474.
109. Nakajima K, Tohyama Y, Kohsaka S, Kurihara T (2001) Ability of rat microglia to uptake extracellular glutamate. *Neurosci Lett* 307:171-174.
110. Narayan R.Bhat, Peisheng Zhang, John C Lee, Edward L.Hogan (1998) Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Subgroups of Mitogen-Activated Protein Kinases Regulate Inducible Nitric Oxide Synthase and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Gene Expression in Endotoxin-Stimulated Primary Glial Cultures. *Journal of Neuroscience* 18:1633-1641.
111. 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.
112. Newman W S (2003) Neuroanatomía y Neurofisiología clínicas de Manter y Gatz. Manual Moderno.
113. Novikov L, Novikova L, Kellerth JO (1997) Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neuroscience* 79:765-774.
114. Okuda Y, Nakatsuji Y, Fujimura H, Esumi H, Ogura T, Yanagihara T, Sakoda S (1995) Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the



central nervous system of mice correlates with the severity of actively induced experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 62:103-112.

115. Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, Yanagihara T (1997) Nitric oxide via an inducible isoform of nitric oxide synthase is a possible factor to eliminate inflammatory cells from the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 73:107-116.
116. Pal E, Tabira T (2002) Autonomic regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: the role of interferon-gamma. *Neuroimmunomodulation* 10:80-84.
117. Parslow GT, Stites PD, Terr IA, Imboden B.J (2001) *Inmunología básica y clínica. Manual Moderno.*
118. Popovich PG, Guan Z, Wei P, Huitinga I, Van RN, Stokes BT (1999) Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 158:351-365.
119. Popovich PG, Jones TB (2003) Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. *Trends Pharmacol Sci* 24:13-17.
120. Popovich PG, Stokes BT, Whitacre CC (1996) Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. *J Neurosci Res* 45:349-363.
121. Popovich PG, Wei P, Stokes BT (1997a) Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol* 377:443-464.

122. Popovich PG, Yu JY, Whitacre CC (1997b) Spinal cord neuropathology in rat experimental autoimmune encephalomyelitis: modulation by oral administration of myelin basic protein. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:1323-1338.
123. Pozza M, Bettelli C, Aloe L, Giardino L, Calza L (2000) Further evidence for a role of nitric oxide in experimental allergic encephalomyelitis: aminoguanidine treatment modifies its clinical evolution. *Brain Res* 855:39-46.
124. Purves D. (2001) *Neuroscience*. pp 681. Sinauer Associates, Inc. USA.
125. Putheti P, Soderstrom M, Link H, Huang YM (2003) Effect of glatiramer acetate (Copaxone) on CD4+CD25high T regulatory cells and their IL-10 production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 144:125-131.
126. Rao P, Segal BM (2004) Experimental autoimmune encephalomyelitis. *Methods Mol Med* 102:363-375.
127. Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M (1998) Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 4:814-821.
128. Revesz T, Kidd D, Thompson AJ, Barnard RO, McDonald WI (1994) A comparison of the pathology of primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Brain* 117 ( Pt 4):759-765.
129. Rhoney DH, Luer MS, Hughes M, Hatton J (1996) New pharmacologic approaches to acute spinal cord injury. *Pharmacotherapy* 16:382-392.

130. Roitt I, Brostoff J, Male D. (1996) Immunology. Mosby, New York.
131. Roitt I, Brostoff J, Male D (1996) T cell Receptors and MHC molecules. In: Immunology .Mosby, Barcelona , Spain.
132. Rosenberg LJ, Teng YD, Wrathall JR (1999) Effects of the Sodium Channel Blocker Tetrodotoxin on Acute White Matter Pathology After Experimental Contusive Spinal Cord Injury. J Neurosci 19:6122-6133.
133. Rothwell NJ, Relton JK (1993) Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the CNS. Neurosci Biobehav Rev 17:217-227.
134. Sahrbacher UC, Lechner F, Eugster HP, Frei K, Lassmann H, Fontana A (1998) Mice with an inactivation of the inducible nitric oxide synthase gene are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. Eur J Immunol 28:1332-1338.
135. Santambrogio L, Benedetti M, Chao MV, Muzaffar R, Kulig K, Gabellini N, Hochwald G (1994) Nerve growth factor production by lymphocytes. J Immunol 153:4488-4495.
136. Schori H, Kipnis J, Yoles E, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, Schwartz M (2001) Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. Proc Natl Acad Sci U S A 98:3398-3403.
137. Schwartz M (2001) T cell mediated neuroprotection is a physiological response to central nervous system insults. J Mol Med 78:594-597.

138. Schwartz M, Cohen IR (2000) Autoimmunity can benefit self-maintenance. *Immunol Today* 21:265-268.
139. Schwartz M, Moalem G, Leibowitz-Amit R, Cohen IR (1999) Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci* 22:295-299.
140. Schwartz M, Shaked I, Fisher J, Mizrahi T, Schori H (2003) Protective autoimmunity against the enemy within: fighting glutamate toxicity. *Trends Neurosci* 26:297-302.
141. Schweizer M, Richter C (1994) Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. *Biochem Biophys Res Commun* 204:169-175.
142. 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.
143. Sharma HS, Westman J, Olsson Y, Alm P (1996) Involvement of nitric oxide in acute spinal cord injury: an immunocytochemical study using light and electron microscopy in the rat. *Neurosci Res* 24:373-384.
144. Shi FD, Flodstrom M, Kim SH, Pakala S, Cleary M, Ljunggren HG, Sarvetnick N (2001) Control of the autoimmune response by type 2 nitric oxide synthase. *J Immunol* 167:3000-3006.
145. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. (1998) *Basic neurochemistry molecular, cellular and medical aspects*. 6<sup>a</sup> edition. pp 1104. Lippincott Raven; New York.

146. Snell SR (1994) Neuroanatomía clínica. Ed. Médica Panamericana.
147. Snyder HS, Bredt SD (1992) Funciones biológicas del óxido nítrico. Investigación y ciencia.pp 12-20.
148. Stokes BT, Reier PJ (1992) Fetal grafts alter chronic behavioral outcome after contusion damage to the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 116:1-12.
149. Stover SL, Fine PR (1987) The epidemiology and economics of spinal cord injury. *Paraplegia* 25:225-228.
150. Subudhi SK, Alegre ML, Fu YX (2005) The balance of immune responses: costimulation verse coinhibition. *J Mol Med.* 83:193-202
151. Tada Y, Ho A, Matsuyama T, Mak TW (1997) Reduced incidence and severity of antigen-induced autoimmune diseases in mice lacking interferon regulatory factor-1. *J Exp Med* 185:231-238.
152. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, Naruo M, Okabe H, Takatsuki K (1997) Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 79:1177-1182.
153. Taylor-Robinson AW, Liew FY, Severn A, Xu D, McSorley SJ, Garside P, Padron J, Phillips RS (1994) Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol* 24:980-984.
154. Teitelbaum D, Arnon R, Sela M (1999) Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of copolymer 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3842-3847.

155. Teitelbaum D, Arnon R, Sela M (1997) Cop 1 as a candidate drug for multiple sclerosis. *J Neural Transm Suppl* 49:85-91.
156. Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, Nencioni L, Labardi D, Rubartelli A, Cozzolino F, Aloe L, Garaci E (1996) Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 85:345-356.
157. Tortora G., Derrickson B. (2006) *Principios de Anatomia y Fisiologia*. Panamericana.
158. Van Landeghem FK, Stover JF, Bechmann I, Bruck W, Unterberg A, Buhner C, Von DA (2001) Early expression of glutamate transporter proteins in ramified microglia after controlled cortical impact injury in the rat. *Glia* 35:167-179.
159. Vercelli D (2003) Arginase: marker, effector, or candidate gene for asthma? *J Clin Invest* 111:1815-1817.
160. Vladutiu AO (1995) Role of nitric oxide in autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 76:1-11.
161. Wamil A W, Wamil B D, Hellerqvist C G (1998) CM 101 mediated recovery of walking ability in adult mice paralyzed by spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13188-13193.
162. Wang CX, Reece C, Wrathall JR, Shuaib A, Olschowka JA, Hao C (2002) Expression of tumor necrosis factor alpha and its mRNA in the spinal cord following a weight-drop injury. *Neuroreport* 13:1391-1393.
163. West NE, Qian H, Guzik TJ, Black E, Cai S, George SE, Channon KM (2001) Nitric oxide synthase (nNOS) gene transfer modifies venous bypass graft

remodeling: effects on vascular smooth muscle cell differentiation and superoxide production. *Circulation* 104:1526-1532.

164. Wong JM, Billiar TR (1995) Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. *Adv Pharmacol* 34:155-170.
165. Wong ML, Bongiorno PB, Rettori V, McCann SM, Licinio J (1997) Interleukin (IL) 1beta, IL-1 receptor antagonist, IL-10, and IL-13 gene expression in the central nervous system and anterior pituitary during systemic inflammation: pathophysiological implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:227-232.
166. Woo MS, Jung SH, Hyun JW, Kim HS (2004) Differential regulation of inducible nitric oxide synthase and cytokine gene expression by forskolin and dibutyryl-cAMP in lipopolysaccharide-stimulated murine BV2 microglial cells. *Neurosci Lett* 356:187-190.
167. Xu J, Kim GM, Chen S, Yan P, Ahmed SH, Ku G, Beckman JS, Xu XM, Hsu CY (2001) iNOS and nitrotyrosine expression after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 18:523-532.
168. Xu M, Ng YK, Leong SK (2000) Neuroprotective and neurodestructive functions of nitric oxide after spinal cord hemisection. *Exp Neurol* 161:472-480.
169. Yoles E, Friedmann I, Barouch R, Shani Y, Schwartz M (2001) Self-Protective mechanism awakened by glutamate in retinal ganglion cells. *J Neurotrauma* 18:339-349.
170. Young MJ, Bresnitz EA, Strom BL (1983) Sample size nomograms for interpreting negative clinical studies. *Ann Intern Med* 99:248-251.

171. Young W (1996) Spinal cord regeneration. *Science* 273:451.
172. Young W, Koreh I (1986) Potassium and calcium changes in injured spinal cords. *Brain Res* 365:42-53.
173. Yu Y, Matsuyama Y, Nakashima S, Yanase M, Kiuchi K, Ishiguro N (2004) Effects of MPSS and a potent iNOS inhibitor on traumatic spinal cord injury. *Neuroreport* 15:2103-2107.
174. Zeman RJ, Feng Y, Peng H, Etlinger JD (1999) Clenbuterol, a beta(2)-adrenoceptor agonist, improves locomotor and histological outcomes after spinal cord contusion in rats. *Exp Neurol* 159:267-273.
175. Zhang Z, Krebs CJ, Guth L (1997) Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. *Exp Neurol* 143:141-152.
176. Zwijnenburg PJ, Polfliet MM, Florquin S, van den Berg TK, Dijkstra CD, van Deventer SJ, Roord JJ, van der PT, van Furth AM (2003) CXC-chemokines KC and macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) synergistically induce leukocyte recruitment to the central nervous system in rats. *Immunol Lett* 85:1-4.

#### Paginas Web

Enciclopedia medica en español. 2001. ADAM. Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU:  
[http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp\\_imagepages/19088.htm](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/19088.htm)