



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**EFFECTO DE LA INTENSIDAD DE LESIÓN DE MÉDULA
ESPINAL SOBRE LA AUTORREACTIVIDAD
PROTECTORA EN RATAS INMUNIZADAS CON A91**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

SILVIA SUSANA MARTIÑÓN GUTIÉRREZ

TUTOR

JOSE JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS

COMITÉ TUTORAL

**GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
ROLANDO EFRAÍN HERNÁNDEZ MUÑOZ**

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

MEXICO D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

A **Dios** que me ha dado vida y salud.

A mis padres **Silvia y Gabriel**, quienes han llenado mi vida de cariño y buenos consejos.

A mis hermanos **Gabriel y Serena**, por el simple hecho de existir.

Pero especialmente al amor de mi vida, mi esposo **Juan Armando**, que siempre me ha apoyado para llevar a cabo todos mis sueños y que me regaló un par de hijos preciosos

Emilio Armando y Silvia Helena.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Dr. Juan Antonio Ibarra por la confianza que ha depositado en mí durante todos estos años, gracias por tu amistad Toño.

A los Drs. Rolando Hernández Muñoz y Gabriel Gutiérrez Ospina por todos sus consejos y por haberme alojado en sus laboratorios como a un miembro más de su equipo, sin lo cual no hubiera sido posible la conclusión de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la Facultad de Medicina, el Posgrado en Ciencias Biomédicas y CONACyT.

A la Fundación Alberto y Dolores Andrade A.C.

A mi esposo Dr. Juan Armando Reyes Pérez, por toda la comprensión que me brindó para que yo pudiera concluir este trabajo.

A mis hermanos que cooperaron con ideas y en la revisión final de esta tesis: M.V.Z. José Gabriel Martiñón Gutiérrez y L.C. Sonia Serena Martiñón Gutiérrez.

A todos mis compañeros de laboratorio, quienes hicieron de mi estancia en él una divertida aventura: Isabel (mi comadre), Vianney, Elisa, Psyché, Yolanda, Jonathan, Adrián, Mariana, Humberto, Ana Laura y David.

A Proyecto Camina y la gente que hace posible la existencia de este centro: Familia Harari, Dr. Gabriel Guízar Sahagún, Srita. Laura Baldwin, Srs. Luis y Guillermo García, Sr. Fidel López, M.V.Z. Angelina Martínez.

A las ratas.

RESUMEN

La lesión en la médula espinal genera una serie de condiciones autodestructivas en el organismo, desde fallas en el sistema motriz hasta deficiencias a nivel sistémico. Un sistema que puede verse severamente afectado es el inmune. Una estrategia para estimular la regeneración del tejido neural es la manipulación del sistema inmune mediante la aplicación de péptidos neurales modificados, como es el caso de A91, que favorezcan la autorreactividad protectora y en consecuencia la regeneración del tejido lesionado, sin embargo, si el sistema inmune se ve afectado, este proceso autorreactivo protector pudiera no generarse. En este trabajo se evalúa la respuesta autorreactiva protectora en ratas con lesión de médula espinal en dos modelos (contusión y sección) y con dos intensidades (moderada y severa), y se observa que en las ratas con lesiones de intensidad moderada la respuesta autorreactiva protectora se desarrolló de manera satisfactoria. Además, se observó que el fenotipo de linfocitos T predominante fue el Th2 mismos que se caracterizaron por producir factores neurotróficos. En el caso de ratas con lesiones de intensidad severa no se desarrolló respuesta en contra del péptido A91. Finalmente se evaluaron las cantidades relativas de factores neurotróficos en el área de lesión de médulas espinales de ratas con lesión por contusión de intensidad moderada y por sección incompleta, observándose una mayor expresión en las ratas inmunizadas con A91, sobre las ratas del grupo testigo, y el crecimiento axonal en médulas de ratas con sección completa, sin que se observara diferencia estadística entre las ratas tratadas con A91 y las testigo.

ABSTRACT

Spinal cord injury generates a series of autodestructive conditions, from motor system fails until systemic deficiencies. Immune system can be seriously affected. One strategy to favor regeneration after spinal cord injury is the immune system manipulation through the immunization with modified neural peptides like A91, which generate protective autoimmunity and could be favor the regeneration of injured tissue. However, if immune system is affected, the protective autoimmunity probably could not be activated. In this work protective autoimmunity response was evaluated in rats with two models of spinal cord injury (contusion and transection) with two injury intensities (moderate and severe). The results showed that rats with spinal cord injury of moderate intensity developed a specific immune response against A91, satisfactory in phenotype and neurotrophic factors production, while the rats with spinal cord injury of severe intensity did not developed any response against A91. Finally, the amount of neurotropic factors was evaluated. Results showed a higher expression of neurotrophic factors in moderately contused or incompletely transected rats as compared to control ones. Axonal growth was also evaluated in completely transected rats. There was not a significant difference between treated and control rats.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
ÍNDICE	7
ÍNDICE DE FIGURAS y TABLAS.....	8
ANTECEDENTES.....	9
Introducción.....	9
Anatomía y fisiología de la médula espinal.....	11
Anatomía.....	11
Fisiología.....	16
Fisiopatología de la lesión traumática de la médula espinal.....	20
Regeneración del tejido en el sistema nervioso central.....	27
Estrategias para regenerar el tejido lesionado en el SNC.....	31
Autorreactividad protectora.....	39
Autorreactividad.....	39
Autorreactividad protectora.....	41
Mecanismos de acción de A91.....	43
Planteamiento del problema.....	46
Justificación.....	46
Hipótesis.....	47
Objetivo general.....	47
Objetivos particulares.....	48
MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
RESULTADOS.....	60
DISCUSIÓN.....	74
CONCLUSIONES.....	79
PERSPECTIVAS.....	80
BIBLIOGRAFÍA.....	81
ANEXO: ABREVIATURAS.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Tabla 1: Diseño experimental.</i>	52
<i>Tabla 2: Escala de evaluación locomotora a campo abierto (BBB).</i>	57
<i>Figura 1: Evaluación de la respuesta autorreactiva protectora.</i>	59
<i>Figura 2: Fenotipificación de la respuesta inmune.</i>	61
<i>Figura 3: Producción de BDNF en sobrenadante de cultivo celular.</i>	63
<i>Figura 4: Producción de NT-3 en sobrenadante de cultivo celular.</i>	64
<i>Figura 5: Niveles de BDNF en el epicentro de lesión 21 días después de la lesión de médula espinal en ratas.</i>	66
<i>Figura 6: Niveles de NT-3 en el epicentro de lesión 21 días después de la lesión de médula espinal en ratas.</i>	67
<i>Figura 7: Niveles de BDNF en el epicentro de lesión 120 días después de la lesión de médula espinal en ratas.</i>	68
<i>Figura 8: Niveles de NT-3 en el epicentro de lesión 120 días después de la lesión de médula espinal en ratas.</i>	69
<i>Figura 9: Evaluación de la recuperación de la función motora.</i>	71
<i>Figura 10: Número de axones en crecimiento en el epicentro de la lesión.</i>	73

ANTECEDENTES

❖ *Introducción*

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) es una enfermedad ocasionada principalmente por accidentes automovilísticos (76%), caídas incluyendo accidentes deportivos (17%), y accidentes laborales (7%). (SVAT, 2008)

Se observa mayormente en hombres que en mujeres en una relación 3:1; y el rango de edad más frecuente de presentación es entre los 15 y los 37 años. (Ávila-Castillo, 2004)

La mortalidad a causa de las lesiones de médula espinal sigue siendo muy alta (10-18%) a pesar de los avances que se han observado en el tratamiento de este tipo de padecimiento. (SVAT, 2008)

La distribución por niveles es 39% cervical (principalmente C4 a C6), 35% dorsal (T4 y T5), 10% dorso-lumbar (T12-L1) y 16% lumbar. (SVAT, 2008)

Se considera una enfermedad especialmente trágica debido a la repercusión física, mental y social que sufren el paciente y su familia, pues les es muy difícil aceptar su nueva situación, ocasionando desórdenes afectivos. Además que les es muy complicado reincorporarse a su actividad económica previa al traumatismo. (Paterniti, 2010)

Para los sistemas de salud también resulta una enfermedad muy cara económicamente hablando, pues los pacientes requieren de cuidados por parte de personal capacitado y equipos especiales para su atención y posterior rehabilitación.

Los tratamientos para estos pacientes hasta antes de la Segunda Guerra Mundial estaban encaminados a la estabilización de la columna vertebral, sin considerar la lesión neurológica, afortunadamente la tendencia actual es ofrecer tratamientos que protejan el tejido que no resultó dañado con la lesión primaria, pero que por encontrarse adyacente a la lesión es susceptible a sufrir degeneración secundaria, además de establecer procedimientos terapéuticos que ofrezcan las condiciones necesarias para que el tejido lesionado pueda regenerarse. (González, 2006)

En el presente trabajo se utiliza un péptido neural modificado conocido como A91 para favorecer un microambiente propicio para la recuperación después de una lesión en la médula espinal. El A91 ha demostrado tener características neuroprotectoras en animales con lesión traumática de médula espinal (Martíñón, 2007) favoreciendo la recuperación motora, la supervivencia de neuronas y la preservación de axones en la zona lesionada. En este estudio se pretende demostrar que la inmunización con el péptido neural modificado A91 puede mejorar la producción de neurotrofinas en la zona de lesión lo que probablemente favorecería la regeneración del tejido después de una lesión en la médula espinal.

❖ *Anatomía y fisiología de la médula espinal.*

Anatomía:

La médula espinal se localiza en el conducto raquídeo y en el adulto se extiende desde la primera vértebra cervical hasta cerca de la duodécima vértebra torácica. Tanto la columna vertebral como la médula espinal se encuentran divididas en segmentos: cervical, torácico, lumbar, sacro y coccígeo. Los nervios periféricos que inervan la mayor parte del cuerpo surgen de la médula espinal como 31 pares de nervios segmentarios. La información sensitiva transmitida por los axones aferentes en los nervios periféricos ingresa a la médula espinal a través de las raíces dorsales, las órdenes motoras transmitidas por los axones eferentes abandonan la médula espinal a través de las raíces ventrales. Una vez que las raíces se unen, los axones sensitivos y motores viajan juntos en los nervios espinales segmentarios (salvo algunas excepciones). (Purves, 2003)

La región cervical de la médula espinal da origen a ocho nervios cervicales (C1 a C8), la torácica a 12 nervios torácicos (T1-T12), la lumbar a cinco nervios lumbares (L1-L5), la sacra a cinco nervios sacros (S1-S5) y la coccígea a un nervio coccígeo. (López-Antunes, 1980)

Los nervios segmentarios abandonan la columna vertebral a través de los agujeros intervertebrales que se ubican adyacentes al cuerpo de la vértebra y se numeran de la misma manera. Dado que la médula es considerablemente más corta que la columna vertebral, los nervios lumbares y sacros recorren cierta distancia en el conducto raquídeo antes de salir, formando una colección de raíces nerviosas conocida como la cola de caballo. (López-Antunes, 1980)

La médula espinal presenta dos ensanchamientos donde se acomodan la mayor cantidad de células y conexiones nerviosas necesarias para procesar la información relacionada con las extremidades superiores e inferiores. El ensanchamiento más craneal es el llamado ensanchamiento cervical y abarca desde C5 hasta T1; el ensanchamiento más caudal es el ensanchamiento lumbar que incluye los segmentos L2 a S3. (Ryan, 2005)

Si se hace un corte transversal de la médula espinal se puede observar que está formada por la sustancia blanca rodeando a la sustancia gris. Las vías de la sustancia blanca se encuentran subdivididas en los cordones dorsales, laterales y ventrales, cada uno de los cuales se encuentra formado por haces de axones con funciones específicas. Los cordones laterales incluyen los axones que viajan desde la corteza cerebral para hacer contacto con las neuronas motoras espinales, formando así la principal extensión caudal de las pirámides bulbares. Los cordones dorsales transmiten información sensitiva ascendente desde los mecanorreceptores somáticos mientras que los cordones ventrales y ventrolaterales transmiten tanto información termoalgésica ascendente como información motora descendente. La sustancia gris de la médula espinal está dividida en las “astas” dorsales y ventrales. Las neuronas del asta dorsal reciben información sensitiva que ingresa a la médula espinal a través de las raíces dorsales de los nervios espinales. Las astas ventrales

contienen los cuerpos celulares de las neuronas motoras que envían axones a través de las raíces ventrales para terminar sobre los músculos estriados. Por lo tanto, una regla general de la organización de la médula espinal es que las neuronas que procesan la información sensitiva se localizan dorsalmente, mientras que las neuronas motoras somáticas se localizan centralmente. Las neuronas preganglionares del sistema nervioso autónomo se localizan en una zona intermedia entre las astas dorsales y ventrales. (Lesson y Lesson, 1990)

La médula espinal se encuentra recubierta por tres capas meníngeas (piamadre, aracnoides y duramadre) al igual que el encéfalo. Las tres capas se extienden a lo largo de las raíces nerviosas hasta los agujeros de conjunción.

La piamadre es la más próxima a la superficie medular y penetra en el surco anterior y posterior de la misma, tal como ocurre en la superficie del encéfalo. La piamadre está engrosada lateralmente entre las raíces nerviosas, originando un ligamento dentado, denominado así por las proyecciones dentadas que presenta y que se insertan en la duramadre de manera intercalada. Inferiormente la piamadre se engrosa por la presencia de cierta cantidad de tejido de la neuroglía, constituyendo el *filum terminale*.

La aracnoides recubre la piamadre y origina un tabique intermedio posterior incompleto. El espacio subaracnoideo, que contiene el líquido cefalorraquídeo, se encuentra entre la aracnoides y la piamadre. Este espacio se extiende a lo largo de las raíces nerviosas hasta los agujeros de conjunción. El espacio subdural es un espacio virtual situado entre las aracnoides y la duramadre y solo contiene un líquido lubricante seroso.

La duramadre es una vaina laxa que envuelve la médula y corresponde a la capa interna de la duramadre craneal. La capa externa del periostio corresponde al periostio de

los cuerpos vertebrales, con un espacio extradural (o epidural) situado entre ambas capas. El espacio epidural contiene tejido areolar laxo, tejido adiposo y un plexo venoso. Se extiende lateralmente una corta distancia, acompañando a los nervios espinales desde los agujeros de conjunción. El saco dural o tecal se extiende inferiormente hasta las vértebras S2. Por debajo de este nivel la aracnoides y duramadre se fusionan con la piamadre en el *filum terminale*. (Ryan, 2005)

El encéfalo se encuentra irrigado desde dos orígenes: las arterias carótidas internas, las cuales nacen en el punto del cuello donde las arterias carótidas comunes se bifurcan y forman las arterias vertebrales. Las arterias vertebrales derecha e izquierda se unen a nivel de la protuberancia sobre la superficie ventral del tronco encefálico para formar la arteria basilar en la línea media, la cual a su vez se une a la irrigación proveniente de las carótidas internas en un anillo arterial en la base del encéfalo denominado polígono de Willis. Las arterias cerebrales posteriores nacen en esta confluencia. La unión de dos fuentes importantes en esta anastomosis arterial mejora las posibilidades de que cualquier región del encéfalo siga recibiendo sangre en el caso de que se ocluya una de las arterias mayores. (Sinescu, 2010)

El suministro de sangre arterial a la médula espinal es provisto por las arterias espinales anterior y posterior, las ramas descendentes de las arterias vertebrales y por las arterias radicales anterior y posterior, surgiendo de los vasos segmentales. (Sinescu, 2010)

La arteria espinal anterior tiene una trayectoria descendente, y está localizada en un doble “pial” a lo largo de la fisura media anterior y suministra sangre a dos tercios de la

médula. Las arterias espinales posteriores están localizadas por detrás de la raíz dorsal de los nervios espinales, ellas proveen sangre a un tercio de la médula espinal. (Ryan, 2005)

Las arterias radicales son ramas de los vasos segmentarios (arterias cervical ascendente, cervical profundo, intercostales, lumbares y sacras) que entran en el canal vertebral pasando a través de los forámenes intervertebrales y dan paso a las ramas radicales anterior y posterior y a la rama meníngea. Las arterias radicales segmentarias proveen sangre a las raíces nerviosas y a la médula. La arteria de Adamkiewicz es la fuente principal de irrigación desde T8 hasta el cono medular. Usualmente se origina entre T9 y L2, en 85% de los casos, y entre T5 y T8 en el otro 15%. La anastomosis de las arterias radicales anterior y posterior con las arterias espinales anterior y posterior forma el plexo vasocorona. (Ryan, 2005)

Las arterias centrales, que se originan de la arteria espinal anterior, de las arterias espinales posteriores y del plexo vasocorona, representan las arterias intrínsecas. La mayor densidad de arterias centrales se encuentra en la región cervical, de 8 a 13 arterias por centímetro mientras que en la región toracolumbar solo se encuentran de 2 a 3 arterias por centímetro (en humanos). (Ryan, 2005)

El drenaje venoso se lleva a cabo a través de una red formada a nivel pial, aquí se recolecta la sangre a través de seis canales venosos localizados a lo largo de la fisura anterior media, el sulcus posterior medio y entre las raíces de los nervios espinales (Sinescu, 2010). Y se drena en un plexo venoso anterior y posterior a la médula, que a su vez drena a lo largo de las raíces nerviosas en las venas segmentarias. Los plexos se comunican con las venas del bulbo, en el agujero magno, las venas vertebrales a nivel cervical, las venas ácigos torácicas y las venas lumbares de la región lumbar (Ryan, 2005).

Fisiología:

La médula espinal tiene la finalidad de transmitir los impulsos nerviosos que vienen de todo el organismo hasta el encéfalo para su interpretación y respuesta.

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

Las señales nerviosas son transmitidas por potenciales de acción, que son cambios rápidos en el potencial de membrana. Cada potencial de acción comienza con un cambio brusco del potencial negativo de reposo normal a un potencial de membrana positivo; luego termina con un cambio casi igualmente rápido, de nuevo hacia el potencial negativo. Para conducir una señal nerviosa el potencial de acción se mueve a lo largo de la fibra hasta que llega al extremo de ésta.

Las etapas sucesivas del potencial de acción son las siguientes:

Periodo de reposo. Es el potencial de membrana en reposo antes de que se produzca el potencial. Durante este periodo se dice que la membrana está “polarizada” por un potencial de membrana muy intenso presente.

Periodo de despolarización. En este momento en forma brusca la membrana se torna muy permeable a los iones de sodio (Na^+), lo que permite que enormes cantidades de

estos fluyan hacia el interior del axón. Se pierde el estado de “polarizado” normal de -90 mV y el potencial se eleva rápido en dirección positiva. Esto se denomina despolarización. En las fibras nerviosas grandes, el potencial de membrana realmente “se excede” más allá del nivel cero y se torna ligeramente positivo. Pero en algunas fibras más pequeñas, así como en muchas neuronas del sistema nervioso central, el potencial simplemente se aproxima a nivel cero y no se excede hacia el estado positivo.

Periodo de repolarización. En algunas diezmilésimas de segundo después de que la membrana se tornó sumamente permeable a los iones de Na^+ , los canales de Na^+ comienzan a abrirse más de lo normal. Luego, la rápida difusión de los iones potasio (K^+) hacia el exterior restablece el potencial de membrana en reposo negativo normal. Esto se denomina repolarización de la membrana. (Guyton, 1997)

Las sinapsis eléctricas se encuentran en todo el sistema nervioso central, incluido el encéfalo. En la estructura generalizada de todas las sinapsis eléctricas, las membranas de dos neuronas comunicantes están extraordinariamente cercanas entre sí y conectadas por un tipo de contacto intercelular denominado **unión en hendidura**. Las uniones en hendidura contienen canales apareados y alineados con precisión en la membrana de cada neurona, de modo que cada par de canales forma un poro. El poro del canal de una unión en hendidura es mucho más grande que los poros de los canales iónicos regulados por voltaje. En consecuencia, distintas sustancias pueden difundir simplemente entre el citoplasma de las neuronas presinápticas y postsinápticas. Las sustancias que pueden ser intercambiadas a través de las uniones en hendidura incluyen los iones, así como moléculas mucho más grandes con pesos moleculares de hasta varios cientos de daltones, incluyendo al adenosil trifosfato (ATP) y otros metabolitos intracelulares como los segundos mensajeros, lo que le

da a la sinapsis eléctrica la facultad de regular el señalamiento intracelular y el metabolismo de las neuronas acopladas.

Las sinapsis 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 neurona que se encuentra “corriente arriba” es la fuente de corriente y se denomina presináptica, la neurona que se encuentra “corriente abajo” se llama postsináptica. Esta disposición permite que la comunicación sea bidireccional, dependiendo de la neurona que sufra la despolarización de membrana.

Las sinapsis eléctricas son extraordinariamente rápidas dado que el flujo pasivo de la corriente a través de la unión en hendidura es casi instantáneo, por lo que la comunicación se desarrolla rápidamente.

En las sinapsis químicas la separación entre neuronas es notablemente mayor a la separación entre neuronas de las sinapsis eléctricas, y la unión se denomina **hendidura sináptica**. La característica clave de las sinapsis químicas es la presencia de unos organelos llamados vesículas sinápticas que se encuentran en el interior de la terminación presináptica. Estas vesículas son esféricas y contienen a los neurotransmisores, sustancias químicas que funcionan como mensajeros entre las neuronas presinápticas y postsinápticas (Purves, 2003). Existen diversos neurotransmisores entre ellos podemos mencionar a las catecolaminas, serotonina, histamina, glutamato, GABA, glicina, los sistemas purinérgicos y los neuropéptidos pero el neurotransmisor más estudiado es la acetilcolina (Siegel, 2006).

La transmisión en las sinapsis químicas se inicia cuando un potencial de acción invade la terminación nerviosa de la neurona presináptica. El cambio en el potencial de

membrana asociado con la llegada del potencial de acción produce la apertura de los canales de calcio regulados por voltaje en la membrana presináptica. Debido al acentuado gradiente de concentración de Ca^{2+} a través de la membrana presináptica (la concentración externa de Ca^{2+} es aproximadamente 10^{-3} M mientras que la concentración interna es de alrededor de 10^{-7} M), la apertura de estos canales produce un influjo rápido de Ca^{2+} en la terminación presináptica. El influjo de Ca^{2+} hace que la concentración citoplasmática en la terminación se eleve desde su nivel normalmente bajo hasta un valor mucho más alto. La elevación de la concentración presináptica de Ca^{2+} permite que las vesículas presinápticas se fusionen con la membrana citoplasmática de la neurona presináptica, dado que este proceso es Ca^{2+} dependiente. La unión de las vesículas hace que su contenido (los neurotransmisores) se libere en la hendidura sináptica. Luego de esta exocitosis, los transmisores difunden en toda la hendidura sináptica y se unen a sus receptores en la membrana de la neurona postsináptica. Con la fijación del neurotransmisor a su receptor específico se abren los canales de la membrana postsináptica. El flujo de corriente resultante inducido por el neurotransmisor altera el potencial de membrana de la neurona postsináptica, aumentando o disminuyendo la probabilidad de que la neurona dispare un potencial de acción.

❖ *Fisiopatología de la lesión traumática de la médula espinal.*

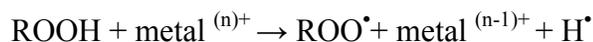
Cuando sucede una lesión traumática de la médula espinal, el traumatismo como tal se conoce como lesión primaria, esta lesión primaria genera una serie de mecanismos autodestructivos en el tejido adyacente conocidos en conjunto como lesión secundaria. La lesión secundaria continúa su desarrollo desde los primeros segundos hasta años después de la lesión (Schwab, 1996), para su estudio se ha dividido en fase aguda, fase de pérdida secundaria de tejido y fase crónica (Hulsebosh, 2002; Tator, 1995). Durante la fase aguda, que comienza con el traumatismo y se prolonga durante varios días, se induce daño al tejido neural directamente por el traumatismo, el impacto produce hemorragia, lo que genera que el flujo sanguíneo al tejido disminuya y se desarrolle necrosis (Sandler, Tator, 1976; Kobrine, 1975). La necrosis se genera en forma centrífuga con desarrollo tanto craneal como caudal, se ha observado que se puede extender una distancia de hasta dos vértebras del sitio de lesión pero puede ser reversible durante las primeras ocho horas después de la lesión (Ropper, 2001). El tejido infartado propaga la necrosis a otras células del sistema nervioso central (SNC) a través de varios mecanismos. El daño ocasionado por la lesión primaria sobre vénulas, arteriolas y capilares limita el flujo de sangre hacia el tejido espinal

(Young, 2002). Inmediatamente después de esto, el infarto se intensifica por mecanismos de daño secundario como son vasoespasmos (Koyanagi, 1993), trombosis (De la Torre, 1981) y choque neurogénico que causa taquicardia, hipotensión, disminución de la resistencia periférica y del rendimiento cardíaco (Guha y Tator, 1988), y que puede producir la muerte de animales de experimentación en cuestión de horas a días y de seres humanos en unas pocas semanas. A nivel celular se manifiesta una pérdida de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa (Bach y Rita, 1993). Esto produce un déficit energético celular, lo que causa necrosis por la depleción del adenosin trifosfato (ATP). Esta depleción de ATP desencadena una serie de mecanismos necróticos, que incluyen la pérdida de la permeabilidad de la membrana celular, descarga del contenido de los lisosomas y activación de enzimas calcio-dependientes autodestructivas, que incluyen proteasas, fosfolipasas, ATPasas y endonucleasas que degradan la membrana citoplasmática y componentes del núcleo celular y citoesqueleto (Cotran, 1999; Tator 1995).

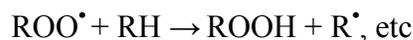
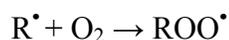
Minutos a horas después de la lesión (fase de pérdida secundaria del tejido) se genera una serie de alteraciones bioquímicas como son la lipoperoxidación y la acumulación de neurotransmisores en la zona de lesión y sus alrededores (Schnell, 1999). Durante la isquemia, la enzima xantina deshidrogenasa dentro de las células endoteliales, sufre una proteólisis limitada que da como resultado la modificación de la enzima a xantina oxidasa, la que, al contrario de su forma original, transfiere electrones a la molécula de oxígeno, lo que genera que las células endoteliales, al ser reexpuestas al oxígeno durante la reperusión sanguínea, generen una reacción enzimática que dará por resultado la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés reactive oxygen species) (Cotran, 1999; Guth, 1999). Estas ROS, junto con las generadas por los neutrófilos (Carlson, 1998) y las

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

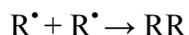
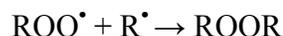
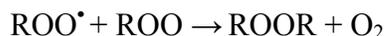
Inicio:



Propagación:



Terminación:



La lipoperoxidación es una reacción en cadena con efectos potencialmente devastadores (Murray, 2001).

La modificación de proteínas es otro mecanismo de muerte celular ocasionado por radicales libres. Esto crea estragos dentro de las células por la oxidación de las cadenas de aminoácidos, causando fragmentación de proteínas por oxidación del esqueleto o formando uniones cruzadas entre proteínas. Finalmente las ROS pueden actuar tanto sobre el DNA nuclear como sobre el mitocondrial ocasionando la separación de sus cadenas (Cotran, 1999).

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

Inicialmente el glutamato se une a sus receptores y causa despolarización. Esto activa canales de sodio voltaje-dependientes, ocasionando una extensa despolarización y un marcado incremento en la concentración de sodio intracelular. La cronicidad de esta respuesta llevará a la liberación de los receptores NMDA de su bloqueo por magnesio, dejándolos disponibles para su activación por glutamato, incrementándose el sodio intracelular. Este desbalance intracelular de iones, ocasionado por el flujo de sodio es corregido por un flujo de iones de cloruro. Además, este intento por restablecer el balance osmótico de la célula lleva un flujo de agua hacia el espacio intracelular ocasionando lisis

(Doble, 1999). De manera alterna, la excitotoxicidad puede matar a las células neuronales por mecanismos calcio-dependientes. Lo que significa que la despolarización crónica lleva consigo un flujo de calcio intracelular vía canales calcio dependientes y la apertura de canales de los receptores NMDA, este flujo se ve incrementado por la movilización del calcio de sus reservorios intracelulares y la operación inversa de intercambio de sodio-calcio de la membrana, como consecuencia se iniciará la activación de enzimas autodestructivas calcio-dependientes (Doble, 1999).

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

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

La apoptosis se puede encontrar en dos fases: la fase temprana es acompañada por necrosis causando la degeneración de múltiples tipos de células, y la fase tardía que se encuentra casi exclusivamente en la materia blanca e involucra a los oligodendrocitos y la microglía (Beattie, 2000). La apoptosis inicialmente ocurre 6 horas después de la lesión

primaria en el centro de la misma y se mantiene por varios días, después de esto el número de células apoptóticas en esta región aumenta firmemente. Sin embargo, en una semana la cuenta de células apoptóticas disminuye en el sitio primario de lesión, pero se incrementa la muerte celular por apoptosis en lugares lejanos a este punto (Crowe, 1997). Bajo ciertas condiciones, como la isquemia y la excitotoxicidad, la apoptosis puede incrementarse como el paso de muerte celular emergente al mismo tiempo que la necrosis está ocurriendo como el proceso degenerativo predominante después de la lesión a la médula espinal (Zipfel, 2000).

Durante las semanas siguientes (fase crónica) continúan disturbios en la organización de las fibras como la fragmentación axonal, desmielinización, degeneración Waleriana, apoptosis de oligodendrocitos y la formación de una cicatriz glial. (Taoka, 1998). En los primeros 15 minutos tras la lesión el tejido periaxonal se hincha empujando las láminas de mielina. En este punto del tiempo sólo se observa daño de la mielina, pero a las veinticuatro horas el contenido axonal puede ser observado en el espacio extracelular. El axoplasma neuronal sufre una transición; primero se observa una apariencia granular con desarreglo de los neurofilamentos y en muchos axones se encuentra abundancia de organelos intracelulares inusuales en esta área. Conforme el tiempo progresa, otros efectos patogénicos dañan a los axones, por ejemplo, la extensa desmielinización y el aborto de conos de crecimiento se incrementan considerablemente, para las veinticuatro horas todos los axones mayores de 40 μm han sido alcanzados por estas condiciones patológicas (Anthes, 1995).

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

❖ *Regeneración del tejido en el sistema nervioso central*

La regeneración en el sistema nervioso central es un proceso comúnmente frustrado por diversos mecanismos. Este proceso ha sido observado desde los estudios de Santiago Ramón y Cajal (1914) quien vio que en lesiones de médula espinal se presentaba un crecimiento del tejido, pero pasadas dos semanas este crecimiento había sido abortado. Actualmente se sabe que esta limitación en la regeneración del tejido neural está dada por diversas moléculas inhibitorias del crecimiento neural asociadas a las células de la glía, la mielina y la matriz extracelular creando así un ambiente inapropiado (Schmidt, 2003). Las células de la microglía reactivas, así como los astrocitos y los oligodendrocitos reactivos constituyen lo que se conoce como gliosis. La gliosis impide la regeneración del tejido dañado por tres condiciones a) interfiere con la función de los circuitos neuronales residuales, promueve la formación de especies reactivas de oxígeno y estimula la excitotoxicidad, b) evita la remielinización y c) forma una cicatriz fibrogliosa que evita la reconexión axonal (Ye, 2004).

La cicatriz fibrogliosa y el microambiente aledaño, están provistos de moléculas que son potentes generadores de colapso de conos de crecimiento. Estas moléculas sirven para darle rigidez a la cicatriz además de actuar como una barrera mecánica y molecular para el crecimiento axonal y se dividen en dos categorías: a) moléculas inhibitorias asociadas a la mielina y b) moléculas sintetizadas por componentes celulares de la cicatriz fibrogliosa, las

cuales pueden subdividirse a su vez en moléculas inhibitorias del crecimiento de las neuritas y en moléculas inhibitorias del crecimiento axonal. (Fawcett and Asher, 1999; Morgenstern, 2002)

Las moléculas inhibitorias asociadas a la mielina más estudiadas son las proteínas NogoA, OMgp y MAG, pero también podemos encontrar proteínas inhibitorias del crecimiento axonal como semaforinas y netrinas. Las proteínas NogoA, OMgp y MAG son producidas por oligodendrocitos y actúan inhibiendo el crecimiento axonal por mecanismos que no han sido bien definidos. (Cafferty, 2010)

Entre las moléculas inhibidoras del crecimiento de las neuritas se puede mencionar a los proteoglicanos, que son moléculas formadas por unidades de disacáridos con glicosaminoglicanos ácidos en su porción terminal y que están conectados por medio de aminoácidos específicos o por centros proteicos. Los proteoglicanos coindritín sulfato (NG2, neurocano, versicano, brevicano y fosfocano) son los principales representantes de este grupo y se sugiere que inhiben el crecimiento de las neuritas, al atrapar a las moléculas promotoras del crecimiento y previniendo así su interacción con su integrina receptora en el cono de crecimiento (Burg, 1996; Morgenstern, 2002; Jessell and Sanes, 2002). Estudios realizados por Bradbury et al. (2002) demostraron que administrando una molécula inhibidora de estos proteoglicanos se promueve la regeneración axonal.

Entre las moléculas inhibitorias del crecimiento axonal podemos mencionar a un grupo de glucoproteínas denominadas tenascinas (tenascina-C, tenascina-R y tenascina-X), (Fawcett and Asher, 1999). Las tenacinas son glucoproteínas de la matriz extracelular altamente conservadas filogenéticamente (Geffroti, 1995) que participan en diversos sistemas del organismo, por ejemplo se ha observado que en infartos cardíacos se sobre

expresa la glucoproteína tenascina-C, esta glucoproteína influye sobre la forma celular después de un infarto y se ha visto que su expresión aumenta durante procesos inflamatorios y aunque su presencia puede ser benéfica en casos de infarto al miocardio o aneurisma aórtico abdominal (Celik, 2011), este efecto no se ha demostrado en SNC, específicamente, en lesión de médula espinal se ha visto que impide la regeneración funcional del tejido (Schweitzer, 2005).

Tenascina-R es otra glucoproteína de la matriz extracelular, esta es expresada por oligodendrocitos y subpoblaciones de neuronas en el SNC adulto de vertebrados, se acumula alrededor de los nódulos de Ranvier y espacios perineuronales rodeando motoneuronas y subpoblaciones de interneuronas, en los axones mielinizados del SNC actúa como modulador funcional de la subunidad β de los canales de sodio voltaje-dependientes, pero inhibe el crecimiento y plasticidad de axones después de una lesión en la médula espinal (Apostolova, 2006).

Finalmente tenascina-X está más relacionado con la fisiología de nervios periféricos que con SNC en adultos. (Geffrotin, 1995)

La intensa respuesta inflamatoria observada después de una LME contribuye también en forma importante a limitar la regeneración del SNC, pues se sabe que la degeneración Waleriana es un proceso atribuido principalmente a la producción de citocinas que son los mediadores moleculares de la inflamación. Entre las citocinas más involucradas podemos mencionar a TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), IL1- α (interleucina uno alfa) e IL1- β que son producidas por la microglía y que promueven a su vez la migración de macrófagos sanguíneos, los cuales migrarán hacia la zona lesionada,

produciendo a su vez más TNF- α , IL1- α e IL1- β , incrementando con ello la respuesta inmune (Shamash, 2002).

Como podemos observar, la regeneración del tejido en el SNC está siendo limitada por diferentes factores mismos que de alguna forma podrían ser neutralizados para promover un microambiente favorable para la regeneración, una vez que el tejido adyacente a la lesión ha sido protegido.

❖ *Estrategias para regenerar el tejido lesionado en el SNC*

Actualmente el estándar terapéutico después de una lesión traumática en la médula espinal es la administración sistémica del glucocorticoide sintético metilprednisolona. Esta terapia está basada en estudios donde se reporta que mejora la recuperación de animales de experimentación y humanos (Rabchevsky, 2002). Su mecanismo de acción no está bien determinado, pero principalmente reduce la producción de citocinas proinflamatorias (Xu, 1998) y la lipoperoxidación (LP) (Díaz-Ruiz, 2000; Limbourg, 2002); Es importante mencionar a la metilprednisolona debido a que en la práctica clínica es muy utilizada, no solo en el tratamiento de la lesión de médula espinal, si no en diversos padecimientos de la materia blanca como esclerosis múltiple y encefalitis aguda diseminada. Metilprednisolona es un glucocorticoide sintético con potentes propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. (Lee JM, 2008) que en diversos estudios ha demostrado ofrecer neuroprotección al tejido neural después de una lesión en la médula espinal (Xu, 1998; Rabchevsky, 2002; Li, 2003; Kim, 2004; Lee, 2005;) aunque recientemente se ha descubierto que la protección está más dirigida a los oligodendrocitos que a las neuronas (Lee, 2008).

La metilprednisolona se encuentra como una opción para el tratamiento de la lesión de médula espinal aguda a dosis muy altas (30 mg por kilogramo de peso dentro de las primeras 8 horas después de la lesión seguido por una infusión de 5.4 mg por kg de peso cada 45 minutos durante las siguientes 23 horas) (Hugenholtz, 2002).

Es importante enfatizar los efectos tóxicos a nivel sistémico que los glucocorticoides aplicados en dosis masivas suelen producir, por ejemplo hipertensión, incremento en la susceptibilidad a infecciones, alteraciones conductuales y retraso en la cicatrización, entre otros efectos secundarios indeseables, (Goodman, 1990); además, se sabe que puede exacerbar la necrosis neuronal posisquémica e inhibir el crecimiento axonal (Bracken, 1993), lo que nos obliga a continuar buscando tratamientos.

Las estrategias que se han utilizado para proporcionar condiciones favorables al tejido neural para que puedan llevarse a cabo procesos de regeneración son muy diversas y con resultados muy variables.

Entre estos tratamientos el uso de trasplantes de células y tejidos a la zona de la lesión es una estrategia utilizada tanto experimentalmente como en la práctica clínica, por lo que tiene una especial importancia. Por ejemplo, el uso de células modificadas genéticamente como es el caso de fibroblastos productores de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF del inglés brain derived neurotrophic factor) que generaron recuperación funcional del tejido después de la lesión en ratas adultas. (Murray, 2002).

El trasplante de células no modificadas genéticamente también ha sido utilizado, como por ejemplo las células de la pulpa dental humana que tienen la capacidad de expresar factores neurotróficos y marcadores embrionarios además de ser de fácil obtención, recientemente fueron empleadas en un estudio realizado por Almeida y col. (2011) en ratones con lesión de médula espinal por compresión y observaron mayor preservación de la materia blanca, mayor expresión de factores neurotróficos en el sitio de lesión así como tejido mejor organizado en comparación con los ratones testigo.

El trasplante de nervio periférico a la médula espinal para reconstruir el área dañada es otra estrategia y cuando se utiliza en combinación con el trasplante de células madre, conocidas como *stem cells*, en el sitio de lesión, principalmente de *stem cells* embrionarias que remielinizan los axones afectados se obtienen mejores resultados. (Myckatyn, Mackinnon; McDonald, 2004)

Las *stem cells* son muy estudiadas pues ofrecen la posibilidad de diferenciarse a casi cualquier célula, aunque tienen la desventaja de ser muy lábiles y necesitar de factores específicos para su diferenciación hacia la estirpe celular necesarias en el sitio de lesión, por ello es común encontrar trabajos en que se usan *stem cells* en combinación con alguna sustancia que ayude en este proceso de diferenciación.

Zhang y colaboradores (2010) aplicaron *stem cells* mesenquimales tratadas con trans-ácido retinoico y modificadas genéticamente para sobreexpresar neurotrofina 3 en ratas con la médula espinal seccionada y descubrieron que este tratamiento a las *stem cells* favoreció la diferenciación neuronal, lo que influyó en una mejor recuperación motora, menor tamaño de la zona de lesión, regeneración axonal limpia y más supervivencia de neuronas.

Las *stem cells* también pueden ser obtenidas del cordón umbilical, Hu y colaboradores (2010) utilizaron estas células derivadas de cordón umbilical humano en ratas con lesión de médula espinal para generar recuperación de la función motora, acompañado de un incremento en el número de neurofilamentos y de estructuras tipo conos de crecimiento, además de incrementar las concentraciones de factor de crecimiento derivado de la glía y de neurotrofina 3 en la médula espinal. Finalmente encontraron menor

cantidad de astrocitos reactivos tanto craneal como caudalmente al sitio de aplicación de las células madre.

Otra estirpe celular utilizada son las células de Schwann, células pertenecientes al sistema nervioso periférico, encargadas de la mielinización de los nervios. (Lesson, 1990)

Se han empleado células de Schwann en la zona de la lesión pues estas actúan como un puente para la regeneración axonal, ya que pueden atravesar quistes y potencialmente rodear la cicatriz glial y de esta manera permitir la reconexión de axones, así a través del uso de trasplantes de células de Schwann se permite la remielinización, y cuando se combina con neurotrofinas se induce una regeneración motora funcional. (Xu et al 1995a, Xu, 1995b, Xu, 1998). Además se ha encontrado evidencia de que las células de Schwann aumentan la regeneración al inhibir la expresión de moléculas inhibitorias en la zona de la lesión producidas por astrocitos (como pueden ser los proteoglicanos de coindritin sulfato) (Plant, 2001), además de reducir la gliosis (Davies, 2011). En un estudio realizado por Zhang y colaboradores (2011) realizaron co-trasplantes de células de Schwann y células estromales de médula ósea y obtuvieron menor amplitud de las cavidades quísticas, se promovió la regeneración axonal, y la recuperación funcional fue más eficiente en relación al testigo y a los tratamientos aplicados de manera independiente.

En un estudio actual se diferenciaron células precursoras de astrocitos en astrocitos que expresan conexina 43 (CX43), transportador 1 para glutamato (GLT-1) y factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), cuando estas células fueron trasplantadas en el área de lesión se generó una mejor recuperación de la motilidad, crecimiento axonal y un notable incremento en la supervivencia de neuronas, en comparación con las ratas a las que se les aplicaron células precursoras de astrocitos sin diferenciar. (Davies, 2011)

El uso de factores tróficos para estimular la regeneración del tejido después de una lesión en la médula espinal es otra estrategia utilizada experimentalmente.

En un trabajo se utilizó factor neurotrófico ciliar (CNTF del inglés ciliary neurotrophic factor) con el que disminuyó significativamente el tejido dañado además de favorecer la recuperación funcional después de una lesión traumática en la médula espinal de ratas. (Ye, 2004)

Recientemente se publicó un trabajo donde se utilizaron puentes de microcápsulas de poli(lactida-co-glicólido) que contenían factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), con esto estimularon el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y aunque no se observó un crecimiento a través de los puentes implantados, si se vio una disminución en el daño ocasionado por la isquemia, además de ofrecer un ambiente que podría ser favorable para la aplicación de tratamientos celulares. (De Laporte, 2011)

La aplicación de factor de crecimiento ácido para fibroblastos (aFGF) a primates no humanos con lesión de médula espinal en combinación con la aplicación de un trasplante de nervio periférico acompañado por terapia física favoreció la recuperación motora de los individuos tratados en comparación con los pertenecientes al grupo testigo. (Ma, 2010)

Dentro de las estrategias adoptadas para regenerar el tejido las de tipo farmacológico son muy estudiadas.

Entre estos fármacos estudiados se puede encontrar a los conocidos como ligandos de inmunofilinas. Las inmunofilinas son proteínas intracelulares con actividades

enzimáticas. Se encuentran 50 veces más en tejido nervioso que en tejido del sistema inmune y son receptores para ciclosporina A, FK506, y rapamicin, sustancias que en conjunto se conocen como ligandos de inmunofilinas (Sosa, 2005).

Ciclosporina A es un quimioterapéutico utilizado para el tratamiento de pacientes con trasplantes de órganos como corazón, hígado, riñón, pulmón, entre otros. Tiene efecto depresor sobre el sistema inmune por lo que se inhibe el rechazo al trasplante. Por este efecto inmunodepresor ha sido utilizada experimentalmente en el tratamiento de la lesión de médula espinal con resultados variables (Ibarra, 1996, Díaz-Ruiz, 1999; Díaz-Ruiz, 2000; McMahon, 2009, Lü, 2010).

FK506 también conocido como tacrolimus, es un macrólido aceptado por la FDA para su uso después de trasplantes de órganos para evitar el rechazo (Avramut, 2003); es un ligando de inmunofilina con actividad inmunosupresora, que al igual que la ciclosporina A se une a inmunofilinas para inhibir la actividad de la enzima peptidil-prolil *cis trans* isomerasa (rotamasa) (Ramírez-Mares, 2009). Tiene efecto sobre la respuesta inmune tanto celular como humoral y en casos de lesión de médula espinal ha dado mejores resultados como neuroprotector que el uso de la metilprednisolona, sin embargo, es importante resaltar que tiene serios efectos adversos como nefrotoxicidad, diabetogénesis y desórdenes linfoproliferativos. (Zhang, 2009).

Rapamicin es un fármaco inmunosupresor que actúa inhibiendo a una molécula conocida como mTOR (del inglés mamalian target of rapamycin) una serin-treonin protein cinasa que regula varias rutas de señalización intracelulares, a través de la traducción de mRNA. Estas rutas involucran la activación de mTOR-dependiente de la proteína ribosomal de 70kDa S6 cinasa (p70S6K) así como la activación del represor de traducción

del mRNA factor de iniciación eucariótica 4E (eIF4E), ligando de la proteína 4EBP, por lo que la actividad de mTOR se modifica en una amplia gama de estados patológicos como cáncer y Alzheimer. Su uso en casos de lesión traumática de la médula espinal ha disminuido el dolor en ratas adultas y la inmunorreactividad que se desarrolla en la zona de lesión. (Asante, 2010)

Otro grupo de fármacos estudiado para favorecer la regeneración del tejido neural después de una lesión en la médula espinal son los antagonistas de la vía Rho. Entre estos podemos mencionar el uso de p21^{Cip1/WAF1} citoplasmática, una proteína conocida como inhibidora del ciclo celular, consiguiéndose regeneración funcional en ratas con lesión traumática en la médula espinal. (Tanaka, 2004)

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

Finalmente, se ha propuesto la estimulación de la autorreactividad protectora como una estrategia para ofrecer neuroprotección con excelentes resultados (Hauben, 2003; Martiñón, 2007) por lo que es posible que proporcione también mecanismos de acción

favorables a la regeneración del tejido después de una lesión traumática en la médula espinal.

A pesar de que se han obtenido resultados alentadores con muchas de estas estrategias, la regeneración del tejido después de una lesión en la médula espinal sigue siendo limitada, por lo que es necesario seguir haciendo investigación para ofrecer una cura a los pacientes que padecen esta enfermedad.

❖ *Autorreactividad protectora*

Autorreactividad

El sistema inmune ha evolucionado para protegernos frente a los agentes patógenos, para llevar a cabo esta importante función, existen células inmunes especializadas en diversas actividades, como son células fagocíticas, células equipadas con gránulos con actividad enzimática, células capaces de reconocer un antígeno en particular y con la maquinaria necesaria para montar una respuesta inmune en contra de él.

Durante la ontogenia de las células inmunes desarrollan en forma aleatoria la capacidad para montar respuestas defensivas, a través de la generación de una gran diversidad de anticuerpos producidos por las células B y de receptores de antígeno expresados por las células T (TCR del inglés T cell receptor). Entre esta variedad es fácil encontrar clones de células que sean específicas contra componentes del mismo organismo (células autoinmunes), aún y cuando existen mecanismos para evitar que estas células autoinmunes lleguen a la circulación, como son la selección clonal en timo y en médula ósea. A los mecanismos de “protección” del organismo contra células autoinmunes circulantes se les conoce en conjunto como tolerancia. Los tres sistemas para evitar que los linfocitos autoinmunes monten respuesta contra los antígenos propios son: delección clonal, donde se realiza una eliminación física de las células autoinmunes, anergia clonal, donde se

lleva cabo una regulación negativa de los mecanismos intrínsecos de la respuesta inmunitaria, y supresión, donde se hace una inhibición de la activación celular mediante la interacción con otras células, como las células productoras de citocinas inhibitorias o los linfocitos anti-idiotípicos que reconocen al propio TCR (Roitt, 2000; Abbas, 2004). Aún con todos estos mecanismos es común encontrar células autoinmunes, ésta autorreactividad es considerada como normal, no es patogénica y es perfectamente compatible con la homeostasis.

La autorreactividad 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 (Moreno, 1996). Las enfermedades autoinmunes se producen cuando por alguna razón los mecanismos de tolerancia se ven afectados, por ejemplo, en algunas enfermedades de tipo bacteriano o viral se pueden liberar antígenos del patógeno similares a los del individuo afectado por la infección, a esto se le conoce como “mimetismo antigénico”, desarrollándose una respuesta cruzada contra el patógeno, pero también contra el organismo huésped, si el sistema inmune no logra controlar esta respuesta autoinmune puede llegar a desarrollarse una enfermedad autoinmune. (Goldsby, 2004)

Existe una diversidad de enfermedades autoinmunes, las cuales se pueden solapar entre sí, es decir un individuo puede padecer más de una enfermedad autoinmune a la vez. Las enfermedades autoinmunes pueden ser específicas de órgano como la tiroiditis de Hashimoto, el mixedema primario, la tirotoxicosis, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, y la diabetes mellitus insulino dependiente; o bien, no específicas de órgano como el lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, escleroderma, la miastenia gravis, artritis reumatoide y la esclerosis múltiple entre otras. (Roitt, 2000)

Autorreactividad protectora

El concepto de autorreactividad protectora fue acuñado por la Dra. Michal Schwartz hace más de 10 años. (Schwartz, 1999)

Consiste en la manipulación del sistema inmune para generar respuestas contra componentes propios del organismo (generalmente modificados en su estructura química), que estén reguladas y se enfoquen a la protección del tejido, en lugar de destruirlo como en el caso de respuestas autoinmunes sin control que pueden derivar en enfermedades autoinmunes.

La autorreactividad protectora ha sido utilizada para tratar diversas enfermedades, por ejemplo: enfermedad de Alzheimer (Frenkel, 2003; Greenberg, 2003, Avidan, 2004), miastenia gravis (Maiti, 2004), encefalomiелitis alérgica experimental (modelo experimental para el estudio de la esclerosis múltiple) (Hammamberg, 2000), enfermedad de Parkinson (Benner, 2004), e incluso en algunos casos de cáncer (Byrne, 2011; Popovic, 2011).

La generación de autorreactividad protectora para preservar el tejido neural después de una lesión en la médula espinal es un tópico interesante que no ha sido estudiado en su totalidad, los mecanismos por los cuales esta respuesta autorreactiva protectora funciona no se encuentran bien definidos, sin embargo, la estimulación de la autorreactividad protectora ha generado respuestas favorables a nivel experimental. Existe clara evidencia por ejemplo de la habilidad de la respuesta inflamatoria para promover la reparación del SNC después de una lesión (Lazarov-Spiegler, 1996; Rapalino, 1998). Adicionalmente, se ha demostrado

el importante papel que desempeña también la respuesta inmune específica en la recuperación del SNC lesionado (Moalem, 1999).

Después de una lesión en el SNC las células T migran hacia el sitio dañado y ahí se acumulan (Schwartz, 1999). Esto hace pensar que dichas células participan de alguna forma en los procesos desarrollados después de la lesión. Algunos estudios han demostrado que la transferencia pasiva de células T específicas para el auto-antígeno MBP reduce el daño neuronal después de una lesión en la médula espinal en roedores, más aún se ha sugerido que en el proceso de protección participan linfocitos T de la estirpe reguladora $CD4^+ CD25^+$ (Hauben, 2000).

La inmunización activa con derivados no encefalitogénicos de péptidos asociados a la mielina como el péptido modificado denominado “A91”, que es un péptido derivado de la proteína básica de la mielina (aminoácidos 87-99) pero con un remplazo en la posición 91 de una lisina por una alanina, puede reducir la degeneración secundaria de neuronas y promover una mejor recuperación motora en animales con lesión de médula espinal (Moalem, 1999; Hauben, 2000). Más aún, estudios han demostrado que esta autorreactividad protectora es un fenómeno fisiológico (Yoles, 2001) que está controlado genéticamente (Kipnis, 2001).

❖ *Mecanismos de acción de A91*

Los linfocitos T CD4⁺ requieren de una gran cantidad de señales originadas por el contacto de marcadores de superficie con moléculas de otras células, por ejemplo, CD3, MHC-II, CD 28, CD40, CD80, CD86 y el mismo receptor TCR, entre otras. De acuerdo con el tipo de moléculas que se expresen en la superficie de la célula presentadora de antígeno, y a la naturaleza del antígeno será la respuesta que el linfocito T CD4⁺ genere. (Nel and Slaughter, 2002)

Es primordial la estructura del antígeno, si el antígeno actúa como un agonista, un agonista parcial o un antagonista, la respuesta por parte del linfocito T será diferente, pudiendo ser una respuesta francamente Th1, Th2, entrar en anergia o incluso y en el peor de los casos generarse delección clonal (Moreno, 1996). Todos estos mecanismos son desencadenados en razón de la señal que el antígeno produzca en el TCR y las señales de transducción que este genere, por ejemplo, un péptido derivado de una proteína nativa puede no generar respuesta, ser ignorado por el TCR, si durante la ontogenia de la célula T este péptido fue presentado como propio, si en cambio, el péptido no había sido presentado durante este periodo de entrenamiento, la célula T puede montar una respuesta en contra de este péptido, es el caso de los péptidos derivados de la proteína básica de la mielina, cuando esta proteína es aplicada en algún organismo sin hacerle ninguna modificación genera una respuesta proinflamatoria conocida como Th1, la cual, de ser exacerbada y no regulada puede llegar a derivar en una enfermedad autoinmune conocida como encefalomiелitis

alérgica experimental (modelo animal para el estudio de la esclerosis múltiple), en cambio, si se le hace una modificación en la secuencia peptídica, la respuesta por parte del linfocito T se ve modificada, pudiendo tomar diferentes caminos: generar un estado de anergia, donde la célula T, a pesar de reconocer al antígeno no genera respuesta alguna, este estado puede ser reversible; o bien, la célula T puede generar una respuesta conocida como delección clonal, donde las células que reconozcan al antígeno modificado son eliminadas del repertorio de células T del organismo, o bien puede generar una respuesta antiinflamatoria, también conocida como Th2 (Jameson, 1995; Kersh, 1996; Hall, 2003). Es el caso del péptido neural modificado A91, el cual es un péptido de trece aminoácidos derivado de la proteína básica de la mielina, es un criptótopo que abarca la secuencia 87 a 99 de aminoácidos (V-H-F-F-**K**-N-I-V-T-P-R-T-P), pero que ha sido modificado en su secuencia peptídica cambiando una lisina por una alanina en la posición 91 de la secuencia (V-H-F-F-**A**-N-I-V-T-P-R-T-P). Este péptido ha demostrado ser altamente inmunogénico, y generar una respuesta autorreactiva protectora (Martíñón, 2007), con características Th2. (Gaur 1997). Es importante mencionar que los linfocitos T activados contra A91 tienen la capacidad de expresar factores neurotróficos, estos factores neurotróficos tienen la facilidad de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que pueden ejercer su acción sobre tejido neural, tanto sano como lesionado (Schwartz and Ziv, 2008; Schwartz and Yoles, 2006). Además la producción de interleucinas de fenotipo antiinflamatorio favorece el control de respuestas inflamatorias exacerbadas que, como se explicó anteriormente son deletéreas para el tejido que no resultó lesionado de forma primaria. Estas interleucinas pueden activar a las células de la microglía, macrófagos residentes del SNC, en un fenotipo neuroprotector que exprese canales dependientes de sodio en su superficie para internalizar glutamato, un neurotransmisor que genera excitación de la membrana de las neuronas postsinápticas, que

si no se regula de manera óptima genera excitotoxicidad, con la consecuente muerte de la neurona, normalmente en un SNC sano, esta regulación la llevan a cabo los astrocitos, sin embargo en condiciones de estrés los astrocitos son insuficientes para remover el exceso de glutamato de la hendidura sináptica generando que la célula postsináptica colapse, pero cuando la microglía internaliza el excedente de glutamato lo transforma a glutamina a través de la enzima glutamina sintetasa, evitando estados de toxicidad y en consecuencia la pérdida de neuronas por degeneración secundaria. (Kipnis, 2002)

❖ *Planteamiento del problema*

¿La intensidad de la lesión de médula espinal tendrá influencia sobre la generación de respuesta autoinmune protectora generada por la inmunización con A91 en ratas?

❖ *Justificación*

En trabajos anteriores en nuestro laboratorio se ha obtenido neuroprotección del tejido neural en ratas con lesión de médula espinal cuando se inmunizan con A91 mostrando recuperación de la actividad motora y preservación de neuronas de las principales vías motoras , sin embargo siempre se ha trabajado con lesiones de intensidad moderada, en este trabajo se desea saber si la respuesta autorreactiva protectora se genera con la misma eficacia en animales lesionados con modelos de intensidad severa que con los modelos de intensidad moderada, además de dilucidar el fenotipo de la respuesta originada y verificar si este fenotipo produce factores neurotróficos y esto favorece la regeneración del tejido neural después de la lesión.

❖ *Hipótesis*

La respuesta autorreactiva protectora generada por la inmunización con el péptido neural modificado A91 será tan eficiente en modelos de lesión de médula espinal de intensidad severa como en modelos de lesión de médula espinal de intensidad moderada, favoreciendo el microambiente del área de lesión para la regeneración del tejido neural a través de la producción de factores neurotróficos BDNF y NT-3.

❖ *Objetivo general*

Evaluar la respuesta autorreactiva protectora generada por la inmunización con A91 en ratas con lesión de médula espinal de diferentes intensidades, así como el fenotipo de dicha respuesta y la capacidad de los linfocitos T activados contra A91 para expresar factores neurotróficos en la zona de lesión para favorecer la regeneración del tejido neural.

❖ *Objetivos particulares*

1. Evaluar la estimulación con A91 de células T obtenidas de ganglios linfáticos de ratas lesionadas en la médula espinal con diferente intensidad e inmunizadas con A91 o con PBS.
2. Conocer el fenotipo de la respuesta inmune contra A91.
3. Analizar la capacidad de las células T anti-A91 para producir los factores neurotróficos BDNF y NT-3, tanto en sobrenadante de cultivos de células inmunes como en el área de lesión de ratas inmunizadas o no con A91.
4. Cuantificar y comparar la recuperación motora de animales con LME inmunizados o no con A91.
5. Cuantificar y comparar la densidad de axones que crucen el área de lesión de la médula espinal de ratas inmunizadas o no con A91.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población Objetivo:

Se utilizaron ratas adultas Sprague-Dawley hembras (de 12 a 14 semanas de edad y 200-220 g de peso) que fueron proporcionadas por el Bioterio de Proyecto Camina A.C. Las ratas fueron alojadas en parejas en cajas de policarbonato en habitaciones con condiciones de luz y temperatura controladas. Todas las ratas fueron tratadas de acuerdo con los estándares de la Ley General de Salud. Título Séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. (Ley General de Salud).

El diseño experimental se encuentra descrito en la Tabla 1.

Lesión traumática de la médula espinal.

Las ratas fueron anestesiadas mediante la inyección intramuscular de una mezcla de clorhidrato de xilazina (10 mg/ kg) y ketamina (50 mg/ kg). Previa asepsia de la región tóraco-lumbar, se realizó un corte longitudinal y se ejecutó una laminectomía a nivel de la 9ª vértebra torácica hasta exponer la médula espinal.

Posterior a la laminectomía y con la rata aún anestesiada se realizó la LME.

Modelo de lesión por contusión: este modelo se realizó en dos intensidades, moderada, dejando caer un cilindro de 10 g de una altura de 25 mm sobre la médula espinal expuesta; y severa, dejando caer el mismo cilindro desde una altura de 50 mm, utilizando el impactador de la Universidad de Nueva York (NYU), un aparato que ha demostrado infligir una lesión por contusión en la médula espinal bien calibrada (Young, 2002).

Modelo de lesión por sección completa: Mediante bisturí se incidieron las meninges en forma longitudinal cuidando de no dañar la médula espinal, con una pinza de disección con dientes de ratón para microcirugía se separaron las meninges y con una tijera de microcirugía se realizó la lesión de la médula espinal de un solo corte transversal, verificando posteriormente que se hubiera cortado la totalidad de la médula con un gancho para microcirugía. Finalmente se suturaron las meninges con sutura absorbible de calibre 10-0 con un punto separado en X.

Modelo de lesión por sección incompleta: Al igual que en la lesión por sección completa se abrieron las meninges, y una vez expuesta la médula espinal se realizó un corte transversal con una hoja de bisturí #12, asegurando que la vía piramidal fuera cortada bilateralmente, y dejando de manera rutinaria 1 mm de tejido intacto del lado derecho de la rata. Se suturaron las meninges con sutura absorbible de calibre 10-0 con un punto separado en X

Después de la lesión las ratas fueron suturadas por planos con sutura absorbible en fascias musculares y con no absorbible en piel.

Cuidados posquirúrgicos:

Los animales fueron alojados en parejas en cajas de policarbonato con cama de viruta de madera estéril y se les administró alimento especial para roedor (Harlan, 2018 Teklad Global) y agua purificada *ad libitum*. Se les realizó masaje vesical dos veces al día durante los primeros 14 días posquirúrgicos para estimular la micción, y en caso necesario se les dio masaje en el colón para que defecaran. Se les administró por vía oral (en el agua de bebida) enrofloxacin como antibiótico a una dosis de 62 mg/kg/día durante 14 días y mediante cánula oral se les administró paracetamol como analgésico a una dosis de 32 mg/kg/día durante 7-10 días.

Inmunización con A91:

La inmunización de las ratas se realizó dentro de la primera hora después de la lesión, aplicando por vía intradérmica en la base de la cola 150 µg de A91 (Invitrogen Life Technologies; San Diego, CA, USA) homogenizados con 150 µl de adyuvante completo de Freund (SIGMA, St. Louis MO, USA), a los animales del grupo testigo se les aplicaron 150 µl de solución amortiguadora de fosfatos (vehículo en que se disolvió el A91) homogenizados con 150 µl de adyuvante completo de Freund.

Tabla 1: Diseño experimental.

Experimento	Modelo de lesión	Grupos	Seguimiento	Evaluaciones
1. Inducción de las células T contra A91, producción de BDNF y NT-3 y de citocinas por estos linfocitos.	Contusión severa Contusión moderada Sección completa Sección incompleta	LME + A91 LME + PBS	14 días	1.1 Ensayos de proliferación celular. 1.2 Cuantificación de la producción de BDNF y NT3 en sobrenadantes (ensayos de ELISA) 1.3 Cuantificación de la producción de IL-4 e IFN- γ en sobrenadantes (ensayos de ELISA)
2. Recuperación motora, expresión de factores neurotróficos en el sitio de lesión, y evaluaciones histológicas.	Contusión moderada (CM)	1) LME + A91 2) LME + PBS	21 días	2.1 Cuantificación de la producción de BDNF y NT3 en el sitio de la lesión (ensayos de ELISA)
		3) LME + A91 4) LME + PBS	120 días	2.1 Cuantificación de la producción de BDNF y NT3 en el sitio de la lesión (ensayos de ELISA) 2.2 Evaluación de la recuperación motora mediante la escala BBB
	Contusión severa (CS)	5) LME + A91 6) LME + PBS	21 días	2.1 Cuantificación de la producción de BDNF y NT3 en el sitio de la lesión (ensayos de ELISA)
		7) LME + A91 8) LME + PBS	120 días	2.1 Cuantificación de la producción de BDNF y NT3 en el sitio de la lesión (ensayos de ELISA) 2.2 Evaluación de la recuperación motora mediante la escala BBB
	Sección completa (SC)	9) LME + A91 10) LME + PBS	21 días	2.1 Cuantificación de la producción de BDNF y NT3 en el sitio de la lesión (ensayos de ELISA)
		11) LME + A91 12) LME + PBS	120 días	2.1 Cuantificación de la producción de BDNF y NT3 en el sitio de la lesión (ensayos de ELISA) 2.2 Evaluación de la recuperación motora mediante la escala BBB 2.3 Evaluación del número de axones en crecimiento en el sitio de lesión.
	Sección incompleta (SI)	13) LME + A91 14) LME + PBS	21 días	2.1 Cuantificación de la producción de BDNF y NT3 en el sitio de la lesión (ensayos de ELISA)
		15) LME + A91 16) LME + PBS	120 días	2.1 Cuantificación de la producción de BDNF y NT3 en el sitio de la lesión (ensayos de ELISA)

Evaluación de la respuesta autorreactiva protectora

Se evaluó la respuesta contra el péptido A91 14 días después de la inmunización, mediante estudios de proliferación de células CD4 en nódulos linfáticos inguinales en ratas con los diferentes modelos de lesión. Bajo anestesia y en condiciones de asepsia y antisepsia se obtuvieron de cada animal los nódulos linfáticos inguinales. Una vez extraídos dichos órganos linfoides, se colocaron inmediatamente en RPMI 1640 más suero fetal bovino (SFB) al 10% para posteriormente ser macerados (sin llegar a triturar) con el émbolo de una jeringa estéril, mediante centrifugado se lavaron las células obtenidas. Después de contar el número total de células, se tiñeron con CFSE y se colocaron 350,000 células/pozo en RPMI más 10% suero fetal bovino en todos los pozos y con los antígenos concanavalina-A (Con-A), ovoalbúmina (OVA), proteína básica de la mielina (MBP) y A91, se sembraron también pozos sin antígeno que se utilizaron como testigo negativo. Se incubaron las placas en presencia de 5% de CO₂ durante 96 h a 37° C. Pasado este tiempo se recolectaron los sobrenadantes de los pozos que se incubaron con A91 y se almacenaron a -20°C para su posterior evaluación.

Las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales anti-CD4 (Becton Dickinson, San Jose, CA), posteriormente se midió la proliferación celular mediante citometría de flujo (FACSCalibur Becton-Dickinson).

Caracterización de la respuesta inmune:

Los sobrenadantes antes recolectados se sometieron a pruebas de ELISA para detectar la cantidad de interleucina 4 (IL-4 Sandwich ELISA kit, Chemicon International) para determinar una respuesta tipo Th2 e interferón gama (IFN- γ Sándwich ELISA kit, Chemicon International) y así distinguir una respuesta tipo Th1.

Presencia de BDNF y NT-3 en sobrenadante de cultivo celular.

Los sobrenadantes antes recolectados se sometieron a pruebas de ELISA para detectar la cantidad de NT-3 (NT-3 ELISA Sandwich kit, Chemicon International) y BDNF (BDNF ELISA Sándwich kit, Chemicon International) producido por las células inmunes.

Presencia de BDNF y NT-3 en el sitio de la lesión:

Se obtuvieron en fresco las médulas espinales de 5 ratas por grupo, y se colocaron en solución amortiguadora de fosfatos 1 M, se maceraron y se centrifugaron. Al sobrenadante se le realizó una prueba de ELISA para determinar la cantidad de neurotrofina 3 (NT-3 ELISA Sándwich kit, Chemicon International) y de factor de crecimiento derivado

de cerebro (BDNF ELISA Sándwich kit, Chemicon International). Se cuantificó el total de proteína contenido en el sobrenadante mediante la técnica modificada de Lowry (Markwell, 1978) y se determinó la cantidad de factor de crecimiento por mg de proteína mediante la fórmula:

$$\text{pg totales de neurotrofina/mg totales de proteína} = \text{pg neurotrofina /mg proteína}$$

Los resultados se procesaron estadísticamente usando la prueba U de Mann-Whitney, $p \leq 0.05$ se consideraron significativas.

Evaluación de la función motora:

La evaluación de la recuperación motora se realizó de manera semanal mediante la escala de locomoción a campo abierto de Basso, Beattie y Brenahan (BBB) (Basso, 1995), donde la motilidad se califica de 0 (parálisis total) hasta 21 (movilidad completa, ratas sanas) (Tabla 2), durante 16 semanas (120 días). Los resultados se analizaron estadísticamente con una ANOVA de medidas repetidas acompañada de prueba de Bonferroni (Basso, 1995), $p \leq 0.05$ se consideraron significativas.

Pruebas histológicas:

Una vez pasado el tiempo de seguimiento, de acuerdo con el diseño experimental, se procedió a la recolección de muestras. Las ratas lesionadas por sección completa se perfundieron vía cardiaca con paraformaldehído al 4% y se obtuvieron las médulas

espinales seleccionando el sitio de lesión (epicentro) como referencia, se obtuvieron fragmentos longitudinales de 15 mm de largo, que tuvieran el epicentro de la lesión en el centro, las muestras se procesaron en parafina y se cortaron de un espesor de 10 μm colocando tres cortes continuos por laminilla.

Se realizó histoquímica a las muestras con una tinción argéntica por el método de Sevier-Münger para tejido nervioso. La tinción se hizo de acuerdo con el protocolo del Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. (1968)

La evaluación de las médulas se realizó con un microscopio Olympus BX41-TF. Se tomaron micrografías a 4x las cuales se unieron con el programa Image Pro Plus para formar reconstrucciones del total de la muestra de médula espinal, a partir de estas reconstrucciones se evaluó el número de axones en crecimiento de forma manual.

Tabla 2: Escala de evaluación locomotora a campo abierto (BBB)

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

RESULTADOS

Evaluación de la respuesta autorreactiva protectora

Se realizó mediante la proliferación de células T CD4⁺, en ratas con lesión de la médula espinal por los diferentes modelos empleados de acuerdo a la metodología previamente descrita. Las células CD4⁺ de ratas con lesión de médula espinal por contusión moderada (Figura 1-A, 2.5 ± 0.42 , n= 4, p= 0.04, ANOVA-Tuckey) y por sección incompleta (Figura 1-B, 2.6 ± 0.2 , n= 4, p= 0.03, ANOVA-Tuckey) e inmunizadas con A91, proliferaron de manera significativa cuando fueron incubadas en presencia de A91, mientras que las células de ratas con lesión por contusión severa (Figura 1-C, 0.9 ± 0.13 , n= 4, p>0.05, ANOVA-Tuckey) y por sección completa (Figura 1-D, 0.8 ± 0.05 , n= 4, p>0.05, ANOVA-Tuckey) e inmunizadas con A91 no proliferaron en presencia de A91. Los pozos que se sembraron en presencia de OVA y MBP no tuvieron proliferación de células en ningún modelo de lesión (datos para MBP no mostrados). Los resultados se presentan en promedio \pm desviación estándar.

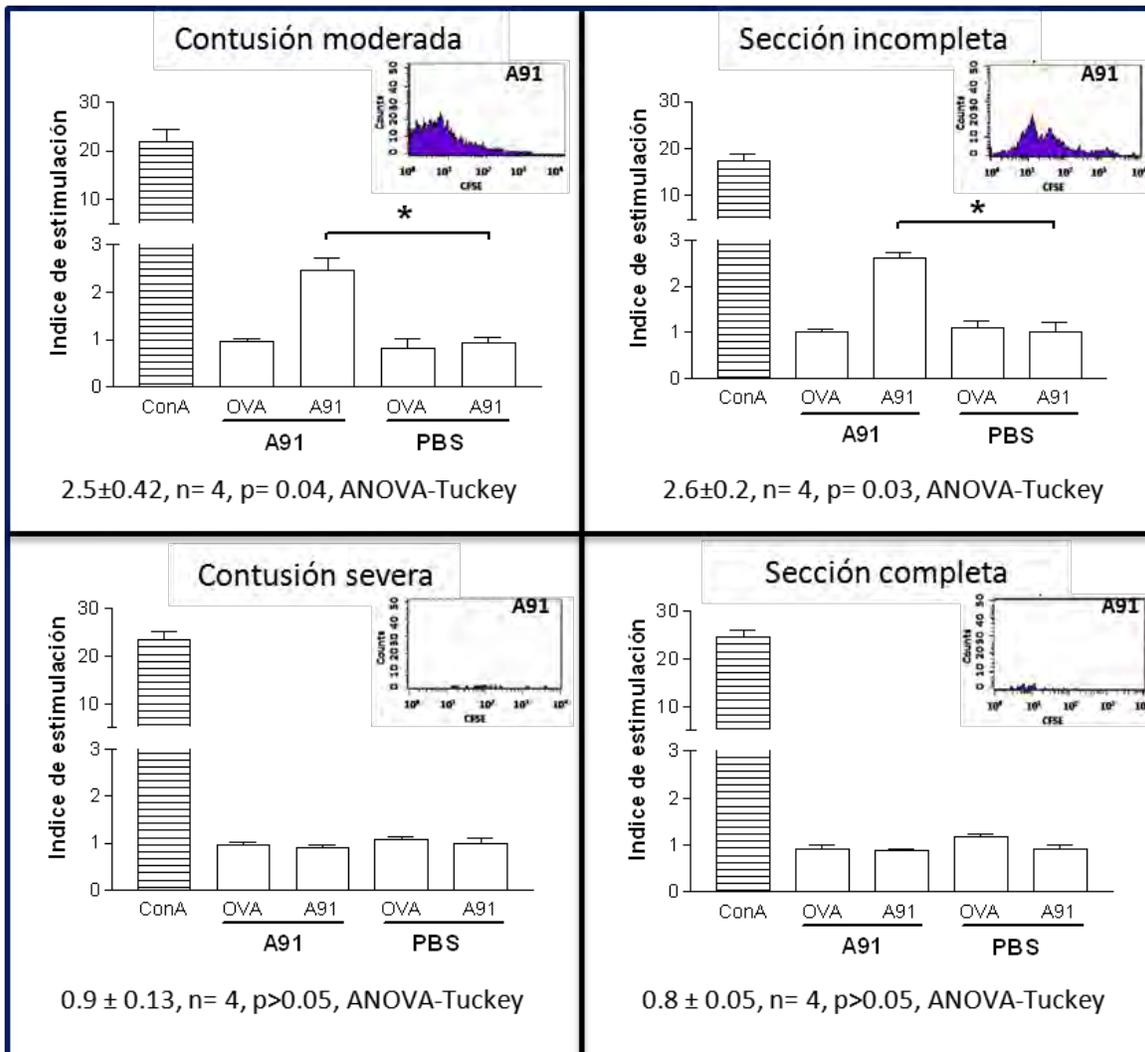


Figura 1: Evaluación de la respuesta autorreactiva protectora. Dónde: ratas lesionadas por contusión moderada (2.5±0.42, n= 4, p= 0.04, ANOVA-Tuckey), ratas lesionadas por sección incompleta (2.6±0.2, n= 4, p= 0.03, ANOVA-Tuckey), ratas lesionadas por contusión severa (0.9 ± 0.13, n= 4, p>0.05, ANOVA-Tuckey) y ratas lesionadas por sección completa (0.8 ± 0.05, n= 4, p>0.05, ANOVA-Tuckey). En los recuadros se presenta una imagen representativa de los histogramas obtenidos por citometría de flujo en las muestras de ratas inmunizadas con A91 y cultivadas en presencia de A91 correspondientes a cada modelo de lesión.

Fenotipo de la respuesta inmune.

Ante estos resultados se quiso saber que fenotipo presentaban las células inmunes específicas contra A91, así que se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos de células CD4⁺ específicas contra A91 y se cuantificó la producción de las citocinas interleucina 4 (IL-4) e interferón gama (IFN- γ) para determinar el fenotipo de la respuesta celular, encontrándose que es una respuesta francamente Th2, tanto en las ratas lesionadas por contusión moderada (Figura 2-A, n= 4, p= 0.007 U de Mann-Whitney) como en las ratas lesionadas por sección incompleta (Figura 2-B, n= 4, p= 0.001 U de Mann-Whitney).

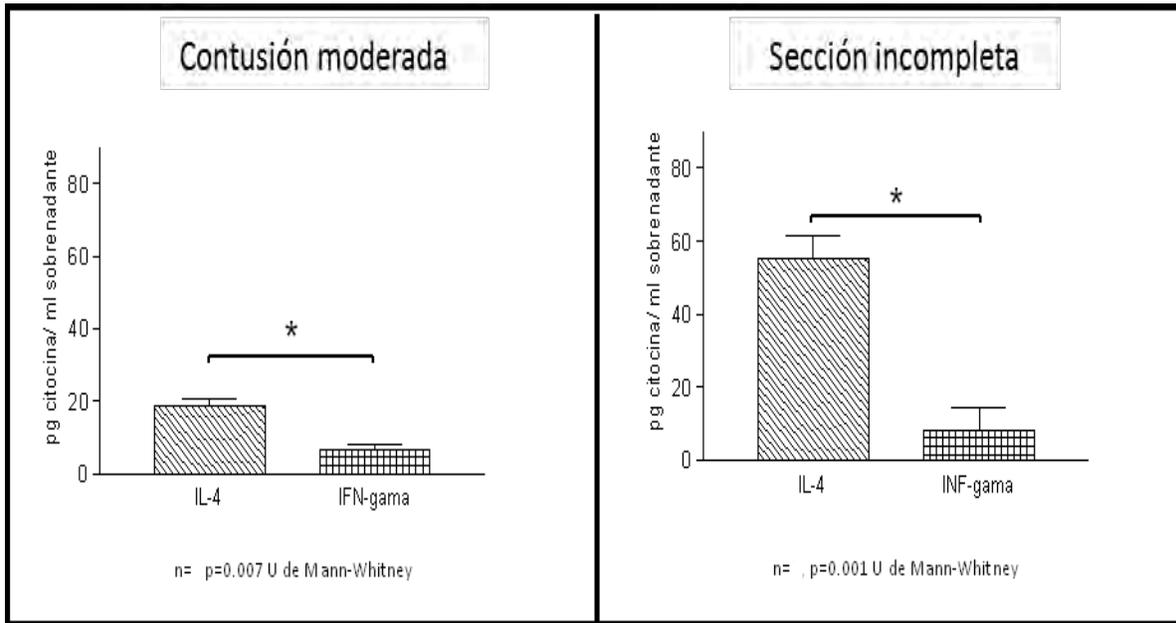


Figura 2: Caracterización de la respuesta inmune. Dónde: ratas lesionadas por contusión moderada (n= 4, p= 0.007 U de Mann-Whitney) y ratas lesionadas por sección incompleta (n=4, p= 0.001 U de Mann-Whitney).

Las células T producen factores neurotróficos.

Con anterioridad se ha reportado que las células T activadas tienen la capacidad de producir factores neurotróficos, así que se midió la concentración de neurotrofinas presentes en el sobrenadante de los cultivos de células T CD4⁺ específicas contra A91, y se encontró que en el caso de células provenientes de ratas con lesión de médula espinal por contusión moderada (Figura 3, n= 4, p=0.05 U de Mann-Whitney) hay un incremento en la producción de BDNF, lo mismo se observó en el caso de células derivadas de ratas con sección incompleta (Figura 3, n= 4, p=0.05 U de Mann-Whitney). Mientras que las concentraciones de NT-3 en ambos modelos de lesión es similar en los sobrenadantes de células provenientes de ratas inmunizadas con A91 a las concentraciones de los sobrenadantes de células provenientes de ratas del grupo testigo (Figura 4).

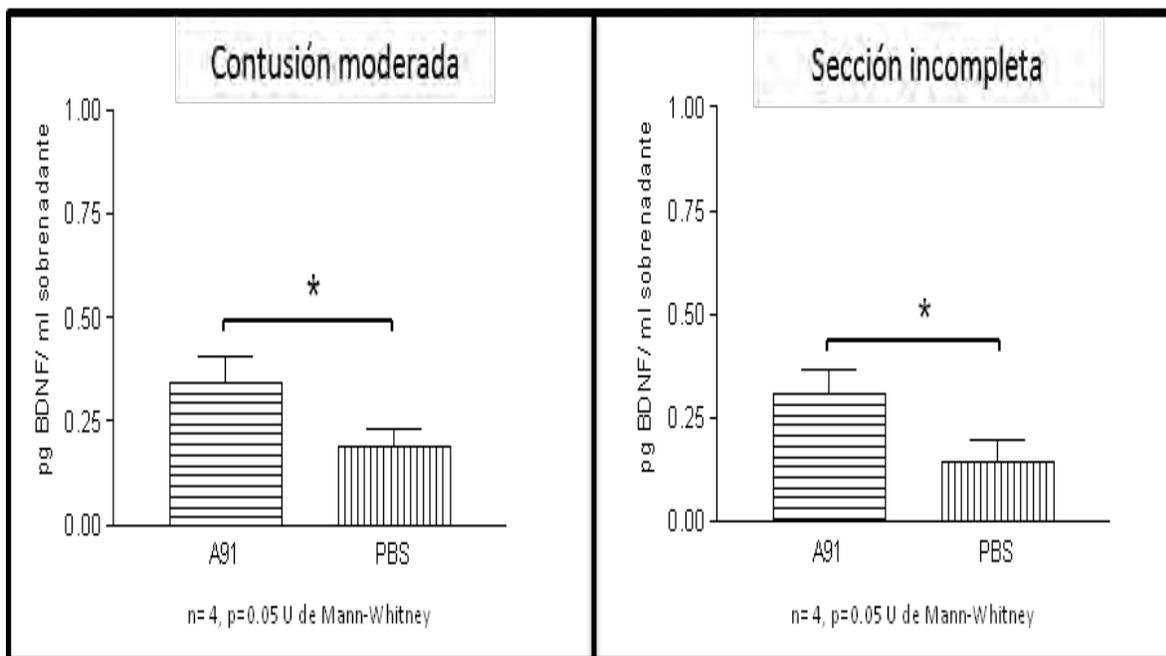


Figura 3: Producción de BDNF en sobrenadante de cultivo celular. Dónde: ratas lesionadas por contusión moderada (n= 4, p=0.05 U de Mann-Whitney) y ratas lesionadas por sección incompleta (n= 4, p=0.05 U de Mann-Whitney).

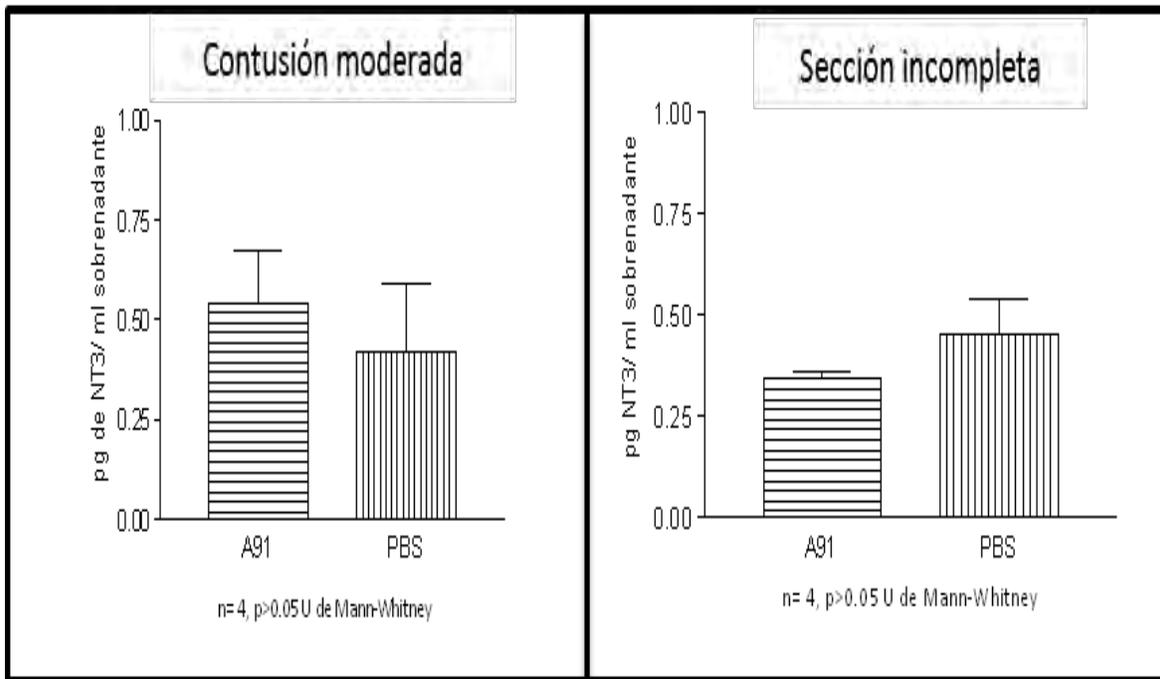


Figura 4: Producción de NT-3 en sobrenadante de cultivo celular. Dónde: ratas lesionadas por contusión moderada (n= 4, $p>0.05$ U de Mann-Whitney) y ratas lesionadas por sección incompleta (n= 4, $p>0.05$ U de Mann-Whitney).

Presencia de BDNF y NT-3 en el epicentro de la lesión

Al inicio del proyecto se quiso saber que tanto influía la inmunización con A91 sobre la producción de factores neurotróficos involucrados con la regeneración del tejido nervioso, para ello se llevó a cabo la evaluación de la cantidad de factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF) y de neurotrofina 3 (NT-3) en tejido neural en el epicentro de lesión a dos tiempos de seguimiento: 21 días y 120 días.

En la evaluación a 21 días, en todos los modelos de lesión las ratas inmunizadas con A91 presentaron mayores cantidades de BDNF en el epicentro de la lesión que sus testigos (n=4; p=0.02 U de Mann-Whitney) (Figura 5), lo mismo sucedió con la producción de NT-3, donde sin importar el modelo de lesión las ratas inmunizadas con A91, presentaron mayor concentración de NT-3 que las ratas pertenecientes al grupo testigo (Figura 6). Sin embargo, cuando se midieron las concentraciones de BDNF y NT-3 120 días después de la lesión, solo las ratas inmunizadas con A91 y con lesión de intensidad moderada presentaron mayores concentraciones tanto de BDNF (Figura 7-A y 7-B, n=4, p=0.02 U de Mann-Whitney) como de NT-3 (Figura 8-A y 8-B, n=4, p=0.02 U de Mann-Whitney), y las médulas de ratas con lesión severa, no mostraron diferencia con los testigos (n=5, p>0.05 U de Mann-Whitney).

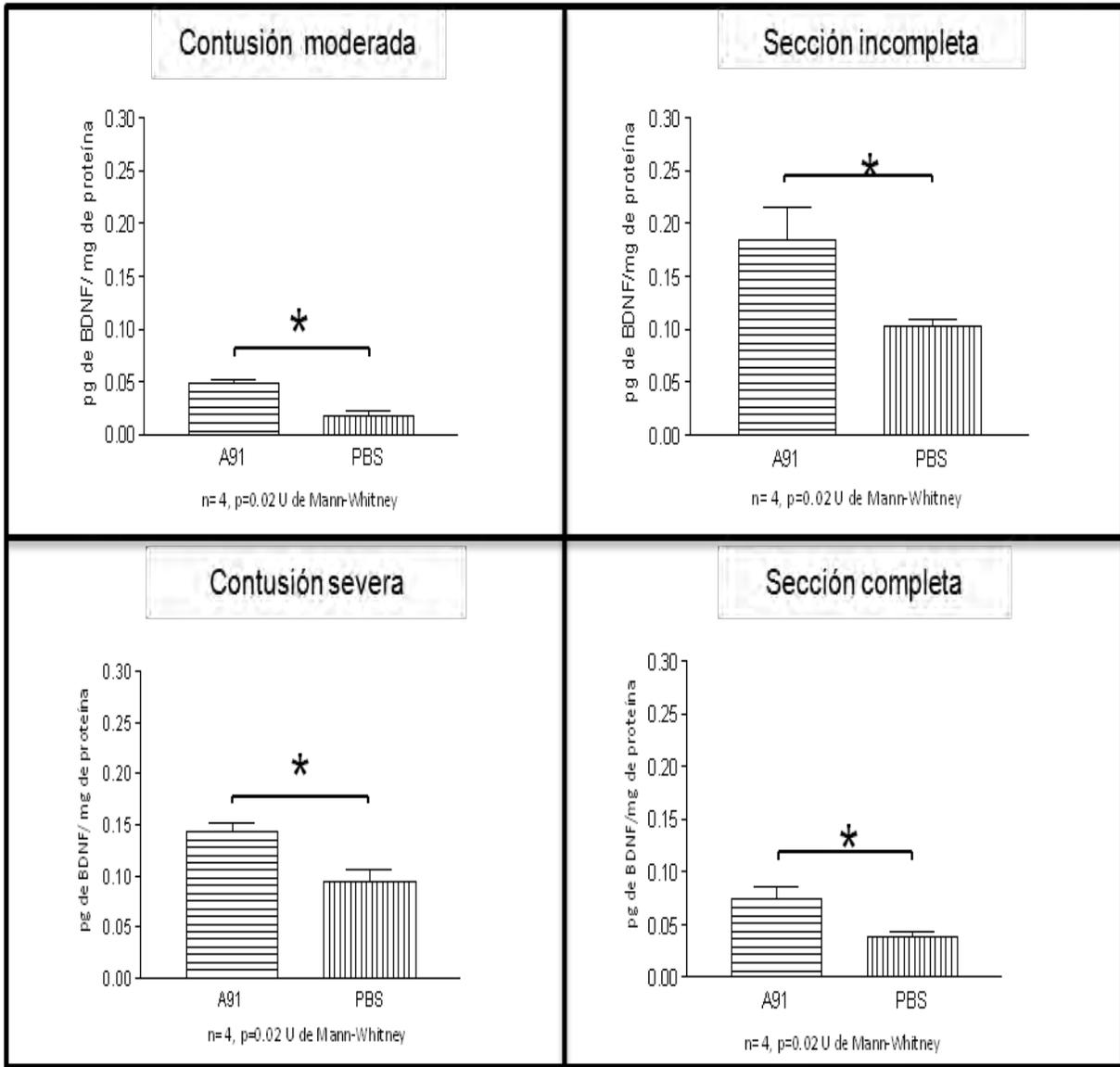


Figura 5: Niveles de BDNF en el epicentro de lesión 21 días después de la lesión de médula espinal en ratas. Dónde: ratas lesionadas por contusión moderada (n=4; p=0.02 U de Mann-Whitney), ratas lesionadas por sección incompleta (n=4; p=0.02 U de Mann-Whitney), ratas lesionadas por contusión severa (n=4; p=0.02 U de Mann-Whitney) y ratas lesionadas por sección completa (n=4; p=0.02 U de Mann-Whitney).

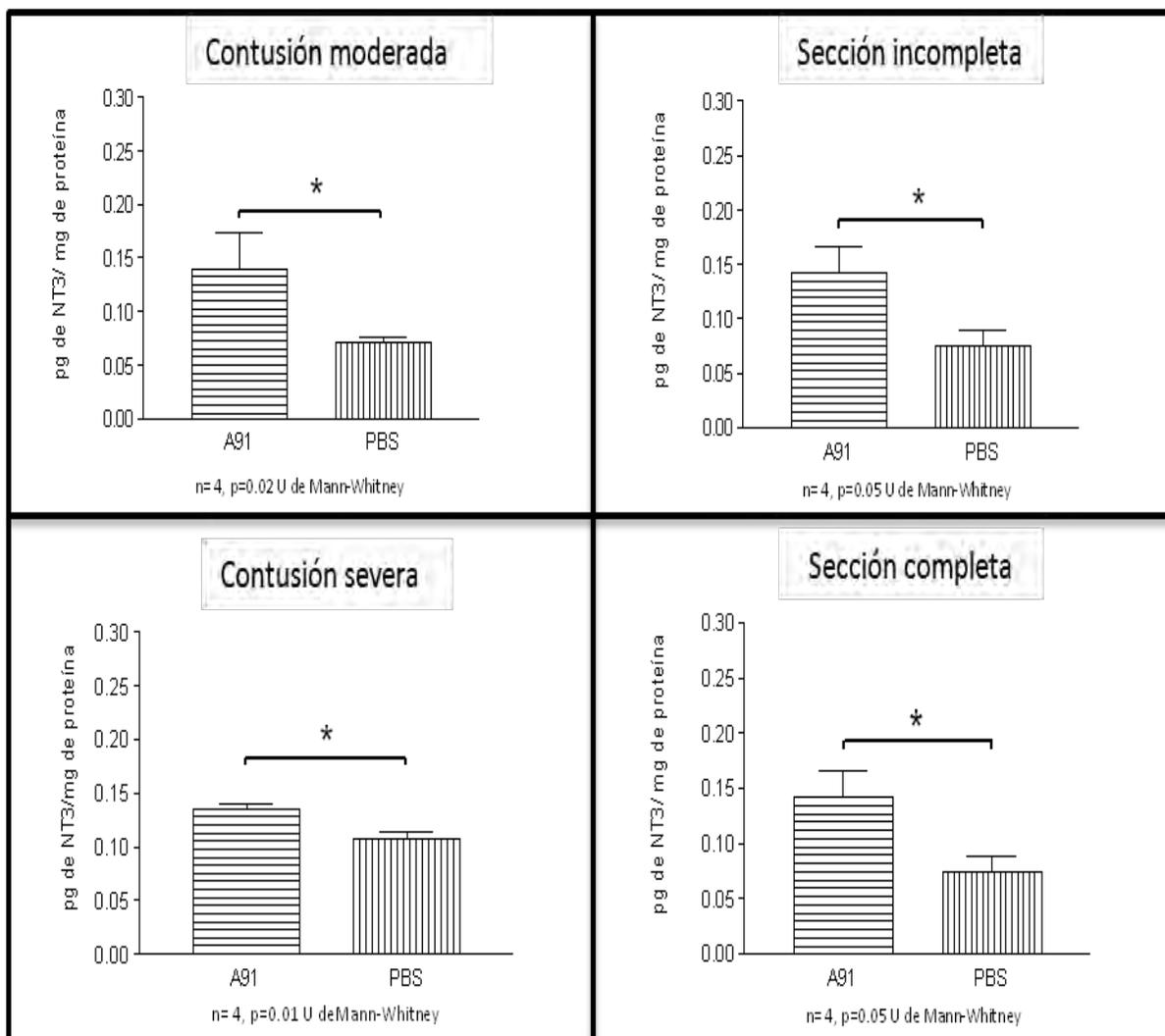


Figura 6: Niveles de NT-3 en el epicentro de lesión 21 días después de la lesión de médula espinal en ratas. Dónde: ratas lesionadas por contusión moderada (n=5; p=0.02 U de Mann-Whitney), ratas lesionadas por sección incompleta (n=4; p=0.05 U de Mann-Whitney), ratas lesionadas por contusión severa (n=4; p=0.01 U de Mann-Whitney) y ratas lesionadas por sección completa (n=5; p=0.05 U de Mann-Whitney).

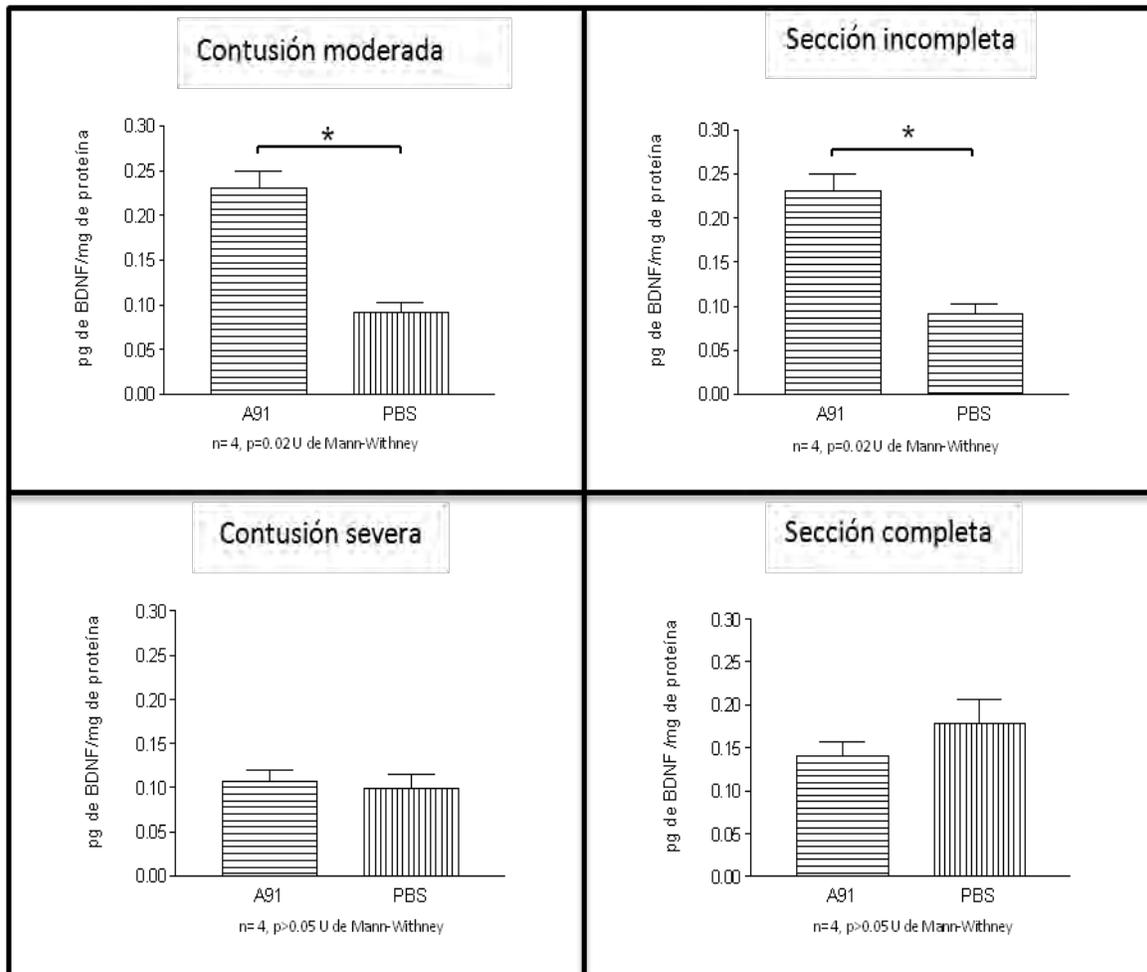


Figura 7: Niveles de BDNF en el epicentro de lesión 120 días después de la lesión de médula espinal en ratas. Donde ratas lesionadas por contusión moderada (n=4; p=0.02 U de Mann-Whitney), ratas lesionadas por sección incompleta (n=4; p=0.02 U de Mann-Whitney), ratas lesionadas por contusión severa (n=4; p>0.05 U de Mann-Whitney) y ratas lesionadas por sección completa (n=4; p>0.05 U de Mann-Whitney).

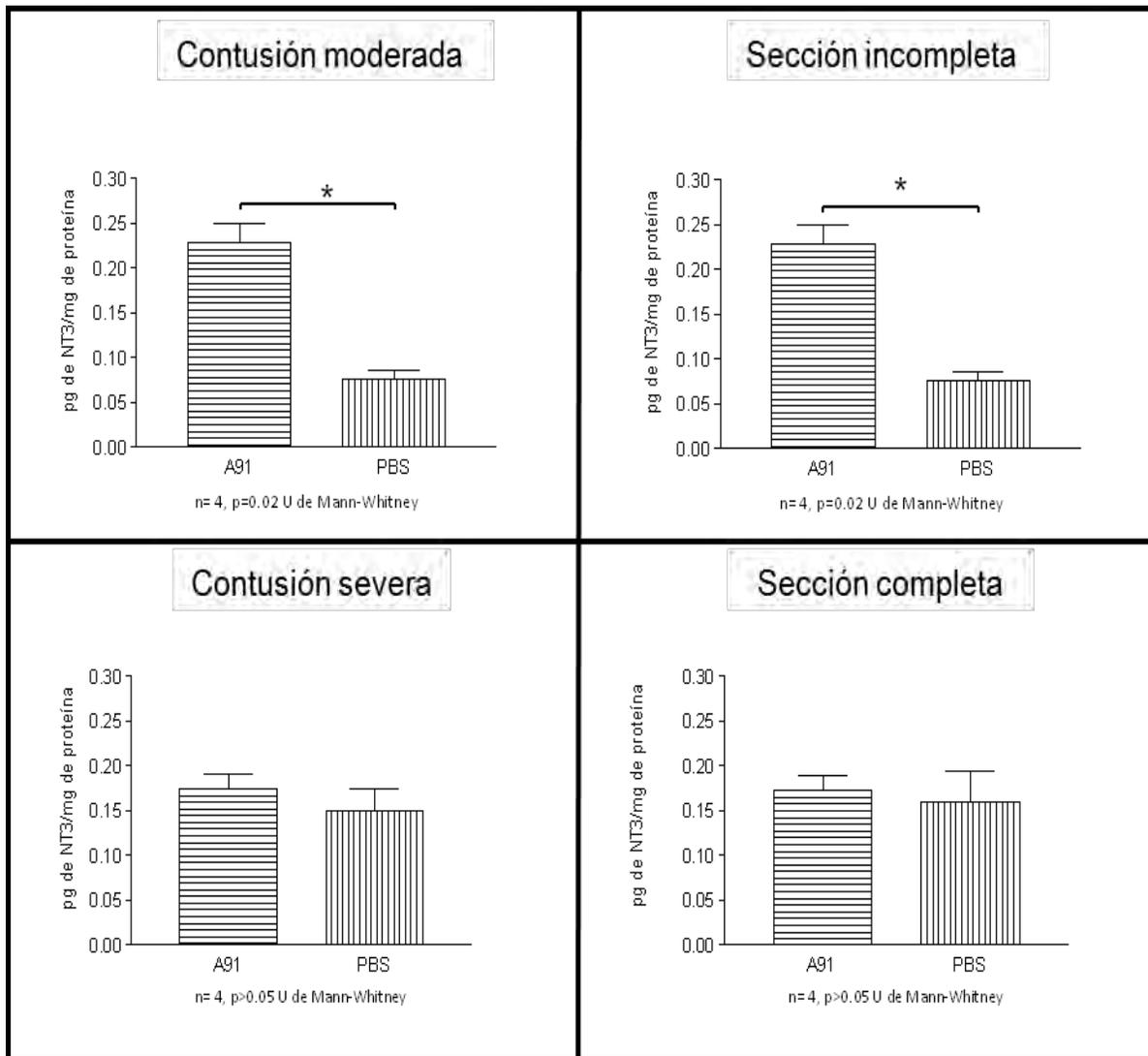


Figura 8: Niveles de NT-3 en el epicentro de lesión 120 días después de la lesión de médula espinal en ratas. Dónde: ratas lesionadas por contusión moderada (n=4; p=0.02 U de Mann-Whitney), ratas lesionadas por sección incompleta (n=4; p=0.01 U de Mann-Whitney), ratas lesionadas por contusión severa (n=4; p>0.05 U de Mann-Whitney) y ratas lesionadas por sección completa (n=4; p>0.05 U de Mann-Whitney).

Evaluación de la función motora.

Posteriormente se procedió a correlacionar estos resultados con la clínica. En la evaluación de la función motora mediante la prueba de motilidad a campo abierto (BBB) se observó que los animales con lesión de médula espinal por contusión moderada (Figura 9-A) e inmunizados con A91 presentaron una recuperación motora superior a la de los animales que fueron tratados con solución de fosfatos (PBS), mostrando mejoría en la motilidad desde las primeras evaluaciones y a todo lo largo del seguimiento (A91: 10.94 ± 1.58 ; PBS: 8.3 ± 0.3). En los casos de lesión por contusión de intensidad severa (Figura 9-B) y por sección completa (Figura 9-C), no se observa diferencia en la recuperación motora entre las ratas pertenecientes al grupo inmunizado con A91 y las del grupo testigo. Los datos se presentan en promedio \pm desviación estándar.

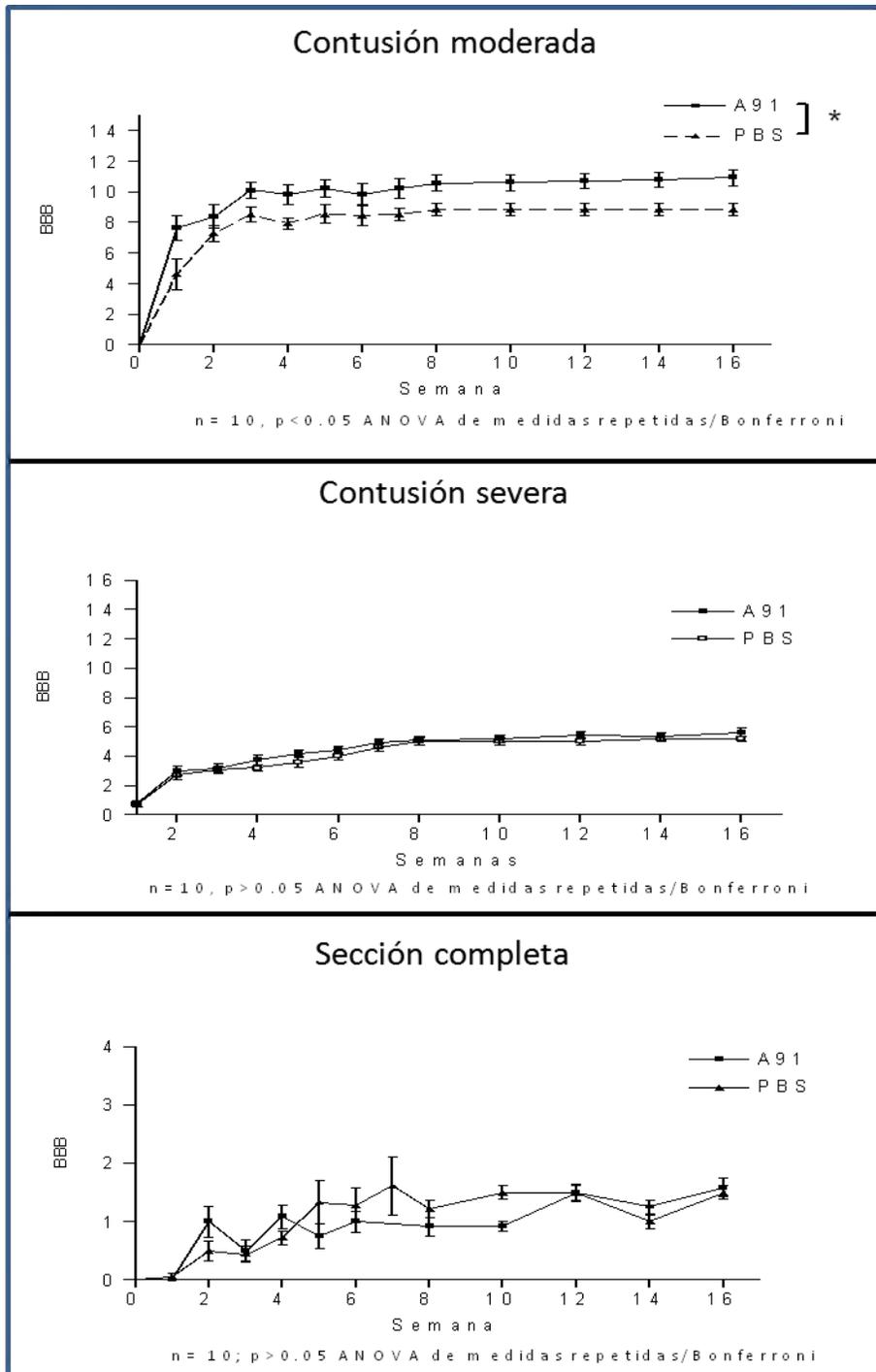


Figura 9: Evaluación de la recuperación de la función motora. Donde Ratas lesionadas por contusión moderada (n=10, p<0.05 ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni); ratas lesionadas por contusión severa (n=10, p>0.05 ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni) y ratas lesionadas por sección completa (n=10, p>0.05 ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni)

Crecimiento de axones en el epicentro de la lesión

Finalmente se realizó una prueba histológica para determinar la correlación entre los datos encontrados y la probable regeneración, esto en el modelo de lesión por sección completa, debido a que en este modelo no se generan dudas en el origen de los axones que se observen, situación que si sucede en los modelos de contusión y sección incompleta, pues quedan axones intactos o algunos cortados en el epicentro que suelen confundirse con axones en crecimiento.

En la evaluación del número de axones en crecimiento, a cuatro meses de seguimiento se observó que entre los grupos inmunizado con A91 y el testigo no había diferencia significativa (Figura 10) (A91: 113 ± 21 ; PBS: 70 ± 42 , $p > 0.05$ U de Mann Whitney). Los datos se presentan en promedio \pm desviación estándar.

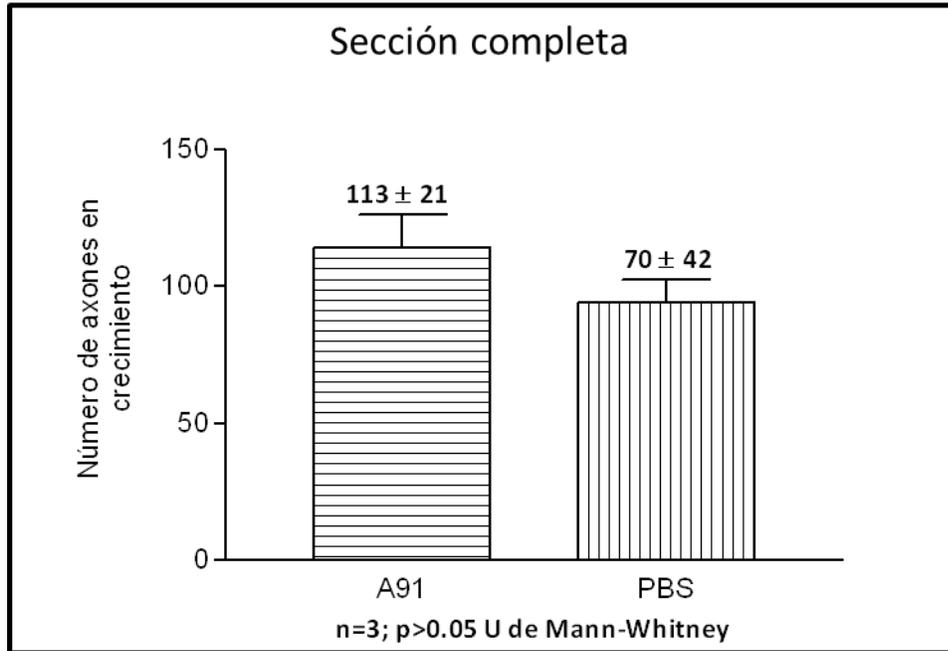


Figura 10: Número de axones en crecimiento en el epicentro de la lesión. Ratas

lesionadas por sección completa (A91: 113 ± 21; PBS: 70 ± 42, p>0.05 U de Mann-Whitney)

DISCUSIÓN

El sistema inmune es el responsable de la protección del organismo. Cuando el sistema inmune se ve comprometido se desarrollan enfermedades que pueden ir desde las causadas por un agente patógeno, hasta enfermedades autoinmunes.

La lesión de la médula espinal es una enfermedad que ocasiona compromiso del sistema inmune. Se ha observado que la manipulación del sistema inmune después de una lesión en la médula espinal puede ser benéfica y proporcionar protección al tejido neural (Yoles, 2001; Kipnis, 2000, Kipnis, 2001; Kipnis, 2002; Martiñón, 2007), sin embargo, en este estudio observamos que la respuesta inmune que se genera después de una inmunización depende en gran medida de la intensidad de la lesión, pues se inhibe cuando la intensidad es severa impidiendo el beneficio esperado por la manipulación del sistema inmune (Fig. 5).

Al no generarse la respuesta autorreactiva protectora la degeneración del tejido neural a causa de una lesión traumática en la médula espinal continúa su curso natural, proporcionando un ambiente inapropiado para que se monte un proceso de regeneración del tejido, dando lugar así, a que procesos como la degeneración Waleriana continúen su curso destructor por meses (roedores) a años (humanos) (David, 2002).

En este trabajo se demostró que la intensidad de la lesión en la médula espinal es un factor determinante para que esta respuesta autorreactiva protectora se desarrolle. Cuando la lesión es de una intensidad moderada, la respuesta inmune se instala con las condiciones de fenotipo (Th2) (Figura 6) y la expresión de neurotrofinas que se requiere (Figs. 7 y 8),

mientras que, cuando la intensidad de la lesión es severa, la inhibición de la respuesta inmune evita que haya desarrollo de esta respuesta autorreactiva protectora. En estudios anteriores se observó que cuando la lesión era en un nivel de la médula espinal muy alto (T1) la proliferación de células obtenidas de ganglio linfático, no se llevaba a cabo. Sin embargo, cuando la lesión se hacía en un nivel más bajo (T12), las células proliferaban, siempre y cuando la lesión fuera de intensidad moderada (Ibarra, 2007). Esto obedece a que el sistema inmune se ve severamente afectado por la intensidad de la lesión.

Hay que recordar que ante una lesión en la médula espinal se desarrolla una respuesta sistémica, con la producción de diversas sustancias conocidas en conjunto como respuesta de choque, en este caso choque neurogénico, que se debe a una falta de tono vascular, ocurre porque los centros de regulación cardiovascular se ven afectados, causando parálisis vascular, lo que genera vasodilatación y secuestro sanguíneo lo cual causa taquicardia en un intento del corazón por restablecer la volemia, sin embargo, como el retorno venoso es insuficiente, la taquicardia no permite un llenado diastólico adecuado. Esto hace que la presión arterial disminuya, estimulando a los barorreceptores de los senos aórticos y carotídeo, del sistema simpático y de la médula adrenal, con la consecuente liberación de catecolaminas (epinefrina y norepinefrina), con vasoconstricción de todos los tejidos, excepto el corazón y el cerebro (Trigo, 1987). Se ha demostrado que las catecolaminas tienen la característica de inhibir la proliferación de las células T (Madden, 1995) además de producir apoptosis en los órganos linfoides de forma rápida y extensa (Prass, 2003).

Como consecuencia a la lesión el eje hipotalámico-pituitario-adrenal se activa. El estímulo nociceptivo incrementa la liberación de hormona liberadora de corticotrofina (CRF) por el núcleo parvocelular del hipotálamo posterior, esta hormona estimula la

secreción de hormona adrenocorticotrófica (ACTH), la cual estimula la secreción de cortisol en la corteza adrenal (Tomlinson, 1997); el cortisol es una hormona esteroidea involucrada en el desarrollo de la respuesta inmune (Stier, 2009; Lucin, 2007), tiene una función moduladora de la respuesta inmune al actuar como un inmunosupresor por estimular la producción de TGF β , lo que inhibe la respuesta inmunitaria (Roitt, 2000). Probablemente la intensidad de la lesión tenga relación con la liberación de las hormonas responsables de la regulación de la respuesta inmune, a mayor intensidad de lesión, mayor liberación de hormonas con la consecuente inhibición de la respuesta inmune.

La falta de respuesta autorreactiva protectora se puede observar clínicamente, pues las ratas, que fueron lesionadas con contusión severa y con sección completa, no tuvieron una recuperación motora favorable, ni tampoco concentraciones de neurotrofinas en la zona de lesión diferentes a las ratas del grupo testigo, e histológicamente la cantidad de axones en crecimiento fue similar a las ratas a las que no se les estimuló con A91.

Mientras que las ratas lesionadas por contusión moderada e inmunizadas con A91, en quienes la respuesta autorreactiva protectora si se desarrolló, tuvieron mejores concentraciones de neurotrofinas en el epicentro de la lesión.

La presencia de factores neurotróficos como BDNF y NT-3 en el área de lesión se espera genere un ambiente favorable para el crecimiento de axones. El BDNF es un factor neurotrófico que estimula la actividad, función y supervivencia de las neuronas a lo largo de toda la vida del individuo (Nagahara, 2011). Ha sido utilizado en modelos de lesión de médula espinal donde ha favorecido el crecimiento de fibras y generado cambios estructurales que han fomentado la recuperación funcional (Sasaki, 2009). En el presente estudio se observa que la presencia de BDNF en el sitio de lesión se sostiene hasta los cuatro meses de seguimiento, en animales que han sido inmunizados con A91 y lesionados

con intensidad moderada. Este ambiente rico en BDNF podría ser favorable para la regeneración del tejido neural, lo mismo que la presencia de NT-3 en la zona de lesión, que al igual que el BDNF se mantuvo hasta los cuatro meses de seguimiento.

NT-3 es una neurotrofina que favorece la diferenciación y supervivencia de neuronas, tanto *in vivo* como *in vitro*. En una importante cantidad de trabajos se ha utilizado NT-3 como estimulante para el desarrollo de crecimiento y diferenciación del tejido neural (Lambert, 2004; Shimazu, 2006; Chao, 2006; Fukumitsu, 2011). En el presente trabajo solo se evaluó crecimiento axonal en el modelo de sección completa pero no se logró demostrar algún efecto positivo. Esto corrobora que con este tipo de lesiones donde la autorreactividad protectora no se desarrolla no hay efectos positivos, entre ellos la regeneración del tejido.

Estudios posteriores deberán dirigirse a evaluar la regeneración en los modelos de lesión donde se desarrolla la autorreactividad protectora eficientemente.

Además en este estudio se observó que las células T específicas contra A91 provenientes de ratas con lesión de médula espinal e inmunizadas con A91, presentaron un fenotipo Th2, mismo que puede promover protección al tejido neural. Esta puede ser la probable explicación de cómo la inmunización con A91 y por consiguiente el fenotipo Th2 neuroprotege: Las citocinas características de la respuesta inmune Th2 como IL-4 e IL-10 son inhibitoras de la expresión del gen de iNOS, esto favorece la protección del tejido neural ante radicales libres, evitándose así la lipoperoxidación (García, 2012). Este fenotipo es además favorable para la producción de neurotrofinas (Ziv, 2006), lo que se comprueba también en los sobrenadantes de los cultivos de células T, donde se observa una producción de BDNF y NT-3 superior en los cultivos de células de ganglios linfáticos extraídos de ratas inmunizadas con A91 sobre la expresión en cultivos originados a partir de ganglios

linfáticos de las ratas testigo. Interleucinas como IGF-1 y la expresión de factores de crecimiento como BDNF favorecen la movilización de células madre hacia el sitio de lesión (Schwartz, 2008) lo que a su vez, favorece el crecimiento axonal.

En los estudios de recuperación motora se observa como las ratas que fueron sometidas a una lesión de intensidad moderada lograron recuperar la motricidad, mientras que las ratas que sufrieron una lesión de intensidad severa no recuperaron la capacidad de moverse, lo que correlaciona con lo observado en la respuesta inmune.

Es importante acentuar que este resultado se debe a un fenómeno de neuroprotección, y no a regeneración del tejido neural, pues la mejoría en la capacidad locomotora en las ratas lesionadas por contusión de intensidad moderada se presentó desde la primera semana después de la lesión (Figura 9-A), y aunque se observó un incremento gradual, se ha visto en otros estudios en nuestro laboratorio que es por que las células supervivientes recuperan su funcionalidad y no porque haya una restauración neural o una regeneración funcional del tejido lesionado. Es importante acentuar la diferencia favorable en la locomoción de los animales lesionados con contusión de intensidad moderada y vacunados con A91 sobre las ratas del grupo testigo que se observó desde las primeras semanas. Reflexionando sobre esta observación vale la pena mencionar que la regeneración del tejido se lleva a cabo a partir de dos semanas después de la lesión, en este estudio la diferencia se observó desde la primera evaluación y fue en aumento gradual a lo largo de todo el estudio, probablemente porque las células que sobrevivieron a la lesión fueron protegidas por la inmunización con A91 de la degeneración secundaria, sin embargo, es necesario llevar a cabo análisis histológicos con las muestras recolectadas en estos experimentos para llegar a una conclusión.

CONCLUSIONES:

1. Las ratas con lesión en médula espinal de intensidad moderada tienen una respuesta autorreactiva protectora inducida por la inmunización con A91 que se caracteriza por presentar un fenotipo Th2 y liberar neurotrofinas.
2. La respuesta autorreactiva protectora en ratas con lesión en la médula espinal está condicionada por la intensidad de la lesión.
3. Las lesiones de intensidad severa afectan al sistema inmune, por lo que no se genera una respuesta específica contra A91, impidiendo se lleve a cabo una respuesta autorreactiva protectora.

PERSPECTIVAS

1. Resulta imprescindible realizar pruebas histológicas donde se evalúe la regeneración del tejido neural inducida por la inmunización con A91 en animales con lesión de médula espinal de intensidad moderada.
2. La información generada en este trabajo da pie a crear sinergismos de A91 con otras estrategias para mejorar las condiciones del área lesionada y así favorecer la regeneración del tejido neural, siempre y cuando la lesión sufrida sea de una intensidad que no afecte la respuesta inmune.
3. Es necesario conocer el mecanismo de acción inmunológico de A91.
4. Se necesita conocer la farmacocinética y farmacodinamia de A91.
5. Es necesario determinar si se genera toxicidad por el uso de A91 y los adyuvantes con que se aplica.

BIBLIOGRAFÍA

1. **SVAT**, (2008). Soporte vital en trauma: Traumatismo vertebral y medular.
http://www.semicyuc.org/files/RCP_files/SVAT_08.pdf
2. **Ávila-Castillo A** (2004). Trauma agudo de la médula espinal. Revista Mexicana de Anestesiología. Anestesia en Ortopedia y Traumatología vol. 27. Supl. 1 (169-171)
3. **Paterniti I**, Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, Di Paola R, Galuppo M, Bramanti P, Cuzzocrea S. (2010) Liver X receptor agonist treatment regulates inflammatory response after spinal cord trauma. J Neurochem. Feb;112(3):611-24.
4. **González I.** (2006). Evaluación clínica y morfométrica después de la administración de glutatión monoetil ester y la inmunización con A91 en ratas con lesión traumática de la médula espinal. Tesis para obtener el título de Bióloga en la Facultad de Ciencias UNAM.
5. **Martiñon S**, García E, Flores N, Gonzalez I, Ortega T, Buenrostro M, Reyes R, Fernandez-Presas AM, Guizar-Sahagún G, Correa D, Ibarra A.(2007) Vaccination with a neural-derived peptide plus administration of glutathione improves the performance of paraplegic rats. Eur J Neurosci. Jul;26(2):403-12. Epub 2007 Jul 10.
6. **Purves D.** et. al. Invitación a la Neurociencia. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 2003.
7. **López Antunes L.** (1980). Anatomía Funcional del Sistema Nervioso. Ed. LIMUSA.

8. **Ryan S**, Mcnicholas M, Eutace S (2005) Anatomía para el diagnóstico radiológico. 2ª ed. Madrid: Marban.
9. **Leeson**, Leeson. Paparo. (1990). Texto Atlas de Histología. Nueva Editorial Interamericana. México
10. **Sinescu C**, Popa F, Grigorean VT, Onose G, Sandu AM, Popescu M, Burnei G, Strambu V, Popa C. (2010) Molecular basis of vascular events following spinal cord injury. J Med Life. Jul-Sep; 3(3):254-61.
11. **Guyton A. C.** (1997) Anatomía y Fisiología del sistema nervioso. Neurociencia básica. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
12. **Siegel G.** et al. Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. Elseiver Academic Press, San Diego California, 2006.
13. **Schwab ME** and Bartholdi D. (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. Physiol. Rev., 76, 319–370
14. **Hulsebosch CE.** (2002) Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. Adv Physiol Educ. Dec;26(1-4):238-55
15. Tator CH. (1995) Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. Brain Pathol. Oct;5(4):407-13.
16. **Sandler AN**, Tator CH (1976). Effect of acute spinal cord compression injury on regional spinal cord blood flow in primates. J Neurosurg. Dec; 45(6):660-76.
17. **Kobrine, A.I.** (1975) The neuronal theory of experimental traumatic spinal cord dysfunction. Surg. Neurol. 3, 261–264

18. **Ropper A. H,** Gorson K. C., Ropper, Weinberg D. H, and Weinstein R. (2001) Treatment experience in patients with anti-myelin-associated glycoprotein neuropathy. Muscle Nerve 24 (6):778-786.
19. **Young W** (2002). Spinal cord contusion models. Prog Brain Res. 137:231-55.
20. **Koyanagi I,** Iwasaki Y, Isu T, Abe H, Akino M, and Kuroda S. (1993) Spinal cord evoked potential monitoring after spinal cord stimulation during surgery of spinal cord tumors. Neurosurgery 33 (3):451-459, 1993.
21. **De la Torre J. C.** (1981) Spinal cord injury. Review of basic and applied research. Spine 6 (4):315-335.
22. **Guha A,** Tator CH (1988) Acute cardiovascular effects of experimental spinal cord injury. J.Trauma 28 (4):481-490.
23. **Bach-y-Rita, P.** and Illis, L.S. (1993) Spinal shock: possible role of receptor plasticity and non synaptic transmission. Paraplegia 31, 82–87
24. **Cotran RS,** Mayadas-Norton T. (1999). Endothelial adhesion molecules in health and disease. Pathol Biol (Paris). Mar;46(3):164-70.
25. **Guth L,** Zhang Z, Steward O. (1999) The unique histopatological responses of the injured spinal cord. Implications for neuroprotection. Ann. N. Y. Acad. Sci. 890: 366-384.
26. **Carlson SL,** Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dosset L. (1998) Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. Exp. Neurol. 151: 77-88.

27. **Murray** RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. (2001) Bioquímica de Harper. 15a. Edición, Ed. Manual Moderno, México.
28. **Panter** SS, Yum SW, Faden AL. (1990) Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. Ann Neurol; 27: 96-99.
29. **Choi** DW. (1996) Ischemia-induced neuronal apoptosis. Curr.Opin.Neurobiol. 6 (5):667-672.
30. **Doble** A. (1999) The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. Pharmacol.Ther. 81 (3):163-221
31. **McDonald** PP, Bald A, Castella MA. (1997) Activation of NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. Blood 89: 3421-3433.
32. **Puchalski** RB, Louis JC, Brose N, Traynelis SF, Egebjerg J, Kukekov V, Wenthold RJ, Rogers SW, Lin F, Moran T. (1994) Selective RNA editing and subunit assembly of native glutamate receptors. Neuron 13 (1):131-147.
33. **Mattson** MP, Rychlik B, You JS, Siskin JE. Sensitivity of cultured human embryonic cerebral cortical neurons to excitatory amino acid-induced calcium influx and neurotoxicity. Brain Res. 542 (1):97-106, 1991.
34. **Matute** C, Alberdi E, Domercq M, Pérez-Cerdá P, Pérez-Samartín A, Sánchez-Gómez V. (2001) The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. TRENDS in Neurosciences 24: 224-230.
35. **Bethea**, J.R. and Dietrich, W.D. (2002) Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. Curr. Opin. Neurol. 15, 355–360

36. **Beattie MS, Li Q, Bresnahan JC.**(2002) Cell death and plasticity after experimental spinal cord injury. Prog Brain Res.;128:9-21
37. **Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS.** Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. Nat Med. 1997 Jan;3(1):73-6
38. **Zipfel GJ, Babcock DJ, Lee JM, Choi DW.** (2000) Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. J Neurotrauma. Oct;17(10):857-69.
39. **Taoka, Y. and Okajima, K.** (1998) Spinal cord injury in the rat. Prog. Neurobiol. 56, 341–358
40. **Anthes DL, Theriault E, and Tator CH.** (1995) Characterization of axonal ultrastructural pathology following experimental spinal cord compression injury. Brain Res. 702 (1-2):1-16.
41. **David S.** (2002). Recruiting the immune response to promote long distance axon regeneration after spinal cord injury. Prog Brain Res;137:407-14
42. **Ramón y Cajal, S.** (1914) Estudios sobre la degeneración del sistema nervioso. Vol II Imprenta Hijos de Nicolás Moya, Madrid.
43. **Ye J, Cao L, Cuib R, Huanga A, Yana Z, Lua C, He C.** (2004) The effects of ciliary neurotrophic factor on neurological function and glial activity following contusive spinal cord injury in the rats. Brain Research 997, 30–39
44. **Fawcett and Asher** (1999). The glial scar and central nervous system repair. Brain Res. Bull. 49, 377-391.

45. **Morgenstern** DA, Asher RA, Fawcett JW (2002) Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. Prog. Brain Res. 137: 313-332.
46. **Cafferty** WB, Duffy P, Huebner E, Strittmatter SM. MAG and OMgp synergize with Nogo-A to restrict axonal growth and neurological recovery after spinal cord trauma. J Neurosci. 2010 May 19;30(20):6825-37. **Burg** MA, Tillet E, Timpl R, Stallcup WB. (1996) Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules. J. Biol. Chem. 271: 26110-26116.
47. **Burg** MA, Tillet E, Timpl R, Stallcup WB. (1996) Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules. J. Biol. Chem. 271: 26110-26116
48. **Jessell** TM, Sanes JR. (2000) Development. The decade of the developing brain. Curr Opin Neurobiol. Oct;10(5):599-611
49. **Bradbury** EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB. (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. Nature 416: 636-640.
50. **Geffroin** C, Garrido JJ, Tremet L, Vaiman M. Distinct tissue distribution in pigs of tenascin-X and tenascin-C transcripts. Eur J Biochem. 1995 Jul 1;231(1):83-92.
51. **Shamash** S, Reichert F, Rotshenker S (2002) The Cytokine Network of Wallerian Degeneration: Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 α , and Interleukin-1 β . J Neurosci, 22(8):3052–3060
52. **Celik** A. (2011) The relationship between tenascin-C levels and the complexity of coronary lesion after myocardial infarction. J Atheroscler Thromb.18(8):693-7

53. **Schweitzer** J, Becker T, Lefebvre J, Granato M, Schachner M, Becker CG. (2005) Tenascin-C is involved in motor axon outgrowth in the trunk of developing zebrafish. Dev Dyn. Nov;234(3):550-66
54. **Apostolova** I, Irintchev A, Schachner M. (2006) Tenascin-R restricts posttraumatic remodeling of motoneuron innervation and functional recovery after spinal cord injury in adult mice. J Neurosci. Jul 26;26(30):7849-59
55. **Rabchevsky** AG, Fugaccia I, Sullivan PG, Blades DA, Scheff SW.(2002) Efficacy of methylprednisolone therapy for the injured rat spinal cord. J.Neurosci.Res. 68 (1):7-18.
56. **Xu** ZP, Saunders GF. (1998). PAX6 intronic sequence targets expression to the spinal cord. Dev Genet;23(4):259-63.
57. **Diaz-Ruiz** A, Rios C, Duarte I, Correa D, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I, Ibarra A (2000). Lipid peroxidation inhibition in spinal cord injury: cyclosporin-A vs methylprednisolone. Neuroreport. Jun 5;11(8):1765-7
58. **Limbourg** FP, Huang Z, Plumier JC, Simoncini T, Fujioka M, Tuckermann J, Schütz G, Moskowitz MA, Liao JK. (2002) Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids. J Clin Invest. Dec; 110(11):1729-38.
59. **Li** L, Xu Q, Wu Y, Hu W, Gu P, Fu Z. Combined therapy of methylprednisolone and brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury in rats. Chin Med J (Engl). 2003 Mar;116(3):414-8

60. **Kim DH, Jahng TA.** Continuous brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion after methylprednisolone treatment in severe spinal cord injury. J Korean Med Sci. 2004 Feb;19(1):113-22
61. **Lee BH, Lee KH, Yoon DH, Kim UJ, Hwang YS, Park SK, Choi JU, Park YG.** Effects of methylprednisolone on the neural conduction of the motor evoked potentials in spinal cord injured rats. J Korean Med Sci. 2005 Feb;20(1):132-8
62. **Lee JM, Yan P, Xiao Q, Chen S, Lee KY, Hsu CY, Xu J.** (2008) Methylprednisolone protects oligodendrocytes but not neurons after spinal cord injury. J Neurosci. Mar 19; 28(12):3141-9.
63. **Hughenoltz H, Cass DE, Dvorak MF, Fewer DH, Fox RJ, Izukawa DM, Lexchin J, Tuli S, Bharatwal N, Short C.**(2002) High-dose methylprednisolone for acute closed spinal cord injury--only a treatment option. Can J Neurol Sci. Aug;29(3):227-35
64. **Goodman GA.** (1990) The pharmacological basis of the therapeutics. Mc Graw-Hill, New York.
65. **Bracken MB, Holford TR.** (1993) Effect of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NACIS 2. J. Neurosurg; 79:500-507.
66. **Murray, M. Kim, D. Liu, Y. Tobias, C. Tessler , A. Fischer I.** (2002) Transplantation of genetically modified cells contributes to repair and recovery from spinal injury. Brain Research Reviews 40 292–300

67. **Almeida** FM, Marques SA, Ramalho BD, Rodrigues RF, Cadilhe DV, Furtado DR, Kerkis I, Pereira LV, Rehen SK, Martinez AM. Human dental pulp cells: a new source of cell therapy in a mouse model of compressive spinal cord injury. J Neurotrauma. 2011 May 25.
68. **Myckatyn** TM, Mackinnon SE, McDonald JW. (2004) Stem cell transplantation and other novel techniques for promoting recovery from spinal cord injury. Transpl Immunol. Apr;12(3-4):343-58
69. **Zhang** W, Yan Q, Zeng YS, Zhang XB, Xiong Y, Wang JM, Chen SJ, Li Y, Bruce IC, Wu W. (2010) Implantation of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells transfected with the neurotrophin-3 gene and pretreated with retinoic acid in completely transected spinal cord. Brain Res. Nov 4;1359:256-71
70. **Hu** SL, Luo HS, Li JT, Xia YZ, Li L, Zhang LJ, Meng H, Cui GY, Chen Z, Wu N, Lin JK, Zhu G, Feng H.(2010) Functional recovery in acute traumatic spinal cord injury after transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. Crit Care Med. Nov;38(11):2181-9.
71. **Leeson**, Leeson. Paparo. (1990). Texto Atlas de Histología. Nueva Editorial Interamericana. México
72. **Xu** XM, Guénard V, Kleitman N, Aebischer P, Bunge MB. (1995) A combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into Schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord. Exp Neurol. Aug;134(2):261-72

73. **Xu XM**, Guénard V, Kleitman N, Bunge MB. (1995) Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. J Comp Neurol. Jan 2;351(1):145-60
74. **Xu ZP**, Saunders GF. (1998). PAX6 intronic sequence targets expression to the spinal cord. Dev Genet;23(4):259-63.
75. **Plant GW**, Bates ML, Bunge MB.(2001) Inhibitory proteoglycan immunoreactivity is higher at the caudal than the rostral Schwann cell graft-transected spinal cord interface. Mol Cell Neurosci. Mar;17(3):471-87
76. **Davies SJ**, Shih CH, Noble M, Mayer-Proschel M, Davies JE, Proschel C. Transplantation of specific human astrocytes promotes functional recovery after spinal cord injury. PLoS One. 2011 Mar 2;6(3).
77. **Zhang JF**, Zhao FS, Wu G, Kong QF, Sun B, Cao J, Zhang Y, Wang JH, Zhang J, Jin XD, Li HL. (2011) Therapeutic effect of co-transplantation of neuregulin-1-transfected Schwann cells and bone marrow stromal cells on spinal cord hemisection syndrome. Neurosci Lett. Jun 22;497(2):128-33.
78. **Davies SJ**, Shih CH, Noble M, Mayer-Proschel M, Davies JE, Proschel C. (2011) Transplantation of specific human astrocytes promotes functional recovery after spinal cord injury. PLoS One. Mar 2;6(3):e17328.
79. **Ye J**, Cao L, Cuib R, Huanga A, Yana Z, Lua C, He C. (2004) The effects of ciliary neurotrophic factor on neurological function and glial activity following contusive spinal cord injury in the rats. Brain Research 997, 30–39

80. **De Laporte** L, des Rieux A, Tuinstra HM, Zelivyanskaya ML, De Clerck NM, Postnov AA, Pr at V, Shea LD. Vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 2 delivery from spinal cord bridges to enhance angiogenesis following injury. J Biomed Mater Res A. 2011 May 31. doi: 10.1002/jbm.a.33112.
81. **Ma** C, Xu J, Cheng H, Lee YS, Lin V, He J.(2010) A neural repair treatment with gait training improves motor function recovery after spinal cord injury. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.:5553-6.
82. **Sosa** I, Reyes O, Kuffler DP.(2005) Advances in spinal cord repair techniques. P R Health Sci J. Dec;24(4):313-22
83. **Ibarra** A, Reyes J, Martínez S, Correa D, Gu zar-Sahagún G, Grijalva I, Castañeda-Hern andez G, Flores-Murrieta FJ, Franco-Bourland R, Madrazo I.(1996) Use of cyclosporin-A in experimental spinal cord injury: design of a dosing strategy to maintain therapeutic levels. J Neurotrauma. Oct;13(10):569-72.
84. **Diaz-Ruiz** A, Rios C, Duarte I, Correa D, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Ibarra A. (1999) Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats. Neurosci Lett. Apr 30;266(1):61-4.
85. **McMahon** SS, Albermann S, Rooney GE, Moran C, Hynes J, Garcia Y, Dockery P, O'Brien T, Windebank AJ, Barry FP.(2009) Effect of cyclosporin A on functional recovery in the spinal cord following contusion injury. J Anat. Sep;215(3):267-79.
86. **L ** HZ, Wang YX, Zhou JS, Wang FC, Hu JG (2010): Cyclosporin A increases recovery after spinal cord injury but does not improve myelination by oligodendrocyte progenitor cell transplantation. BMC Neurosci. Oct 12;11:127

87. **Avramut M, Achim CL (2003)** Immunophilins in nervous system degeneration and regeneration. *Curr Top Med Chem.*;3(12):1376-82.
88. **Ramírez-Mares MV, Saavedra Molina FA (2009):** La azida induce transición de la permeabilidad de la membrana interna en mitocondrias de hígado de rata. *Ciencia y Mar* 2009, XIII (37): 29-36
89. **Zhang J, Zhang A, Sun Y, Cao X, Zhang N (2009):** Treatment with immunosuppressants FTY720 and tacrolimus promotes functional recovery after spinal cord injury in rats. *Tohoku J Exp Med*. Dec;219(4):295-302.
90. **Asante CO, Wallace VC, Dickenson AH. 2010.** Mammalian target of rapamycin signaling in the spinal cord is required for neuronal plasticity and behavioral hypersensitivity associated with neuropathy in the rat. *J Pain*. 2010 Dec;11(12):1356-67
91. **Tanaka H, Yamashita T, Yachi K, Fujiwara T, Yoshikawa H, Tohyama M. (2004)** Cytoplasmic p21Cip1/WAF1 enhances axonal regeneration and funcional recovery after spinal cord injury in rats. *Neuroscience* 127 155–164
92. **Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. (1999)** Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med.* 5: 49-55.
93. **Hauben E et al. (2000)** Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. *J. Neurosci.*; 20: 6421–6430
94. **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. Jun 20;97(13):7446-51
95. **Hauben** E, Gothilf A, Cohen A, Butovsky O, Nevo U, Smirnov I, Yoles E, Akselrod S, Schwartz M. (2003) Vaccination with dendritic cells pulsed with peptides of myelin basic protein promotes functional recovery from spinal cord injury. J Neurosci. Sep 24;23(25):8808-19.
 96. **Roitt**, I., Brostoff, J., Male, D. (2000) Immunology, 5a edición, ed. Mosby, Barcelona, España.
 97. **Abbas** A, Lichtman A. (2004) Inmunología celular y molecular. 5ª Edición, Ed. Elsevier España, S. A., Madrid.
 98. **Moreno**, J. (1996) Mecanismos de autoinmunidad. En: Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. 1a edición, ed. Limusa, S. A. de C. V. México D. F.
 99. **Goldsby** R. (2004) Inmunología. Quinta Edición. McGraw-Hill Interamericana
 100. **Schwartz** M, Cohen I, Lazarov-Spiegler O, Moalem G, Yoles E. (1999) The remedy may lie in ourselves: prospects for immune cell therapy in central nervous system protection and repair. J Mol Med (Berl). Oct;77(10):713-7.
 101. **Frenkel** D, Dewachter I, Van Leuven F, Solomon B. (2003) Reduction of beta-amyloid plaques in brain of transgenic mouse model of Alzheimer's disease by EFRH-phage immunization. Vaccine. Mar 7;21(11-12):1060-5.
 102. **Greenberg** SM, Bacskai BJ, Hyman BT. (2003) Alzheimer disease's double-edged vaccine. Nat Med. Apr;9(4):389-90..

103. **Avidan** H, Kipnis J, Butovsky O, Caspi RR, Schwartz M. (2004) Vaccination with autoantigen protects against aggregated beta-amyloid and glutamate toxicity by controlling microglia: effect of CD4+CD25+ T cells. Eur J Immunol. Dec;34(12):3434-45.
104. **Maiti** PK, Feferman T, Im SH, Souroujon MC, Fuchs S. (2004) Immunosuppression of rat myasthenia gravis by oral administration of a syngeneic acetylcholine receptor fragment. J Neuroimmunol. Jul;152(1-2):112-20.
105. **Hammarberg** H, Lidman O, Lundberg C, Eltayeb SY, Gielen AW, Muhallab S, Svenningsson A, Lindå H, van Der Meide PH, Cullheim S, Olsson T, Piehl F. (2000) Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. J Neurosci. Jul 15; 20 (14):5283-91.
106. **Benner** EJ, Mosley RL, Destache CJ, Lewis TB, Jackson-Lewis V, Gorantla S, Nemachek C, Green SR, Przedborski S, Gendelman HE. (2004) Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. Jun 22;101(25):9435-40.
107. **Byrne** KT, Côté AL, Zhang P, Steinberg SM, Guo Y, Allie R, Zhang W, Ernstoff MS, Usherwood EJ, Turk MJ. Autoimmune melanocyte destruction is required for robust CD8+ memory T cell responses to mouse melanoma. J Clin Invest. 2011 May 2;121(5):1797-809.

108. **Popovic J**, Li LP, Kloetzel PM, Leisegang M, Uckert W, Blankenstein T. (2011) The only proposed T-cell epitope derived from the TEL-AML1 translocation is not naturally processed. Blood. May 25. [Epub ahead of print]
109. **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. Sep; 10(11):1296-302.
110. **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. Jul; 4(7):814-21.
111. **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. Jul 1; 21(13):4564-71.
112. **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
113. **Jameson SC**, Bevan MJ. (1995) T cell receptor antagonists and partial agonists. Immunity. Jan;2(1):1-11
114. **Kersh GJ**, Allen PM. (1996) Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: a single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands. J Exp Med. Oct 1;184(4):1259-68

115. **Hall FC, Visconti KC, Ahmad RC, Parry SL, Miltenburg AM, McConnell HM, Mellins ED, S nderstrup 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. Aug; 48(8):2375-85.**
116. **Gaur A, Boehme SA, Chalmers D, Crowe PD, Pahuja A, Ling N, Brocke S, Steinman L, Conlon PJ. Amelioration of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with altered myelin basic protein peptides involves different cellular mechanisms. J Neuroimmunol. 1997 Apr;74(1-2):149-58.**
117. **Schwartz M, Ziv Y. Immunity to self and self-maintenance: a unified theory of brain pathologies. Trends Immunol. 2008 May;29(5):211-9.**
118. **Schwartz M, Yoles E. Immune-based therapy for spinal cord repair: autologous macrophages and beyond. J Neurotrauma. 2006 Mar-Apr;23(3-4):360-70**
119. **Kipnis J, Mizrahi T, Hauben E, Shaked I, Shevach E, Schwartz M. 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. 2002 Nov 26;99(24):15620-5**
120. **Ley General de Salud. Título S ptimo: De la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación. Editorial Porr a, 6^a Ed, México, D.F. 1990 pp 430-431.**
121. **Young W (2002). Spinal cord contusion models. Prog Brain Res. 137:231-55.**

122. **Markwell** MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal Biochem. 1978 Jun 15;87(1):206-10
123. **Basso**, D.M., Beattie, M.S. & Bresnahan, J.C. (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J. Neurotrauma; 12: 1□21.
124. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. (1968)
125. **Ibarra** A, Jiménez A, Cortes C, Correa D. (2007) Influence of the intensity, level and phase of spinal cord injury on the proliferation of T cells and T-cell-dependent antibody reactions in rats. Spinal Cord, 45, 380-386.
126. **Trigo** F, Mateos A. Editores.(1987) Patología General Veterinaria. División del Sistema de Universidad Abierta, FMVZ, UNAM.
127. **Madden** KS, Sanders VM, Felten DL (1995) Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. Annu Rev Pharmacol Toxicol 35: 417–448.
128. **Prass** K, Meisel C, Hoflich C, Braun J, Halle E, et al. (2003) Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. J Exp Med 198: 725–736.
129. **Tomlinson** S, Heagerty AM, Weetman AP. Editores. (1997) Mechanisms of Disease. An introduction to clinical sciences. Cambridge University Press

130. **Stier** KS, Almasi B, Gasparini J, Piauult R, Roulin A, et al. (2009) Effects of corticosterone on innate and humoral immune functions and oxidative stress in barn owl nestlings. J Exp Biol 212: 2085–2091.
131. **Lucin** KM, Sanders VM, Jones TB, Malarkey WB, Popovich PG (2007) Impaired antibody synthesis after spinal cord injury is level dependent and is due to sympathetic nervous system dysregulation. Exp Neurol 207: 75–84
- Nagahara AH, Tuszynski MH. (2011) Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. Nat Rev Drug Discov. Mar;10(3):209-19.
132. **Nagahara** AH, Tuszynski MH. (2011) Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. Nat Rev Drug Discov. Mar;10(3):209-19.
133. **Sasaki** M, Radtke C, Tan M. A, Zhao P, Hamada H, Houkin K, Honmou O, and Kocsis D. J, (2009) BDNF-Hypersecreting Human Mesenchymal Stem Cells Promote Functional Recovery, Axonal Sprouting, and Protection of Corticospinal Neurons after Spinal Cord Injury. Journal of Neuroscience, November 25, 29(47):14932–14941.
134. **Lambert** WS, Clark AF, Wordinger RJ. Effect of exogenous neurotrophins on Trk receptor phosphorylation, cell proliferation, and neurotrophin secretion by cells isolated from the human lamina cribrosa. Mol Vis. 2004 Apr 19;10:289-96.
135. **Shimazu** K, Zhao M, Sakata K, Akbarian S, Bates B, Jaenisch R, Lu B. NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. Learn Mem. 2006 May-Jun;13(3):307-15.

136. **Chao** MV, Rajagopal R, Lee FS. Neurotrophin signalling in health and disease. Clin Sci (Lond). 2006 Feb;110(2):167-73.
137. **Fukumitsu** H. (2011). Effect of environmental factor influencing the development of mouse cerebral cortex. Yakugaku Zasshi.;131(9):1317-21.
138. **García** E, Silva-García R, Mestre H, Flores N, Martiñón S, Calderón-Aranda ES, Ibarra A. (2012) Immunization with A91 peptide or copolymer-1 reduces the production of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase gene expression after spinal cord injury. J Neurosci Res. Mar; 90(3):656-63.
139. **Ziv** Y, Avidan H, Pluchino S, Martino G, Schwartz M. (2006) Synergy between immune cells and adult neural stem/progenitor cells promotes functional recovery from spinal cord injury. Proc Natl Acad Sci U S A. Aug 29; 103 (35):13174-9.

Anexo: Abreviaturas

LTME	lesión traumática de médula espinal
Na ⁺	sodio
K ⁺	potasio
ATP	adenosil trifosfato
GABA	ácido gama aminobutírico
Ca ⁺	calcio
SNC	sistema nervioso central
ROS	especies reactivas de oxígeno
DNA	ácido desoxirribonucleico
NMDA	N-metil-D-aspartato
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
IL1- α	interleucina uno alfa
IL1- β	interleucina uno beta
LP	lipoperoxidación
BDNF	factor neurotrófico derivado de cerebro
CX43	conexina 43
GLT-1	transportador 1 para gluatamato
GDNF	factor neurotrófico derivado de células gliales
CNTF	factor neurotrófico ciliar
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
FGF-2	factor de crecimiento de fibroblastos
FDA	Food and Drugs Administration
eIF4E	factor de iniciación eucariótica 4E
SI	sistema inmune
TCR	receptor de célula T
MHC	complejo principal de histocompatibilidad

CD	grupo de diferenciación (del inglés cluster of differentiation)
Th	célula T cooperadora
NT-3	neurotrofina 3
mg	miligramo
kg	kilogramo
LME	lesión de médula espinal
g	gramo
mm	milímetro
NYU	Universidad de New York
μ g	microgramos
μ l	microlitros
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
SFB	suero fetal bovino
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
Con-A	concanavalina A
OVA	ovoalbúmina
MBP	proteína básica de mielina
CO ₂	dióxido de carbono
IL-4	interleucina 4
INF- γ	interferón gama
M	molar
BBB	prueba de locomoción a campo abierto, escala de Basso, Beattie y Bresnahan
PT	patas traseras
PD	patas delanteras
T1	vértebra torácica 1
T12	vértebra torácica 12
CRF	hormona liberadora de corticotrofina
ACTH	hormona adrenocorticotrófica
iNOS	sintasa del óxido nítrico inducible

Development of Protective Autoimmunity by Immunization with a Neural-Derived Peptide Is Ineffective in Severe Spinal Cord Injury

Susana Martiñón¹, Elisa García^{1,2}, Gabriel Gutierrez-Ospina³, Humberto Mestre², Antonio Ibarra^{1,2*}

1 Centro de Investigación del Proyecto CAMINA A.C., Mexico City, Mexico, **2** Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Anáhuac México Norte, Huixquilucan, Estado de México, Mexico, **3** Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Abstract

Protective autoimmunity (PA) is a physiological response to central nervous system trauma that has demonstrated to promote neuroprotection after spinal cord injury (SCI). To reach its beneficial effect, PA should be boosted by immunizing with neural constituents or neural-derived peptides such as A91. Immunizing with A91 has shown to promote neuroprotection after SCI and its use has proven to be feasible in a clinical setting. The broad applications of neural-derived peptides make it important to determine the main features of this anti-A91 response. For this purpose, adult Sprague-Dawley rats were subjected to a spinal cord contusion (SCC; moderate or severe) or a spinal cord transection (SCT; complete or incomplete). Immediately after injury, animals were immunized with PBS or A91. Motor recovery, T cell-specific response against A91 and the levels of IL-4, IFN- γ and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) released by A91-specific T (T_{A91}) cells were evaluated. Rats with moderate SCC, presented a better motor recovery after A91 immunization. Animals with moderate SCC or incomplete SCT showed significant T cell proliferation against A91 that was characterized chiefly by the predominant production of IL-4 and the release of BDNF. In contrast, immunization with A91 did not promote a better motor recovery in animals with severe SCC or complete SCT. In fact, T cell proliferation against A91 was diminished in these animals. The present results suggest that the effective development of PA and, consequently, the beneficial effects of immunizing with A91 significantly depend on the severity of SCI. This could mainly be attributed to the lack of T_{A91} cells which predominantly showed to have a Th2 phenotype capable of producing BDNF, further promoting neuroprotection.

Citation: Martiñón S, García E, Gutierrez-Ospina G, Mestre H, Ibarra A (2012) Development of Protective Autoimmunity by Immunization with a Neural-Derived Peptide Is Ineffective in Severe Spinal Cord Injury. PLoS ONE 7(2): e32027. doi:10.1371/journal.pone.0032027

Editor: Cesario V. Borlongan, University of South Florida, United States of America

Received: October 13, 2011; **Accepted:** January 17, 2012; **Published:** February 14, 2012

Copyright: © 2012 Martiñón et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was partially supported by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT), grant No. 57204, Camina Research Center and Universidad Anahuac México Norte. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: iantonio65@yahoo.com

Introduction

Protective autoimmunity (PA) is a physiological T cell-dependent response to neural antigens that protects rather than destroys neural tissue [1–5]. In order to obtain the maximal benefits of PA, it is possible to boost this response by immunizing with neural constituents. However, when immunizing with self-antigens there is always a risk of developing a pathological autoimmune response. At the moment, PA can be boosted with non-encephalitogenic peptides such as A91, these have significant evidence of their neuroprotective effects after SCI. A91 is a peptide derived from myelin basic protein (sequence 87–99) but replacing the lysine residue at position 91 with alanine. Immunizing with A91 reduces tissue damage and improves motor recovery after moderate SCI. The therapeutic effect of this strategy has been improved by combining A91 immunization with other therapies [6]. As immunizing with these types of peptides promises important expectations in the future, it is relevant to better understand the general conditions needed to achieve its beneficial effects.

The effect of PA depends on the rapid and proper development of the specific immune response [7] in such a way that any disturbance could derail the benefits of PA. A previous study in our laboratory showed that the adaptive immune response to any immunogen depends on the severity of SCI [8]; the more severe the injury (severe SCC) the more impaired the immune response. Since the beneficial outcome of PA depends on the proper development of this response we attempted to evaluate motor recovery, lymphocyte proliferation, T cell phenotype and neurotrophin production in animals subjected to SCI. Injury consisted of either a moderate SCC, severe SCC, incomplete SCT or complete SCT. A91 induced a better motor recovery in rats with moderate SCC. This beneficial effect was associated with a proliferative T cell response to A91 and the subsequent improvement in motor recovery. The proliferative response was characterized by a Th2 phenotype and the significant release of BDNF. In contrast, severe injuries eliminated the beneficial effect of A91 on motor recovery. This failure was associated to the decrease of the specific immune response towards A91.

Materials and Methods

Animals

Adult female Sprague-Dawley rats (13–14 weeks old, 200–220 g) were supplied by the Animal Breeding Center of Proyecto Camina A. C. Efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Ethics Statement

All procedures were in accordance with the National Institutes of Health (US) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Mexican Official Norm on Principles of Laboratory Animal Care (NOM 062-ZOO-1999). All animal procedures were approved by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT) Animal Bioethics and Welfare Committee (ID: 57204; CSNBTBIBAJ 090812 960).

Spinal Cord Injury

Rats were anesthetized by intramuscular injection of ketamine (80 mg/kg; PISA Laboratories, Mexico City, Mexico) and xylazine (12.5 mg/kg; Bayer Laboratories, Mexico City, Mexico). One hour after anesthesia induction the spinal cord was exposed and the animals were subjected to a SCC or SCT at T9. For contusion, a 10-g rod was dropped onto the exposed spinal cord from a height of 25 (moderate) or 50 mm (severe), using the NYU impactor (NYU, New York). This device is shown to inflict a well-calibrated contusive injury of the spinal cord [9]. Prior to transection, the dura mater was dissected and separated from the spinal cord with a 30-gauge needle. Complete transection was performed by sliding a straight-edged scalpel blade through the spinal cord. Accuracy of the injury was visually verified by passing a micro-hook through the internal contour of the dura. For incomplete transection, approximately 50% of the dorsal spinal cord (including the corticospinal tracts) was transversely cut with iridectomy scissors. After injury, the aponeurotic plane and the skin were sutured separately with nylon thread.

Animal Care

The animals were matched for age and weight in each experiment and housed in pairs in a light- and temperature-controlled room. To minimize stress, animals were handled daily at least once a day 7 days prior to the surgical procedure.

Sterile bedding and filtered water was replaced daily. Bladder expression was assisted manually twice a day until automatic voidance was regained. During the first week after contusion the animals received a course of enrofloxacin (Marvel, Mexico City, Mexico) in their drinking water at an approximate dose of 64 mg/kg/d. All rats were carefully monitored for evidence of postsurgical complications. Animals with signs of infections were excluded from the study.

Antigen

The A91 peptide was derived from the encephalitogenic sequence of myelin basic protein (MBP; amino acids 87–99). Nonencephalitogenicity was obtained by replacing the lysine residue at position 91 with alanine. The modified peptide was purchased from Invitrogen Life Technologies (San Diego, CA, USA). Reverse-phase HPLC confirmed that the purity of the A91 peptide was >95%.

Active immunization

Rats were immunized subcutaneously at the base of the tail with 150 µg of A91 or phosphate buffered saline (PBS) emulsified in an

equal volume of complete Freund's adjuvant (CFA) containing 0.5 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* (Sigma, St. Louis MO) within a 60 min time frame after injury.

Assessment of functional recovery

Motor functional recovery was assessed using the Basso, Beattie & Bresnahan (BBB) open-field test of locomotor ability [10]. The recovery was scored on the BBB Locomotor Rating Scale of 0 (complete paralysis) to 21 (complete mobility). Animals were tested weekly during an 8-week period by observers blinded to the treatment received by each rat.

T cell proliferation

Cells were pooled from excised inguinal lymph nodes 14 days after SCI (n = 4). The cells were cultured in quintuplicate flat-bottomed wells in 0.2 ml of RPMI-1640 medium (GIBCO, New York) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, New York) on a 96-well microtiter plate. Cells (2.5×10^5 cells per well) were cultured 72 hrs in antigen-free medium or together with A91 (10 µg/ml), ovalbumin (OVA; 10 µg/ml; Sigma), or concanavalin-A (ConA; 10 µg/ml; Sigma St. Louis MO) at 37°C in 5% CO₂. After two washes with RPMI-1640, cells were labeled with carboxyfluorescein diester amine (CFSE) (Molecular Probes), CFSE-labeled cells divide and its progeny are endowed with half the number of carboxyfluorescein-tagged molecules and thus each cell division can be assessed by measuring the corresponding decrease in cell fluorescence. CFSE was used at a final concentration of 1 µM and, 5 µl/well of this solution were rapidly dispensed into the cell suspension insuring a homogeneous labeling. Cells were then incubated for 24 h at 37°C. Staining was halted by the addition of an equal volume of fetal bovine serum. The proliferative response was determined by flow cytometry. Cells were also stained with phycoerythrin-labeled anti-CD4 monoclonal antibodies (BD Pharmingen, San Diego, CA), unstained cells were used as controls. Cells stained with CFSE and CD4 were analyzed. For analysis, the area of lymphocytes was selected based on the light scattering characteristics (size/granularity) of these cells. Afterwards, the area of CD4+ cells was selected and analyzed for CFSE fluorescence. Mean fluorescence intensity data was obtained from fluorescence histograms to evaluate the fractions of T cells that have completed certain number of divisions. Ten thousand events were collected for each sample on a FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, Mountain View, CA) and analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences). The stimulation index (SI) was calculated by dividing the mean percentage of proliferation in experimental wells by the mean percentage of proliferation in the corresponding control wells (cells cultured without antigen).

Table 1. Number of animals per group used to evaluate motor recovery.

Groups	Number of animals Immunized with	
	A91	PBS
Moderate SCC	10	10
Severe SCC	10	10
Complete SCT	10	10

SCC: Spinal cord contusion; SCT: Spinal cord transection.
doi:10.1371/journal.pone.0032027.t001

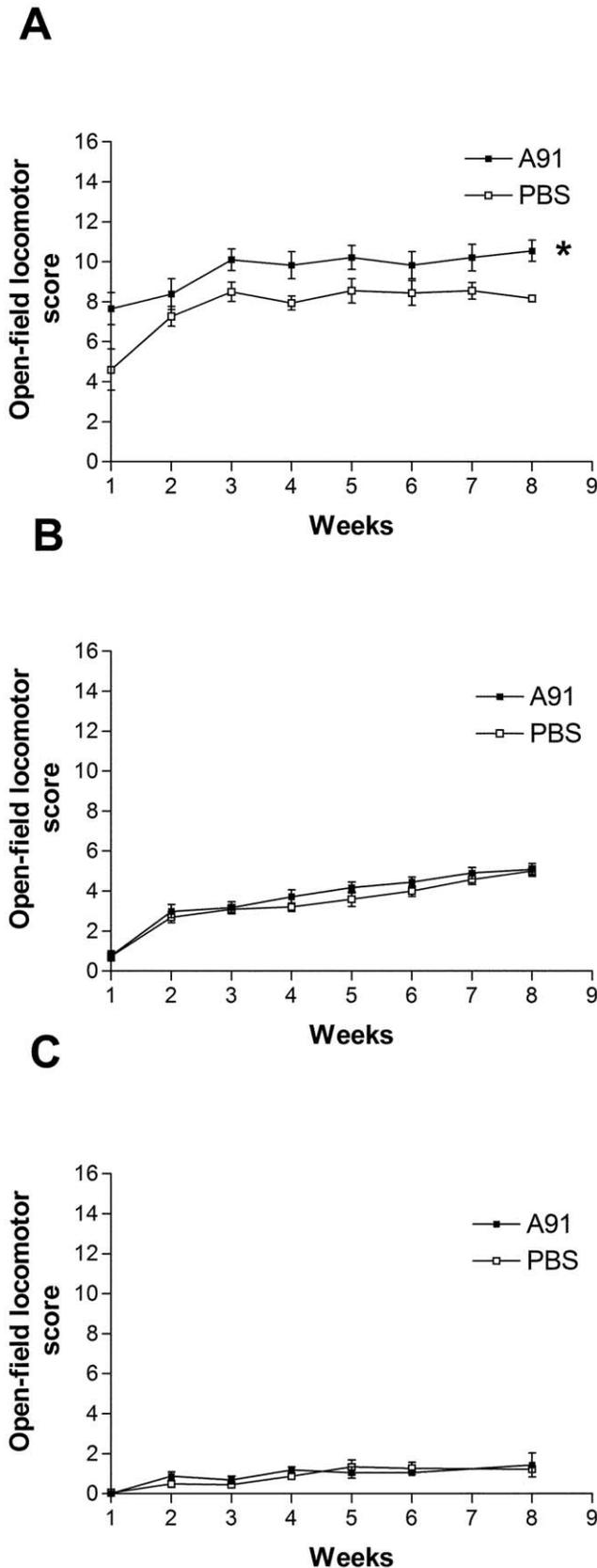


Figure 1. Motor recovery of spinal cord injured rats. Animals were subjected to a moderate (A) or severe spinal cord contusion (B). The recovery of rats subjected to a complete SCT is also shown (C). In all

cases, animals were treated either with A91 or PBS. Severe injuries abolished the beneficial effect induced by immunizing with A91. * Different from PBS group ($p < 0.05$, two-way ANOVA for repeated measures). Each point represents the mean \pm SD of 10 rats. doi:10.1371/journal.pone.0032027.g001

Cytokine analysis

An ELISA kit (BD Biosciences, San Diego CA) was used to analyze the concentration of either IL-4 or IFN- γ in supernatants obtained from T cell proliferation assays as described by the manufacturer.

BDNF analysis

An ELISA kit (Chemicon International) was used to analyze the concentration of BDNF in supernatants obtained from T cell proliferation assays as described by the manufacturer.

Statistical analysis

Data was analyzed using the GraphPad Prism 3.0 software and presented as mean \pm standard deviation (SD). Motor recovery was analyzed by two-factor ANOVA for repeated measures. The proliferative response was evaluated using the Kruskal-Wallis test with *post-hoc* Mann-Whitney U tests. In the analysis of the IL-4/IFN- γ index and BDNF levels a Student's t-test was performed. Differences of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results

A91-induced motor recovery is impaired by severe SCI

The first step of this work, investigated the effect of immunizing with A91 on the functional motor recovery of animals subjected to either a moderate SCC, severe SCC, or a complete SCT ($n = 10$ per group). In all cases, the effect of A91 immunization was compared to PBS immunization controls ($n = 10$, see Table 1). Figure 1A depicts that one week after injury, A91 immunization promoted a better recovery in moderate SCC animals (7.9 ± 0.6 vs. 4.2 ± 0.9 , A91 and PBS immunization respectively; mean \pm SD). Towards the end of study (week 8), A91-treated rats showed a significant improvement in recovery compared to PBS-immunized animals (10.2 ± 0.5 vs. 8.3 ± 0.3 , A91 and PBS immunization respectively; $p < 0.05$, $F = 11.67$). In contrast, A91 immunization did not promote any functional improvement in animals subjected to severe SCC (Figure 1B). At the end of the evaluation period, the recovery of A91-immunized rats (5.09 ± 0.1) did not differ significantly from PBS-immunized controls (5.0 ± 0.2 , $p > 0.05$, $F = 0.93$). Finally, animals subjected to complete SCT had poor post-injury recovery (Fig. 1C). As

Table 2. Number of animals per group used to evaluate the proliferative response.

Groups	Number of animals immunized with	
	A91	PBS
Moderate SCC	5	5
Severe SCC	5	5
Complete SCT	5	5
Incomplete SCT	5	5

SCC: Spinal cord contusion; SCT: Spinal cord transection. doi:10.1371/journal.pone.0032027.t002

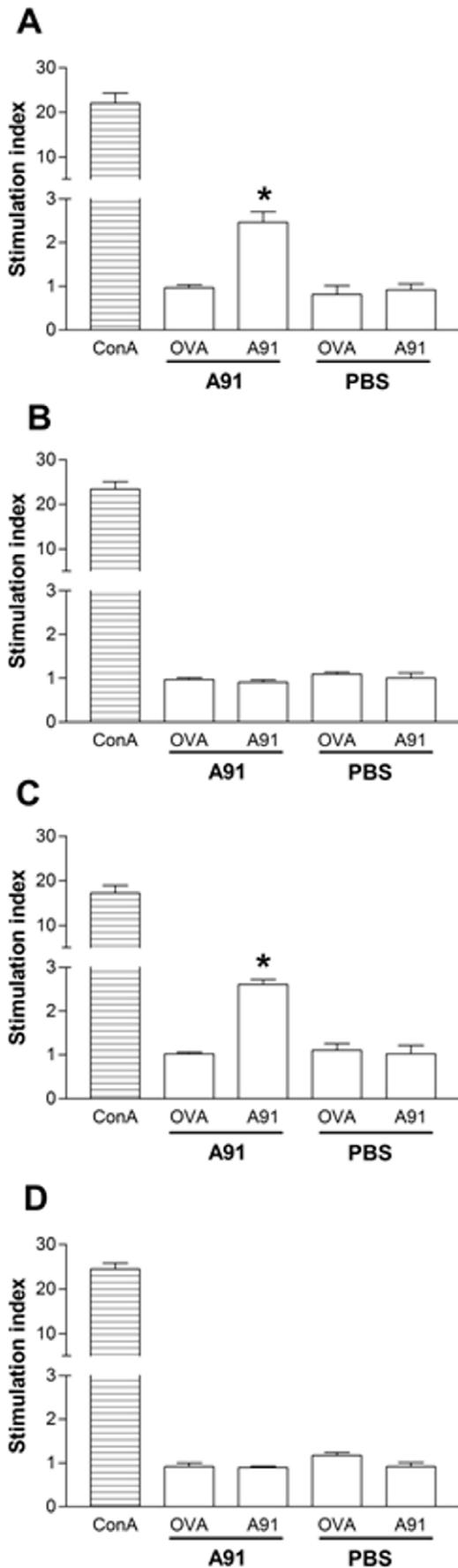


Figure 2. Effect of spinal cord injury on the proliferative response to A91. T cell proliferation against A91 was analyzed in rats with moderate (A) or severe (B) spinal cord contusion (SCC). The same evaluation was performed on rats with incomplete (C) or complete (D) spinal cord transection (SCT). Severe SCC and complete SCT inhibited the proliferative response against A91. * Different from PBS group ($p=0.01$, Mann-Whitney U test). Bars represent the mean \pm SD of 5 rats. doi:10.1371/journal.pone.0032027.g002

shown, both A91- and PBS- immunized rats presented comparable motor recovery that was very low, even towards the end of the study (1.6 ± 0.2 vs. 1.1 ± 0.1 , A91 and PBS respectively; $p > 0.05$, $F = 0.02$).

Severe SCI impairs the ability to develop an adaptive T_{A91} cell response after immunization

In view of the above results, we now intended to find if immunization with A91 was inducing a specific immune response in animals with severe SCC or complete SCT. The rationale for this study was based on the idea that the absence of neuroprotection could be the result of a failure to induce an anti-A91 response (PA). For this purpose, twenty rats were subjected to a moderate ($n=10$), or severe ($n=10$) SCC; another 20 were subjected to a complete ($n=10$) or incomplete SCT ($n=10$, see Table 2). The last group was added to investigate the proliferative response in animals that received an incomplete transection of the spinal cord. Immediately after injury, animals were immunized with A91 ($n=5$) or PBS ($n=5$, see Table 2). Total leukocyte cell fractions obtained from lymph nodes of these animals were assayed. Figures 2 and 3 show that A91 immunization induced significant proliferation of T_{A91} cells in rats with moderate SCC (Fig. 2A; SI = 2.5 ± 0.42 , mean \pm SD) or incomplete SCT (Fig. 2C; SI = 2.6 ± 0.2). However, in the case of rats subjected to severe SCC (Fig. 2B; SI = 0.90 ± 0.13) or complete SCT (Fig. 2D; SI = 0.8 ± 0.05), the proliferative response against A91 was absent (see also figure 3).

T_{A91} cells have a prevalent Th2 phenotype and secrete increased amounts of BDNF

In order to better characterize the proliferative response induced by A91 immunization in moderately injured animals (rats presenting the neuroprotective effect), we now explored the IL-4/IFN- γ index in the supernatants obtained from the proliferation assays stimulated with A91 peptide and performed to PBS- and A91-immunized animals (previous experiment). Immunizing with A91 caused an increased release of IL-4 in proliferating lymphocytes. In both moderate SCC (Fig. 4A; 2.94 ± 0.3 , mean \pm SD; $p < 0.0001$ vs. PBS, Student's t-test) and incomplete SCT rats (Fig. 4B; 3.16 ± 0.6 ; $p = 0.001$ vs. PBS, Student's t-test) the IL-4/IFN- γ index of A91-immunized rats was significantly higher than that observed for PBS-immunized controls (1.2 ± 0.2 and 1.01 ± 0.5 respectively).

Previous studies have demonstrated that Cop-1- (another neural-derived peptide) specific T cells are capable of producing high levels of BDNF [11]. The next step of this study explored the concentration of BDNF in the supernatant of cells from A91- or PBS-immunized rats that were co-cultured with A91. As is shown, the proliferative response induced by A91 in moderate SCC rats was capable of producing increased amounts of BDNF (Fig. 5A and B). The levels of this neurotrophin were significantly higher in cultures from A91-stimulated animals than those observed in PBS-stimulated controls.

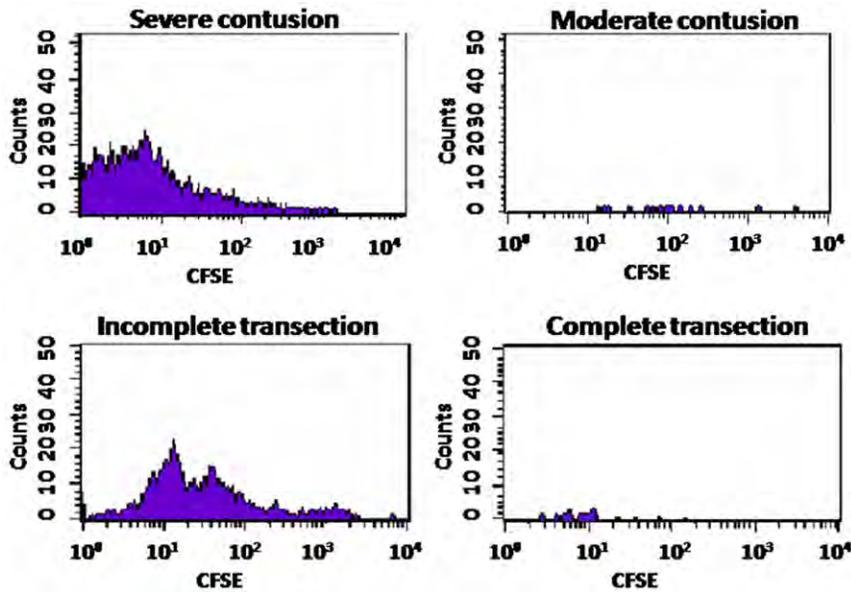


Figure 3. Representative histograms of A91-immunized animals. The ability of T cells to proliferate in the presence of A91 peptide was evaluated using CFSE assays and flow cytometry. Cells stained for CFSE and CD4 were analyzed. Ten thousand events were collected for each sample. doi:10.1371/journal.pone.0032027.g003

Discussion

For some time, the immune response has been considered as a harmful mediator after SCI [12]. Nevertheless, there is strong evidence supporting that immune cells improve the neurological outcome after injury [6,13]. For instance, the immune response developed after immunization with neural-derived peptides (PA) is capable of ameliorating neurotoxicity [14,15], lipid peroxidation [16] and other degenerative mechanisms [7,17,18]. It is clear that immune cells promote a microenvironment where different destructive phenomena are being suppressed, providing tissue protection and improving the functional recovery [2].

Previous studies have shown that immunizing with A91 activates a specific immune response that provides significant neuroprotection and motor recovery after a moderate SCC [6]. In order to better understand this anti-A91 response we investigated the features of PA under different SCI severities. The results indicated that the improvement in motor function observed after moderate SCI was associated with the prevalence of an anti-inflammatory Th2 phenotype. In addition, this Th2 phenotype was capable of releasing significant amounts of BDNF. Previous studies have shown that immunizing with A91 induces a Th2 phenotype in models of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), in this case the immunization ameliorated the course of EAE [19]. The present work demonstrated, for the first time, that A91 also induces a Th2 phenotype in experimental models of SCI. That finding provides substantial elements to explain, at least in part, our previous observations about the inhibitory effect of A91 immunization on iNOS gene expression and nitric oxide production [20]. Cytokines like IL-4 and IL-10 downregulate the expression of the iNOS gene, we hypothesized that this effect was caused by the action of a predominantly IL-4-secreting Th2 phenotype [21,22]. On the other hand, the fact that this Th2 phenotype is capable of increasing BDNF production also provides more elements to explain the protective action of A91 immunization. BDNF prevents the death of motor neurons in newborn rats after nerve transection through its action on tyrosine kinase (Trk) receptors [23] and also rescues spinal cord motor neurons

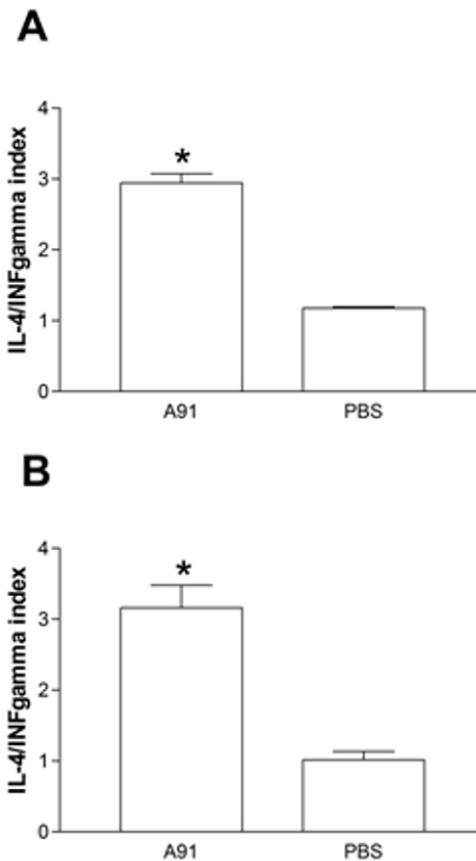


Figure 4. IL-4/IFN- γ index in the supernatant of T cells exposed to A91. Lymphocytes were obtained from rats with moderate spinal cord contusion (A) or incomplete spinal cord transection (B). T_{A91} cells predominantly released IL-4. * Different from PBS ($p < 0.0001$ (A), $p = 0.001$ (B) Student's t-test). Bars represent the mean \pm SD of 5 rats. Data was taken from one of three experiments where the same effect was observed. doi:10.1371/journal.pone.0032027.g004

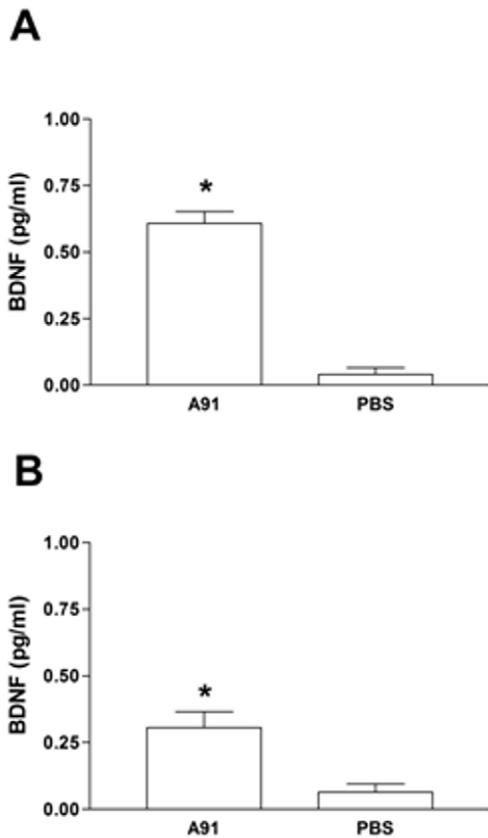


Figure 5. BDNF released by T cells from A91- or PBS-immunized rats. In both cases, T cells were exposed to A91. The levels observed in rats with moderate spinal cord contusion (A) or incomplete spinal cord transection (B) are presented. T_{A91} cells released significant amounts of BDNF. * Different from PBS ($p=0.01$ (A), Mann-Whitney U test; $p=0.02$ (B), Mann-Whitney U test). Bars represent the mean \pm SD of 5 rats. Data was taken from one of three experiments where the same effect was observed. doi:10.1371/journal.pone.0032027.g005

from axotomy-induced cell death [24]. The increased production of this neurotrophic factor could also be a relevant mechanism of neuroprotection.

Another significant finding was the reduction of the A91 response after severe SCI. With regard to this, it is worth mentioning that this loss was observed using the same immunization scheme used in moderate SCI. Previous studies in our laboratory have shown that immunizing with 150 μ g of A91 is sufficient to obtain neuroprotection [16] and improve functional recovery after a moderate SCI [6]. The present work applied the same scheme and was unable to induce the specific immune response after either a severe SCC or a complete SCT. Moreover, the absence of an A91 response was associated with an impaired motor recovery. The lack of a response could be the result of a

References

- Yoles E, Hauben E, Palgi O, Agranov E, Gothilf A, et al. (2001) Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *J Neurosci* 21: 3740–3748.
- Hauben E, Agranov E, Gothilf A, Nevo U, Cohen A, et al. (2001) Posttraumatic therapeutic vaccination with modified myelin self-antigen prevents complete paralysis while avoiding autoimmune disease. *J Clin Invest* 108: 591–599.
- Bakalash S, Kipnis J, Yoles E, Schwartz M (2002) Resistance of retinal ganglion cells to an increase in intraocular pressure is immune-dependent. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 2648–2653.
- Hauben E, Butovsky O, Nevo U, Yoles E, Moalem G, et al. (2000) Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. *J Neurosci* 20: 6421–6430.
- 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.
- Martinon S, Garcia E, Flores N, Gonzalez I, Ortega T, et al. (2007) Vaccination with a neural-derived peptide plus administration of glutathione improves the performance of paraplegic rats. *Eur J Neurosci* 26: 403–412.

state of immunosuppression developed after injury. The existence of a SCI-immune depression syndrome (SCI-ICD) has been reported to develop during the first seven days after injury [25]. Furthermore, our group demonstrated that severe SCC further worsens this state of immunodepression making humoral and cellular responses almost inexistent [8]. The impact of SCI on the immune system is the result of several factors. For instance, immediately after injury there is a period of increased autonomic discharge causing catecholamine over-production. Catecholamines are capable of inhibiting lymphocyte proliferation [26] and cause rapid and extensive apoptosis in lymphoid organs [27]. After injury there is also a significant increase in corticosterone, a steroid hormone involved in regulation of the immune response [28,29]. According to the above observations, it appears that the scenario induced by SCI does not allow immune cells to be competent enough to undergo adaptive immunity activation. However, several studies (including the present manuscript) demonstrate that in spite of immune system-suppression after injury, the activation of a specific response against an immunogen is still feasible [6,16,30,31]. Nevertheless, the severity of the injury could be a strong determinant in the functioning of the immune system. In light of this notion, and considering the results of our previous work, it is likely that the more severe the SCI, the larger the impairment in immunological function [8]. Under this context, we could explain the failure to induce an anti-A91 response and thus the failure in functional motor recovery in animals with severe injuries.

In view of the present results, it should be stressed that stimulation of PA cannot be performed under the basis of a general paradigm, even if the animals belong to the same strain or share similar weight and age. The previous observation indicates that experimental protocols evaluating PA in animals with severe SCI should consider the altered activation of the adaptive immune response.

Finally, in animals with complete SCT it is difficult to expect that PA (even if it is developed) will exert its protective actions. Since there are no spared axons in complete SCT this model does not benefit from the effects of neuroprotection. Therefore the beneficial mechanisms exerted by PA could be directed towards ameliorating the damage by restoring the neural tissue; however this phenomenon should be further explored.

Acknowledgments

The authors would like to thank F. Lopez for assisting in animal care, Dr. A. Rivas for advice on flow cytometry assays and P. A. Martiñón for digital assistance. We would especially like to thank the Doctorate in Biomedical Sciences program of the National Autonomous University of Mexico.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AI. Performed the experiments: SM EG HM. Analyzed the data: AI SM GGO. Contributed reagents/materials/analysis tools: AI GGO. Wrote the paper: AI HM.

7. 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.
8. Ibarra A, Jimenez A, Cortes C, Correa D (2007) Influence of the intensity, level and phase of spinal cord injury on the proliferation of T cells and T-cell-dependent antibody reactions in rats. *Spinal Cord* 45: 380–386.
9. 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.
10. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12: 1–21.
11. Aharoni R, Eilam R, Domev H, Labunskay G, Sela M, et al. (2005) The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factors in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 19045–19050.
12. Jones TB, Basso DM, Sodhi A, Pan JZ, Hart RP, et al. (2002) Pathological CNS autoimmune disease triggered by traumatic spinal cord injury: implications for autoimmune vaccine therapy. *J Neurosci* 22: 2690–2700.
13. Schwartz M, Yoles E (2006) Immune-Based Therapy for Spinal Cord Repair: Autologous Macrophages and Beyond. *J Neurotrauma* 23: 360–370.
14. Shaked I, Tchoresh D, Gersner R, Meiri G, Mordechai S, et al. (2005) Protective autoimmunity: interferon-gamma enables microglia to remove glutamate without evoking inflammatory mediators. *J Neurochem* 92: 997–1009.
15. Schori H, Yoles E, Schwartz M (2001) T-cell-based immunity counteracts the potential toxicity of glutamate in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 119: 199–204.
16. Ibarra A, Garcia E, Flores N, Martinon S, Reyes R, et al. (2010) Immunization with neural-derived antigens inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury. *Neurosci Lett* 476: 62–65.
17. Avidan H, Kipnis J, Butovsky O, Caspi RR, Schwartz M (2004) Vaccination with autoantigen protects against aggregated beta-amyloid and glutamate toxicity by controlling microglia: effect of CD4+CD25+ T cells. *Eur J Immunol* 34: 3434–3445.
18. Schori H, Robenshtok E, Schwartz M, Hourvitz A (2005) Post-intoxication vaccination for protection of neurons against the toxicity of nerve agents. *Toxicol Sci* 87: 163–168.
19. Gaur A, Boehme SA, Chalmers D, Crowe PD, Pahuja A, et al. (1997) Amelioration of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with altered myelin basic protein peptides involves different cellular mechanisms. *J Neuroimmunol* 74: 149–158.
20. Garcia E, Silva-Garcia R, Mestre H, Flores N, Martinon S, et al. (2011) Immunization with A91- peptide or copolymer-1 reduces the production of nitric oxide and iNOS gene expression after spinal cord injury. *J Neurosci Res*; In press.
21. Erdman SE, Rao VP, Poutahidis T, Rogers AB, Taylor CL, et al. (2009) Nitric oxide and TNF-alpha trigger colonic inflammation and carcinogenesis in Helicobacter hepaticus-infected, Rag2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1027–1032.
22. Morris KR, Lutz RD, Bai X, McGibney MT, Cook D, et al. (2009) Suppression of IFN [gamma] +mycobacterial lipoarabinomannan-induced NO by IL-4 is due to decreased IRF-1 expression. *Tuberculosis* 89: 294–303.
23. Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA (1992) Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* 360: 757–759.
24. Yan Q, Elliott J, Snider WD (1992) Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature* 360: 753–755.
25. Riegger T, Conrad S, Liu K, Schluessener HJ, Adibzadeh M, et al. (2007) Spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS). *Eur J Neurosci* 25: 1743–1747.
26. Madden KS, Sanders VM, Felten DL (1995) Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 417–448.
27. Prass K, Meisel C, Hoflich C, Braun J, Halle E, et al. (2003) Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med* 198: 725–736.
28. Stier KS, Almasi B, Gasparini J, Pialut R, Roulin A, et al. (2009) Effects of corticosterone on innate and humoral immune functions and oxidative stress in barn owl nestlings. *J Exp Biol* 212: 2085–2091.
29. Lucin KM, Sanders VM, Jones TB, Malarkey WB, Popovich PG (2007) Impaired antibody synthesis after spinal cord injury is level dependent and is due to sympathetic nervous system dysregulation. *Exp Neurol* 207: 75–84.
30. Hauben E, Ibarra A, Mizrahi T, Barouch R, Agranov E, et al. (2001) 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.
31. Popovich PG, Stuckman S, Gienapp IE, Whitacre CC (2001) Alterations in immune cell phenotype and function after experimental spinal cord injury. *J Neurotrauma* 18: 957–966.