



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOMEDICAS

ANÁLISIS DE LOS GENES RELACIONADOS CON LA
INFLAMACIÓN MODULADOS POR LA INMUNIZACIÓN CON
PÉPTIDOS NEURALES MODIFICADOS EN RATAS CON LESIÓN
TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

EDNA ELISA GARCÍA VENCES

TUTOR:

JOSÉ JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS

COMITÉ TUTORAL:

MARIA DOLORES CORREA BELTRÁN

GABRIEL GUTIERREZ OSPINA

MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Agradezco a Dios

Por permitirme vivir y disfrutar un logro más y por llenar cada día de mi vida con bendiciones.

A mis padres

Gustavo García Rivera y Leticia Vences Cortes

Por darme la vida y enseñarme a enfrentarla. Gracias por sus consejos y su apoyo incondicional.

A mi esposo

Marco A. Guerrero Godínez

Que con su amor, comprensión, lucha y apoyo no me permitió rendirme y me ayudó a lograr terminar una meta más. Gracias por creer en mí y por todo lo que me das día a día amor.

A mi hermano

Erick y a mis abuelos

Evelia Rivera y Trinidad García

Por tener los brazos siempre abiertos con amor para mí.

A todos mis compañeros que dieron su apoyo en este proyecto:

Adrián, Roxana, Susana, Vinnitsa, Gaby, Mariana, Jonathan y Yolanda.

“Especialmente agradezco a todos los animales que dan su vida para que exista el avance de la ciencia y permitir darnos cuenta que nunca debemos de perder nuestra humanidad y ética al usarlos. “

AGRADEZCO:

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

Al Dr. Raúl Silva por su apoyo incondicional para sacar adelante los experimentos.

Al Instituto Camina y gente que labora ahí por su apoyo.

A los docentes del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por brindarme los conocimientos y la experiencia profesional ahora aprendidos.

Al programa de becas de CONACYT por su apoyo en la realización de mi proyecto

Al Grant de CONACYT número 57204, que permitió poner en mis manos la infraestructura para este proyecto

RESUMEN

La lesión traumática de médula espinal (LTME), se asocia con una serie de mecanismos autodestructivos, donde la respuesta inflamatoria y la liberación excesiva de óxido nítrico (NO•) por la síntasa inducible (iNOS), están relacionados con la destrucción neural. Se han desarrollado una serie de estrategias neuroprotectoras para controlar estos fenómenos, una estrategia innovadora con resultados interesantes ha sido la autorreactividad protectora, basada en la modulación de la respuesta inflamatoria por medio de la inmunización con péptidos neurales modificados como A91 y Cop-1. Dicha modulación podría ser a través de la regulación en la expresión de genes inflamatorios, dentro de los cuales se encuentra iNOS. Al momento no existe ningún estudio que analice el efecto de la respuesta autorreactiva sobre la expresión de genes relacionados con la inflamación y sobre la expresión iNOS y la producción de NO•.

Para esto se realizó una LTME por contusión en ratas Fischer 344, inmunizadas o no con A91 o Cop-1 (60 min después de la lesión), siete días después de la LTME, se analizó el mRNA de algunos genes relacionados con la respuesta inflamatoria en tres experimentos: 1) microarreglos en médula espinal (ME) de ratas con lesión severa (LS); 2 y 3) RT-PCR tiempo real en ME de ratas con LS y moderada respectivamente. Al final se analizó la producción de NO• en un cuarto experimento en ME de ratas con lesión moderada (LM), mediante la técnica de Griess. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron un incremento significativo de la expresión de los genes proinflamatorios como IL1 rap, Tnfs11 e IL 12 y un incremento en SOC 3 después de la LS en el grupo A91. En el caso de LM, estos péptidos mostraron un efecto neuroprotector basado en el aumento en la expresión de IL10 e IL4 y una disminución en TNF α e iNOS, reflejándose en la producción de NO• donde la inmunización con A91 o Cop-1 disminuyó los niveles de nitritos después de una LM.

Palabras Claves: neuroprotección, A91, Cop-1, lesión en médula espinal, autorreactividad protectora, iNOS, IL10, IL4

ABSTRACT

As a consequence of spinal cord injury (SCI), a number of autodestructive mechanisms develop. Among them, the inflammatory response and excessive release of nitric oxide (NO) from the inducible nitric oxide synthase (iNOS) playing an important role in neural destruction. At present, several strategies have been explored in order to control the harmful effect of this phenomenon. Protective autoimmunity is a recent strategy based on the modulation of inflammatory response by immunizing with neural derived peptides such as A91 and Cop-1. Since immunization with A91 or Cop-1 induces an anti-inflammatory Th2-type response, we envisioned that a possible mechanism of action could be through the down-regulation of proinflammatory genes and its repercussion in iNOS expression gene and nitric oxide production.

In order to test this hypothesis, the mRNA- genes related inflammatory expression was evaluated 7 days after injury by the design of three experiments: 1) Inflammatory genes expression microarrays of spinal cord after severe SCI; 2 y 3) Inflammatory genes expression by Quantitative RT-PCR after severe and moderate SCI respectively. In a fourth experiment were analyzed nitrites concentrations after SCI moderate. The results showed a significantly increased of proinflammatory genes expression like IL1, TNF α , IL 12 and SOCS3 after immunization with A91. After moderate SCI the neuroprotective effect was observed by the increased of IL10 and IL4 gene expression and decreased of TNF α and iNOS expression, reflected in the nitric oxide production where the levels decreased after SCI by A91 and Cop-1 immunization.

Key words: inducible nitric oxide synthase, neuroprotection, A91, Cop-1, Spinal Cord Injury, protective autoreactivity, interleukin 10, interleukin 4

INDICE

PAG.

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
1. Generalidades	
2. Lesión de médula espinal (LME)	4
3. Fisiopatología de la lesión traumática de médula espinal (LTME).	7
A. Lesión primaria	8
B. Lesión secundaria	11
a) Pérdida de regulación iónica y edema	
b) Liberación excesiva intracelular de calcio	12
c) Producción de radicales libres (RL) y lipoperoxidación	13
d) Excitotoxicidad por glutamato	15
e) Respuesta inflamatoria	16
i. Respuesta inflamatoria después de una LTME	17
f) Fenómeno de Autoreactividad	22
i. Respuesta autorreactiva	
ii. Autorreactividad en el SNC	25
4. Neuroprotección después de la LME	25
A. Autorreactividad protectora	28
a) Mecanismos inmunoreguladores originados por	30

III. JUSTIFICACIÓN	33
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
V. HIPÓTESIS	34
VI. OBJETIVO GENERAL	34
VII. OBJETIVOS PARTICULARES	35
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS	35
1. Características de la muestra	
2. Diseño experimental	36
A. Consideraciones del diseño experimental	37
3. Consideraciones éticas	38
4. Técnicas utilizadas en los tres experimentos	38
A. Lesión Traumática de Médula Espinal.	
B. Inmunización activa	39
C. Cuidados post-lesión	39
D. Extracción de la médula espinal	40
E. Obtención y purificación de RNA total	40
F. Técnicas utilizadas en el primer experimento	42
a) Microarreglos	
G. Técnicas utilizadas en el segundo experimento	45
H. Técnicas utilizadas en el tercer experimento	47
I. Técnicas utilizadas en el cuarto experimento	48
a) Técnica de Griess	
J. Estadística	49
IX. RESULTADOS	49
1. Primer experimento. Microarreglos.	

2. Segundo y tercer experimento. RT-PCR lesión severa y moderada	52
A. Tnfs 11	54
B. TGF β	55
C. Cish	56
D. Caspasa 3	56
E. Bmp3	57
F. Interleucina 12 (IL12)	58
G. Interleucina 1 rap (IL1rap)	58
H. Interleucina 6 (IL6)	59
I. Interleucina 10 (IL10)	60
J. Interleucina 4 (IL4)	61
K. Soc 3	62
L. IFN γ	63
M. TNF α	64
N. iNOS	65
3. Cuarto experimento medición de óxido nítrico (nítritos) en médula espinal	67
X. DISCUSIÓN	68
XI. CONCLUSIONES	81
XII. PERSPECTIVAS	81
XIII. ANEXOS	82
1. Anexo 1. Membrana de microarreglos	
XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

A. INDICE DE FIGURAS

	PAG.
Figura 1. Conformación de la médula espinal y columna vertebral.	3
Figura 2. Inervación de la medula espinal con el sistema nervioso autónomo.	4
Figura 3. Cronología de la descripción de la lesión de médula espinal.	5
Figura 4. Alteraciones fisiológicas comunes en pacientes con LME.	6
Figura 5. Laminectomía y lesión de médula espinal	38
Figura 6. Cuidados post- operatorios de los animales lesionados	39
Figura 7. Evaluación de integridad del RNA Total por electroforesis	41
Figura 8. Hibridación de cRNA marcado con biotina en las membranas de microarreglos.	42
Figura 9. Análisis de los genes en la membrana con ayuda del software GEArray Expression Analysis Suite.	43
Figura 10. Análisis de microarreglos por bloque de animales	44
Figura 11. Normalización de datos	44
Figura 12. Determinación del peso de la médula espinal y homogenizado	48
Figura 13. Genes en conjunto analizados por microarreglos por grupo experimental.	50
Figura 14. Comparación de los genes analizados por microarreglos en los grupos de experimentación	51
Figura 15. Análisis de melting curve y melting peaks.	53
Figura 16. Análisis de la expresión de Tnfs 11 después de la inmunización con A91 o Cop-1.	55

Figura 17. Análisis de la expresión de TGF β después de la inmunización con A91 o Cop-1.	55
Figura 18. Análisis de la expresión de Cish después de la inmunización con A91 o Cop-1.	56
Figura 19. Análisis de la expresión de Caspasa 3 después de la inmunización con A91 o Cop-1.	57
Figura 20. Análisis de la expresión de Bmp 3 después de la inmunización con A91 o Cop-1.	57
Figura 21. Análisis de la expresión de IL12 después de la inmunización con A91 o Cop-1.	58
Figura 22. Análisis de la expresión de IL1rap después de la inmunización con A91 o Cop-1.	59
Figura 23. Análisis de la expresión de IL6 después de la inmunización con A91 o Cop-1.	59
Figura 24. Análisis de la expresión de IL10 después de la inmunización con A91 o Cop-1, después de una lesión severa (A) y una lesión moderada (B).	60
Figura 25. Análisis de la expresión de IL4 después de la inmunización con A91 o Cop-1, después de una lesión severa (A) y una lesión moderada (B).	61
Figura 26. Análisis de la expresión de SOC 3 después de la inmunización con A91 o Cop-1, después de una lesión severa (A) y una lesión moderada (B).	62
Figura 27. Análisis de la expresión de IFN γ después de la inmunización con A91 o Cop-1, después de una lesión severa (A) y una lesión moderada (B).	63
Figura 28. Análisis de la expresión de TNF α después de la inmunización con A91 o Cop-1, después de una lesión severa (A) y una lesión moderada (B).	64
Figura 29. Análisis de la expresión de iNOS después de la inmunización con	65

A91 o Cop-1, después de una lesión severa (A) y una lesión moderada (B).

Figura 30. Análisis de la cantidad de NO en tejido (nitrito) después de la 68

inmunización con A91 o Cop-1

Figura 31. Ubicación de los genes analizados en la membrana de microarreglos 82

B. INDICE DE TABLAS

	PAG
Tabla 1. Escala de ASIA	6,7
Tabla 2. Distribución de animales	36
Tabla 3. Genes, secuencias, amplificado y programa de los genes estudiados en lesión severa.	46
Tabla 4. Análisis de los genes seleccionados	52
Tabla 5. Patrón de expresión de los genes analizados por RT-PCR después de una LTME severa.	66
Tabla 6. Patrón de expresión de los genes analizados por RT-PCR después de una LTME moderada.	67
Tabla 7. Características de los genes analizados por microarreglos	82

ABREVIATURAS

AP-1	del inglés activator protein 1
APLs	del inglés altered peptidic ligands
ASIA	del inglés American Spinal Injury Association
ATF2	del inglés, activating transcription factor - 2
Bmp3	del inglés bone morphometric protein 3
BDNF	del inglés, brain neuronal derived factor
C	carbon
Ca²⁺	calcio
CCD	del inglés charge coupled device
CD	del inglés cluster of differentiation
cDNA	del inglés complementary desoxyribunocleic acid
CFA	del inglés complete Freund adjuvant
Cish	del inglés cytokine inducible SH2 protein
Cl	cloro
Cop-1	copaxona, copolímero 1
COX-2	ciclooxigenasa 2
CPA	células presentadoras de antígenos
cRNA	del inglés complementary ribunocleic acid
CR3	del inglés complement receptor type 3
DC	del inglés dendritic cells
DE	del inglés standar desviation
DNA	del inglés desoxyribunocleic acid

EAE	encefalomielitis alérgica experimental
E-FABP	del inglés epidermal fatty acid binding protein
GluRs	receptores ionotróficos de glutamato
HPRT	del inglés hypoxantine - guanine phosphoribosyltransferase
H₂O₂	peróxido de hidrógeno
IL1rap	del inglés receptor accesory protein of interleuquina 1
ICAM	del inglés, intercellular adhesión molecule-1
IFN	interferon
IL	interleucina
iNOS	del inglés inducible nitric oxide synthase
K⁺	potasio
L•	radical lipídico
LME	lesión de médula espinal
LP	lipoperoxidación
LPS	lipopolisacarido
LOO•	radical lipidico peroxil
LTME	lesión traumática de médula espinal
MAPk	del inglés mitogen activated protein kinases
MBP	del ingles myelin basic protein
M-CSF	del inglés macrophage.colony stimulating factors
ME	médula espinal
Mg²⁺	magnesio
MnSOD	del inglés superoxido dismutasa de manganeso
mRNA	del inglés messenger ribonucleic acid
MS	del inglés multiple sclerosis

N	nitrógeno
Na⁺	sodio
NFκB	del inglés nuclear factor kappa β
NGF	del inglés neural growth factors
NO	del inglés nitric oxide
NT-3	del inglés neurotrophin 3
NYU	del inglés New York University
O₂	delta y sigma del oxígeno
O₂⁻	anión superóxido
ONOO	peroxinitrito
OH	radical hidroxilo
OVA	ovalbumina
PBS	del inglés phosphate buffered saline
PMN	polimorfonucleares
Prx	peroxidasa
RL	radicales libres
RNA	del inglés ribonucleic acid
RNS	del inglés reactive nitrogen species
ROS	del inglés reactive oxygen species
RT-PCR	la retrotranscripción seguida por la reacción en cadena de la polimerasa
S	azufre
SNC	sistema nervioso central
Soc 3	del inglés supressor of cytokine signalling 3
STAT-1	del inglés signal transducers and activators of transcription- 1
TCR	del ingles T cell receptor

TGFβ	transformation growth factor β
TNFs 11	del inglés ligand 11 tumoral nuclear factor
TNFα	del inglés tumor necrosis factor alpha
VCAM-1	del inglés vascular cell adhesión molecule 1

I. INTRODUCCIÓN

La expresión ordenada de cientos de genes es esencial para la función del SNC (sistema nervioso central). Después de una lesión en médula espinal, existe la expresión o supresión de varios genes, los cuales interactúan dando lugar a la muerte neuronal y la pérdida subsecuente de la función motora. Para desarrollar una terapia viable, resulta esencial identificar los caminos específicos moleculares alterados por un fenómeno y para esto se han llevado a cabo estudios identificando varios genes inducidos después de una lesión traumática de la médula espinal (LTME) (Sinescu et al., 2010a), como son los involucrados con la respuesta inflamatoria exacerbada y no controlada que se lleva a cabo después de la lesión (Fleming et al., 2006).

Además de la respuesta inflamatoria, se desencadena una respuesta autoinmune contra constituyentes neurales (Popovich et al., 1997; Schori et al., 2001b). Esta respuesta puede ser capaz de incrementar el daño al tejido nervioso, o bien promover protección e incluso restauración del tejido lesionado (Moalem et al., 1999; Schori et al., 2001a; Schwartz and Cohen, 2000; Yoles et al., 2001). Actualmente, una estrategia innovadora es la que propone modular la respuesta autoinmune contra constituyentes neurales y con esto también la respuesta inflamatoria, promoviendo protección y restauración del tejido neural lesionado (Moalem et al., 1999; Schori et al., 2001a; Yoles et al., 2001). Dicha modulación se ha llevado a cabo mediante la inmunización activa o pasiva con auto-antígenos neurales como la proteína básica de la mielina (MBP, del inglés myelin basic protein), reduciendo el daño neuronal después de una LTME (Hauben et al., 2001a). Otra estrategia es la inmunización activa con derivados no encefalitogénicos, como el péptido alterado denominado “A91” [derivado de la MBP (aminoácidos 87-99) pero con un reemplazo en la posición 91 de una lisina por una alanina] o el copolímero-1 [cop-1; polímero sintético compuesto por: L-alanina, L-lisina, L-ácido glutámico y L-tirosina (6:2:5:1) llamado también acetato de glatiramer (Copaxona)] (Hauben et al., 2001a; Ibarra et al., 2004; Kipnis et al., 2000; Yoles et al., 2001) los cuales pueden reducir la degeneración secundaria de neuronas y promover una mejor recuperación motora en animales con LTME (Hauben et al., 2001a; Ibarra et al., 2004; Martinon et al., 2007).

La inmunización activa con estos péptidos no-encefalitogénicos ha originado resultados muy alentadores en ratas con LTME (Hauben et al., 2000; Kipnis et al., 2000; Martinon et al., 2007); sin embargo, hasta la fecha no se conoce con exactitud el efecto que la respuesta originada por estos péptidos ejerce

sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria. La autoreactividad protectora modula de alguna forma la respuesta inflamatoria después de una LTME y dicha modulación podría ser a través de la regulación de la expresión de genes proinflamatorios. Al momento no existe ningún estudio que analice el efecto de la respuesta autoinmune protectora sobre la expresión de genes relacionados con la inflamación después de una LTME.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue el analizar la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria en el sitio de lesión de ratas con LTME inmunizadas o no con A91 o Cop-1.

II. ANTECEDENTES

1. Generalidades

La médula espinal junto con el encéfalo contienen centros reguladores del funcionamiento del organismo, forman parte del SNC y se encuentran protegidos por la columna vertebral y el cráneo respectivamente, además de una protección vascular-membranal constituida por tres membranas denominadas meninges (piamadre, aracnoides y duramadre) y de un líquido circulante con función de amortiguador y medio de nutrientes para el SNC llamado líquido cefalorraquídeo (localizado entre aracnoides y piamadre) (Kandel Eric R et al., 2000).

La médula espinal está alojada en el canal vertebral y de esta salen transversalmente los nervios espinales que se distribuyen por todo el cuerpo; su grosor no es uniforme, ya que presenta dos abultamientos correspondientes a la inervación de los cuatro miembros (plexo braquial y lumbar). La parte inferior de la médula espinal no corresponde al final de la columna vertebral, la médula termina entre las vértebras lumbares 1 y 2, de tal forma que después de esto se extiende una prolongación fibrosa llamada *filum terminale* que se encarga de la extensión de las raíces de los nervios raquídeos lumbosacros. Por lo tanto, los segmentos vertebrales y medulares no coinciden teniendo que ubicar su localización y función de acuerdo al nivel vertebral (**Figura 1**). Transversalmente, la médula espinal está constituida por dos zonas: 1) la sustancia gris con forma de H (constituida por cuerpos neuronales interconectados, donde en el asta posterior se encuentra la parte sensitiva, en la mediolateral, las células del sistema nervioso autónomo y en la anterior las células motoras), en la cual al centro de esta se encuentra el conducto del epéndimo (por el cual circula el líquido cefalorraquídeo), 2) la

El sistema nervioso autónomo forma parte del sistema nervioso periférico; sin embargo, se encuentra intrínsecamente relacionado con la médula espinal para su funcionamiento y control, está compuesto por una serie de ganglios situados a cada lado de los cuerpos vertebrales, los cuales regulan la función de todos los órganos que son inervados por estos (Figura 2). De esta manera, al llevarse a cabo una lesión en la médula espinal, se ven afectados varios órganos dependiendo del nivel de la lesión dejando al individuo cuadripléjico o tetrapléjico (Kandel Eric R et al., 2000; Moore Keith I. and Dalley Arthur F., 2002).

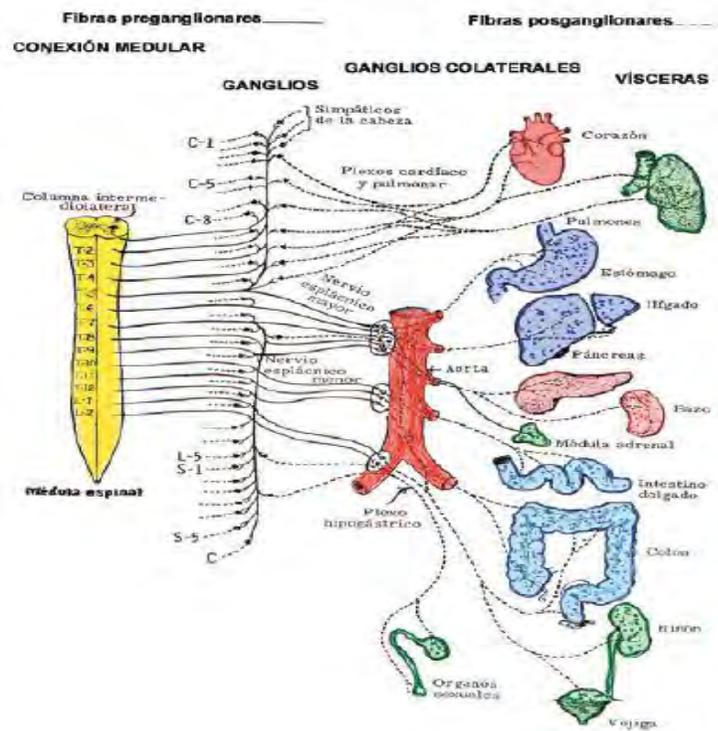


Imagen construida del contenido de la Guía de Autocuidados. Lesión Medular. Serie M. num.30. 2001. Generalitat Valenciana. España.

Figura 2. Inervación de la médula espinal con el sistema nervioso autónomo.

2. Lesión de médula espinal (LME)

La primera descripción del desarrollo de una LME y los mecanismos involucrados data de hace 5000 años por los egipcios (Newman WS, 2003), pero a pesar de la descripción cronológica de la LME (Figura 3), esta sigue siendo un problema social, que actualmente está siendo controlado, aumentando las expectativas de vida de 25 a 30 años, gracias a las diferentes líneas de investigación, siendo la causa principal de muerte las disfunciones cardíacas y respiratorias

(Bunge et al., 1993a) Sin embargo, la recuperación motora del individuo es muy baja, así como también la posibilidad de reintegración a actividades productivas (Harvey et al., 1992) debido a que las secuelas neurológicas producidas por la lesión traumática de la médula y sus raíces están acompañadas de síntomas y signos neurológicos que dañan la integridad física y fisiológica (Figura 4), afectando como consecuencia los aspectos sociales, profesionales y de calidad de vida del paciente. El pronóstico de un paciente depende de la edad, el nivel, el déficit neurológico y la severidad de la lesión primaria; por lo que el grado y el nivel de lesión traumática determinan el compromiso neurológico y sus secuelas. Está demostrado que pacientes con lesiones entre C1-C3, C4- C5 y C6-C8 tienen una mortalidad de 6.6, 2.5 y 1.5 veces mayor que el resto de los niveles. Por esto un tratamiento eficaz debe estar fundamentado en el conocimiento fisiopatológico de la cascada de eventos que aparecen una vez se genera la lesión, los cuales originan la parálisis del paciente (Dumont et al., 2001a) .

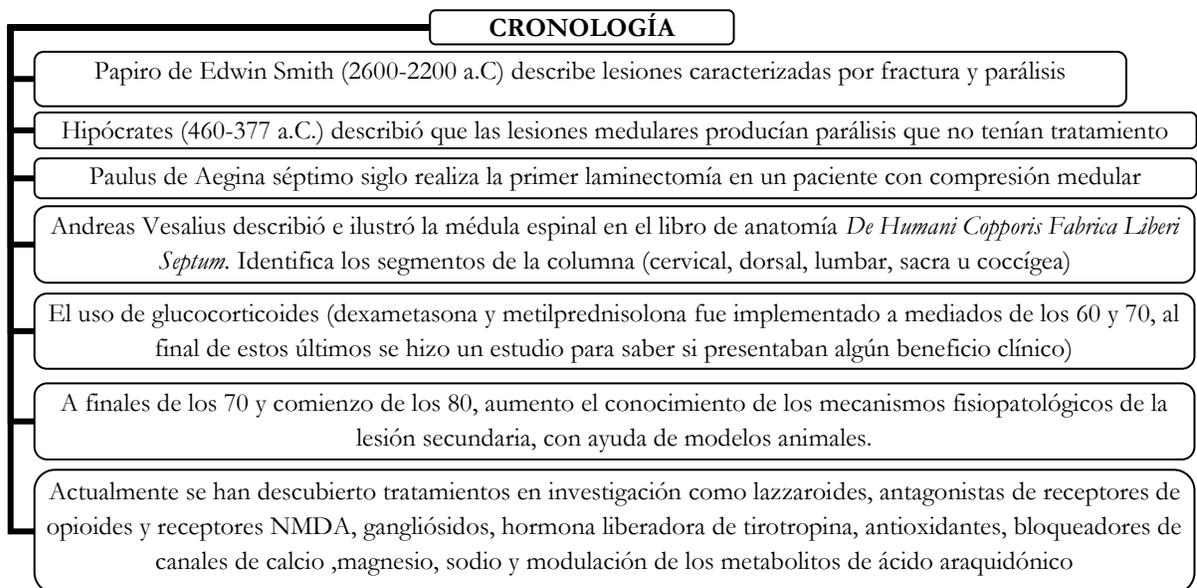


Figura 3. Cronología de la descripción de la lesión de médula espinal.(Dumont et al., 2001a)

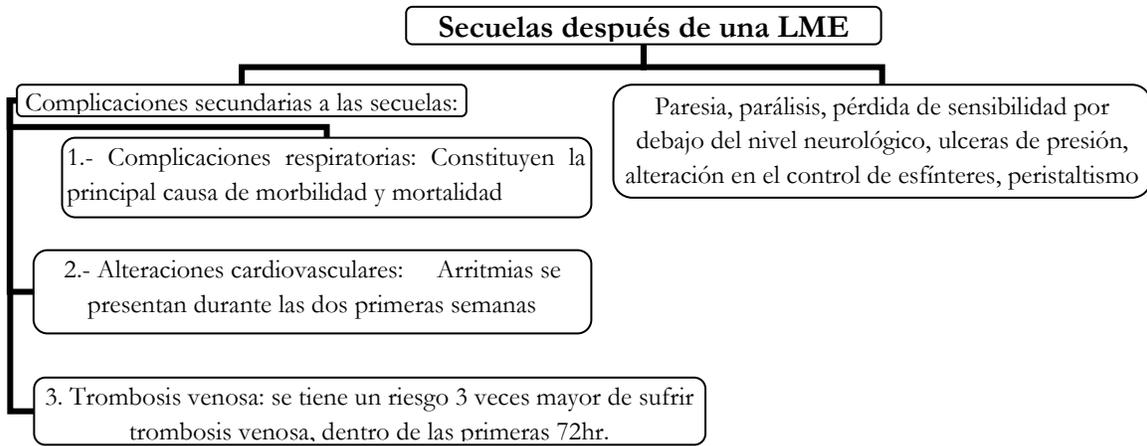


Figura 4. Alteraciones fisiológicas comunes en pacientes con LME (Rabchevsky and Smith, 2001).

El daño neurológico causado después de una lesión se valora de acuerdo al tipo de lesión según la escala de la Asociación Americana de lesión medular (del inglés American Spinal Injury Association: ASIA) (**Tabla 1**), la cual es la herramienta de diagnóstico estándar que se utiliza para la evaluación motora y sensitiva en miembros; teniendo una incidencia del 45% el grado A, 30% el grado B, 15% el grado B y 10% el grado C; considerándose como una lesión completa a la sección completa de la médula espinal y a una lesión incompleta a la lesión por compresión, contusión y hemisección (Sekhon LHS and Fehlings MG, 2001).

Tabla 1. Escala de ASIA¹

Grado de lesión	Características
A	Lesión completa: ausencia de la función motora y sensitiva por debajo del nivel de la lesión, abarca a los segmentos sacros S4 y S5
B	Lesión incompleta: ausencia de la función motora pero se conserva la sensibilidad por debajo del nivel neurológico, en los segmentos sacros S4 y S5 . Tipo 1. Se conserva el tacto superficial, Tipo 2. Se conserva además la temperatura y el dolor.

C	Lesión incompleta: se conserva la sensibilidad y la función motora con fuerza muscular menor de 3 por debajo del nivel neurológico (esto quiere decir, que no son lo suficientemente fuertes para moverse contra la gravedad)
D	Lesión incompleta: se conserva la sensibilidad y la función motora con mayor fuerza de 3 por debajo del nivel neurológico (esto quiere decir, que las articulaciones pueden moverse contra la gravedad).
E	Función motora y sensitiva normal

- Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injured Patients. American Spinal Cord Injury Association 1982, Chicago.

3. Fisiopatología de la lesión traumática de médula espinal (LTME).

La fisiopatología de la LME involucra dos tipos de lesión: lesión primaria y secundaria. La lesión primaria está caracterizada por el mecanismo de lesión, que puede ser por una contusión, compresión, hemisección o sección completa, causando una interrupción de las estructuras vasculares y neurales en la médula espinal (ME). La lesión secundaria involucra una serie de mecanismos autodestructivos anudados a la participación de eventos bioquímicos, moleculares, celulares que aumentan el daño neural causado por la lesión primaria (Fleming et al., 2006).

Después de una LTME se presenta lo que se conoce con el término de “CHOQUE ESPINAL”, definido en 1850 por Marshall Hall, como el estado de inestabilidad pasajera y pérdida de función de la médula espinal aislada por debajo de la lesión, después de una sección parcial o total de la misma. Este fenómeno se caracteriza por la pérdida funcional de la médula, con parálisis flácida, ausencia del tono muscular y actividad motora así como de la sensibilidad y de los reflejos. Estos síntomas se originan por la interrupción de la continuidad de las fibras ascendentes y descendentes (motoras, sensitivas y autónomas) (Newman WS, 2003; Snell SR, 1994). Este tipo de lesión desencadena una serie de mecanismos autodestructivos que originan una interrupción del parénquima medular con secuelas a largo plazo (Balentine JD, 1983; Goodkin R and Cambell JB, 1979; Lemke et al., 1987). Por esta serie de eventos y mecanismos, se divide en dos a la LTME con el fin de agruparlos,

siendo una lesión primaria (mecanismo mecánico de la lesión) y lesión secundaria, mecanismos autodestructivos que conllevan a la pérdida de la función.

A. Lesión primaria

La lesión primaria es el resultado directo del trauma inicial y sus consecuencias varían de acuerdo al tipo, lugar e intensidad del mismo, siendo el daño causado persistente por horas o días.

Existen cuatro mecanismos de lesión primaria: 1) impacto más compresión persistente o contusión y compresión, 2) impacto con compresión transitoria, 3) distracción y 4) laceración-transección. Estos mecanismos no se presentan por separado y generalmente se presentan más de uno en el paciente con lesión medular (Dumont et al., 2001a).

El mecanismo de impacto por compresión persistente es la forma más común de presentación (Dumont et al., 2001b). Es evidente en las fracturas con estallido del cuerpo vertebral y retropulsión de fragmentos de hueso que comprimen la médula espinal, luxofracturas y hernias discales agudas. El segundo mecanismo es el que se observa en los pacientes con enfermedad degenerativa de la columna cervical que sufren un trauma en hiper-extensión. La distracción, que es el estiramiento forzado de la médula espinal en el plano axial, constituye un tercer mecanismo que aparece cuando hay desgarramiento o estiramiento de la médula espinal o de su irrigación sanguínea, por fuerzas secundaria a flexión, extensión, rotación o luxación, laceración-transección es el último mecanismo de lesión medular. (Dumont et al., 2001a). La laceración de la médula espinal puede deberse a proyectiles de arma de fuego, luxofractura con desplazamiento de fragmentos afilados, heridas con elementos cortantes o distracción severa. La laceración puede tener diversos grados de gravedad desde una lesión menor hasta la transección completa.

Con respecto al daño tisular se distinguen cuatro tipos:

- 1.- Maceración de la médula en la cual la morfología es completamente distorsionada
- 2.- Laceraciones medulares originadas por una hemisección o sección completa.
- 3.- Contusiones que llevan a un hematoma central que involucra un centro necrótico

4.- Contusiones expandidas en las cuales no tienen un centro necrótico en el sitio de lesión (Bunge et al., 1993; Bunge et al., 1997).

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

Con respecto a la localización de la LTME y daño tisular se caracterizan en:

- 1.- Lesión central pequeña que afecta al haz espinotalámico en ambos lados.
- 2.- Lesión central grande que implica vías del dolor, haces y sustancia gris adyacente (De Groot J, 1993).
- 3.- Lesión periférica irregular (herida penetrante o compresión de la medula) incluye a las vías largas y la sustancia gris, de manera que se anulan las funciones por debajo del nivel de la lesión. Ocurre de manera temprana una alteración de la función motora. El compromiso de las células motoras de las astas grises anteriores a nivel de la lesión da lugar a una parálisis parcial o total de los músculos, con pérdida del tono muscular (De Groot J, 1993; Snell S.R, 1994).
- 4.- La hemisección de la ME causa el síndrome de Brown – Séquard que puede ser resultado de siringomielia, tumor medular hematomeleia, heridas por balas o puñaladas. El **síndrome** de Brown Sequard es una clasificación de la lesión medular incompleta que se caracteriza por una parálisis ipsilateral (del mismo lado de la lesión) de la motoneurona inferior en el segmento de la lesión, pérdida o disminución de la propiocepción, el tacto y la sensación de vibración, mientras que en el lado contralateral hay pérdida o disminución de la sensibilidad de temperatura y dolor (Perry Zejdlik Cynthia, 1992).
- 5.- La sección medular completa, da como resultado una pérdida completa de toda la sensibilidad y los movimientos voluntarios por debajo del nivel de la lesión (De Groot J, 1993).

El trauma mecánico inicial tiende a dañar primordialmente la sustancia gris central, con relativa preservación de la sustancia blanca, especialmente la periférica. Se cree que esta mayor tendencia al daño de la sustancia gris se debe a una consistencia más blanda y una mayor vascularización. El efecto inmediato después de un daño mecánico en la médula espinal es el vasoespasmo de los vasos superficiales originando una hemorragia intraparenquimal, causando

daño en la microvasculatura de la materia gris (Mautes et al., 2000), disminuyendo la perfusión y como consecuencia la falta de regulación del flujo sanguíneo que produce infartos locales por hipoxia e isquemia que pueden llegar a presentarse dependiendo de la intensidad de la lesión, agravándose todo esto por el shock neurogénico, hipotensión arterial, bradicardia, arritmia o shock hemorrágico hemorragia intraparenquima. En modelos de contusión tiene su máxima extensión de los 3 a 5 días después de la lesión dentro de los segmentos rostrales y caudales al epicentro de la lesión, presentándose tanto en la materia gris como en la blanca (Sinescu et al., 2010b; Fleming et al., 2006; Mautes et al., 2000; Mautes et al., 2000).

La principal consecuencia de la hemorragia es la muerte neuronal por necrosis, que se puede observar en el área blanca localizada alrededor de la materia gris, varios puntos con lesión degenerativa incluyendo desmielinización axonal y destrucción parenquimal y estructural de la médula espinal (Fleming et al., 2006; Mautes et al., 2000). La sustancia gris se daña en forma irreversible dentro de la primera hora posterior al trauma, mientras que la sustancia blanca lo hace dentro de las primeras 72 horas (Dumont et al., 2001a; Marsala and Yaksh, 1994).

La lesión primaria ocasiona la ruptura de la barrera hematoencefálica en el sitio de lesión causando una destrucción focal del tejido neural que desestabiliza las membranas neuronales y endoteliales (Profyris et al., 2004). La degeneración Walleriana comienza a las 24 hrs después del traumatismo y se incrementándose en los primeros días trayendo como consecuencia la muerte de oligodendrocitos y la formación de cavidades en la materia blanca y gris (Amar and Levy, 1999). Este fenómeno causa la muerte de varias neuronas por varias horas después de la LME, asociado con la formación de edema causando un efecto negativo en la circulación sanguínea a la médula, extendiendo la respuesta inflamatoria (Esposito and Cuzzocrea, 2011). Por lo tanto la lesión primaria da como consecuencia el desarrollo de una serie de cambios celulares y moleculares, que promueven la muerte neuronal y alteran patrones de expresión génica procesos que forman parte de la lesión secundaria (Uchida et al., 2010).

B. Lesión secundaria

Estudios experimentales y observaciones clínicas han establecido que la lesión secundaria de la LTME se origina por una serie de cambios fisiopatológicos dependientes del tiempo, que inician en los primeros minutos de la lesión y continúan durante los siguientes días e incluso meses (Bowtell, 1999). Las alteraciones que ocurren en el tejido nervioso generan una cascada de eventos que originan una mayor destrucción del parénquima medular y daño neuronal irreversible, repercutiendo sobre la supervivencia neuronal (Balentine JD, 1983).

Por otra parte la intensidad de la lesión también es un factor que influye directamente sobre el resultado de algunos fenómenos secundarios, dentro de los cuales se encuentran la pérdida de regulación iónica, liberación intracelular de calcio (Ca^{2+}), producción de radicales libres (RL), peroxidación de lípidos (lipoperoxidación: LP), liberación de neurotransmisores con efecto tóxico tales como glutamato y aspartato, monoaminas, neuropéptidos y el desarrollo de una respuesta inflamatoria y autorreactiva, estando todos estos fenómenos altamente relacionados influyendo unos en otros y siendo regulados directa o indirectamente por la expresión de genes inflamatorios (Profyris et al., 2004). Además de contribuir a la extensión de la lesión, muchos de ellos originan la alteración del flujo sanguíneo, isquemia local, formación de edema, necrosis del tejido, inflamación, desarrollo de la muerte neuronal, desmielinización y degeneración axonal en el epicentro de la lesión y en las zonas adyacentes (Profyris et al., 2004; Braugher and Hall, 1992).

a) Pérdida de regulación iónica y edema

Es el primer mecanismo secundario que aparece después de la LTME y se da cuando se incrementa la concentración de los iones sodio (Na^+) y Ca^{2+} intracelulares y una disminución de los iones potasio (K^+) y magnesio (Mg^{2+}); esto lleva a una despolarización de la membrana neuronal y al acarreo de moléculas de agua asociadas con los iones Na^+ y Ca^{2+} lo que produce edema (Lemke et al., 1987; Young and Koreh, 1986). Diversos estudios han reportado la disminución en la expresión de genes relacionados con canales iónicos y transportadores de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} lo que promueve la falta de regulación iónica (Nashmi et al., 2000).

El edema vasogénico resulta en un principio como consecuencia de la ruptura de la barrera hematoencefálica y en segundo por la pérdida de regulación iónica dando como resultado la acumulación de agua en los espacios extracelulares. La acumulación de agua está fuertemente relacionada con la fase aguda de la lesión por contusión en ME, estando el edema relacionado

con la intensidad del trauma inicial y con la disfunción motora en el individuo que sufre de LME (Wagner et al., 2011). Considerando que la presencia de edema en cualquier parte del SNC tiene como consecuencia la compresión de tejidos adyacentes, se presenta en estos un evento isquémico que fomenta el desarrollo de otros fenómenos autodestructivos como la liberación de radicales libres, lipoperoxidación e inflamación (Sharma, 2005).

b) Liberación excesiva intracelular de calcio

El desbalance iónico y la formación de edema contribuyen a la entrada masiva de calcio, el cual está intrínsecamente relacionado con la neurotoxicidad generada por la liberación de glutamato y la activación de proteasas y fosfolipasas que causan la destrucción de neurofilamentos y la desestabilización de proteínas fundamentales para el sostén celular, además de generar radicales libres como especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species), causar falla energética, daños al citoesqueleto y errores de plegamiento proteico (Nesic et al., 2002). Durante los primeros minutos después de la lesión la expresión de genes involucrados con la regulación de calcio disminuye, fomentando esta disminución una entrada masiva de Ca^{2+} intracelular y promoviendo así el daño neuronal secundario (Blaustein and Lederer, 1999).

Por otra parte, el exceso de Ca^{2+} libre intracelular inhibe las funciones mitocondriales y activa las proteasas neutras que destruyen los neurofilamentos, parte fundamental del citoesqueleto axonal, observándose en las primeras horas o días pos-lesión un colapso y fragmentación axonales (Siegel GJ et al., 1998). Aunado a la activación secundaria de las fosfolipasas, la cual favorece la liberación de ácidos grasos a partir de los fosfolípidos de membrana y dan lugar a la formación de productos propios de la desintegración de la membrana (ácido araquidónico, leucotrienos y tromboxanos), originando la pérdida estructural y funcional de los constituyentes de la membrana, cabe mencionar que principalmente actúan destruyendo la mielina (Balentine JD, 1983).

La excitotoxicidad por glutamato y la entrada de Ca^{2+} intracelular son fenómenos intrínsecamente relacionados, ya que la liberación excesiva de glutamato contribuye a inducir la muerte celular inmediata por un exceso en el flujo de Ca^{2+} intracelular, activando vías de señalización calcio dependientes que resultan en muerte celular (Sattler and Tymianski, 2000; Sapolsky, 2001). La actividad del receptor para glutamato es el encargado de inducir los cambios transcripcionales relacionados con varias cinasas calcio-calmodulinas dependientes, contribuyendo al daño

secundario después de la LME. Los genes que codifican para estas proteínas se han visto sobre- expresados 1 hr después de la LME (Nesic et al., 2002; Sapolsky, 2001).

c) Producción de radicales libres (RL) y lipoperoxidación.

El organismo genera RL como ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés reactive nitrogen species), en bajas concentraciones como consecuencia del metabolismo realizado en muchos procesos fisiológicos. Sin embargo, cuando su producción no es controlada, como sucede en muchas condiciones patológicas, los RL se convierten en moléculas demasiado reactivas que llegan a ser destructivas para células y tejidos (Kleinova et al., 2007).

Los RL son moléculas altamente reactivas que tienen uno o más electrones desapareados ya sea por pérdida o ganancia de ellos. Los RL conocidos incluyen el delta y sigma del oxígeno (O_2), el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH) y su principal precursor, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Otros RL son el azufre (S), nitrógeno (N), cloro (Cl), carbono (C), que son susceptibles de asociarse con el oxígeno y formar otros radicales como el óxido nítrico (NO, del inglés nitric oxide; NO^\bullet). Los metales como el Fe, Mn, Co, Ni y Cu que pueden tener electrones sin aparear también pueden considerarse RL (Gutteridge, 1995, Kovacic and Jacintho, 2001, (de Zwart et al., 1999).

El daño causado por los RL se denomina estrés oxidativo o estrés nitrosivo (Kovacic and Jacintho, 2001). Esto ocurre cuando se presenta una sobreproducción de ROS/RNS y existe en el sistema un bajo nivel de defensas antioxidantes. Cuando ocurre una LTME, los RL pueden dañar a lípidos membranales, proteínas, DNA (del inglés, desoxyribonucleic acid) y RNA (del inglés, ribonucleic acid), provocando mutaciones o daños irreversibles que llevan a la muerte celular (de Zwart et al., 1999). Por otra parte tres proteínas que funcionan como antioxidantes que son: peroxidasa (Prx) 1/6 y superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) son modificadas por fosforilación, oxidación o nitración respectivamente, durante el estrés oxidativo 1 día después de una LTME, participando en la pérdida de la capacidad antioxidante (Banes et al., 1995).

La respuesta inflamatoria, es parcialmente responsable de la producción de RL después de una LTME, dichas moléculas reactivas dañan las células nerviosas y endoteliales, originando el fenómeno conocido como lipoperoxidación (interacción de los RL con los ácidos grasos). Los

ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de membrana y el colesterol son las estructuras celulares más susceptibles de ser atacados por los RL. Los ácidos grasos son los constituyentes más comunes de los lípidos y las sustancias que confieren a estos últimos su característica polar. Debido a que el SNC tiene pocas defensas antioxidantes y altas concentraciones de ácidos grasos, se favorece la formación y liberación de radicales libres aumentando con esto el daño neuronal (de et al., 1996; Droge, 2002).

El O_2^- es formado por un proceso de reducción del oxígeno molecular mediado por las NADPH oxidasas, el anión superóxido junto con el $NO\bullet$ forma un compuesto altamente neurotóxico denominado como peroxinitrito ($O_2^- + NO\bullet = ONOO^-$), que es responsable del desarrollo de la lipoperoxidación (Droge, 2002). En pH fisiológico el peroxinitrito reacciona tomando un electrón de un ácido graso poliinsaturado, generando un radical lipídico ($L\bullet$) que interactúa con el oxígeno molecular para formar un radical lipídico peroxil ($LOO\bullet$); si este no es neutralizado por antioxidantes se desarrolla el fenómeno de lipoperoxidación originando la despolarización de la membrana, que en el caso de la médula espinal se origina el proceso de desmielinización. (Droge, 2002; Gutteridge, 1995)

Cabe mencionar que después de una LTME la liberación de ácidos grasos aumenta debido a la acción de proteínas transportadoras de lípidos como la E-FABP (del inglés, epidermal fatty acid binding protein) el cual se incrementa 24hr después de la lesión contribuyendo a la formación de edema y al desarrollo de la respuesta inflamatoria (de et al., 1996; Faden, 1993).

Otro RL de importancia es el $NO\bullet$, el cual es un gas con una vida media entre seis y diez segundos, como consecuencia de su reacción con el oxígeno y el agua se convierte en nitritos y nitratos. Esta molécula es producida por diferentes tipos celulares después de una LTME y puede dañar el parénquima medular cuando la sintasa que lo produce es la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS, del inglés inducible nitric oxide synthase) (Hamada et al., 1996), debido a que esta sintasa produce altas concentraciones, que son tóxicas y especialmente pro-inflamatorias (Guzik et al., 2003). La iNOS normalmente no se encuentra expresada para hacerlo necesita un estímulo inmunológico/inflamatorio, es decir, la presencia de lipopolisacárido (LPS) o de citocinas inflamatorias como $TNF\alpha$ (del inglés, tumor necrosis factor), interleucina (IL) 6, IL-1 e interferon (IFN) γ , produciendo NO en cantidades nanomolares, por períodos prolongados (Lopez-Jaramillo, 2000; Guzik et al., 2003).

Después de una LTME, concentraciones altas de NO• (producido por iNOS) y de peroxinitrito, se incrementan de 3 a 5 veces más, teniendo su pico a las 12 horas después de la lesión (Xu et al., 2000). En algunos estudios se ha detectado la expresión y la actividad de iNOS a las 3,4,24 y 72 horas después de una LTME vinculándose con el fenómeno de lipoperoxidación y destrucción neuronal (Liu et al., 2001; Liu et al., 2003; Xu et al., 2000). Las altas concentraciones de NO• participan a su vez en el daño celular e incremento de la permeabilidad vascular, por lo que contribuye a la formación de edema (Sharma et al., 1996), así como participa en la liberación de altas concentraciones de Ca²⁺ y glutamato fomentando el desarrollo del fenómeno de excitotoxicidad. Por otra parte, el NO• altera la cadena transportadora de electrones en mitocondria, generando la producción de otros RL ya que tiene efecto directo en enzimas que poseen un centro catalítico sulfúrico como la ubiquinona succinato (Stubbs, Jr. et al., 1998), además de tener un efecto retroactivo con el desarrollo de la respuesta inflamatoria ya que la expresión de iNOS y la producción de NO participan en la producción de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) incrementando la producción de productos proinflamatorios como son las prostaglandinas y tromboxanos (Vladutiu, 1995).

d) Excitotoxicidad por glutamato

Las concentraciones de glutamato y aspartato en el SNC necesitan un equilibrio constante, 15 minutos después de una LME, las concentraciones aumentan seis veces más al compararse con los niveles fisiológicos (Christensen et al., 1996), y esto debido a una sobre-estimulación de los receptores ionotróficos de glutamato (GluRs), como resultado de la entrada masiva de Ca²⁺ y del flujo de Na⁺, este último se ha visto que puede provocar un incremento secundario de Ca²⁺ intracelular, llevando a una sobreexcitación de las neuronas viables y muerte neuronal; este efecto tóxico se conoce como excitotoxicidad (Faden and Simon, 1988).

El concepto de excitotoxicidad se refleja principalmente en la glía del CNS. Dentro de las células gliales o neuroglia se encuentran los astrocitos, oligodendrocitos y la microglía. Sin embargo, las células más susceptibles al fenómeno de excitotoxicidad son los oligodendrocitos los cuales son los encargados de mielinizar a los axones debido a que estos son altamente vulnerables a la sobre activación de GluRs. Las señales de excitotoxicidad están reguladas por los receptores de glutamato tipo AMPA y kainato; estos receptores en los oligodendrocitos son activados por glutamato, en adición estas células contribuyen al control de los niveles de

glutamato extracelular. Una alteración aguda o crónica en la homeostasis del glutamato puede resultar en una sobre activación de los receptores AMPA y kainato y con ello a una muerte celular de los oligodendrocitos y una consecuente desmielinización (Matute et al., 2001).

La liberación excesiva de glutamato correlaciona con el tamaño de la lesión inicial de médula espinal. Después de la lesión primaria, la liberación de glutamato se observa en el epicentro y alrededor de la lesión 1 hr. después de la LME (Liu et al., 1999;McAdoo et al., 1999). Correlacionando esta liberación y excitotoxicidad con genes relacionados con los receptores para neurotransmisores como son NMDA, AMPA, GABA, acetilcolina, kainato y GluR, lo que lleva a la destrucción de los oligodendrocitos y al proceso de desmielinización (Nesic et al., 2002).

e) Respuesta inflamatoria.

La respuesta inflamatoria es un fenómeno característico de la inmunidad innata, este tipo de inmunidad se refiere a todas las medidas de resistencia congénitas que se activan y operan desde la primera vez que el cuerpo se enfrenta a un antígeno exógeno o endógeno que es reconocido. No requiere de un encuentro o exposición previa a tal agente, ni tampoco se modifica significativamente con exposiciones repetidas al patógeno durante toda la vida de un individuo, ya que ésta es débil o ausente, pero se incrementa sustancialmente con las exposiciones subsecuentes volviéndose altamente específica y directa. Los sistemas inmunes innato y adquirido se componen cada uno de numerosos elementos que tienen la capacidad de llevar a cabo diversas funciones protectoras. Algunos de estos elementos son células especializadas que tienen la habilidad para reconocer, secuestrar y eliminar varios tipos de microorganismos o sustancias dañinas: fenómeno conocido como inmunidad celular o mediada por células; el resto de los componentes son macromoléculas solubles que circulan por la sangre y en el líquido extracelular, que actúan sobre el patógeno, la defensa de este tipo se le conoce como inmunidad humoral (Abbas A.K. and Lichtman, 2004;Roitt I et al., 1997).

i. Respuesta inflamatoria después de una LTME.

Inmediatamente después del traumatismo que lleva a la ruptura de la barrera hematoencefálica, ocurre una reacción inflamatoria que involucra la acción de mediadores químicos y la participación de células inflamatorias lo que origina la activación de células

inmunológicas residentes (astrocitos y microglía) y de las reclutadas desde la periferia: macrófagos, linfocitos, etc. (Popovich et al., 1997)

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

La LME desarrolla una serie de estímulos inflamatorios en varios tipos de células produciendo diferentes tipos de citocinas que determinan la extensión del daño tisular y celular secundario (Lee et al., 2010). Durante la respuesta inflamatoria la infiltración de células inmunológicas es el principal contribuidor para desarrollar degeneración neuronal (Glaser et al., 2004). Estas son guiadas al sitio de lesión desde la periferia por el efecto de quimiocinas y citocinas liberadas por células de la microglia y astrocitos, las cuales junto con los macrófagos periféricos constituyen el recurso principal en el sitio de lesión (Profyris et al., 2004; Hall and Springer, 2004a). Estos eventos forman parte de la respuesta inflamatoria aguda la cual puede llegar a ser crónica si no existe regulación del ambiente proinflamatorio que se desencadena; en la respuesta crónica podemos encontrar la participación de otras células inmunes y por lo tanto la activación de otras vías de señalización y por lo tanto de otros genes inflamatorios. La inflamación crónica puede persistir por la migración constante de la periferia de neutrófilos, macrófagos, linfocitos, basófilos y eosinófilos, incrementando los niveles de citocinas inflamatorias y con ello la extensión del daño y el aumento de la destrucción neural, dificultando la posibilidad de reparación y regeneración tisular (Hausmann, 2003; Hurst et al., 2001; Trivedi et al., 2006).

Después de la LME se han sido caracterizado dos ondas de infiltración celular: la primera constituida por células polimorfonucleares (PMN) que predomina durante las primeras horas, los neutrófilos aparecen en la pared de venas y vénulas adyacentes a la lesión en las primeras 3 o 4 horas, siendo observados en el tejido de las 8 a 24 horas posteriores a la lesión. La respuesta inflamatoria se ve reflejada por el aumento de leucocitos en el líquido cefalorraquídeo, la infiltración de PMN en el sitio de lesión, el incremento en los niveles de leucotrienos (principalmente LTB_4), así como en la actividad de la mieloperoxidasa. Además se presenta un aumento significativo de la expresión de ICAM-1, la cual favorece la infiltración tisular de los neutrófilos entre las 3 y las 12 horas posteriores a la lesión (Trivedi et al., 2006).

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

En diversos estudios se ha reportado que el reclutamiento de leucocitos en la ME lesionada es una respuesta fisiológica asociada con la producción de citocinas y protein cinasas que están involucradas en la reparación del tejido lesionado. Los neutrófilos, por ejemplo, son las primeras células reclutadas con el objetivo de limpiar el sitio de posibles patógenos y restos celulares a través del proceso de fagocitosis (primeras fases de reparación) sin embargo al estar activados también dan inicio a la liberación de una cantidad importante de neurotoxinas tales como: ROS y RNS, así como también quimiocinas y una variedad de enzimas que de alguna forma promueven la destrucción tisular (Bethea and Dietrich, 2002; Popovich et al., 2003; Taoka et al., 1997). Una prueba de ello es el reporte de Taoka (Taoka et al., 1997) quien demuestra que después de una lesión en la ME, el pico máximo de migración de neutrófilos correlaciona perfectamente con la magnitud del daño y las alteraciones motoras observadas después de una lesión.

En lo referente a los macrófagos, su activación se acompaña de la liberación de factores microbicidas como la mieloperoxidasa y elastasa mismas que contribuyen indudablemente a la lesión tisular (Giulian et al., 1993). De hecho, algunos estudios han demostrado que el bloqueo farmacológico de los productos de estas células promueve una mejor preservación anatómica y funcional después de una LTME (Blight, 1992; Popovich et al., 2003). La infiltración de monocitos y

macrófagos después de una LTME tiene como objetivo remover los restos celulares y estimular la infiltración de nuevos vasos sanguíneos y células parenquimales. La infiltración de estas células, ayuda a la interacción con los linfocitos T, ya que actúan como células presentadoras de antígenos (CPA) regulando así la activación y proliferación de estos (Popovich et al., 2003).

La reacción de la neuroglia ante una lesión, ya sea causada por un traumatismo físico o por una obstrucción vascular, se caracteriza por la migración de las células microgliales al sitio de lesión, en donde proliferan y son activamente fagocíticas. La microglía son células pluripotenciales capaces de desarrollar diferentes fenotipos. La severidad de la lesión determina la intensidad de la respuesta inflamatoria y por lo tanto la cantidad de células reclutadas en el sitio de lesión y la magnitud de la respuesta inmunológica debido a la interacción de la microglía con las células T, llevando a estas a una especificidad antigénica que va a regular la respuesta inmunológica y las fases subsecuentes (Shaked et al., 2005).

Las células de la microglía, están distribuidas en el CNS, sirviendo como un sensor patológico y comienza a activarse en respuesta a un estímulo dañino (Kreutzberg, 1996). La microglía activada migra hacia los sitios de lesión invadido por patógenos y se transforma desde el fenotipo resting (células ramificadas) a células ameboideas (fagocíticas) (Kim and de, 2005). En adición existe una sobre-regulación de receptores de superficie, como son el CR3 (del inglés, complement receptor type 3) y MHC II (del inglés major histocompatibility complex). Esta microglía activada puede liberar una serie de citocinas, quimiocinas y enzimas, las cuales dependen del estímulo de activación, dentro de estas podemos encontrar IL1- β , IL-6, TNF α , TGF- β 1 (transformation growth factor- β 1), M-CSF (del inglés, macrophage-colony stimulating factors) (Hao et al., 2002); iNOS, NGF (del inglés, neural growth factor), NT-3 (del inglés, neurotrophin-3) y BDNF (del inglés, brain neuronal derived factor) (Nakajima et al., 2001a; Nakajima and Kohsaka, 2001).

Con la salida excesiva de glutamato y la retroalimentación por la respuesta inflamatoria después de una LTME, la microglía adquiere un fenotipo (microglía reactiva) que expresa muy bajas cantidades de moléculas MHC II y es incapaz de mantener una buena interacción con los linfocitos T (Nakajima et al., 2001b; Shaked et al., 2005). Este fenotipo se caracteriza por la liberación excesiva de NO y TNF α llevando a la toxicidad. En estas condiciones los astrocitos y las neuronas

postsinápticas muestran signos de daño, manifestados por la expresión de ROS y estas células en ausencia de alguna intervención pueden llegar a la apoptosis (Hao et al., 2002).

Por otra parte la microglía activada, al igual que los macrófagos, remueve los despojos celulares después de la lesión y es capaz también de promover la revascularización en el área de lesión facilitando así la liberación de factores tróficos y nutrientes para la supervivencia y la proliferación de las células migrantes en el área dañada (Shaked et al., 2005). Además, la microglía, es capaz de expresar transportadores para glutamato lo cual aparentemente contribuye a amortiguar las concentraciones de glutamato y con ello a proteger a las células de la toxicidad originada por éste (Nakajima et al., 2001b; van Landeghem et al., 2001).

La microglía activada y los macrófagos sanguíneos extravasados constituyen la mayoría de células inflamatorias presentes en el sitio de lesión. Estos son morfológicamente distintos y responden diferente a señales moduladoras (Popovich et al., 1999). La presencia de estos dos tipos celulares forman parte de una respuesta temprana del SI innato a lesiones del SNC originadas por diversos mecanismos, incluyendo entre estos la isquemia y traumatismos mecánicos (Guo et al., 2004; Mueller et al., 2003). Los macrófagos y las células de la microglía participan de manera importante en los procesos desarrollados después de la lesión liberando citocinas y neurotoxinas (Bethea et al., 1998).

Ya que en el cerebro y la ME existe una considerable heterogeneidad de macrófagos, la contribución relativa de una población particular en la reacción inflamatoria local puede dictar si una cascada de eventos inicia como un proceso regenerativo o destructor. Todo depende del fenotipo en el cual se activen los macrófagos, esto se ha enfatizado sobretodo en el caso de la microglía (Popovich et al., 2003).

Los linfocitos son las células que modulan la intensidad de la respuesta inflamatoria. Su participación después de una LTME se ha relacionado con el daño al tejido neural ya que son capaces de producir citocinas proinflamatorias como $IFN\gamma$, $IL1\beta$ (Popovich et al., 1996; Shaked et al., 2005). $IFN\gamma$ está relacionado directamente con la destrucción neuronal debido a que induce la expresión de otras citocinas proinflamatorias como $TNF\alpha$, $IL6$, $IL12$ e $IL1\beta$ y moléculas proinflamatorias como ROS e INOS, debido a que participa en la inducción de la vía $NF\kappa\beta$ (del inglés nuclear factor kappa β) y AP-1 (del inglés activator protein-1) (Mir et al., 2008; Esposito and Cuzzocrea, 2009; Shaked et al., 2005), además de participar en la inducción de una respuesta citolítica por

TCD8+ (CD, del inglés cluster of differentiation) ya que IFN γ es el principal inductor de MHC I mediante la fosforilación de STAT 1 (del inglés signal transducers and activators of transcription- 1) (Neumann et al., 1997).

Por otra parte, en diversos estudios se ha reportado que la presencia de linfocitos T con fenotipo Th2 en el sitio de lesión favorece la recuperación funcional (Hauben et al., 2000; Hauben et al., 2001a; Moalem et al., 1999). Los linfocitos T son capaces de sintetizar NGF, BDNF y diversas neurotrofinas (NT3, NT4 y NT5) (Moalem et al., 1999; Santambrogio et al., 1994). Además un gran número de células inflamatorias (linfocitos B, macrófagos, microglía, mastocitos, eosinófilos y basófilos) pueden ser estimuladas también por los linfocitos T para liberar NGF (Torcia et al., 1996). Estos factores neurotróficos pueden desempeñar una función neuroprotectora (por ejemplo el BDNF, que bloquea la expresión de iNOS y promueve hasta un 40% la supervivencia de las motoneuronas) (Barouch and Schwartz, 2002) o bien regeneradora (Novikov et al., 1997).

A pesar de que se le han conferido efectos benéficos a la respuesta inflamatoria, después de una LTME (Lotan and Schwartz, 1994), dicha respuesta puede ser la responsable de la necrosis del tejido lesionado y circundante (Lotan and Schwartz, 1994; Rothwell and Relton, 1993; Zhang et al., 1997), ya que juega un papel muy importante en la generación de RL, citocinas, quimiocinas que llevan al daño del tejido neural debido a que esta puede persistir por varias semanas o meses. Este efecto dañino es observado debido a que la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso no está modulada, lo cual extiende el daño al tejido neural (Donnelly and Popovich, 2008) ya que esta respuesta inflamatoria a su vez está correlacionada y participa en el desarrollo de otros fenómenos autodestructivos como la excitotoxicidad, lipoperoxidación y la producción de radicales libres, así como en el desarrollo de una respuesta autoreactiva contra constituyentes neurales (Donnelly and Popovich, 2008; Hashimoto et al., 2005; Donnelly and Popovich, 2008).

Después de una LTME se desencadena una respuesta autorreactiva contra constituyentes neurales (Hauben et al., 2000; Ibarra et al., 2003; Popovich et al., 1996; Popovich et al., 1996a). Esta respuesta puede ser capaz de incrementar el daño al tejido nervioso, o bien promover protección (Ibarra et al., 2004; Kipnis et al., 2002a; Kipnis et al., 2002b; Popovich et al., 1996; Schwartz, 2001) e incluso restauración (Lazarov-Spiegler et al., 1996; Lotan and Schwartz, 1994; Rapalino et al., 1998; Schwartz, 2001) del tejido lesionado.

f) Fenómeno de Autorreactividad.

El fenómeno de autorreactividad es característico de una respuesta inmune específica, siendo los linfocitos las únicas células capaces de reconocer específicamente a los agentes patógenos o antígenos, y por tanto, los encargados de iniciar la respuesta inmunitaria adaptativa.

i. **Respuesta autorreactiva.** Algunas células T autorreactivas escapan de los procesos tímicos de selección y aparecen en la circulación periférica, de forma que se pueden encontrar en la sangre periférica de individuos no lesionados linfocitos T autorreactivos a péptidos derivados de antígenos tisulares específicos, como es el caso de la proteína básica de la mielina PBM, la cual es muy abundante en el SNC (Hauben et al., 2001a; Roitt I et al., 1997)

Fisiológicamente durante la maduración tímica los linfocitos T autorreactivos deben de sufrir destrucción tímica, sin embargo, existen diversas condiciones por las cuales una célula T autorreactiva puede escapar debido a :

- ❖ No todos los antígenos propios se expresan en el timo
- ❖ No todos los epítomos propios se unen con la suficiente afinidad como para producir los complejos péptido- MHC estables necesarios para la eliminación de las células T
- ❖ No todos los TCR se unen a sus respectivos ligandos con la suficiente afinidad como para que se eliminen las células T (Roitt I et al., 1997)

Las células T sólo reconocen un antígeno cuando se presenta en forma de péptido asociado a MHC I o II. El repertorio de células T periféricas depende tanto del rango de autoantígenos como de su capacidad para unirse a los diversos antígenos MHC. La capacidad de los péptidos para unirse al MHC depende de las secuencias de aminoácidos de los puntos de unión de las moléculas MHC. Sabemos que la mayoría de aminoácidos polimórficos de las moléculas MHC se encuentran situados en el surco de unión con el péptido. Por lo tanto, el gran polimorfismo de secuencia que presentan las moléculas MHC ejerce una poderosa influencia sobre la unión a los péptidos y en consecuencia, sobre la activación de las células T

(Abbas A.K. and Lichtman, 2004; Roitt I et al., 1997)

La autorreactividad se impide mediante procesos que ocurren durante el desarrollo celular, y no está programada genéticamente. Es decir, la aptitud para distinguir entre lo propio y lo no propio se adquiere durante el desarrollo; desde un punto de vista inmunológico, lo

propio incluye todos los epítomos (determinantes antigénicos) codificados por el DNA de cada individuo, mientras que cualquier otro epítomo es considerado como exógeno. Sin embargo, no es solo la estructura de una molécula *per se* lo que determina si será considerada propia o ajena. Sin embargo existen características no estructurales en un epítomo que determinan de que manera será reconocido, y de qué manera el linfocito T se activara, dentro de estas podemos mencionar:

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

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

- ❖ Eliminación clonal: eliminación física de las células del repertorio en alguna fase de su proceso de maduración
- ❖ Anergia clonal: regulación negativa de los mecanismos intrínsecos de la respuesta inmunitaria
- ❖ Supresión: inhibición de la actividad celular mediante la interacción con otras células, como las que producen citocinas inhibitorias o los linfocitos anti-idiotípicos, que reconocen al propio receptor de antígeno (Parslow T.G et al., 2002; Roitt I et al., 1997)

Estos sistemas dependen de numerosos factores que determinan cuál de estos mecanismos se aplica a cada linfocito autorreactivo concreto. Entre ellos se encuentran: 1) el grado de madurez de la célula que se pretende silenciar, 2) la afinidad del receptor por el autoantígeno, 3) la naturaleza del antígeno, 4) su concentración, 5) su distribución tisular, 6) su patrón de expresión y 7) la disponibilidad de señales coestimulantes. En ausencia de señales coestimulantes es más frecuente que los antígenos pasen desapercibidos para la respuesta inmunitaria (Parslow T.G et al., 2002)

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

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

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

✓ La cantidad de autoantígeno es demasiado pequeña como para ser detectada

✓ El autoantígeno se encuentra situado en células tisulares que no expresan moléculas de MHC o expresan muy poca cantidad de las mismas

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

✓ El antígeno se presenta en ausencia de coestimulación, mediada por varias moléculas de superficie, dentro de las cuales la más importante es la vía B7-CD28/CTLA-4 (del inglés cytotoxic T-lymphocyte antigen 4). La expresión de B7 en las CPA es necesaria para la presentación de muchos antígenos y la subsecuente interacción con CD28 localizada en la superficie celular de la célula T, así como la expresión de CTLA-4 dependiente del TCR, determinan la activación de la célula T: al no expresarse alguna de estas o expresarse a bajos niveles, el linfocito no se activa o se energiza (Roitt I et al., 1997).

Sin embargo a pesar de todos estas características y situaciones del epítipo, autoantígeno y linfocito autorreactivo, después de una LME esta autorreactividad se presenta, siendo su gravedad dependiendo de la carga genética de cada individuo (Popovich et al., 1997a).

ii. Autorreactividad en el SNC.

A pesar de que existen mecanismos por medio de los cuales estas células autorreactivas son eliminadas o inactivadas, estos no son insuficientes y por ello prácticamente en todos los individuos sanos podemos encontrar células autorreactivas. Esta autorreactividad o autoinmunidad se considera normal, no es patogénica y es perfectamente compatible con la homeostasis. La autorreactividad puede ser parte de una respuesta inmune normal originada durante algunas enfermedades infecciosas e inflamatorias, sin embargo cuando es excesiva ocasiona un estado patológico siendo el resultado una enfermedad autoinmune (Grimaldi et al., 2005; Milner et al., 2005; Subudhi et al., 2005). Existen diversas enfermedades consideradas como autoinmunes o al menos con un componente de tipo autoinmune, tal es el caso del lupus eritematoso sistémico (LES), la enfermedad de Graves, la miastenia gravis o la esclerosis múltiple (MS, del inglés

múltiple esclerosis) entre otras. La MS es una afección inflamatoria desmielinizante del SNC en la que se ha reportado la existencia de una respuesta autoinmune contra el principal constituyente de la mielina, la MBP (Revesz et al., 1994). La EAE es uno de los modelos experimentales de la MS en ratas y ratones. Esta enfermedad neuro-inflamatoria puede ser inducida en estos animales, sensibilizando al sistema inmunológico (SI) con tejido o proteínas del SNC capaces de inducir dicha enfermedad (proteínas encefalitogénicas) como la MBP en adyuvante completo de Freund (Fuller et al., 2004; Pal and Tabira, 2002; Rao and Segal, 2004). Después de una LTME se desarrolla un fenómeno de autoinmunidad parecido al desarrollo fisiopatológico que se presenta en MS.

4. Neuroprotección después de la LME

Para mitigar en lo posible la aparición de cambios fisiopatológicos capaces de incrementar secundariamente la lesión medular, la mayoría de las investigaciones de los últimos años, apuntan a la necesidad de comenzar el tratamiento, lo más precozmente posible, siendo el intervalo óptimo, alrededor de las 4 horas tras producirse la lesión; debido a que en este tiempo, comienza el infarto de la sustancia gris, y el edema se extiende a la sustancia blanca. Las estrategias desarrolladas se basan en evitar o contrarrestar los mecanismos secundarios desarrollados después de una LTME, para poder preservar y regenerar el tejido neural, creando el concepto de neuroprotección (Hall and Springer, 2004b; Lewitus et al., 2006).

La neuroprotección es la prevención o disminución de la degeneración del tejido neural que acompaña a una lesión en el SNC. Esta estrategia busca disminuir el daño infligido al SNC por un trauma, neutralizando los mediadores tóxicos o incrementando la resistencia del tejido a la toxicidad (Aguayo et al., 1990; Gelderd, 1990; Reier et al., 1988; Reier et al., 1992). Este proceso ha demostrado tener efecto después de una LTME al disminuir el grado de destrucción en la zona lesionada y aumentar la sobrevida de los animales (Guizar-Sahagun et al., 1994). Muchos agentes farmacológicos están siendo evaluados por su eficiencia en pacientes con LTME, ya que en modelos animales han mostrado resultados prometedores (Rhoney et al., 1996). El uso de glucocorticoides como metilprednisolona iniciado dentro de las primeras 8 horas posteriores a la LTME y administrado a dosis altas durante 24 horas, mejora la recuperación motora de los pacientes

(Bracken, 1990).

En lo que se refiere a la administración de agentes anti-inflamatorios podemos mencionar al compuesto antiangiogénico derivado de la toxina de Streptococcus Beta-hemolítica del grupo B (GBS ó CM 101), el cual administrándolo una hora después de la lesión en ratones se observó recuperación en la locomoción (Wamil et al., 1998).

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

El tratamiento con inhibidores de la oxido nítrico sintasa como NG- nitro- L arginina metilester (L-NAME) administrados durante la fase aguda de la lesión en ME en modelos experimentales, promueven una recuperación clínica significativamente mayor en ratones que recibieron el tratamiento con respecto a los que no. Sin embargo la inhibición no selectiva de NO• podría tener efectos negativos en lo que se refiere a la eNOS y nNOS (Hamada et al., 1996). Otros compuestos disminuyen la excitotoxicidad provocada por el glutamato. Entre ellos podemos mencionar el bloqueador de canales iónicos MK-801, así como el antagonista de AMPA, NBQX; los cuales han demostrado neuroprotección en modelos de contusión, en lo que se refiere al NBQX promueve principalmente sobrevida de oligodendrocitos (Rosenberg et al., 1999).

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

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

El fármaco clenbuterol también se ha propuesto como un agente que promueve neuroprotección, se ha descrito que tiene la capacidad de revertir la atrofia muscular después de una LTME cuando se administra a una concentración de 10mg/Kg. por día. El clenbuterol es un agonista del receptor β_2 adrenérgico, que al ser estimulado promueve que se expresen diversos factores tróficos, además se ha observado que por medio de este mecanismo se

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

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

Actualmente, una estrategia innovadora es la que propone estimular el propio sistema inmunológico (SI) para promover protección del tejido neural (Moalem et al., 1999) denominada **“Autorreactividad Protectora”**. En ella, diversos trabajos han demostrado que la estimulación del SI mediante inmunización activa o pasiva con auto-antígenos neurales como la MBP, reduce el daño neuronal después de una lesión incompleta de la ME (LIME) (Hauben et al., 2001a), lo cual sugiere la existencia de una respuesta autoinmune que se encarga de proteger en este caso el tejido neural (Moalem et al., 1999; Schwartz and Cohen, 2000). Los resultados de estos experimentos abren un campo nuevo en la investigación de LTME donde el control de la respuesta autoinmune puede ser benéfico bajo ciertas condiciones.

A. Autorreactividad protectora.

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

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

Por otra parte se ha demostrado recientemente que el SI juega también un papel muy importante en los procesos de cicatrización, producción de tejido conectivo, angiogénesis y regeneración de tejidos vulnerables. Por lo tanto, la función primaria del SI no es solamente el defender el organismo contra ataques externos sino también participar en el mantenimiento y reparación del mismo (Schwartz et al., 1999a; Schwartz et al., 1999b). Algunas evidencias indican que algunas formas de intervención del SI pueden ayudar a proteger o restaurar la integridad del SNC. Se ha demostrado que el SI innato, representado por macrófagos activados, puede facilitar el proceso de regeneración del SNC, así como en un aspecto de inmunidad específica, las células T autorreactivas que reconocen epítomos de la MBP pueden proteger a las neuronas del SNC de la degeneración que se extiende del sitio de lesión a áreas adyacentes (Hauben et al., 2000; Schwartz et al., 1999b) dependiendo del fenotipo de activación y del estímulo. Ya que en algunos estudios han demostrado que la transferencia pasiva de células T específicas para el auto-antígeno proteína básica de la mielina (MBP, del inglés myelin basic protein) reduce el daño neuronal y una mejor actividad motora después de una LTME en roedores. (Hauben et al., 2001b).

Estas investigaciones apuntan la posibilidad de que las células T autorreactivas, puedan directa o indirectamente promover protección axonal disminuyendo los efectos de la degeneración secundaria a través de múltiples mecanismos, ya sea por la secreción de citocinas, factores neurotróficos y/ o por la producción de quimiocinas las cuales puedan atraer a otros elementos del SI como neutrófilos y macrófagos que se sabe pueden participar en la regeneración axonal. En estudios recientes se sugiere que en situaciones donde los mecanismos locales hemostáticos no pueden hacer frente adecuadamente al estrés oxidativo que se genera como consecuencia de una lesión, el organismo recluta un mecanismo de mantenimiento adaptativo alterno, que le permite aminorar este evento destructivo. Tal mecanismo podría ser desencadenado por el propio SI dirigido contra componentes propios (Schwartz et al., 1999b).

También es conocido que la inmunización activa con péptidos neurales modificados puede favorecer la protección del tejido nervioso después de una lesión (Hauben et al., 2000; Kipnis et al., 2001; Yoles et al., 2001) y que puede ser observada como una segunda línea de defensa del cuerpo cuando los mecanismos locales son insuficientes. La inmunización activa con derivados no encefalitogénicos de péptidos asociados a la mielina como el péptido alterado denominado "A91" [derivado de la MBP (aminoácidos 87-99) pero con un reemplazo en la posición 91 de una lisina por una alanina] o el copolímero-1 [cop-1; polímero sintético compuesto por: L-

alanina, L-lisina, L-ácido glutámico y L-tirosina (6:2:5:1) llamado también acetato de glatiramer (Copaxona)] (Kipnis et al., 2000;Kipnis et al., 2003;Schori et al., 2001a;Yoles et al., 2001) puede similarmente reducir la degeneración secundaria de neuronas y promover una mejor recuperación motora en animales con LTME (Hauben et al., 2000;Moalem et al., 1999). Más aún, estudios recientes han demostrado que esta autoinmunidad protectora es un fenómeno fisiológico (Yoles et al., 2001) que está controlado genéticamente (Kipnis et al., 2001).

La inmunización activa con péptidos no-encefalitogénicos ha originado resultados muy alentadores en ratas con LTME (Hauben et al., 2000;Ibarra et al., 2004) sin embargo hasta la fecha no se conoce con exactitud el efecto que la respuesta originada por estos péptidos ejerce sobre la expresión de genes fuertemente relacionados con la respuesta inflamatoria. Las células inflamatorias desempeñan una función importante en el fenómeno protector inducido por la inmunización con péptidos no encefalitogénicos, dicha función depende de la intensidad con que se desarrolle la respuesta inflamatoria misma que depende a su vez de la expresión de algunos genes que codifican para moléculas proinflamatorias como: el NF κ B, iNOS, AP-1, TNF α , IL-1, entre otros. Al parecer la autorreactividad protectora modula de alguna forma la respuesta inflamatoria después de una LTME. Dicha modulación podría ser a través de la regulación de la expresión de algunos de estos genes proinflamatorios, al actuar en diferentes puntos de regulación génica desde comunicación celular hasta los mismos factores de transcripción o producción de la molécula inflamatoria (Cross et al., 1996;Mendez et al., 2004;Wong and Billiar, 1995;Xu and Feng, 2000). Por lo que es importante analizar los mecanismos regulados por la inmunización con estos péptidos.

a) Mecanismos inmunoreguladores originados por A91 y Cop-1.

La activación de los linfocitos T CD4+ depende en gran parte del conjunto de señales de transducción originadas por diferentes moléculas estimuladoras y co-estimuladoras encontradas en la membrana celular. Entre ellas podemos mencionar a CD28, CD4, CD3, CTLA-4 y el mismo TCR (del inglés T cell receptor), entre otros. Todas estas moléculas originan un conjunto de señales que pueden o no culminar en la activación del linfocito T. De todas estas señales, la emitida por el TCR es un evento importante ya que de acuerdo a algunos estudios, cambios sutiles en la estructura del ligando del TCR resultan en efectos distintos sobre la activación del linfocito T (Nel and Slaughter, 2002). La presencia de aminoácidos conocidos como ligandos peptídicos alterados (APLs del inglés altered peptidic ligands)

diferentes en la región reconocida por el TCR o bien la presencia de secuencias repetidas formando co-polímeros, sin que se modifique la capacidad de unión al MHC puede resultar en un cambio en el fenotipo, anergia o ausencia del reconocimiento. En el caso de los APLs, una pequeña variación en la secuencia primaria peptídica puede ejercer un efecto importante en su capacidad para interactuar ya sea con el MHC o con el mismo TCR convirtiendo de esta forma a un péptido agonista en uno parcialmente agonista o incluso antagonista. Los péptidos agonistas llevan a cabo interacciones de gran afinidad con el TCR y originan una muy robusta respuesta de los linfocitos T, mientras que los parcialmente agonistas o antagonistas llevan a cabo interacciones de baja afinidad que originan alteración o incluso inhibición de la respuesta (Hall and Springer, 2004b; Huang and Anderson, 2003; Jameson and Bevan, 1995; Kersh and Allen, 1996). El APL originado de la secuencia 87-99 de la MBP (secuencia altamente inmunogénica) denominado A91 es un péptido que de acuerdo a estudios previos puede perfectamente funcionar como un agonista parcial. En modelos murinos de encefalomiелitis alérgica experimental (EAE). El A91 ha sido capaz de disminuir de manera importante la severidad de la enfermedad. Dicha inhibición se ha demostrado que es antígeno específica y producto de un cambio en el perfil de citocinas liberadas. Los animales con EAE y tratados con A91 presentan una disminución substancial de los niveles de citocinas derivadas de los linfocitos Th1 y un aumento en la liberación de las derivadas de los Th2. El APL A91 origina un cambio en el patrón de citocinas producidas por los linfocitos T reactivos contra la secuencia 87-99 de la MBP, de un fenotipo Th1 (proinflamatorio; INF- γ , TNF, IL-2) a uno Th2 (regulador; IL-4, IL-10) (Gaur et al., 1997). De tal forma que la respuesta originada por A91 puede estar controlando la acción destructora de los linfocitos T autorreactivos anti-MBP 87-99 mediante la regulación de la liberación de las citocinas proinflamatorias. Esto a su vez promueve la modulación de la respuesta inflamatoria misma que, como antes ya se mencionó, si se desarrolla en forma intensa (no modulada) es capaz de originar la destrucción del tejido neural.

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

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

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

puede proveer el sistema inmunológico: factores de crecimiento y neuroprotectores, amortiguación de sustancias excitotóxicas etc. (Barouch and Schwartz, 2002; Schwartz, 2003)

Tomando como base los efectos de estos péptidos (A91 o Cop-1) sobre la activación de los linfocitos T, que se diferencian hacia un fenotipo Th2, las citocinas antiinflamatorias podrían tener un efecto importante sobre la expresión de diversos genes proinflamatorios relacionados con el daño al tejido neural como son: iNOS, TNF α , INF γ , IL1, IL6, ya que citocinas antiinflamatorias como IL10 pueden inhibir vías de señalización involucradas con la expresión de genes proinflamatorios como son la P38 MAPk (del inglés mitogen activated protein kinases), NFk β , ATF2 (del inglés, activating transcription factor - 2) (Abbas A.K. and Lichtman, 2004). Dicha modulación podría ser uno de los mecanismos por medio de los cuales la inmunización con péptidos neurales modificados estaría propiciando su efecto protector sobre el tejido neural.

III. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento no se han descrito los mecanismos exactos por medio de los cuales la autorreactividad protectora modula la respuesta inflamatoria desarrollada después de una LTME. Ya que la expresión de genes relacionados con la inflamación está fuertemente involucrada en la modulación de la respuesta inflamatoria y con la destrucción del tejido neural, la inhibición de la expresión de estos genes a través de la respuesta autoinmune protectora podría ser el mecanismo por el cual se ejerce protección sobre el tejido neural. Actualmente no existen estudios que analicen el efecto de la inmunización con péptidos neurales sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria y sobre la traducción de sus productos proteicos en modelos con LTME. La modulación de la autorreactividad protectora es una terapia que puede tener una amplia aplicación a nivel clínico y que podrá brindar una importante terapia a gran parte de los pacientes con enfermedades neurodegenerativas. Las perspectivas de esta terapia son muy alentadoras ya que puede ofrecer grandes beneficios en enfermedades neurodegenerativas agudas (lesión de nervio óptico y de ME) o crónicas (Alzheimer, Parkinson, Esclerosis lateral amiotrófica etc.). El mejor conocimiento de los mecanismos por medio de los cuales esta terapia está funcionando nos llevará a una más rápida aplicación a nivel clínico.

Actualmente en nuestro grupo de investigación la inmunización activa con estos péptidos no-encefalitogénicos ha originado resultados muy alentadores en ratas con LTME (Martinon, 2007; Ibarra, 2010). Sin embargo, hasta la fecha no se conoce con exactitud el efecto que la respuesta originada por estos péptidos ejerce sobre la expresión de genes fuertemente relacionados con la respuesta inflamatoria ya que la intensidad con que se desarrolle, está directamente relacionada con la expresión de genes que codifican para moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias. La autorreactividad protectora modula de alguna forma la respuesta inflamatoria después de una LTME, dicha modulación podría ser a través de la regulación de la expresión de genes proinflamatorios y antiinflamatorios. Al momento no existe ningún estudio que analice el efecto de la respuesta autoinmune protectora sobre la expresión de genes relacionados con la inflamación después de una LTME y sobre la producción de NO•.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿La inmunización con A91 y Cop-1 disminuirá la expresión de genes proinflamatorios y aumentará la expresión de genes antiinflamatorios en el sitio de lesión de ratas después de una LTME?

V. HIPÓTESIS

Si la inmunización con A91 o con Cop-1 inducen una respuesta de células T con fenotipo predominante Th2 y las citocinas liberadas por estas células tienen un efecto supresor sobre la expresión de genes proinflamatorios, entonces la inmunización con estos péptidos causará una disminución en la expresión de algunos genes proinflamatorios y el aumento de genes antiinflamatorios en el sitio de lesión de ratas con LTME, repercutiendo en la producción de NO•.

VI. OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de genes relacionados con la inflamación en el sitio de lesión de ratas con LTME inmunizadas o no con A91 o Cop-1.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar la expresión de genes relacionados con la inflamación en médula espinal de ratas no sujetas a LTME (Sham).
2. Analizar la expresión de genes relacionados con la inflamación en el sitio de lesión de ratas sujetas a LTME e inmunizadas con A91.
3. Analizar la expresión de genes relacionados con la inflamación en el sitio de lesión de ratas sujetas a LTME e inmunizadas con Cop-1.
4. Analizar la expresión de genes relacionados con la inflamación en el sitio de lesión de ratas sujetas a LTME e inmunizadas con ovoalbúmina (OVA).
5. Analizar la expresión de genes relacionados con la inflamación en el sitio de lesión de ratas sujetas a LTME y no inmunizadas, solo con la solución amortiguadora de fosfatos (PBS, del inglés phosphate buffered saline).
6. Comparar la expresión de genes relacionados con la inflamación en el sitio de lesión de los cinco grupos anteriores.
7. Analizar la producción de NO• en médula espinal después de una LTME

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Características de la muestra: Se utilizaron 75 ratas hembras Fischer 344 (resistentes a desarrollar EAE) de un peso de 200 a 230g, provistas por el Instituto Camina A.C. Para llevar a cabo el análisis de expresión de genes relacionados con la inflamación a los 7 días después de la LTME, se dividieron al azar en 3 animales por grupo para microarreglos y en 4 animales por grupo para la retrotranscripción seguida por la reacción en cadena de la polimerasa (RT- PCR tiempo real). En lo referente a la medición de la cantidad de NO en médula espinal se dividieron al azar 4 animales por grupo para llevar a cabo la técnica de Griess, la cual determina la cantidad de nitritos totales, los cuales son un parámetro para determinar la cantidad de NO (Tabla 2)

Tabla 2. Distribución de animales

Grupo / Tiempo	Microarreglos # animales	RT- PCR Tiempo real # animales		Técnica de Griess # animales
		LTME Severa	LTME Moderada	
1. LTME + vehículo (PBS)	3	4	4	4
2. LTME + OVA	3	4	4	4
3. LTME + A91	3	4	4	4
4. LTME + Cop-1	3	4	4	4
Sin lesión	3	4	4	4
TOTAL	15	20	20	20

2. Diseño experimental

Se realizaron 4 experimentos y en cada uno, se formaron 5 grupos:

Grupo 1: Ratas sin lesión, solo con laminectomía

Grupo 2: Ratas con LTME + vehículo (PBS)

Grupo 3: Ratas con LTME + inmunización con OVA

Grupo 4: Ratas con LTME + inmunización con A91

Grupo 5: Ratas con LTME + inmunización con Cop-1

A. Consideraciones del diseño experimental

La variante que se maneja en cada experimento fue la intensidad de la lesión y la técnica de análisis de expresión empleada. Detallando a continuación la variación en cada experimento.

1.- En el primer y segundo experimento, los animales recibieron una lesión severa, en el primer experimento (n=3) se analizó la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria por medio de microarreglos; en el segundo experimento (n=4) se analizaron genes blancos por medio de RT-PCR tiempo real.

2.- En lo que se refiere al tercer experimento, se llevó a cabo una lesión moderada analizando los mismos genes que en el segundo experimento (n=4).

3.- En los tres experimentos se analizó la expresión de los genes relacionados con la respuesta inflamatoria 7 días después de la LTME, inmunizando a los animales 60 min después de la lesión, este tiempo se estableció tomando como base estudios anteriores, en los que se observó el efecto neuroprotector de A91 y Cop-1 en modelos de LTME y traumatismo craneoencefálico en los que se realizó la inmunización a estos tiempos (Martinon et al., 2007; Kipnis et al., 2003).

4.- En el cuarto experimento se analizó la cantidad de NO•, determinando la cantidad de nitritos en médula espinal de ratas inmunizadas 60 min después de una LTME moderada (n=4 por grupo), obteniendo la médula espinal 7 días después de la lesión.

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

6.- En los tres primeros experimentos se analizó también la expresión de los genes en la membrana de microarreglos y los seleccionados en animales sin LTME (n= 4 por cada experimento) y en el cuarto experimento se analizó la cantidad de NO• en la médula espinal de animales sin LTME.

6.- En el cuarto experimento de cada ME se analizó la cantidad de NO• en el epicentro de la lesión y en los segmentos localizados desde el epicentro de la lesión hasta 1.25 cm. caudales y craneales del sitio de lesión. En todos los casos se estudiaron 2.5 cm. de tejido (100 µg aprox.), esta cantidad de tejido nos permitió estudiar el sitio de lesión y el tejido hasta donde esta se extiende tanto craneal como caudal.

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

4. Técnicas utilizadas en los cuatro experimentos

A. Lesión Traumática de Médula Espinal.

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

Una vez descubierta la ME se llevó a cabo la LTME por una contusión severa dejando caer un cilindro de 10 g de una altura de 50 mm sobre el sitio expuesto, en el caso de una lesión severa y a una altura de 25mm para una lesión moderada, se utilizó el impactador de la Universidad de Nueva York (del inglés New York University, NYU), un aparato que ha demostrado infligir una lesión por contusión calibrada en la ME (Young, 1996). **(Figura 5)**



Figura 5. Laminectomía y lesión de médula espinal. En la figura (A) se muestra la médula espinal E expuesta por laminectomía a nivel de la vertebra torácica 9, en las figuras B y C se muestra la lesión por contusión infligida con ayuda del impactador de la Universidad de Nueva York.

Las ratas se inmunizaron mediante una inyección intradérmica, en la base de la cola, con 150 μg de A91, Cop-1, OVA emulsificado en un volumen igual de CFA conteniendo 1mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*. La inmunización se realizó en el tiempo previamente explicado.

C. Cuidados post-lesión

Se colocaron las ratas lesionadas sobre camas con aserrín y con agua filtrada que se cambió diariamente hasta el término del estudio. La vejiga fue evacuada con ayuda de un masaje en el abdomen, dos veces al día (por la mañana y por la tarde) (**Figura 6**), hasta que se logró la función normal de la micción, que se pierde por unos días debido a la lesión. Todas las ratas fueron monitoreadas cuidadosamente para evitar infección en el tracto urinario u otro signo de enfermedad sistémica. Durante los primero días y cuando se presentó hematuria después de este periodo, recibieron un tratamiento de enrofloxacina en el agua con una dosis de 64 mg/ Kg/ día y paracetamol usado como analgésico después de la lesión a una dosis de 50 mg/ Kg/ 8 a 12 horas.



Figura 6. Cuidados post- operatorios de los animales lesionados. Los animales

después de la lesión tuvieron cuidados especiales como se muestra en la figura en donde se está vaciando la vejiga de uno de ellos, ya que después de la LTME a nivel de T9 se pierde la capacidad de micción

D. Extracción de la médula espinal.

Siete días después de la LTME se les aplicó una dosis letal (100 mg/kg) de pentobarbital sódico vía i.p, a los animales para sacrificarlos. Antes de que cayeran en paro respiratorio, las ratas se colocaron en posición dorsal para hacer un corte en la piel para dejar expuesta el área del sitio de la contusión. Se cortó el músculo a los lados del sitio de lesión, y las apófisis espinosas de las vértebras, para liberar poco a poco y exponer mediante laminectomía la médula espinal 1.25 cm craneales y caudales, tomando como punto cero el sitio de lesión, se retiró del canal vertebral y se colocó en 1ml de TRIZOL para posteriormente comenzar la extracción del RNA total en los tres primeros experimentos.

Para el cuarto experimento la médula espinal se retiró del canal vertebral y se colocó en una solución de extracción para llevar a cabo la determinación de nitritos por medio de la técnica de Griess.

E. Obtención y purificación de RNA total

Se obtuvo RNA total en los primeros tres experimentos de análisis de expresión génica, a partir de 2.5 cm de tejido medular (100 µg), para cada una de los animales utilizados, por la técnica de TRIZOL, la cual se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se maceró el tejido con ayuda de un pistilo en el tubo eppendorf, sometándolo después a lisis con ayuda de una solución caotrópica (1000 µl de TRIZOL) (Invitrogen Reagent).

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

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

➤ Posteriormente se hizo la evaluación de su integridad y aspecto en geles de agarosa 1.5%, corriendo la muestra en la cámara de electroforesis a 80 voltios. (Figura 7)

➤ Para los tres experimentos se analizó la integridad de la muestra no procesando ninguna muestra que no presentara las siguientes características:

1.- La relación 260/280nm (indicador de pureza), en el espectrofotómetro fuera de 1.8 a 2.0

2.- Se observarán las dos bandas ribosomales 28 s y 18 s en la electroforesis, en las cuales la 28 s tiene que presentar el doble de intensidad de la banda 18 s.

3.- La muestra no estuviera degradada o comenzara a degradarse observando al final del corrimiento que no se presentara el efecto de “vela”, es decir fuera del área de corrimiento.

M - RNA total muestras de médula espinal

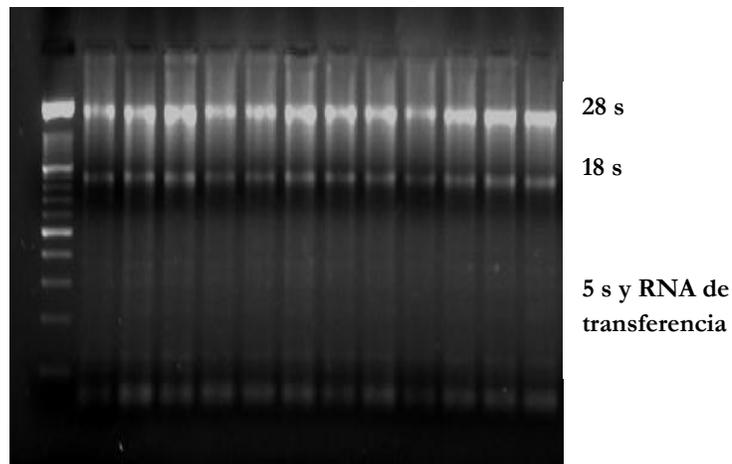


Figura 7. Evaluación de integridad del RNA Total por electroforesis.

Se observaron las dos bandas ribosomales principalmente y se calcula que el 10 % de la cantidad de RNA total es el RNA mensajero (mRNA), característica que se tomo en cuenta para futuros experimentos en los que piden cantidades exactas de RNA total. **M.** Marcador de pares de bases

F) Técnicas utilizadas en el primer experimento.

a) Microarreglos.

Una vez obtenido el RNA total se procedió a hacer una purificación del RNA por medio de columnas de filtración y tratamiento de DNAsas, con el fin de eliminar el DNA genómico, por medio de RNA isolation kit, de Superarrays Technologies. Posteriormente se realizó la retrotranscripción (RT), obteniendo DNA complementario (cDNA, del inglés complementary desoxyribunocleic acid), para después llevar a cabo la obtención de RNA complementario (cRNA, del inglés complementary ribunocleic acid) marcado con biotina UTP – 6 fosfato con ayuda del kit True Labeling- AMP 2.0 . Cada RNA fue procesado individualmente, teniendo una muestra al final de cRNA por cada animal de cada grupo.

Una vez marcado el cRNA se llevo a cabo la hibridación en las membranas Oligo GEArray® Rat Inflammatory Cytokine & Receptor Microarrays, con ayuda del kit GEA hybridization and detection de SuperArray Technologies. (Figura 8)



Superarray microarrays protocol

Figura 8. Hibridación de cRNA marcado con biotina en las membranas de microarreglos. El cRNA marcado con biotina UTP, se colocó en la membrana y por medio de soluciones de hibridación, se unieron a los genes contenidos en la muestra a las sondas específicas.

Para poder visualizar los genes expresados en cada muestra de cRNA se utilizó el kit Chemiluminescent Detection de Superarrays Technologies, para finalmente analizar la expresión de los genes contenidos en la membrana, capturando las imágenes por medio de una cámara CCD en donde éste el sensor que contiene diminutas células fotoeléctricas que

registran la imagen, desde donde la imagen es procesada por la cámara y enviada a una computadora para su visualización. Posteriormente se usó el Software GEMArray Expression Analysis Suite, en cada una de las imágenes adquiridas, para su análisis posterior. **(Figura 9)**



Superarray microarray protocol image

Figura 9. Análisis de los genes en la membrana con ayuda del software GEMArray Expression Analysis Suite. Análisis de los genes por medio de GEMArray Expression Analysis Suite, en donde fue obtenida una imagen de cada membrana procesada, en cada membrana se analizó el gen por cuadruplicado, donde posteriormente se normalizaron los datos para poder llevar a cabo la comparación entre grupos.

Cada membrana utilizada tenía 112 genes colocados en cuadrantes en donde cada uno de estos contenía la sonda que codificaba para cada gen, 12 cuadrantes eran genes control en donde todos tenían que presentar quimioluminiscencia para considerar que el experimento estuvo correctamente procesado. Para poder llevar a cabo el análisis se colocó una imagen de cada grupo, con el fin de formar bloques, en cada imagen se dibujó una rejilla para ubicar la membrana dentro del área de análisis. Cabe mencionar que los datos arrojados por el software eran resultados netos, es decir sin el background causado por la adquisición de imágenes. **(Figura 10)**

Una vez obtenido el RNA total, previamente evaluado por espectrofotometría y electroforesis, se procedió a sintetizar cDNA por medio del protocolo ThermoScript Plus Reverse Transcription de Invitrogen, en donde se obtuvo cDNA a partir de 2 µg de RNA total.

Posteriormente se llevo a cabo PCR tiempo real por medio del protocolo Syber Green DNA Master Plus de Roche utilizando para cada gen 1 µl de cDNA total. Se analizaron genes tanto inflamatorios como antiinflamatorios después de la lesión por contusión severa, seleccionándolos con base al análisis de microarreglos y con base a antecedentes observados en otros estudios después de una LTME.

Los genes analizados fueron IL10, TGFβ , Cish (del inglés cytokine inducible SH2 protein), IFNγ, Caspasa 3, Bmp3 (del inglés bone morphometric protein 3), IL12, IL1rap (del inglés receptor accessory protein of interleuquina 1), TNF α , TNFs 11(del inglés ligand 11 tumoral nuclear factor), IL6, Soc 3 (del inglés supressor of cytokine signalling 3) e IL4; usando HPRT (del inglés hypoxantine - guanine phosphoribosyltransferase) como gen control. En el cual se manejaron los mismos programas de PCR en el termociclador.

Para el análisis de estos genes se diseñaron dos pares de iniciadores a partir de la secuencia del cDNA de genes de rata reportados en el GENE BANK del NCBI. Los criterios del diseño son: un tamaño máximo de 20 nt, que incluyo una secuencia de unión exónica, con una Tm de 60 a 61°C, con un equilibrio de bases AT y GC, con secuencias que no fueron complementarias entre sí y que no forman estructuras secundarias, que amplifiquen fragmentos de 110 a 300 pb (lo que puede permitirnos realizar PCR tiempo real). (Tabla 3)

Tabla 3. Genes, secuencias, amplificado y programa de los genes estudiados en lesión severa.

Gen	GenBank	Secuencias	Tamaño	Programa de PCR tiempo real
Hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HPRI)	NM_012583.2	Sentido 5' AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA 3' Antisentido 3' CAAAGCCTAAAAAGACAGCGG- 5'	192 pb	Pre-incubación
Interleucina 10. (IL10)	NM_012854	Sentido 5'- GGGGTGACAATAACTGCA -3' Antisentido 3'- GGGGCATCACTTCTACCA-5'	216 pb	1 ciclo
Proteína accesoria del receptor para interleucina 1 (IL1rap)	NM_012968.1	Sentido 5'- ATTTCCGCCTTCCAGAGAAT - 3 Antisentido 3'- GAGTCTCATGGGGGAATTGA-5'	182 pb	95°C/10min
Interleucina 6 IL 6	NM_001008725	Sentido 5'- TGT GGA AGA CAA ACC ATG TTG CCG- 3' Antisentido 3'- TAT TGC AGG TGA GCT G GA CGT TCT -5	117pb	Amplificación
Factor transformante de crecimiento β Tgfb3	NM_013174.1	Sentido 5'- CCCAACCCAGCTCCAAGCG- 3' Antisentido 3'- CAGCCACTCTGCGGTGCCTC- 5'	132 pb	95°C/ 10 s
Caspasa 3 Casp3	NM_012922.2	Sentido 5'- GCCCTGCAGCCCATGTGGAG- 3' Antisentido 3'-CCCACAGGGAGAGCCAGCGA- 5'	122 pb	60°C/10 s
Proteína con dominios SH2, inductora de citocinas Cish	NM_031804.1	Sentido 5'- TGTGCATAGCCAAGACGTTTC- 3' Antisentido 3'- TAATGCTGCACAAGGCTGAC- 5'	286 pb	72°C/ 7 s
Interferon IFN gama	NM_138880	Sentido 5'- CAA CCA GGC CAT CAG CAA CAA CAT - 3' Antisentido 3'- TCT GTG GGT TGT TCA CCT CGA ACT- 5'	128 pb	Melting Curve
Interleucina 12 IL12	NM_053390	Sentido 5'- TGC CAA GTG TCT TAA CCA GTC CCA- 3' Antisentido 3'- TGA TCG ATG TCT CCA GCA GTG CAA-5'	111pb	1 ciclo
Tnfs 11	NM_057149.1	Sentido 5'-TTGAGGGATGTGACAGTGG-3' Antisentido 3'- GGCTGCAAAGGTTGTGATCT -5'	148 pb	95°C - 0 s
Bmp3	NM_017105.1	Sentido 5'- AAGGTTGTTCCCATGACAGC-3' Antisentido 3'- TTTTGACAGCCAAGACATGC-5'	185 pb	65°C- 1 min
Factor de necrosis tumoral α TNF α	NM_012675	Sentido 5'- CTC TTC TGT CTA CTG AAC TTC GGG-3' Antisentido 3'- GAG AAG ATG ATC TGA GTG TGA GGG -5'	115 pb	95°C- 0 s /o.1
Interleucina 4 IL4	NM_201270	Sentido 5'-GTAACGACAGCCCTCTGA-3' Antisentido 3'- TCACCGAGAACCCAGAGA-5'	217pb	Cooling
Soc 3	NM_053565.1	Sentido 5'-ACGGAACCTTCCTTTGAGGT-3' Antisentido 3'CGTTGACAGTCTTCCGACAA-5'	175pb	1 ciclo
Síntasa inducible del óxido nítrico iNOS	AY211532.1	Sentido 5'- AAGCTGGTGGCCGCCAAGCT-3' Antisentido 3'-ATGTGAGGGGTTTGGGGGA-5'	258pb	40°C/30 s

La PCR tiempo real se llevo a cabo en el equipo Light Cycler 2.0 de Roche tomando para cada muestra el valor de C.P (del inglés, Cross Point), verificando que cada gen tuviera la misma melting curve, que garantiza la especificidad de amplificación del producto. En valor de C.P fue normalizado tomando como cero los valores del grupo sin lesión por medio de delta 1 ($\delta 1$) y delta 2 ($\delta 2$), comparándolo posteriormente con los demás grupos, presentándose los resultados en unidades arbitrarias.

H) Técnicas utilizadas en el tercer experimento.

Una vez obtenido el RNA total, previamente evaluado por espectrofotometría y electroforésis, se procedió a sintetizar cDNA por medio del protocolo Thermoscript Plus Reverse Transcription de Invitrogene, en donde se obtuvo cDNA a partir de 2 µg de RNA total.

Posteriormente se llevo a cabo PCR tiempo real por medio del protocolo Syber Green DNA Master Plus de Roche utilizando para cada gen 1 µl de cDNA total. Se analizaron genes tanto inflamatorios como antiinflamatorios después de la lesión por contusión moderada, seleccionando 5 genes, con base a antecedentes observados en otros estudios después de una LTME, mismos que fueron comparados con la lesión severa. Cabe mencionar que a pesar que no se encontraba en la membrana de microarreglos el gen que codifica para la sintasa inducible del oxido nítrico (iNOS, del inglés inducible nitric oxide synthase), se decidió analizar su expresión debido al papel que tiene en el desarrollo de la respuesta inflamatoria así como también en otros fenómenos autodestructivos como son la lipoperoxidación y la muerte neuronal, además de que los genes analizados como IFN γ , TNF α , e IL10 pueden regular de manera directa o indirecta su expresión, por lo que la expresión de iNOS se realizo después de una LTME moderada en ratas inmunizadas o no con A91 o Cop-1.

Los genes analizados fueron IL10, IL4, Soc 3, IFN γ , TNF α , e iNOS usando HPRT como gen control. En los cuales se manejaron los mismos programas de PCR en el termociclador. Utilizando los mismos iniciadores que en el caso de lesión severa. **(Tabla 3, indicando a los genes sombreados, como genes analizados en este experimento, usando las mismas secuencias y programas).**

La PCR tiempo real se llevó a cabo en el equipo Light Cycler 2.0 de Roche tomando para cada muestra el valor de punto de cruce (C.P del inglés Cross Point), verificando que cada gen tuviera la misma melting curve, que garantiza la especificidad de amplificación del producto. En valor de C.P fue normalizado tomando como cero los valores del grupo sin lesión por medio de $\delta 1$ y $\delta 2$, comparándolo posteriormente con los demás grupos, presentándose los resultados en unidades arbitrarias.

I) Técnicas utilizadas en el cuarto experimento

a) Técnica de Griess

Una vez extraída la médula espinal, se obtuvo el peso del tejido con ayuda de una balanza analítica con el fin de poder realizar cálculos posteriores, se colocó la muestra en un tubo que contenía 3 ml de ácido perclórico (HClO_4) al 8 %, para llevar a cabo su homogenización y la separación del sobrenadante al centrifugar la muestra a 13000 rpm por 10 min. (Figura 12)



Figura 12. Determinación del peso de la médula espinal y homogenizado. Las médulas se pesaron y fueron homogenizadas en un solución de HClO_4 al 8 %, para posteriormente separar fases y que los nitritos queden en el sobrenadante, precipitándose los restos celulares.

Posteriormente del total del sobrenadante se tomaron 500 μl a los cuales se les agregó la misma cantidad del reactivo de Griess, el cual es hecho a partir de dos soluciones que permiten determinar la cantidad de nitritos:

Solución 1: Se prepararon 5 ml de Naphthylethylendiamine dihydrochloride en H_2O al 0.1%.

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O} (0.1\%) / 5 \text{ ml} &= 0.005 \text{ g} \\ &= 5 \text{ mg} \end{aligned}$$

Solución 2: Se prepararon 5 ml de Sulfanilamide 1% en ácido fosfórico al 5%

$$\begin{aligned} (1\%) / 5 \text{ ml} &= 0.050 \text{ g} \\ &= 50 \text{ mg} \end{aligned}$$

Dejando reposar la muestra con el reactivo de Griess (solución 1 y 2) por 15 min para posteriormente leer la muestra a una longitud de onda de 550nm en el espectrofotómetro y

determinar la cantidad de nitritos en μM (siendo la absorbancia a 550nm la cantidad de nitritos) por gramo de tejido, tomando en cuenta el peso de cada médula espinal.

J) Estadística

En los cuatro experimentos debido al número de grupos a que los datos no cayeron en la normalidad; los datos fueron analizados por la prueba de Kruskal Wallis y de ser necesario se aplicó una U de Mann Withney.

IX. RESULTADOS

1) Primer experimento. Microarreglos.

Siete días después de la LTME se llevó a cabo el análisis de expresión de genes relacionados con el proceso inflamatorio por medio de microarreglos, colocando una muestra por membrana, teniendo al final 3 membranas analizadas por grupo.

Se detectó la expresión por quimioluminiscencia de 112 genes (**Anexo 1**), de los cuales 12 eran genes control. Los genes fueron agrupados en cada animal de acuerdo a su expresión como se muestra en la **Figura 13**.

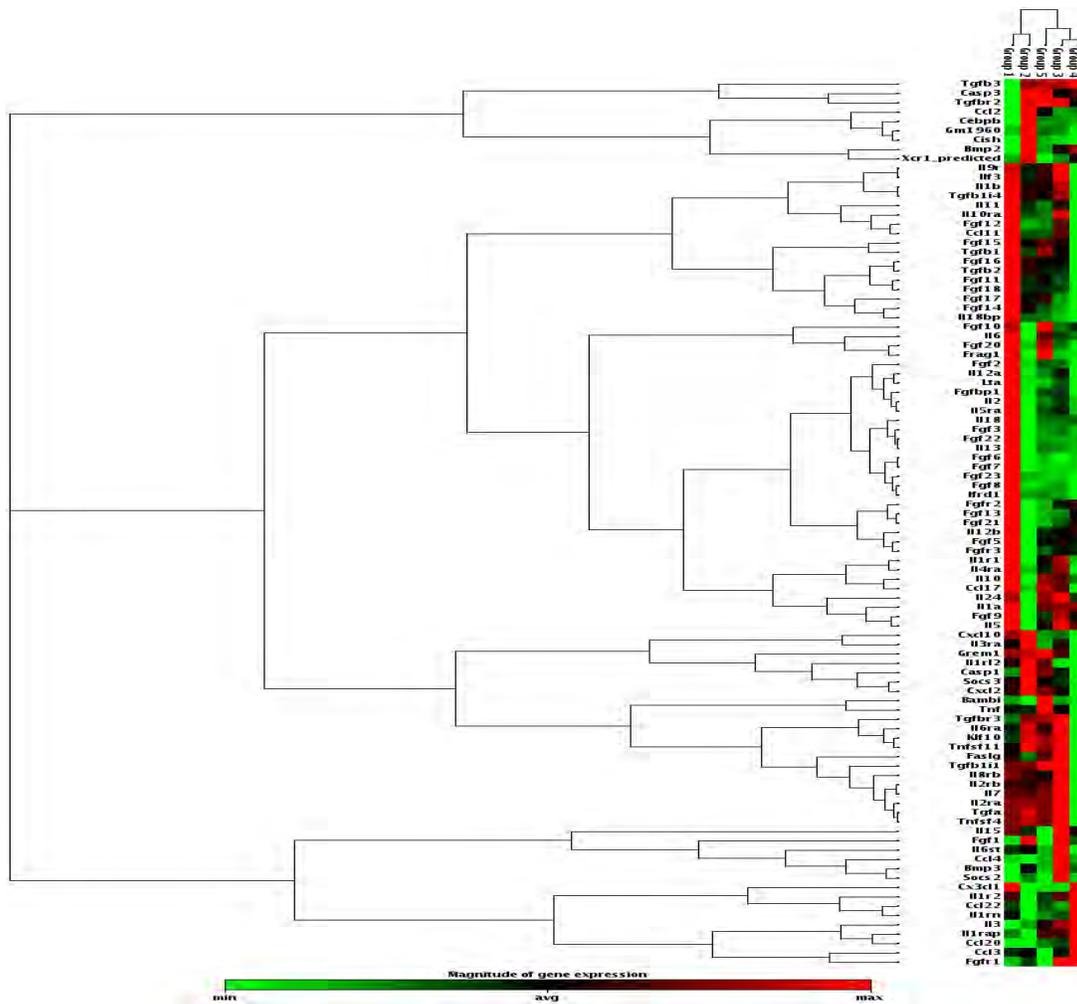


Figura 13. Genes en conjunto analizados por microarreglos por grupo experimental. De acuerdo a su magnitud de la expresión génica se realizó un conjunto de genes por grupo experimental de los 127 genes, en la figura en verde se muestra los genes con menor expresión, en negro genes que no tuvieron cambios de expresión y en rojo los genes con mayor expresión. Observando la expresión de los grupos colocados de izquierda a derecha en el siguiente orden: PBS, OVA, A91, Cop-1 y Sham, analizando que el grupo PBS tiene mayor número de genes sobreexpresados en comparación con los demás grupos, sin mostrar un análisis estadístico significativo.

Después de la normalización de datos con la opción empty spots (opción que permitió solo analizar la cantidad de pixeles dentro de cada pozo) se compararon los resultados entre grupos, animal por animal obteniendo una gráfica de ésto, para cada comparación. (Figura 14)

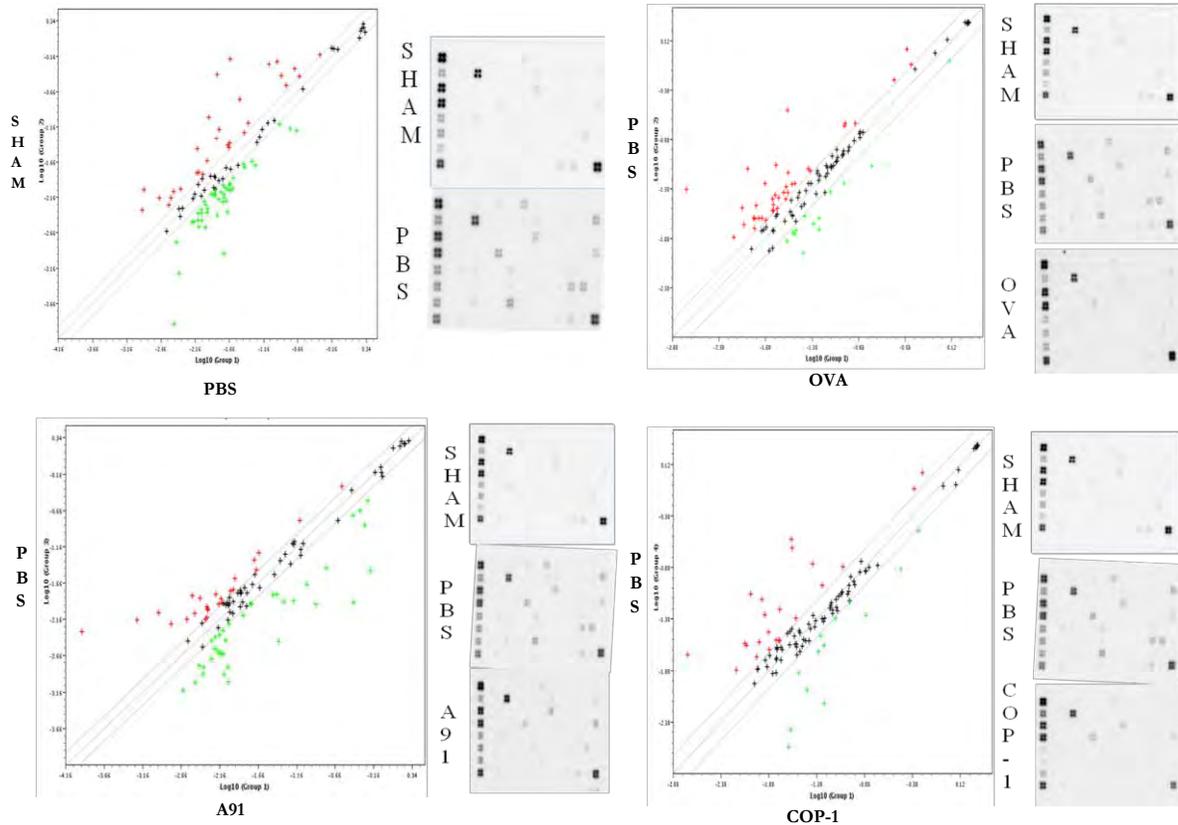


Figura 14. Comparación de los genes analizados por microarreglos en los grupos de experimentación. Se compararon los genes en cada animal de cada grupo, con ayuda de gráficas para obtener un patrón general de expresión, en donde los genes que no presentaron variación se localizaron dentro de las líneas perpendiculares, los genes en verde fueron genes disminuidos en el grupo correspondiente en el eje de las X, mientras los genes en rojo, fueron genes que aumentaron su expresión en el grupo de las Y. En cada gráfica se muestran las imágenes tomadas para poder llevar a cabo el análisis mediante el software GEArray Expression Analysis Suite.

Se seleccionaron los genes de interés con base a los resultados en el microarreglo y a estudios anteriores en donde se ha relacionado la contribución de estos genes en el desarrollo de la fisiopatología después de la LTME y en la respuesta autorreactiva, considerando que en uno de los grupos el valor de los genes fuera igual o mayor a 1.0 unidad arbitraria de expresión. (Tabla 4)

Tabla 4. Análisis de los genes seleccionados

Gen	Grupos (media +/- Desviación estándar)			
	PBS	OVA	Cop-1	A91
IL10	1.20 +/- 0.71	0.79 +/- 0.47	0.63 +/- 0.36	0.90 +/- 0.19
IL1 rap	1.38 +/- 0.83	1.10 +/- 0.84	0.86 +/- 0.62	1.25 +/- 0.53
IL6	1.19 +/- 0.28	0.87 +/- 0.70	0.52 +/- 0.47	0.97 +/- 0.41
TGFB	0.94 +/- 0.16	0.70 +/- 0.32	0.42 +/- 0.15	0.74 +/- 0.08
Cish	1.38 +/- 0.37	1.00 +/- 0.69	0.59 +/- 0.55	0.97 +/- 0.38
IFN γ	1.17 +/- 0.38	0.84 +/- 0.71	0.42 +/- 0.34	0.87 +/- 0.46
Casp 3	1.45 +/- 0.42	1.08 +/- 0.79	0.66 +/- 0.65	1.15 +/- 0.47
IL 12	1.14 +/- 0.34	0.85 +/- 0.70	0.50 +/- 0.43	0.87 +/- 0.40
TNF α	1.21 +/- 0.30	0.89 +/- 0.61	0.57 +/- 0.26	1.02 +/- 0.36
TNFs11	1.33 +/- 0.40	1.08 +/- 0.74	0.49 +/- 0.41	1.01 +/- 0.46
Socs3	1.00 +/- 0.58	1.05 +/- 0.77	0.71 +/- 0.31	0.60 +/- 0.34
Bmp3	1.73 +/- 0.71	1.81 +/- 1.43	1.33 +/- 0.78	1.10 +/- 0.27
IL4	1.17 +/- 0.38	0.90 +/- 0.74	0.46 +/- 0.36	0.92 +/- 0.46

Tabla 4. Resultados de los genes seleccionados en unidades arbitrarias obteniendo la media y la desviación estándar de cada grupo, en ninguno de los casos se presentó una diferencia significativa ($p > 0.05$, Kruskal Wallis).

2) Segundo y tercer experimento. RT-PCR lesión severa y moderada.

Con el fin de confirmar el patrón de expresión de los genes seleccionados en los microarreglos con una técnica cuantitativa, se procedió a llevar a cabo RT-PCR tiempo real en la médula espinal de animales con LTME severa, analizando cada gen por duplicado. Una vez hecho el estudio se analizó el efecto de la intensidad de la lesión sobre la expresión de cinco genes del segundo experimento, estudiándolos por RT-PCR después de una lesión moderada, constituyendo el tercer experimento.

Para asegurarnos que los valores eran específicos de cada gen estudiado, antes de procesar los resultados en ambos experimentos, se tomó en cuenta en cada corrimiento la melting curve, parámetro que indica de manera indirecta, la especificidad de los iniciadores para unirse a la secuencia de DNA que codifica un gen determinado, siendo por lo tanto las unidades de fluorescencia detectadas el producto de la amplificación de un solo gen. (Figura 15)

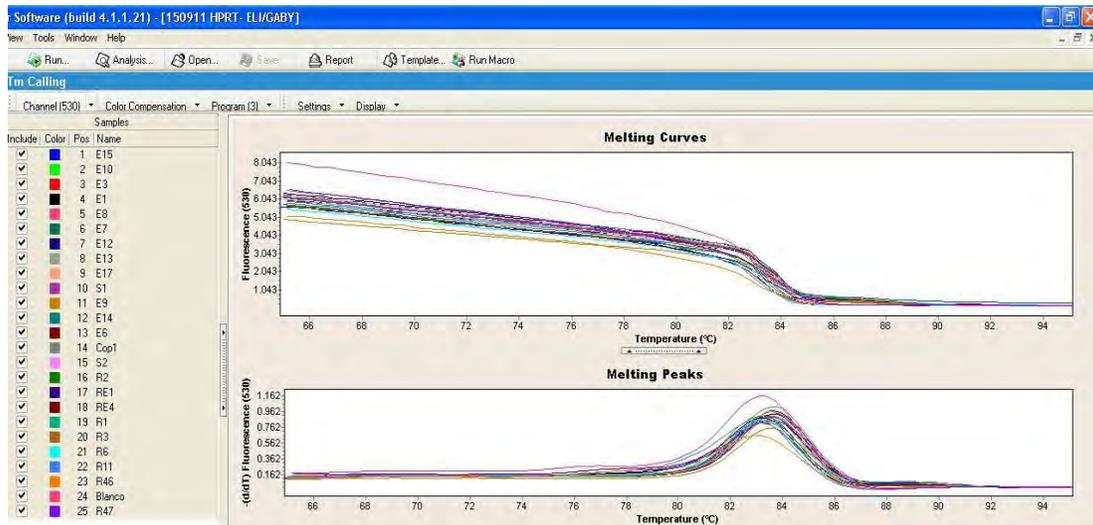


Figura 15. Análisis de melting curve y melting peaks. En cada corrimiento se observó que todas las muestras tuvieran un mismo patrón de curva, en la parte superior de la figura se muestra el patrón de dirección de todas las muestras que determina el melting curve dando origen a un solo pico de melting, que garantiza la unión específica a una sola secuencia de los primers o iniciadores para detectar la expresión de un solo gen por corrimiento.

Tomando los valores del parámetro cross point o CP (el cual nos indica cuando la fluorescencia del amplificado se detecta y que es directamente relacionado con la cantidad de cDNA para un gen en la muestra tomada), se llevó a cabo la normalización de datos, restando la CP del gen control (HPRT) obteniendo $\delta 1$ y $\delta 2$, tomando como cero a los animales del grupo sin lesión (Sham). Este procedimiento se realizó en cada uno de los genes analizados en ambos experimentos, reportándose los resultados en unidades arbitrarias.

Por lo tanto en el segundo experimento se analizaron por RT-PCR 13 genes seleccionados en los cinco grupos de experimentación, tomados de los resultados de microarreglos y de artículos previos en donde los productos de estos juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria,^(Carlson et al., 1998; Carmel et al., 2001; De et al., 2005) estos genes fueron: TNFs 11

(Figura 16), TGF β (Figura 17), Cish (Figura 18), Caspasa 3 (Figura 19), Bmp3 (Figura 20), IL12 (Figura 21), IL1rap (Figura 22), IL6 (Figura 23), IL10 (Figura 24), IL4 (Figura 25), Soc 3 (Figura 26), IFN γ (Figura 27) y TNF α (Figura 28).

En el tercer experimento se analizaron 6 genes seleccionados en los cinco grupos de experimentación, cinco de estos genes fueron estudiados en el segundo experimento y fueron retomados en este, debido a que en artículos anteriores estos han sido vinculados con una respuesta Th2 [IL10 (Figura 24), IL4 (Figura 25), Soc 3 (Figura 26)] o una respuesta que promueve el fenotipo Th1 [IFN γ (Figura 27), TNF α (Figura 28)], (Abbas A.K. and Lichtman, 2004; Aharoni et al., 2000) además de agregar al estudio iNOS (Figura 29), gen vinculado con el desarrollo de otros fenómenos autodestructivos (lipoperoxidación y liberación de otros radicales libres), el cual es activado cuando existe una respuesta inflamatoria no controlada, pudiendo los otros genes estudiados en este experimento regular indirecta o directamente la expresión de este último (Guzik et al., 2003).

A. Tnfs 11

Después de 7 días de la lesión severa, el grupo inmunizado con A91 (7.74 +/- 0.96 promedio/desviación estándar DE) presentó un incremento significativo (* $p < 0.01$ Kruskal Wallis, seguida de una U de Mann Withney) en la expresión de Tnfs11, en comparación con PBS (0.7340 +/- 0.1562 promedio/DE); por otra parte aunque en menor nivel los grupos inmunizados con OVA (2.96 +/- 0.3077 promedio/DE) y Cop-1 (3.35 +/- 0.4424 promedio/DE) tuvieron también un incremento significativo al compararse a su vez con el grupo PBS (** $p = 0.0286$, Kruskal Wallis, seguida de una U de Mann Withney). (Figura 16)

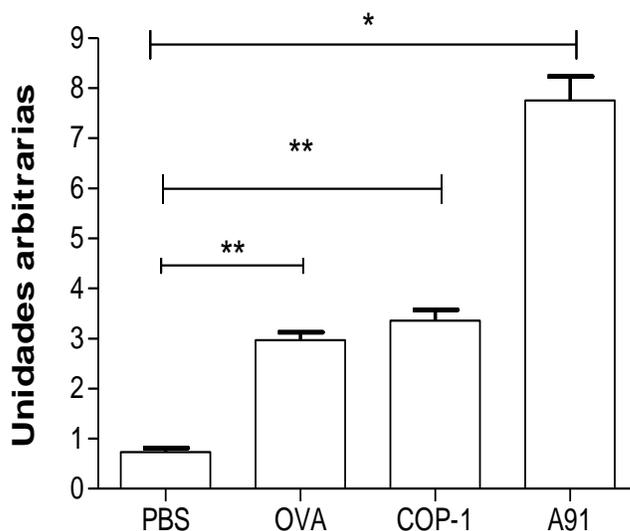


Figura 16. Análisis de la expresión de Tnfs 11 después de la inmunización con A91 o Cop-1. Gráfica de barras donde

se muestra la expresión de Tnfs 11 después de una LTME severa. Se observa que en los grupos inmunizados con cualquier antígeno provoca un incremento significativo de la expresión de Tnfs 11 en comparación con los animales que solo recibieron la solución de fosfatos (PBS) más el adyuvante (* $p < 0.01$ A91 contra PBS y ** $p = 0.0286$ OVA y Cop-1 contra PBS Kruskal Wallis, seguida de una U de Mann Withney), las barras muestran la media +/- error estándar.

B. TGF β

En lo que se refiere a la expresión de TGF β , después de una lesión severa en médula espinal se observó un incremento significativo ($p = 0.017$ Kruskal Wallis, seguida de una U de Mann Withney) en la expresión en el grupo A91 (1.321 +/- 0.2090, promedio/DE) en comparación con los grupos inmunizados con OVA (0.6593 +/- 0.0701 promedio/ DE) y Cop-1 (0.6721 +/- 0.1082 promedio/DE), sin embargo al comparar A91 con el grupo PBS (0.7671 +/- 0.7738 promedio/ DE) no se presentó una diferencia significativa. (Figura 17)

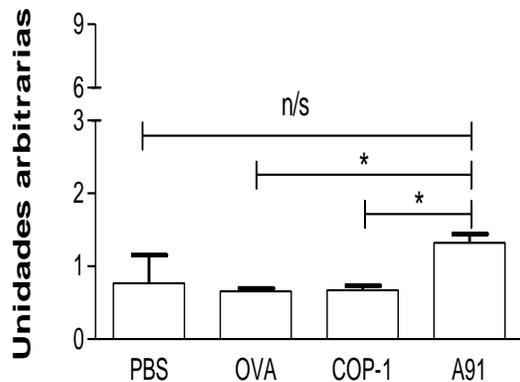


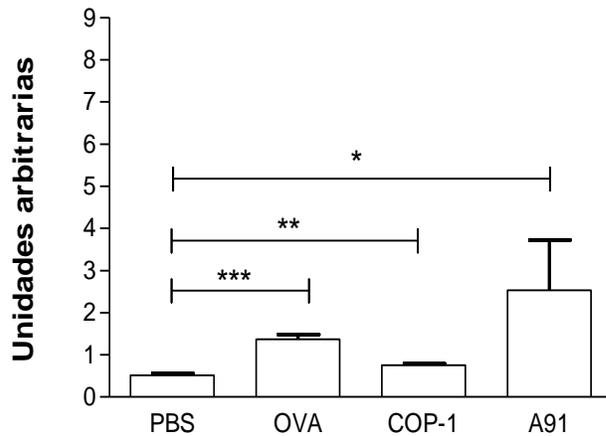
Figura 17. Análisis de la expresión de TGF β después de la inmunización con A91 o Cop-1.

Gráfica de barras donde se muestra la expresión de TGF β después de una LTME severa, en donde se observa que en el grupo inmunizado con A91 provoca un incremento en la expresión de TGF β en comparación con el grupo PBS, pero este no fue significativo ($p > 0.5$ Kruskal Wallis). Sin embargo al comparar los valores con los grupos Cop-1 y OVA, el incremento en la expresión en A91 si tuvo significancia (* $p = 0.017$ Kruskal Wallis,

seguida de una U de Mann Withney), las barras representan la media +/- error estándar.

C. Cish.

Al analizar la expresión de Cish después de una lesión severa se observó un incremento del grupo inmunizado con A91 (2.534 +/- 2.056 promedio/DE), en comparación con los grupos OVA (1.369 +/- 0.2308 promedio/DE) y Cop-1 (0.7533 +/- 0.08091 promedio/DE). Sin embargo, este incremento de la expresión de Cish en el grupo A91, fue significativo al compararse con el grupo PBS (0.5112 +/- 0.09199 promedio/DE) ($p < 0.05$ Kruskal Wallis). (Figura 18)



barras representan la media +/- error estándar

Figura 18. Análisis de la expresión de Cish después de la inmunización con A91 o Cop-1.

Gráfica de barras donde se muestra la expresión de Cish después de una LTME severa. En la gráfica se observa que en el grupo inmunizado con A91 provoca un incremento en la expresión de Cish, el cual fue significativo solo al compararlo con el grupo PBS (* $p < 0.05$ Kruskal Wallis). Por otra parte, cuando se comparó el grupo PBS con el grupo OVA y Cop-1 estos últimos tuvieron un incremento significativo (** $p < 0.05$ y *** $p < 0.01$ Kruskal Wallis), las

D. Caspasa 3

Después de una lesión severa se observó un incremento significativo ($p = 0.028$ Kruskal Wallis seguida por una U de Mann Withney) en la expresión del gen que codifica para Caspasa 3 en los animales inmunizados con A91 (1.209 +/- 0.07162 promedio/DE), en comparación con los grupos inmunizados con Cop-1 (0.5809 +/- 0.1920 promedio/DE) y OVA (0.9363 +/- 0.1518 promedio/DE), así como con el grupo PBS (0.2268 +/- 0.1433 promedio/DE). Los grupos OVA y Cop-1 presentaron a su vez un incremento significativo ($p = 0.028$ Kruskal Wallis seguida por una U de Mann Withney), en comparación con el grupo PBS. Este incremento fue menor al observado en el grupo A91, siguiendo en orden de expresión el grupo OVA y Cop-1, siendo la menor expresión para el grupo PBS. (Figura 19)

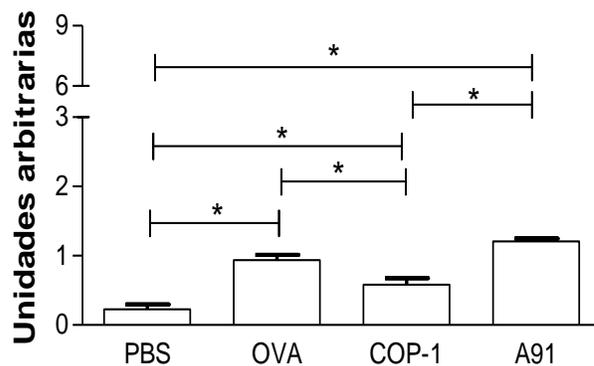


Figura 19. Análisis de la expresión de Caspasa 3 después de la inmunización con A91 o Cop-1.

Gráfica de barras donde se muestra la expresión de Caspasa 3 después de una LTME severa. En la gráfica se observa que los grupos inmunizados con OVA y A91, indujeron un aumento significativo de la expresión de Caspasa 3 en comparación con los grupos inmunizados con Cop-1 y con PBS

(*p=0.028 del grupo PBS en comparación con los grupos OVA, Cop-1 y A91; y **p=0.028 del grupo OVA en comparación con los grupos Cop-1 y A91, Kruskal Wallis seguida por una U de Mann Withney), las barras representan la media +/- error estándar.

E. Bmp3.

Al analizar la expresión de Bmp3 después de una lesión severa, se observó un incremento significativo (p=0.0215 Kruskal Wallis) en los grupos inmunizados con OVA (0.6365 +/- 0.2787 promedio/DE), Cop-1 (0.8177 +/- 0.0841 promedio/ DE) y A91 (0.9845 +/- 0.1963 promedio/DE), en comparación con el grupo PBS (0.1853 +/- 0.1295 promedio/DE), sin existir diferencia significativa entre estos. (Figura 20)

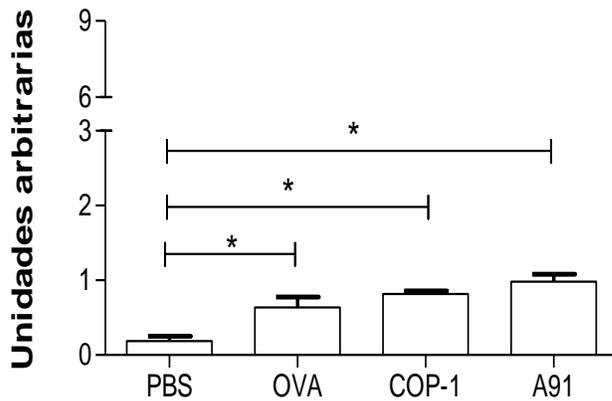


Figura 20. Análisis de la expresión de Bmp 3 después de la inmunización con A91 o Cop-1. Gráfica de barras donde se observa la expresión de Bmp3 después de una LTME. En la gráfica se observa que los grupos inmunizados con OVA, Cop-1 y A91 presentan un incremento significativo (*p=0.0215, Kruskal Wallis) en comparación con el grupo PBS, sin presentarse diferencia significativa entre estos. Las barras representan la media +/- error estándar

F. Interleucina 12 (IL12)

Con respecto a la expresión de IL12, después de una lesión severa, en el grupo inmunizado con A91 se presentó un incremento significativo (A91 con PBS: p < 0.01 Kruskal Wallis, A91 en comparación con OVA y Cop-1 p= 0.0286 Kruskal Wallis seguida por una U de Mann Withney) en la expresión de IL12, en comparación con los demás grupos (A91: 1.797 +/- 0.1968 promedio/DE; Cop-1: 1.244 +/- 0.0625 promedio/ DE; OVA: 0.9272 +/- 0.8532 promedio/ DE y PBS: 0.3844 +/- 0.06269 promedio/ DE). (Figura 21)

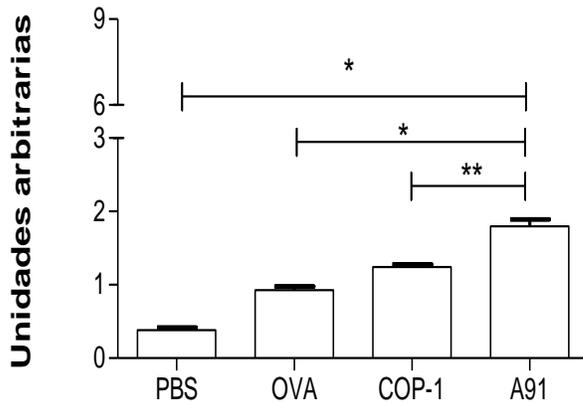


Figura 21. Análisis de la expresión de IL12 después de la inmunización con A91 o Cop-1.

Gráfica de barras donde se analizó la expresión de IL12 después de la LTME. En la gráfica se observa que el grupo inmunizado con A91, indujo un aumento significativo de la expresión de IL12 en comparación con el grupo PBS (* $p < 0.01$ Kruskal Wallis), así como al compararse con los grupos inmunizados con OVA, Cop-1 (*/** $p=0.028$, Kruskal Wallis

seguida por una U de Mann Withney), las barras representan la media +/- error estándar.

G. Interleucina 1 rap (IL1rap).

Después de una lesión severa el grupo inmunizado con A91 (4.174 +/- 0.3019 promedio/ DE) presentó un incremento significativo (A91 con PBS: $p=0.004$ Kruskal Wallis, A91 en comparación con OVA y Cop-1 $p=0.0286$ Kruskal Wallis seguida por una U de Mann Withney) en los niveles de expresión de IL1rap en comparación con los demás grupos (PBS: 0.4285 +/- 0.01744 promedio/DE; OVA: 1.274 +/- 0.1110 promedio/DE; Cop-1: 1.589 +/- 0.1442 promedio/DE). (Figura 22)

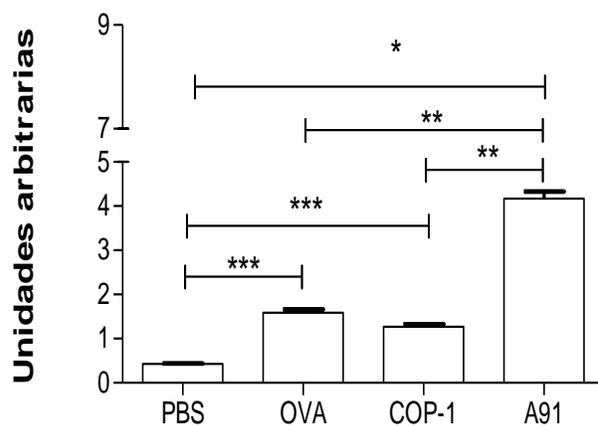


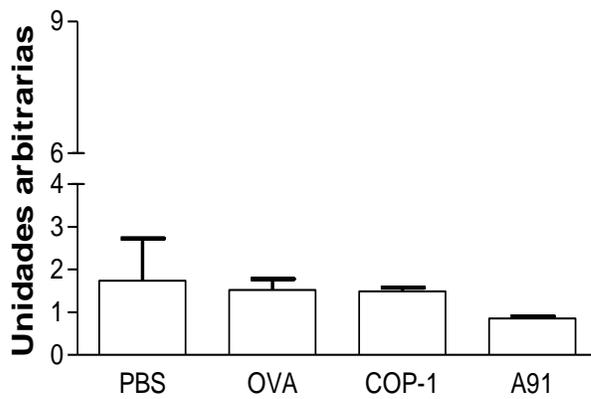
Figura 22. Análisis de la expresión de IL1rap después de la inmunización con A91 o Cop-1.

Gráfica de barras en la que se observó la expresión de IL1rap después de la LTME. En la gráfica se observa que los grupos inmunizados con A91, Cop-1 u OVA indujeron un incremento significativo de la expresión de IL1rap en comparación con el grupo PBS (A91 contra PBS * $p = 0.004$ y; Cop-1, OVA contra PBS *** $P=0.05$ Kruskal Wallis). A pesar de esto el mayor incremento en la expresión de IL1rap fue

presentado en el grupo inmunizado con A91 en comparación con los grupos inmunizados con OVA o Cop-1, siendo este significativo (** $p=0.028$, Kruskal Wallis seguida por una U de Mann Withney), las barras representan la media +/- error estándar.

H. Interleucina 6 (IL6)

En lo que respecta a la expresión de IL6, el grupo A91 presentó una reducción en la expresión (A91: 0.8594+/- 0.4579 promedio/ DE; PBS: 1.743+/- 0.9872 promedio/DE; OVA: 1.523+/- 0.2594 promedio/DE; Cop-1: 1.486+/- 0.9071 promedio/ DE). Sin embargo, este no fue significativo en ninguno de los casos ($p > 0.05$ Kruskal Wallis). (**Figura 23**)



representan la media +/- error estándar.

Figura 23. Análisis de la expresión de IL6 después de la inmunización con A91 o Cop-1. Gráfica de barras en donde se analizó la expresión de IL6 después de una LTME. En la gráfica se observa que el grupo inmunizado con A91, presenta una tendencia a disminuir la expresión de IL6, sin embargo no fue significativa, en comparación con los grupos inmunizados con OVA, Cop-1 y el grupo con PBS ($p > 0.05$, Kruskal Wallis), las barras

En lo que respecta a los siguientes genes, estos se analizaron también en lesión moderada (tercer experimento), debido a que en artículos anteriores se ha mostrado su efecto directo en la modulación de la respuesta inflamatoria (Esposito and Cuzzocrea, 2009; Hall and Springer, 2004; Kuperman and Schleimer, 2008; Ledebor et al., 2000; Yoshimura et al., 2007) y por lo tanto, en el efecto que puedan tener sobre la autorreactividad protectora, permitiendo que se desarrolle neuroprotección o daño después de la LTME. Por lo que en las siguientes gráficas se compara el efecto de la intensidad de la lesión sobre la expresión de cada uno de los casos (Gráficas A: Lesión severa; Gráficas B: Lesión moderada).

I. Interleucina 10 (IL10)

Al analizar la expresión de IL10 después de una lesión severa se observó un incremento no significativo ($p > 0.05$ Kruskal Wallis) en la expresión en el grupo inmunizado con Cop-1 (0.4946 +/- 0.2907 promedio/DE) al compararse con los demás grupos (PBS: 0.3217 +/- 0.3095 promedio/DE; OVA: 0.2355 +/- 0.1073 promedio/DE y A91: 0.4048 +/- 0.1357 promedio/DE). Por otra parte después de la lesión moderada, se observó un aumento significativo (**/* $p = 0.028$ Kruskal Wallis seguida por una U de Mann Withney) en los grupos A91 (2.489 +/- 0.303 promedio/DE) y Cop-1 (1.674 +/- 0.5426 promedio/DE) en comparación con los grupos inmunizados con OVA (0.631 +/- 0.2199 promedio/DE) y PBS (0.3657 +/- 0.1085 promedio/DE). (Figura 24)

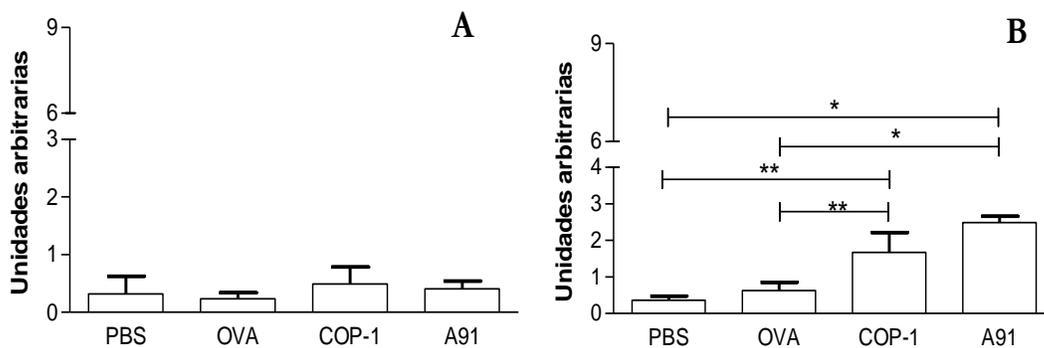


Figura 24. Análisis de la expresión de IL10 después de la inmunización con A91 o Cop-1, después de una lesión severa (A) y una lesión moderada (B). Gráfica de barras donde se muestra la expresión de IL10 después de una LTME. Después de una lesión severa (A) el grupo inmunizado con Cop-1, indujo un aumento de la expresión de IL10, sin embargo este no fue significativo, en comparación con los grupos inmunizados con OVA, Cop-1 y el grupo con PBS (* $p > 0.05$, Kruskal Wallis), por otra parte después de una lesión moderada (B) en los grupos A91 y Cop-1 se presentó un aumento significativo en comparación con el grupo OVA y PBS (**/* $p = 0.028$, Kruskal Wallis, seguida por una U de Mann Withney) las barras representan la media +/- error estándar.

J. Interleucina 4 (IL4)

En lo que se refiere a la expresión de IL4, no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$, Kruskal Wallis), entre el grupo PBS (0.3249 ± 0.0237 DE) y los grupos inmunizados con OVA (0.5577 ± 0.1946 DE), Cop-1 (0.3782 ± 0.5567 DE) y A91 (0.5001 ± 0.1319). En cuanto a la lesión moderada el grupo Cop-1 (2.298 ± 1.204 DE) provocó un aumento significativo en comparación con los grupos OVA (1.073 ± 0.2141 DE) y PBS (0.8188 ± 0.4123 DE) pero no con el grupo A91 (1.266 ± 0.1456 DE) (* $p = 0.028$, Kruskal Wallis, seguida por una U de Mann Withney). (Figura 25)

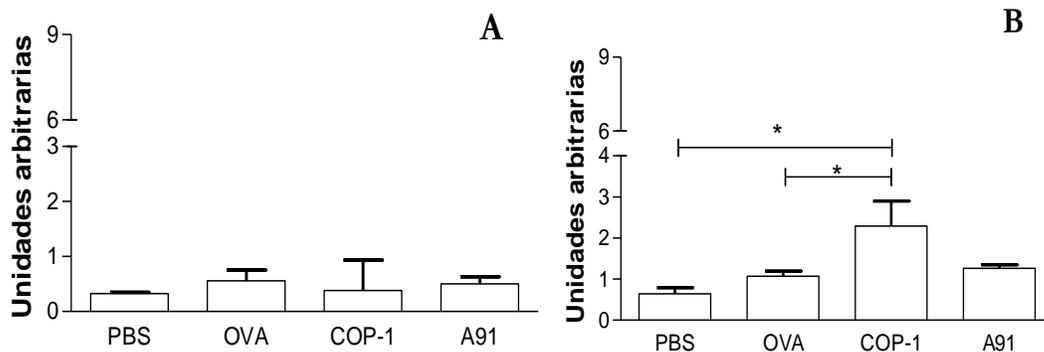


Figura 25. Análisis de la expresión de IL4 después de la inmunización con A91 o Cop-1, después de una lesión severa (A) y una lesión moderada (B). Gráfica de barras donde se muestra la expresión de IL4 después de una LTME. En la gráfica se observa que después de una lesión severa (A) los niveles de expresión fueron similares en todos los grupos sin existir diferencia estadística significativa ($p > 0.05$, Kruskal Wallis), por otra parte después de una lesión moderada (B) el grupo Cop-1 provocó un aumento significativo en comparación con los grupos OVA y PBS pero no con el grupo A91 (* $p = 0.028$, Kruskal Wallis, seguida por una U de Mann Withney) las barras representan la media \pm error estándar.

K. Soc 3.

A los 7 días después de una lesión severa se observó un incremento significativo en la expresión de Soc 3 en el grupo A91 (0.9924 ± 0.07748 promedio/DE), en comparación con el grupo PBS (0.2288 ± 0.1621 promedio/DE). Sin embargo, con los grupos inmunizados con OVA ($0.3469 \pm$

0.1577 promedio/DE) o Cop-1 (0.5824 +/- 0.1074 promedio/DE) no se presentó esta diferencia significativa. En lo referente a la lesión moderada se observó que por el contrario con lo visto en el lesión severa, el grupo PBS (1.546 +/- 0.4730 promedio/DE) tuvo un incremento en la expresión de SOC 3, pero sin presentar diferencia estadística significativa ($p > 0.05$, Kruskal Wallis, seguida por una U de Mann Withney) entre los grupos inmunizados con OVA (0.9676 +/- 0.6601 promedio/DE), Cop-1 (0.5553 +/- 0.3757 promedio/DE) y A91 (1.349 +/- 0.3879 promedio/DE). **(Figura 26)**

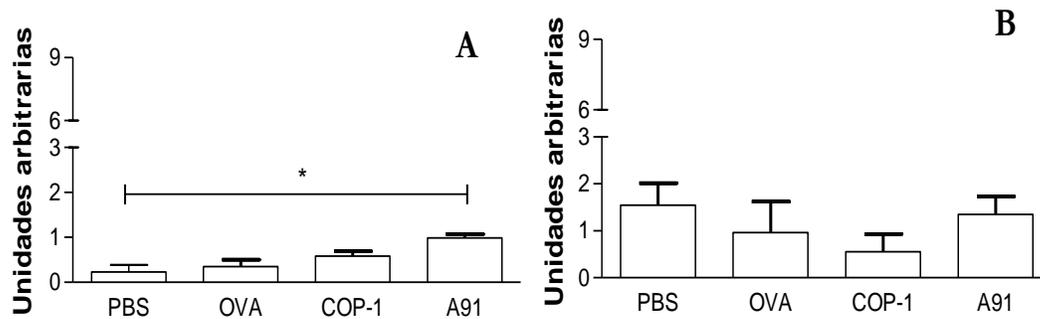


Figura 26. Análisis de la expresión de SOC 3 después de la inmunización con A91 o Cop-1, después de una lesión severa (A) y una lesión moderada (B). Gráfica de barras en donde se muestra la expresión de Soc3 después de la LTME. Después de una lesión severa (A) el grupo A91, promovió un aumento significativo de la expresión de SOC 3, en comparación con el grupo PBS (* $p < 0.01$, Kruskal Wallis), sin embargo esta diferencia significativa no la presento con los grupos inmunizados con OVA o Cop-1, por otra parte después de una lesión moderada (B) se observó que por el contrario a lo visto en el lesión severa el grupo PBS tuvo un aumento en la expresión de SOC 3; sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa entre los grupos ($p > 0.05$, Kruskal Wallis, seguida por una U de Mann Withney) las barras representan la media +/- error estándar.

L. IFN γ .

Al analizar los niveles de expresión de IFN γ se observó que tanto en lesión severa (PBS: 0.2956 +/- 0.03091 promedio/DE; OVA: 1.585 +/- 0.8891 promedio/DE; Cop- 1: 1.285 +/- 0.8763 promedio/DE y A91: 0.8673 +/- 0.2486 promedio/DE), como en lesión moderada (PBS: 0.6026 +/- 0.3269 promedio/DE; OVA: 0.8512 +/- 0.4082 promedio/DE; Cop- 1: 0.8049 +/- 0.050 promedio/DE y A91: 0.8775 +/- 0.0763 promedio/DE) **no se**

observó diferencia significativa entre grupos ($p > 0.05$ Kruskal Wallis). Cabe mencionar que en lesión severa se presentó un aumento de la expresión en el grupo inmunizado con OVA y Cop-1 y en lesión moderada estos niveles disminuyeron quedando casi igual que los grupos A91 y PBS. (Figura 27)

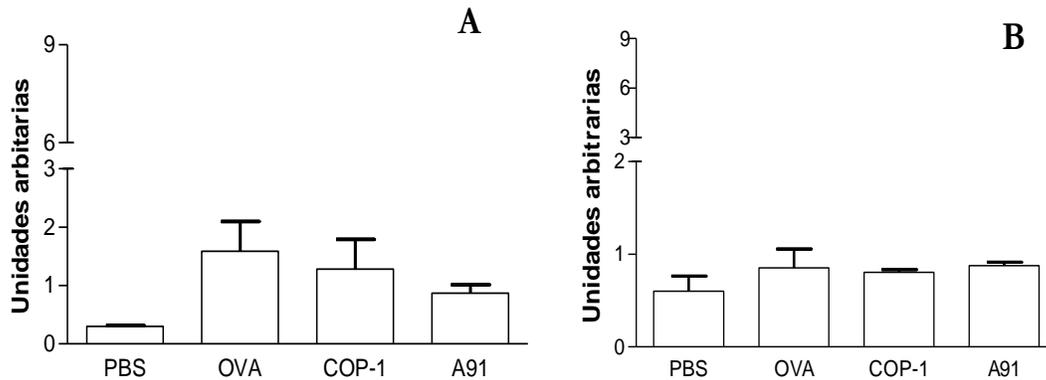


Figura 27. Análisis de la expresión de IFN γ después de la inmunización con A91 o Cop-1, después de una lesión severa (A) y una lesión moderada (B). Gráfica de barras donde se analizó la expresión de IFN γ después de la LTME. Siete días después de una lesión severa (A) el grupo OVA, promovió un aumento en la expresión de IFN γ , al igual que los grupos Cop-1 y A91 en comparación con el grupo PBS. Sin embargo, este aumento no fue significativo para ninguno de los grupos ($p > 0.05$, Kruskal Wallis, seguida por una U de Mann Withney); por otra parte después de una lesión moderada (B) los niveles incrementados de la expresión de IFN γ disminuyeron quedando casi igual que los del grupo PBS en donde no hubo diferencia significativa entre grupos ($p > 0.05$, Kruskal Wallis) las barras representan la media +/- error estándar

M. TNF α .

En lo referente a la expresión de TNF α después de una lesión severa, se observó un aumento ligero de la expresión en el grupo A91, sin embargo los niveles entre los grupos fueron similares por lo que no existió diferencia significativa (PBS: 0.6953 +/- 0.2640 promedio/DE; OVA: 0.9486 +/- 0.2291 promedio/DE; Cop-1: 0.9217 +/- 0.3674 promedio/DE y A91: 1.204 +/- 0.2718 promedio/DE; $p > 0.05$, Kruskal Wallis, seguida por una U de Mann Withney). Por otra parte después de una lesión moderada se observó una disminución significativa en la expresión de TNF α en los animales de los grupos inmunizados con OVA (0.2783 +/- 0.2267 promedio/DE; * $p < 0.01$, Kruskal Wallis), Cop-1 (2.653 +/-

1.513 DE) y A91 (1.456 +/- 1.199 DE; * $p < 0.05$, Kruskal Wallis) en comparación con el grupo PBS (6.422 +/- 0.3354 promedio/DE) sin presentar diferencia significativa, diferencia significativa entre los grupos inmunizados. (Figura 28)

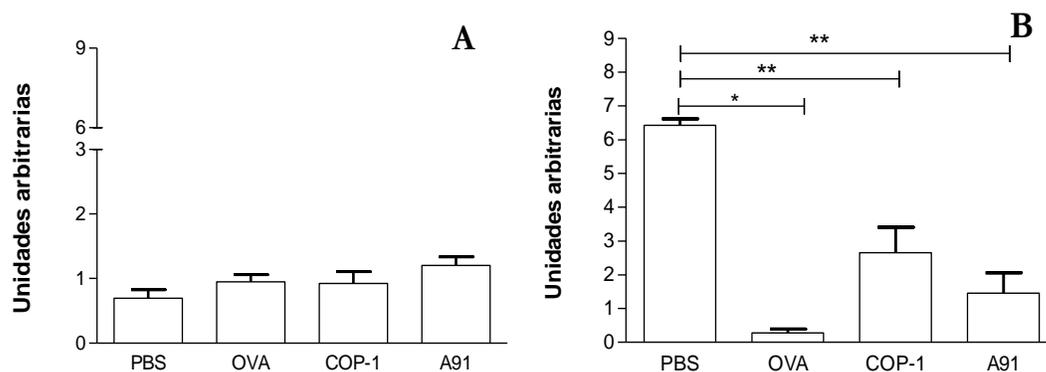


Figura 28. Análisis de la expresión de TNF α después de la inmunización con A91 o Cop-1, después de una lesión severa (A) y una lesión moderada (B). Gráfica de barras donde se muestra los niveles de expresión de TNF α después de una LTME. Después de una lesión severa (A) en todos los grupos se presentaron unidades de expresión similares sin existir diferencia estadística (* $p > 0.05$, Kruskal Wallis, seguida por una U de Mann Withney), solo se presentó un ligero incremento en el grupo A91. Por otra parte, después de una lesión moderada (B) el grupo PBS presentó un aumento significativo en la expresión de TNF α , en comparación con los grupos inmunizados con OVA (* $p < 0.01$, Kruskal Wallis), Cop-1 y A91 (* $p < 0.05$, Kruskal Wallis) las barras representan la media +/- error estándar.

N. iNOS

En lo que respecta a la expresión de iNOS después de una lesión moderada, los grupos inmunizados con A91 (2.7 +/- 0.2 promedio/DE) o Cop-1 (0.5 +/- 0.4 promedio/DE) presentaron una reducción en la expresión que fue significativa ($p < 0.05$ y $p = 0.01$, A91 y Cop-1 en comparación con PBS respectivamente; Kruskal-Wallis seguida por una U de Mann-Whitney U) al compararlo con el grupo PBS (5.4 +/- 1.4 promedio/DE), pero no con el grupo inmunizado con OVA (2.756 +/- 1.034 promedio/DE). (Figura 29)

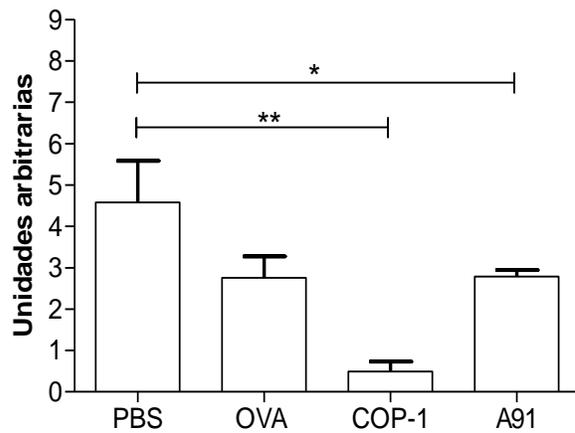


Figura 29. Análisis de la expresión de iNOS después de la inmunización con A91 o Cop-1.

Gráfica de barras en donde se analizó la expresión de iNOS después de una LTME moderada. En la gráfica se observa que los grupos inmunizados con A91 o Cop-1, inducen una reducción de la expresión de iNOS, siendo esta significativa, en comparación con el grupo PBS (* $p < 0.05$ y ** $p = 0.01$, A91 y Cop-1 en comparación con PBS respectivamente; Kruskal-Wallis seguida por una U de Mann-Whitney U), las barras representan la

media +/- error estándar.

En las siguientes tablas se muestra un resumen del patrón de expresión de los genes analizados, observado después de una LTME severa (Tabla 5) y después de una LTME moderada (Tabla 6).

Tabla 5. Patrón de expresión de los genes analizados por RT-PCR después de una LTME severa.

Genes	PBS	OVA	Cop-1	A91
	Promedio +/- DE	Promedio +/- DE	Promedio +/- DE	Promedio +/- DE
Tnfs 11	0.7340 +/- 0.15	↑ 2.96 +/- 0.30	↑↑ 3.35 +/- 0.44	↑↑↑ 7.74 +/- 0.96
TGFβ	↑↑ 0.7671 +/- 0.77	0.6593 +/- 0.0701	↑ 0.6721 +/- 0.10	↑↑↑ 1.321 +/- 0.20
Cish	0.5112 +/- 0.09	↑↑ 1.369 +/- 0.23	↑ 0.7533 +/- 0.08	↑↑↑ 2.5340 +/- 2.05
Caspasa 3	0.2268 +/- 0.14	↑↑ 0.9363 +/- 0.15	↑ 0.5809 +/- 0.19	↑↑↑ 1.209 +/- 0.07
Bmp3	0.1853 +/- 0.12	↑ 0.6365 +/- 0.27	↑↑ 0.8177 +/- 0.08	↑↑↑ 0.98 +/- 0.19

IL12	0.3844+/-0.06	↑0.9272+/-0.85	↑↑1.244+/-0.06	↑↑↑1.797+/-0.19
IL1rap	0.4285+/-0.01	↑1.274+/-0.11	↑↑1.589 +/- 0.14	↑↑↑4.174+/-0.30
IL6	↑↑↑1.743+/-0.98	↑↑1.523+/-0.25	↑1.486+/-0.90	0.85+/-0.45
IL10	↑0.3217+/- 0.30	0.2355+/- 0.10	↑↑↑ 0.4946+/-0.29	↑↑0.4048+/-0.13
IL4	0.3249 +/-0.02	↑↑↑0.5577+/-0.19	↑0.3782+/-0.55	↑↑0.5002+/-0.13
Soc 3	0.2288+/- 0.1621	↑0.3469+/-0.15	↑↑0.5824+/-0.10	↑↑↑1.349+/-0.38
IFNγ	0.2956+/-0.03	↑↑↑1.585+/-0.88	↑↑1.285+/-0.87	↑0.8673+/-0.24
TNFα	0.6953+/-0.26	↑↑0.9486+/-0.22	↑0.9217+/-0.36	↑↑↑1.204+/-0.27

Tabla 6. Patrón de expresión de los genes analizados por RT-PCR después de una LTME moderada.

Genes	PBS	OVA	Cop-1	A91
	Promedio +/- DE	Promedio +/- DE	Promedio +/- DE	Promedio +/- DE
IL10	0.3657+/-0.10	↑0.631+/-0.21	↑↑1.674+/-0.54	↑↑↑2.489+/-0.30
IL4	0.8188 +/- 0.4123	↑1.073+/-0.21	↑↑↑2.298+/-1.20	↑↑1.266+/-0.14
Soc 3	↑↑↑1.546+/-0.47	↑0.9676+/-0.66	0.5553+/-0.37	↑↑1.349+/-0.38
IFNγ	0.6026+/-0.32	↑↑0.8512+/-0.40	↑0.8049+/-0.050	↑↑↑0.8775+/-0.07
TNFα	↑↑↑6.422+/-0.33	0.2783+/-0.22	↑↑2.653+/-1.51	↑1.456+/-1.19
iNOS	↑↑↑5.482+/- 1.40	↑2.756+/- 1.034	0.590+/- 0.48	↑↑2.790+/-0.26

3) Cuarto experimento medición de óxido nítrico (nitritos) en médula espinal.

Debido a los resultados observados en cuanto a la expresión de iNOS, decidimos medir la cantidad de nitritos en médula espinal lesionada en animales inmunizados con Cop-1 o A91, con el fin de correlacionar la expresión de iNOS con la cantidad de NO en médula espinal. Observando que a los 7 días después de una LTME moderada, en la médula espinal de animales inmunizados con A91 (372.39 +/- 80.25 promedio/DE) o Cop-1 (304.28 +/- 121.57 promedio/ DE) se presentó menor cantidad de NO (nitritos) en comparación con el grupo PBS (1437.48 +/- 239.73 promedio/DE) siendo esta disminución significativa ($p=0.004$, Kruskal Wallis seguida de una U de Mann Withney). Sin embargo, al comparar los grupos inmunizados con A91 o Cop-1 con el grupo OVA (1205 +/- 414.27 DE) solo hubo diferencia significativa con Cop-1 ($p<0.01$ Kruskal Wallis) y no con A91 ($p>0.05$ Kruskal Wallis, seguida por una U de Mann Withney). (Figura 30)

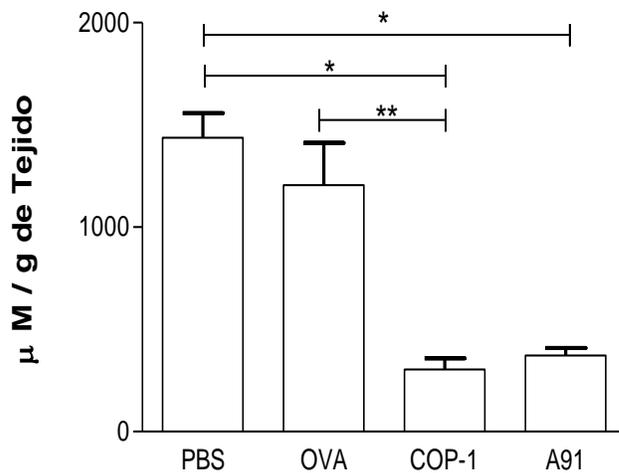


Figura 30. Análisis de la cantidad de NO en tejido (nitritos) después de la inmunización con A91 o Cop-1. Gráfica de barras en donde se analizó la cantidad de NO• después de una LTME moderada. En la gráfica se observa que los grupos inmunizados con A91 o Cop-1, inducen una reducción de la cantidad de nitritos por g de tejido (médula espinal), siendo esta significativa, en comparación con el grupo PBS (* $p=0.004$, Kruskal Wallis seguida de una U de Mann Withney), en lo que respecta al grupo inmunizado con OVA solo se presentó

diferencia significativa al compararse con el grupo Cop-1 (** $p<0.01$ Kruskal Wallis) las barras representan la media +/- error estándar.

X. DISCUSIÓN

En este estudio se analizó el efecto de la inmunización con péptidos neurales modificados sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria. Este fenómeno en el SNC se caracteriza por no tener un control, no ser regulado y presentarse de manera exacerbada, provocando que inicie un evento de autorreactividad contra proteínas propias del SNC (Schwartz et al., 1999b). Siendo la MBP un blanco de reconocimiento inmunogénico muy importante, especialmente por su alto porcentaje en el SNC (Newman WS, 2003; Popovich et al., 1996).

Las células inmunológicas que participan en la respuesta inflamatoria como los linfocitos T CD4+, reconocen secuencias inmunogénicas de la MBP, que son presentadas por CPAs residentes o reclutadas de la periferia, iniciándose una respuesta característica del fenotipo Th1 que, al ser proinflamatorio, permite el desarrollo de otros fenómenos autodestructivos que conllevan a la desmielinización axonal y a la falta de conducción eléctrica, teniendo como consecuencia clínica la parálisis del individuo que sufre una LTME (Perry Zejdlik Cynthia, 1992; Popovich et al., 1996).

En diversos estudios realizados por nuestro grupo de trabajo y otros grupos en esta área, se ha demostrado que la inmunización con los péptidos A91 o Cop-1, induce una respuesta en la que predomina el fenotipo Th2, que interviene en forma benéfica modulando algunos o varios de los elementos pro-inflamatorios que participan en la respuesta inmune observada después de una LTME. Así mismo, disminuye en forma significativa otros eventos autodestructivos relacionados con la respuesta inflamatoria como la lipoperoxidación, fenómeno originado por la acción de radicales libres producidos principalmente después de una respuesta inflamatoria. La inmunización con estos péptidos ha mostrado la reducción de niveles de lipoperoxidación después de una LTME moderada (Ibarra et al., 2010).

Debido a que todos los fenómenos autodestructivos involucrados después de una LTME son eventos regulados genéticamente, el efecto neuroprotector observado por la inmunización con A91 o Cop-1 puede darse también por una acción en la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria después de una LTME. Para empezar a analizar esta posibilidad, se llevó a cabo un análisis por microarreglos de genes inflamatorios en la médula espinal de animales con LTME severa e inmunizados con péptidos neurales modificados (A91, Cop-1). Los resultados de este proyecto muestran que la expresión de 112 genes relacionados

con la inflamación se alteró en algunos casos pero no presentó diferencia significativa al compararse con los animales inmunizados sólo con PBS ó con una proteína exógena (ovoalbúmina). A pesar de lo anterior, se seleccionaron 13 genes tomando como criterio de selección el papel del gen en la respuesta inflamatoria y el incremento de 1.0 unidad arbitraria en su expresión con respecto al presentado por el grupo con PBS. Sobre estos genes se llevaron a cabo el segundo y tercer experimentos, analizando el efecto de la inmunización sobre estos genes con una técnica cuantitativa como es la RT-PCR tiempo real.

En los resultados del segundo y tercer experimento, se observaron diferencias significativas solo para ciertos genes de los grupos estudiados: Cish, Bmp3, IL12, IL1rap, Caspasa 3, IL10, IL4 y TNF α .

En lo referente a Cish, esta molécula es miembro de la familia de proteínas CIS/SOCS/SSI, inducida principalmente en las células hematopoyéticas (Matsumoto et al., 1997), por varias proteínas de la familia de IL2, como IL2, IL4, IL7, IL9 e IL15; cada una de las cuales puede unirse al receptor γ de IL2 (Giri et al., 1994; Kondo et al., 1993; Yoshimura et al., 2007). En estudios in vivo se ha demostrado que la expresión de Cish es regulada por las proteínas STAT (Matsumoto et al., 1999; Verdier et al., 1998), particularmente en animales mutados para el gen Cish, se observó que tanto esta proteína como SOC 3 están involucradas en la regulación negativa de STAT5 en diferentes puntos de la vía de señalización, mediando las señales originadas por IL2, por lo que Cish es necesaria para la actividad de esta citocina (Aman et al., 1999). A pesar de que esta molécula puede ser inducida por citocinas tanto inflamatorias como antiinflamatorias, por el patrón de expresión inflamatorio que observamos en este estudio que, más adelante detallaremos, podemos deducir que Cish después de una LTME severa, podría estar inducido por citocinas como IL2, ya que ésta tiene un papel importante en el desarrollo del SI y la modulación de la activación del linfocito T y B durante las respuestas inmunológicas (Abbas A.K. and Lichtman, 2004; Yoshimura et al., 2007; Zhu et al., 1999). En este estudio se observó que la inmunización con A91 promueve la expresión de Cish en un nivel superior a los demás grupos inmunizados, sin embargo los tres presentaron un incremento significativo al compararse con PBS. Por lo anterior podemos deducir que la inmunización con cualquier antígeno incrementa la respuesta inflamatoria al estimular la expresión de Cish (Matsumoto et al., 1999; Zhu et al., 1999). En el caso de la inmunización con A91 la respuesta es mayor, lo que nos sugiere que en estas condiciones (lesión severa), los linfocitos T anti-A91 generados por la inmunización podrían estar colaborando a incrementar la respuesta

inflamatoria en lugar de modularla. Lo anterior se contrapone con hallazgos previos en nuestro grupo de investigación, debido a que, hemos demostrado que la inmunización con A91 genera un fenotipo Th2 en lesiones moderadas, mismo que modula la respuesta inflamatoria y promueve protección al tejido neural. Por otra parte, también hemos observado que en una lesión severa, la respuesta a la inmunización con A91 está inhibida, es decir no se detecta proliferación celular después de la inmunización e incluso no se observa el efecto protector de la misma (Martinon et al., 2012). En relación al fenotipo inducido, es muy posible que el microambiente generado por la severidad de la lesión tenga algún efecto sobre la inducción del fenotipo. De ser posible lo anterior, los linfocitos T anti-A91 al ser activados *in situ* por la MBP liberada en grandes cantidades, podrían estarse activando hacia un fenotipo Th1. Al momento no contamos con algún indicio claro de que esto esté sucediendo; sin embargo, en estudios anteriores hemos observado que cuando un animal lesionado recibe 2 inmunizaciones con A91 (mayor exposición al péptido), el efecto benéfico de la inmunización en lesiones moderadas, se inhibe (Martinon et al., 2007). Al momento no contamos con información que nos demuestre que en este caso prevaleció la activación de un fenotipo Th1; sin embargo, los resultados de la presente tesis, en forma indirecta, apuntan a confirmar esta teoría ya que la inmunización con A91 provocó un incremento significativo de varios elementos proinflamatorios, en particular de IL-12.

Cabe mencionar que la respuesta predominantemente inflamatoria puede ser también el resultado de otro factor importante, ya que después de una lesión severa hay un área mayor de necrosis en el sitio de lesión y en regiones adyacentes promoviendo que exista una mayor liberación de proteínas tisulares por el incremento de la destrucción neural. Estas proteínas pueden actuar como DAMPS (del inglés, damage associated molecular patterns), las cuales actúan como autoantígenos y son reconocidas vía receptores tipo Toll, que activan diversas vías de señalización (NFkB y MyD88) en las células que participan en inmunidad innata y en linfocitos T, contribuyendo al desarrollo de la respuesta inflamatoria, considerando estas moléculas a ser uno de los principales factores para el desarrollo de diversas enfermedades autoinmunes y en este caso del fenómeno de autorreactividad (Kagel and Popovich, 2009; Mills, 2011).

En relación al segundo punto: inhibición de la respuesta anti-A91 en animales con lesión severa, los resultados observados en el presente trabajo nos hacen reflexionar que aunque es claro que la respuesta inmune está muy disminuida (ya que la expresión de los genes

disminuye significativamente en comparación con la expresión observada en los animales con lesión moderada), puede ser que exista, aunque mínima, una respuesta contra A91. Esta respuesta que no fue detectada en los estudios *in vitro* que se llevaron a cabo previamente por nuestro grupo de investigación, lo que se percibe en forma indirecta al observar el efecto de la inmunización con A91 sobre la expresión de varios de los genes estudiados.

Otro gen analizado fue Bmp3, esta proteína participa como ligando en la vía de señalización de TGF β , en fenómenos como sobrevida celular e isquemia, así como también en embriogénesis, diferenciación y en ciertas interacciones de citocinas y su receptor. La inducción de esta proteína es debido a la acción de ciertos factores de crecimiento como: factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TGF β , factor de crecimiento tipo insulina (1 y 2), y factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (Reddi and Cunningham, 1990), pudiendo a su vez Bmp3 estar correlacionada con la expresión y acción de factores de crecimiento. En el SNC, la familia de las Bmps promueve la generación de astrocitos a partir de células progenitoras bipotentes o multipotentes oligodendrogiales (Mabie et al., 1997; Mehler et al., 1997). En este estudio se observó que la inmunización con cualquier antígeno promueve la expresión de Bmp3, comparado con el grupo PBS, siendo el A91 el que presentó mayor incremento; por lo que la inmunización con cualquier antígeno fomenta la proliferación de astrocitos para la formación de cicatriz glial tipo meningoglia como consecuencia del daño tisular severo, la cual comienza a formarse a partir de los 7 días, tiempo que coincide con este estudio (Silver and Miller, 2004; Tom et al., 2004). Esta cicatriz actúa como un mecanismo de sustitución de tejido promoviendo la formación de una barrera que impide la regeneración axonal después de la lesión (Allendorph et al., 2007; McKeon and Lyman, 1991).

En lo referente a la expresión del gen Tnfs 11, después de una LTME severa, éste se incrementa con la inmunización con cualquier antígeno al ser comparado con el grupo PBS, siendo el A91 nuevamente el que indujo una mayor expresión de Tnfs11. Tnfs11 (también conocido como ligando RANK), es una proteína transmembranal que se une específicamente a miembros de la familia de factores asociados a receptores TNF que regulan la activación de la vía NF κ B y c-Jun cinasa (JNK, del inglés c-Jun terminal cinasa). El gen Tnfs11 se expresa y es producido por los linfocitos T activados, los cuales liberan esta proteína que actúa como ligando (RANK-L ó Tnfs11) del receptor RANK, encontrado en células dendríticas, osteoclastos y macrófagos. La expresión de Tnfs11, por sus efectos celulares, podría

exacerbar la respuesta inflamatoria, de esta forma, podemos pensar que más que un efecto protector, la inmunización con cualquiera de los inmunógenos aquí estudiados, especialmente con A91, está fomentando un microambiente más propicio para la degeneración que para la protección. Lo anterior es congruente con los resultados observados en estudios previos en nuestro laboratorio ya que hemos observado que en lesiones severas la inmunización con A91 no promueve ningún tipo de recuperación a diferencia de lo que sucede en lesiones moderadas (Martinon et al., 2012). Finalmente, después de una lesión severa, se puede dar la activación de vías proinflamatorias como es el caso de NFκB vía Tnfs11 y con esto exacerbar la respuesta inflamatoria (Fiumara et al., 2001).

Estudios recientes han demostrado que la apoptosis se produce durante la lesión secundaria, como consecuencia de un traumatismo de la médula espinal contribuyendo a un mayor daño neuronal y pérdida funcional (Yu and Fehlings, 2011). La cascada de muerte celular por apoptosis se puede activar por citocinas inflamatorias producto de la lesión, incremento de calcio libre intracelular, la liberación de radicales libres y excitotoxicidad. Después de la lesión medular los dos mecanismos que conllevan a apoptosis, son a través del ligando Fas / receptor Fas, inducido por macrófagos por la producción iNOS o bien por el daño mitocondrial debido a la activación directa de la caspasa-3, activada por la caspasa 9 (la cual se activa por la liberación del citocromo C) o por la caspasa 8 (Matsushita et al., 2000; Yu and Fehlings, 2011). Una de las terapias propuestas después de una LTME ha sido el uso de inhibidores de la caspasa 3 con el fin de promover neuroprotección (Martinon and Ibarra, 2008; Matsushita et al., 2000). Al analizar la expresión de caspasa 3, en este estudio se encontró que los grupos inmunizados con OVA y A91 presentan una mayor expresión en el gen que codifica para caspasa 3 después de una LTME severa al compararse con el grupo PBS y Cop-1, siendo aún mayor en el caso del grupo A91. Debido a que la caspasa 3 es indispensable para la condensación apoptótica de la cromatina y la fragmentación del DNA en todos los tipos celulares, ésta funciona como un indicador directo del fenómeno de apoptosis celular (Porter and Janicke, 1999). Con base a lo anterior podemos deducir que al activar la respuesta inmunológica con cualquier antígeno, se induce apoptosis después de una lesión severa, originada por la intensidad del mecanismo de daño, presentándose necrosis en el sitio de lesión y un evento apoptótico en los extremos craneal y caudal del epicentro, pudiendo ser este daño mayor al estimular la respuesta inmunológica con cualquier antígeno. Generalmente, después de una LTME, las células que presentan apoptosis son las

neuronas, células de la microglía y oligodendrocitos en los sitios adyacentes de lesión, contribuyendo a la desmielinización postraumática que se desarrolla durante la primera semana

(Bethea and Dietrich, 2002).

En estudios previos de nuestro grupo de trabajo se ha analizado el efecto de la inmunización con A91 en la inducción de apoptosis mediante la prueba de túnel, después de una LTME moderada, observando que a los 7 días el grupo inmunizado con A91 tiene menor índice de fragmentación de DNA (apoptosis) que el grupo PBS (Rodríguez, R. in process). En nuestro estudio, este efecto no se observó después de una LTME severa. Por lo anterior, sugerimos que la intensidad de la lesión, determina el efecto que la inmunización con A91 tendrá sobre el fenómeno de apoptosis secundario a una LTME.

Después de una lesión severa el propio mecanismo de lesión y el efecto del adyuvante completo de Freund inducen la expresión de IL12 (Shibaki and Katz, 2002); sin embargo, al estimular la respuesta inmune a nivel periférico con cualquier antígeno esta expresión aumenta significativamente en la médula espinal. Lo anterior se observó claramente en los grupos inmunizados con OVA, Cop-1 o A91, siendo mayor para el grupo A91 en comparación con todos los grupos. La IL12 es una citocina pleiotrópica originalmente denominada como el factor estimulante de las células citolíticas asesinas naturales (NK, del inglés natural killer) o factor de maduración de linfocitos citotóxicos (LC) (Abbas A.K. and Lichtman, 2004) es proinflamatoria e inmunoreguladora (Presky et al., 1998). Esta citocina es liberada por los monocitos y macrófagos, teniendo efecto en la inducción de los linfocitos Th1, estimulando a estos y a las NK para que produzcan IFN γ y con esto la activación de otras células como los macrófagos. Los mismos linfocitos T son capaces de autoactivarse por medio de esta citocina (Abbas A.K. and Lichtman, 2004; Roitt I et al., 1997).

El efecto neuroprotector inducido por A91 después de una lesión moderada no se presenta en una lesión severa. Como ya antes se mencionó, una de las causas es el incremento de respuesta inflamatoria en el sitio de lesión, fomentada ésta por la expresión de IL12 al promover un fenotipo predominante Th1, exacerbado por la participación de monocitos y macrófagos al producir radicales libres como consecuencia de las citocinas inflamatorias de este fenotipo, que conllevan al incremento de la inflamación (Abbas A.K. and Lichtman, 2004) y a la

destrucción neural. Cabe mencionar que, este resultado apoya nuevamente nuestra hipótesis de que a nivel local (en el sitio de lesión) si existe activación y proliferación de linfocitos T y que estos a diferencia de lo que hemos observado a nivel periférico, se están activando hacia un fenotipo Th1.

La IL1 es una citocina pleiotrópica que está vinculada con el inicio de la respuesta inflamatoria, además de tener múltiples funciones en la periferia y en el SNC, pudiendo ser regulada a diferentes niveles. Esta citocina induce la activación de una serie de factores de transcripción como NFkB, AP-1, JNK y p38 (MAPK cinasas), originando así la producción de numerosas citocinas proinflamatorias (TNF α , IL1 e IL6), producción de quimiocinas, moléculas de adhesión, óxido nítrico (NO), y prostaglandinas (PG) a través iNOS y COX-2 respectivamente así como el incremento en la proliferación de linfocitos Th1 (Dunne and O'Neill, 2003; Roitt I et al., 1997).

La actividad de IL1 reside en dos tipos de citocinas, IL1 α e IL1 β las cuales se unen al mismo receptor e inician respuestas idénticas. La unión con el receptor involucra el reclutamiento de una proteína accesoria denominada IL1rap, la cual no se une directamente a los ligandos; sin embargo, es necesaria para iniciar la vía de transducción de señales, por lo tanto esta proteína es una parte importante del complejo del receptor para IL1 el cual inicia los eventos de señalización que resultan en la activación de los genes inducidos por la acción de IL1 (Abbas A.K. and Lichtman, 2004; Sims, 2002).

En el gen de IL1rap puede darse un splicing alternativo lo que da como resultado que existan dos variantes transcripcionales que codifican para dos isoformas diferentes, una membranal y otra soluble (Libra et al., 2006; Sims, 2002). En la presente tesis, la variante analizada fue la membranal la cual participa en los efectos proinflamatorios de la IL1. Los resultados nos indicaron que el grupo inmunizado con A91 presentó un incremento significativo en la expresión de IL 1 rap después de una LTME severa en comparación con los demás grupos, lo cual apoya nuevamente el efecto proinflamatorio y apoptótico visto anteriormente con los genes analizados, ya que la IL1 *in vitro* es capaz de inducir la vía NFkB, la cual está relacionada con efectos proinflamatorios y con la inducción de apoptosis después de un evento isquémico (Clemens et al., 1991). Lo anterior también explica el incremento de caspasa 3 después de una LTME severa en el grupo inmunizado con A91. Todo lo observado hasta el momento nos lleva a

pensar que el paradigma de inmunización utilizado para una lesión moderada no es el mismo que se tendría que utilizar para una lesión severa, más aún, la inmunización como tal muy probablemente no es en este caso el tratamiento adecuado.

En relación a los genes estudiados en ambos modelos de lesión (moderada y severa), se observó de manera general que después de una lesión severa los niveles de expresión son inferiores (generalmente alrededor de una unidad de expresión) en comparación con los observados después de una lesión moderada.

El primer gen analizado en las dos intensidades de lesión fue IL10, considerada una citocina antiinflamatoria por sus efectos en el sistema inmunológico. Debido a que afecta diversos tipos celulares, es capaz de inhibir a los macrófagos y células dendríticas activadas, inhibe la producción de IL1 α y β , IL8, IL12, IFN α , MIP-1 α (proteína inflamatoria de macrófagos) y TNF α . Regula la expresión espontánea de moléculas MHC II, ICAM-1, CD80 y CD86, así como la expresión de antígeno en macrófagos e inhibe la producción de óxido nítrico en estas células, por iNOS (Abbas A.K. and Lichtman, 2004; Clemens et al., 1991; Howard and O'Garra, 1992; Moore et al., 2001).

Esta citocina en el SNC ha mostrado tener efecto benéfico en modelos *in vitro* de isquemia; en neuronas corticales de ratones knock out para IL10, se observó una mayor excitotoxicidad (Grilli et al., 2000). Los mismos ratones pero en modelos de dolor, presentaron más dolor y pérdida de materia gris después de una LTME. En otros estudios, después de una LTME o lesión excitotóxica de la médula espinal, la administración de IL10 disminuye la respuesta inflamatoria e incrementa la supervivencia neuronal (Abraham et al., 2004; Brewer et al., 1999). La IL-10 tiene una gran capacidad para modular la intensidad de la respuesta inflamatoria y con esto la expresión y producción de citocinas (Abraham et al., 2004; Bethea et al., 1999; Plunkett et al., 2001). Por otra parte, el mRNA del receptor para IL10 y la proteína como tal se han identificado en las neuronas de la médula espinal *in vitro*, donde la IL10 activa vías de señalización involucradas en la supervivencia y crecimiento neuronal (Zhou et al., 2009).

En el presente trabajo después de una lesión severa la expresión de IL-10 fue mínima y además no hubo diferencia significativa entre los grupos analizados. Lo anterior apoya nuevamente la idea de que la lesión severa promueve un microambiente más inflamatorio que antiinflamatorio lo que coincide al analizar los genes *Tnfs11*, *IL1rap*, *Cish*, *Caspasa 3* e *IL12* mencionados anteriormente en el grupo inmunizado con A91. Por el contrario, después de una

lesión moderada los niveles de expresión de la IL-10 fueron mucho mayores siendo el grupo A91 el de mayor incremento, esto puede explicar parcialmente el efecto neuroprotector de la inmunización con A91 después de una LTME moderada, ya que en algunos estudios se ha demostrado el efecto neuroprotector de la IL10 después de una lesión (Zhou et al., 2009b; Zhou et al., 2009a). En estudios de ratones knock-out para IL10 se ha observado un incremento significativo en la cantidad de citocinas proinflamatorias como el TNF α después de una lesión por compresión lo que demuestra el efecto inhibitorio de la IL-10 sobre dicha citocina (Genovese et al., 2009). En la presente tesis la inmunización con A91 además de provocar un incremento en la expresión de la IL-10, también causó una disminución significativa del TNF α .

En lo que se refiere a la expresión de IL4, nuevamente la expresión de esta citocina fue mínima en el caso de los animales con lesión severa y no se observó ninguna diferencia estadística entre los grupos. En contraste, después de una LTME moderada los niveles de expresión para IL4 fueron mayores. Los grupos inmunizados con A91 y Cop-1 presentaron un incremento en la expresión de esta citocina misma que es característica de un fenotipo Th2 y que a través de diversas vías puede ser capaz de promover neuroprotección (García et al., 2012). Esta citocina es considerada como el principal estímulo para el desarrollo de linfocitos Th2, es la única citocina que activa a la proteína STAT6, que induce la transcripción de genes responsables de la diferenciación y proliferación de linfocitos Th2 y el cambio de linfocitos B, además de inhibir la activación de los macrófagos M1 (proinflamatorios) y promover el fenotipo M2 (antiinflamatorio) (Abbas A.K. and Lichtman, 2004; Gordon, 2003). El incremento de IL4 puede favorecer el efecto neuroprotector de la inmunización con A91 y Cop-1, ya que esta citocina induce la expresión de MHCII en macrófagos humanos y murinos (Becker and Daniel, 1990; Cao et al., 1989; Crawford et al., 1987; Gerrard et al., 1990), aumenta la presentación antigénica en macrófagos murinos derivados de la médula ósea (Zlotnik et al., 1987), e interfiere en la producción y acción de citocinas inflamatorias como IL1 (Hart et al., 1989), IL6 (Cheung et al., 1990) y TNF α . La IL-4 promueve también la inactivación de moléculas coactivadoras de STAT 1 y NF κ B al activar STAT6 (Hamilton et al., 2002; Hebenstreit et al., 2006), regulando de esta manera la respuesta inflamatoria después de una LTME moderada.

En el análisis de la expresión de TNF α después de una LTME se observó también un efecto directo de la intensidad de la lesión ya que los niveles de expresión 7 días después de una LTME severa (1.5 unidades arbitrarias de expresión como máximo) fueron menores a los

de una lesión moderada (6.5 unidades de expresión aproximadamente). Este es el mismo efecto que ya se ha comentado antes. Aún con lo anterior, la inmunización con A91 presentó una tendencia a incrementar la expresión de $TNF\alpha$ en comparación con el PBS y el resto de los inmunógenos en los animales con lesión severa. $TNF\alpha$ es una citocina de la inmunidad innata producida por macrófagos y células NK considerada como proinflamatoria, ya que ésta estimula la secreción de IL8 y de moléculas de adhesión por las células endoteliales, regulando la diapédesis y el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos en el sitio de lesión (Esposito and Cuzzocrea, 2009; Esposito and Cuzzocrea, 2011). Esta citocina induce la producción de peróxidos y óxido nítrico, así como IL1, IL6, prostaglandinas, participando en fenómenos como choque séptico y térmico (Abbas A.K. and Lichtman, 2004).

En los animales con lesión moderada, la inmunización con los diferentes inmunógenos (OVA, Cop-1 y A91) disminuyó significativamente la expresión de $TNF\alpha$. Como pudo observarse en este estudio, existe una disminución significativa en la expresión de todos los genes en los animales con lesión severa. En estudios previos, nuestro grupo de investigación reportó la baja respuesta inmunológica existente contra diversos inmunoestimuladores (Ibarra et al., 2007), incluso la nula respuesta contra A91 a nivel periférico en modelos con lesión severa de la médula espinal (Martinon et al., 2012).

Una posible explicación a esta falta de respuesta es el estado de inmunosupresión periférica desarrollado después de una LTME, mismo que, de acuerdo a estudios previos, depende importantemente de la severidad de la lesión (Ibarra et al., 2007). Se ha reportado la existencia de un síndrome de inmunodepresión, el cual se presenta durante los primeros siete días después de la LTME (Riegger et al., 2007), tiempo que coincide con el momento del análisis de genes en este estudio. El impacto de la LTME en el SI es el resultado de diversos factores. Inmediatamente después de la lesión se ha observado una sobreproducción de catecolaminas, las cuales inhiben la proliferación de linfocitos, al inducir apoptosis en estas células (Madden et al., 1995; Prass et al., 2003). El análisis de este fenómeno después de una lesión severa y sus efectos sobre la respuesta en el sitio de lesión y en diversos órganos linfáticos abre la oportunidad de realizar investigaciones futuras en esta área.

Aunque a nivel periférico existe un estado de inmunodepresión en los modelos de lesión severa, a nivel local (sitio de lesión), si se observa (aunque muy disminuida) una

respuesta que de acuerdo a los datos de la presente tesis es predominantemente inflamatoria y que se ve incrementada por la inmunización periférica de cualquier inmunógeno, especialmente de aquellos que comparten secuencias con la proteína básica de la mielina como el A91. Lo anterior nos sugiere una posible activación de la respuesta inmune a nivel periférico, aunque ésta probablemente es muy limitada y por lo tanto no pueda ser detectada, como sucedió en nuestros estudios anteriores (Martinon et al., 2012).

En el caso de LTME moderada, la expresión de genes proinflamatorios como $Tnf\ \alpha$ se observó disminuida en forma significativa, mientras que la de genes antiinflamatorios como IL10 e IL4 se incrementó cuando se inmunizaron los animales con los diferentes inmunógenos, especialmente con A91 y COP-1. Esto explica parcialmente el efecto neuroprotector que se ha observado en modelos con LTME moderada (Martinon et al., 2007; Martinon et al., 2012).

Además de inhibir la respuesta inflamatoria, la IL-10 tiene otros efectos que en conjunto con la IL-4, ayudan a disminuir el daño a nivel tisular. A través de diversos mecanismos, ambas citocinas pueden disminuir significativamente la producción de óxido nítrico (NO), uno de los principales radicales libres que contribuye al daño del tejido neural.

Ya que citocinas como $TNF\alpha$, IL10 e IL4, que se vieron afectadas por la inmunización que se llevó a cabo en este proyecto, tienen alguna influencia sobre la expresión de iNOS y la producción de NO (Guzik et al., 2003; Heba et al., 2001; Kone et al., 2003), decidimos en este trabajo analizar también el efecto de la inmunización con COP_1 y A91 sobre la expresión del gen que codifica para iNOS y la producción de NO.

Los resultados de este último experimento nos reportaron una reducción significativa en la expresión de iNOS y en la producción de NO, lo cual pudo deberse a los efectos de IL4 e IL10.

En estudios previos se ha visto que estas citocinas generadas por los linfocitos con fenotipo Th2, además de tener efectos sobre las células del SI (diferenciación de las células T hacia el fenotipo Th2, inhibición de la producción de IL12, entre otros) también pueden actuar sobre la expresión y la actividad de la iNOS. IL-4 por ejemplo, promueve la expresión de enzimas intracelulares como la arginasa. La enzima arginasa cataliza la hidrólisis de arginina a

ornitina y compite con iNOS por su sustrato, la L- arginina ^(Vercelli, 2003). En modelos *in vitro* esta citocina ha demostrado disminuir la síntesis de la enzima iNOS en poblaciones de macrófagos ^(Gordon, 2003).

IL10 disminuye la expresión de iNOS por diversos mecanismos, por una parte, es un activador de la molécula STAT3 (del inglés, signal transducer and activator of transcription 3), considerada un inhibidor de citocinas proinflamatorias y de la liberación de óxido nítrico y por otra cuando interactúa con su receptor, activa a SOCS3 ^(McNamee et al., 2010), la cual es capaz de inhibir la vía NFκB, factor de transcripción indispensable para la expresión de iNOS ^(Kakita et al., 2009). Se sabe también que IL 10 inhibe la expresión de IL1 β, la cual es considerada como inductora de la expresión del gen iNOS ^(Wong and Billiar, 1995).

Los resultados obtenidos en este estudio deben de ser la base para el diseño de investigaciones futuras dirigidas a conocer los mecanismos de acción que tiene la inmunización con A91 y Cop-1. Así como establecer mejores condiciones para el uso de estos péptidos como una herramienta terapéutica en lesiones del SNC y en desordenes neurodegenerativos, sin el riesgo a desarrollar una enfermedad autoinmune.

XI. CONCLUSIONES

- En una lesión severa, se disminuye significativamente la expresión de genes pro y anti-inflamatorios
- En la lesión severa prevalece la expresión de genes proinflamatorios y ésta se incrementa al inmunizar con cualquier inmunógeno pero más significativamente con A91.
- En una lesión moderada se incrementa significativamente la expresión de los genes para IL-10 e IL-4 al inmunizar con los péptidos A91 y COP-1.
- La inmunización con A91 o COP-1 disminuyen en forma significativa la expresión de la iNOS y la producción de NO.

XII. PERSPECTIVAS

- Analizar el efecto de la inmunización con A91 y Cop-1 sobre la actividad de las citocinas codificadas por los genes analizados, en el sitio de lesión y a nivel periférico
- Analizar el efecto dosis – respuesta después de una LTME severa de A91 y Cop-1.
- Analizar el efecto de la inmunización con A91 o Cop-1 en los diferentes picos de expresión de cada uno de los genes analizados.
- Caracterizar la respuesta Th1 o Th2 en el sitio de lesión

- Analizar la activación de receptores tipo Toll después de la inmunización con A91 y Cop-1 en las dos intensidades de LTME.
- Identificar los mecanismos que contribuyen a incrementar la expresión de genes proinflamatorios después de la inmunización con A91 en una lesión severa.

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Membrana de microarreglos

Se uso la membrana Oligo GEArray® Rat. Inflammatory Cytokines & Receptors Microarray. HybTube Format Cat. No. ORN-011.2, la cual se ejemplifica en la **Figura 31** y se menciona la posición y cada uno de los genes en la **Tabla 7**.

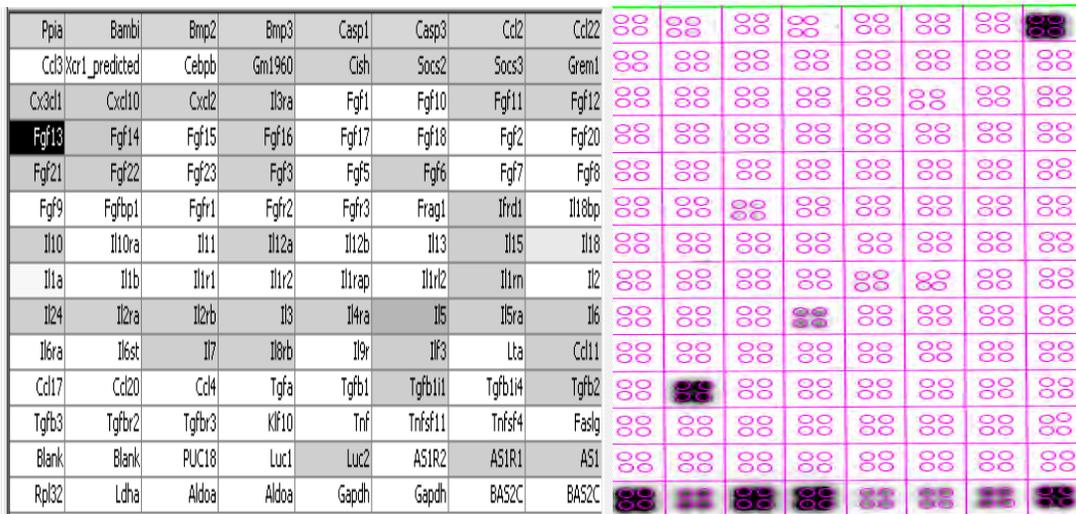


Figura 31. Ubicación de los genes analizados en la membrana de microarreglos. En la figura se muestra del lado izquierdo la posición de cada uno de los genes en el esquema de la membrana y del lado derecho la rejilla que se trazaba encima de las membranas obtenidas por la cámara

Tabla 7. Características de los genes analizados en microarreglos

Posición	Identificación	Símbolo	Nombre (del inglés)
1	NM_017101	Ppia	Peptidylprolyl isomerase A
2	NM_139082	Bambi	BMP and activin membrane-bound inhibitor, homolog (<i>Xenopus laevis</i>)
3	NM_017178	Bmp2	Bone morphogenetic protein 2
4	NM_017105	Bmp3	Bone morphogenetic protein 3
5	NM_012762	Casp1	Caspase 1
6	NM_012922	Casp3	Caspase 3, apoptosis related cysteine protease
7	NM_031530	Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
8	NM_057203	Ccl22	Chemokine (C-C motif) ligand 22
9	NM_013025	Ccl3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
10	XM_236740	Xcr1	Chemokine (C motif) receptor 1 (predicted)

11	NM_024125	Cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
12	NM_138522	Gm1960	Gene model 1960, (NCBI)
13	XM_343472	Cish	Cytokine inducible SH2-containing protein
14	NM_058208	Socs2	Suppressor of cytokine signaling 2
15	NM_053565	Socs3	Suppressor of cytokine signaling 3
16	NM_019282	Grem1	Gremlin 1 homolog, cysteine knot superfamily (<i>Xenopus laevis</i>)
17	NM_134455	Cx3cl1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
18	NM_139089	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
19	NM_053647	Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
20	NM_139260	Il3ra	Interleukin 3 receptor, alpha chain
21	NM_012846	Fgf1	Fibroblast growth factor 1
22	NM_012951	Fgf10	Fibroblast growth factor 10
23	NM_130816	Fgf11	Fibroblast growth factor 11
24	NM_130814	Fgf12	Fibroblast growth factor 12
25	NM_053428	Fgf13	Fibroblast growth factor 13
26	NM_022223	Fgf14	Fibroblast growth factor 14
27	NM_130753	Fgf15	Fibroblast growth factor 15
28	NM_021867	Fgf16	Fibroblast growth factor 16
29	NM_019198	Fgf17	Fibroblast growth factor 17
30	NM_019199	Fgf18	Fibroblast growth factor 18
31	NM_019305	Fgf2	Fibroblast growth factor 2
32	NM_023961	Fgf20	Fibroblast growth factor 20
33	NM_130752	Fgf21	Fibroblast growth factor 21
34	NM_130751	Fgf22	Fibroblast growth factor 22
35	NM_130754	Fgf23	Fibroblast growth factor 23
36	NM_130817	Fgf3	Fibroblast growth factor 3
37	NM_022211	Fgf5	Fibroblast growth factor 5
38	NM_131908	Fgf6	Fibroblast growth factor 6
39	NM_022182	Fgf7	Fibroblast growth factor 7
40	NM_133286	Fgf8	Fibroblast growth factor 8
41	NM_012952	Fgf9	Fibroblast growth factor 9
42	NM_022603	Fgfbp1	Fibroblast growth factor binding protein 1
43	NM_024146	Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1
44	XM_341940	Fgfr2	Fibroblast growth factor receptor 2
45	NM_053429	Fgfr3	Fibroblast growth factor receptor 3
46	NM_053895	Frag1	FGF receptor activating protein 1
47	NM_019242	Ifrd1	Interferon-related developmental regulator 1
48	NM_053374	Il18bp	Interleukin 18 binding protein
49	NM_012854	Il10	Interleukin 10
50	NM_057193	Il10ra	Interleukin 10 receptor, alpha
51	NM_133519	Il11	Interleukin 11
52	NM_053390	Il12a	Interleukin 12 ^a
53	NM_022611	Il12b	Interleukin 12b
54	NM_053828	Il13	Interleukin 13
55	NM_013129	Il15	Interleukin 15
56	NM_019165	Il18	Interleukin 18
57	NM_017019	Il1a	Interleukin 1 alpha
58	NM_031512	Il1b	Interleukin 1 beta
59	NM_013123	Il1r1	Interleukin 1 receptor, type I
60	NM_053953	Il1r2	Interleukin 1 receptor, type II
61	NM_012968	Il1rap	Interleukin 1 receptor accessory protein
62	NM_133575	Il1rl2	Interleukin 1 receptor-like 2
63	NM_022194	Il1rn	Interleukin 1 receptor antagonist
64	NM_053836	Il2	Interleukin 2
65	NM_133311	Il24	Interleukin 24
66	NM_013163	Il2ra	Interleukin 2 receptor, alpha chain
67	NM_013195	Il2rb	Interleukin 2 receptor, beta chain
68	NM_031513	Il3	Interleukin 3
69	NM_133380	Il4ra	Interleukin 4 receptor, alpha
70	NM_021834	Il5	Interleukin 5
71	NM_053645	Il5ra	Interleukin 5 receptor, alpha

72	NM_012589	Il6	Interleukin 6
73	NM_017020	Il6ra	Interleukin 6 receptor, alpha
74	NM_001008725	Il6st	Interleukin 6 signal transducer
75	NM_013110	Il7	Interleukin 7
76	NM_017183	Il8rb	Interleukin 8 receptor, beta
77	NM_017021	Il9r	Interleukin 9 receptor
78	NM_053412	Ilf3	Interleukin enhancer binding factor 3
79	NM_080769	Lta	Lymphotoxin A
80	NM_019205	Ccl11	Chemokine (C-C motif) ligand 11
81	NM_057151	Ccl17	Chemokine (C-C motif) ligand 17
82	NM_019233	Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20
83	NM_053858	Ccl4	Chemokine (C-C motif) ligand 4
84	NM_012671	Tgfa	Transforming growth factor alpha
85	NM_021578	Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1
86	XM_341934	Tgfb1i1	Transforming growth factor beta 1 induced transcript 1
87	XM_001072618	Tgfb1i4	Transforming growth factor beta 1 induced transcript 4
88	NM_031131	Tgfb2	Transforming growth factor, beta 2
89	NM_013174	Tgfb3	Transforming growth factor, beta 3
90	NM_031132	Tgibr2	Transforming growth factor, beta receptor II
91	NM_017256	Tgibr3	Transforming growth factor, beta receptor III
92	NM_031135	Klf10	Kruppel-like factor 10
93	NM_012675	Tnf	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
94	NM_057149	Tnfsf11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
95	NM_053552	Tnfsf4	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
96	NM_012908	Faslg	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
97		Blank	
98		Blank	
99	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA
100	N/A	Luc1	Luciferase, a 61 kDa monomeric protein (firefly, SA_oligo1)
101	X65316	Luc2	Luciferase, a 61 kDa monomeric protein (firefly, SA_oligo2)
102	SA_00005	AS1R2	Artificial Sequence 1 Related 2 (80% identity)(48/60)
103	SA_00004	AS1R1	Artificial Sequence 1 Related 1 (90% identity)(54/60)
104	SA_00003	AS1	Artificial Sequence 1
105	NM_013226	Rpl32	Ribosomal protein L32
106	NM_017025	Ldha	Lactate dehydrogenase A
107	NM_012495	Aldoa	Aldolase A
108	NM_012495	Aldoa	Aldolase A
109	NM_017008	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
110	NM_017008	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
111	SA_00007	BAS2C	Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence
112	SA_00007	BAS2C	Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence

XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas A.K., Lichtman AH (2004) Inmunología celular y molecular. Madrid: España: Interamericana- McGraw Hill.
2. Abraham KE, McMillen D, Brewer KL (2004) The effects of endogenous interleukin-10 on gray matter damage and the development of pain behaviors following excitotoxic spinal cord injury in the mouse. *Neuroscience* 124:945-952.
3. Aguayo AJ, Bray GM, Carter DA, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M (1990) Regrowth and connectivity of injured central nervous system axons in adult rodents. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 50:381-389.
4. Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M (1999) Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:634-639.
5. Allendorph GP, Isaacs MJ, Kawakami Y, Izpisua Belmonte JC, Choe S (2007) BMP-3 and BMP-6 structures illuminate the nature of binding specificity with receptors. *Biochemistry* 46:12238-12247.
6. Aman MJ, Migone TS, Sasaki A, Ascherman DP, Zhu M, Soldaini E, Imada K, Miyajima A, Yoshimura A, Leonard WJ (1999) CIS associates with the interleukin-2 receptor beta chain and inhibits interleukin-2-dependent signaling. *J Biol Chem* 274:30266-30272.
7. Amar AP, Levy ML (1999) Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 44:1027-1039.
8. Arnon R, Sela M, Teitelbaum D (1996) New insights into the mechanism of action of copolymer 1 in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neurol* 243:S8-13.
9. Balentine JD (1983) Calcium toxicity as a factor in spinal cord injury. *Surv Synth Path Res* 2:184-193.
10. Banes AJ, Tsuzaki M, Yamamoto J, Fischer T, Brigman B, Brown T, Miller L (1995) Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem Cell Biol* 73:349-365.
11. Barouch R, Schwartz M (2002) Autoreactive T cells induce neurotrophin production by immune and neural cells in injured rat optic nerve: implications for protective autoimmunity. *FASEB J* 16:1304-1306.
12. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, Anderson DK, Faden AI, Gruner JA, Holford TR, Hsu CY, Noble LJ, Nockels R, Perot PL, Salzman SK, Young W (1996) MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study. J Neurotrauma* 13:343-359.

13. Becker S, Daniel EG (1990) Antagonistic and additive effects of IL-4 and interferon-gamma on human monocytes and macrophages: effects on Fc receptors, HLA-D antigens, and superoxide production. *Cell Immunol* 129:351-362.
14. Bethea JR, Castro M, Keane RW, Lee TT, Dietrich WD, Yeziarski RP (1998) Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation. *J Neurosci* 18:3251-3260.
15. Bethea JR, Dietrich WD (2002) Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. *Curr Opin Neurol* 15:355-360.
16. Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F, Marcillo AE, Loor K, Green J, Dietrich WD (1999) Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 16:851-863.
17. Blaustein MP, Lederer WJ (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79:763-854.
18. Blight AR (1992) Spinal cord injury models: neurophysiology. *J Neurotrauma* 9:147-149.
19. Bowtell DD (1999) Options available--from start to finish--for obtaining expression data by microarray. *Nat Genet* 21:25-32.
20. Bracken MB (1990) Methylprednisolone in the management of acute spinal cord injuries. *Med J Aust* 153:368.
21. 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.
22. Braughler JM, Hall ED (1992) Involvement of lipid peroxidation in CNS injury. *J Neurotrauma* 9 Suppl 1:S1-S7.
23. Brewer KL, Bethea JR, Yeziarski RP (1999) Neuroprotective effects of interleukin-10 following excitotoxic spinal cord injury. *Exp Neurol* 159:484-493.
24. Bunge RP, Puckett WR, Becerra JL, Marcillo A, Quencer RM (1993) Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Adv Neurol* 59:75-89.
25. Bunge RP, Puckett WR, Hiester ED (1997) Observations on the pathology of several types of human spinal cord injury, with emphasis on the astrocyte response to penetrating injuries. *Adv Neurol* 72:305-315.
26. Camand E, Morel MP, Faissner A, Sotelo C, Dusart I (2004) Long-term changes in the molecular composition of the glial scar and progressive increase of serotonergic fibre sprouting after hemisection of the mouse spinal cord. *Eur J Neurosci* 20:1161-1176.
27. Cao H, Wolff RG, Meltzer MS, Crawford RM (1989) Differential regulation of class II MHC determinants on macrophages by IFN-gamma and IL-4. *J Immunol* 143:3524-3531.

28. Cheung DL, Hart PH, Vitti GF, Whitty GA, Hamilton JA (1990) Contrasting effects of interferon-gamma and interleukin-4 on the interleukin-6 activity of stimulated human monocytes. *Immunology* 71:70-75.
29. Christensen MD, Everhart AW, Pickelman JT, Hulsebosch CE (1996) Mechanical and thermal allodynia in chronic central pain following spinal cord injury. *Pain* 68:97-107.
30. Clemens JA, Ho PP, Panetta JA (1991) LY178002 reduces rat brain damage after transient global forebrain ischemia. *Stroke* 22:1048-1052.
31. Crawford RM, Finbloom DS, Ohara J, Paul WE, Meltzer MS (1987) B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. *J Immunol* 139:135-141.
32. Cross AH, Keeling RM, Goorha S, San M, Rodi C, Wyatt PS, Manning PT, Misko TP (1996) Inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity correlate with disease activity in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 71:145-153.
33. De Groot J (1993) *Neuroanatomía Correlativa*. Ed. Manual Moderno. México.
34. de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 26:202-226.
35. de LM, Welcher AA, Nahin RH, Liu Y, Ruda MA, Shooter EM, Molina CA (1996) Fatty acid binding protein is induced in neurons of the dorsal root ganglia after peripheral nerve injury. *J Neurosci Res* 44:283-292.
36. Donnelly DJ, Popovich PG (2008) Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol* 209:378-388.
37. Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
38. Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert RJ, Boulos PT, Ellegala DB, Dumont AS (2001a) Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin Neuropharmacol* 24:254-264.
39. Dumont RJ, Verma S, Okonkwo DO, Hurlbert RJ, Boulos PT, Ellegala DB, Dumont AS (2001b) Acute spinal cord injury, part II: contemporary pharmacotherapy. *Clin Neuropharmacol* 24:265-279.
40. Dunne A, O'Neill LA (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003:re3.
41. Esposito E, Cuzzocrea S (2009) TNF-alpha as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma. *Curr Med Chem* 16:3152-3167.
42. Esposito E, Cuzzocrea S (2011) Anti-TNF therapy in the injured spinal cord. *Trends Pharmacol Sci* 32:107-115.
43. Faden AI (1993) Experimental neurobiology of central nervous system trauma. *Crit Rev Neurobiol* 7:175-186.
44. Faden AI, Simon RP (1988) A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol* 23:623-626.

45. Fiumara P, Snell V, Li Y, Mukhopadhyay A, Younes M, Gillenwater AM, Cabanillas F, Aggarwal BB, Younes A (2001) Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines. *Blood* 98:2784-2790.
46. Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA, Dekaban GA, Marcillo AE, Saenz AD, Pasquale-Styles M, Dietrich WD, Weaver LC (2006) The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain* 129:3249-3269.
47. Fridkis-Hareli M, Neveu JM, Robinson RA, Lane WS, Gauthier L, Wucherpfennig KW, Sela M, Strominger JL (1999) Binding motifs of copolymer 1 to multiple sclerosis- and rheumatoid arthritis-associated HLA-DR molecules. *J Immunol* 162:4697-4704.
48. Fujimoto T, Nakamura T, Ikeda T, Taoka Y, Takagi K (2000) Effects of EPC-K1 on lipid peroxidation in experimental spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 25:24-29.
49. Fuller KG, Olson JK, Howard LM, Croxford JL, Miller SD (2004) Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Methods Mol Med* 102:339-361.
50. Garcia E, Silva-Garcia R, Mestre H, Flores N, Martinon S, Calderon-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* 90:656-663.
51. Gaur A, Boehme SA, Chalmers D, Crowe PD, Pahuja A, Ling N, Brocke S, Steinman L, Conlon PJ (1997) Amelioration of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with altered myelin basic protein peptides involves different cellular mechanisms. *J Neuroimmunol* 74:149-158.
52. Gelderd JB (1990) Evaluation of blood vessel and neurite growth into a collagen matrix placed within a surgically created gap in rat spinal cord. *Brain Res* 511:80-92.
53. Genovese T, Esposito E, Mazzon E, Di PR, Caminiti R, Bramanti P, Cappelani A, Cuzzocrea S (2009) Absence of endogenous interleukin-10 enhances secondary inflammatory process after spinal cord compression injury in mice. *J Neurochem* 108:1360-1372.
54. Gerrard TL, Dyer DR, Mostowski HS (1990) IL-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor selectively increase HLA-DR and HLA-DP antigens but not HLA-DQ antigens on human monocytes. *J Immunol* 144:4670-4674.
55. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, Namen A, Park LS, Cosman D, Anderson D (1994) Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J* 13:2822-2830.
56. Giulian D, Corpuz M, Chapman S, Mansouri M, Robertson C (1993) Reactive mononuclear phagocytes release neurotoxins after ischemic and traumatic injury to the central nervous system. *J Neurosci Res* 36:681-693.
57. Glaser J, Gonzalez R, Perreau VM, Cotman CW, Keirstead HS (2004) Neutralization of the chemokine CXCL10 enhances tissue sparing and angiogenesis following spinal cord injury. *J Neurosci Res* 77:701-708.
58. Goodkin R, Cambell JB (1979) Sequential pathologic changes in spinal cord injury. *Arch Neurol* 30:197-201.

59. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3:23-35.
60. Grilli M, Barbieri I, Basudev H, Brusa R, Casati C, Lozza G, Ongini E (2000) Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage. *Eur J Neurosci* 12:2265-2272.
61. Grimaldi CM, Hicks R, Diamond B (2005) B cell selection and susceptibility to autoimmunity. *J Immunol* 174:1775-1781.
62. Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I, Franco-Bourland R, Salgado-Ceballos H, Ibarra A, Larriva-Sahd J (1994) Neuroprotection of completely lacerated spinal cord of adult rats by homotopic and heterotopic transplantation. *Restor Neurol Neurosci* 7:61-70.
63. Guo LH, Mittelbronn M, Brabeck C, Mueller CA, Schluesener HJ (2004) Expression of interleukin-16 by microglial cells in inflammatory, autoimmune, and degenerative lesions of the rat brain. *J Neuroimmunol* 146:39-45.
64. Gutteridge JM (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41:1819-1828.
65. Guzik TJ, Korbut R, mek-Guzik T (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54:469-487.
66. Hall ED, Springer JE (2004b) Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx* 1:80-100.
67. Hall ED, Springer JE (2004a) Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx* 1:80-100.
68. Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Tsuchiya K, Niwa M, Tsutsumishita Y, Fukuzawa K (1996) Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord. *Free Radic Biol Med* 20:1-9.
69. Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo J (2002) Regulation of chemokine expression by antiinflammatory cytokines. *Immunol Res* 25:229-245.
70. Hao AJ, Dheen ST, Ling EA (2002) Expression of macrophage colony-stimulating factor and its receptor in microglia activation is linked to teratogen-induced neuronal damage. *Neuroscience* 112:889-900.
71. Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA (1989) Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3803-3807.
72. Harvey C, Wilson SE, Greene CG, Berkowitz M, Stripling TE (1992) New estimates of the direct costs of traumatic spinal cord injuries: results of a nationwide survey. *Paraplegia* 30:834-850.
73. Hashimoto M, Nitta A, Fukumitsu H, Nomoto H, Shen L, Furukawa S (2005) Inflammation-induced GDNF improves locomotor function after spinal cord injury. *Neuroreport* 16:99-102.
74. Hauben E, Agranov E, Gothilf A, Nevo U, Cohen A, Smirnov I, Steinman L, Schwartz M (2001a) Posttraumatic therapeutic vaccination with modified myelin self-antigen prevents complete paralysis while avoiding autoimmune disease. *J Clin Invest* 108:591-599.

75. Hauben E, Ibarra A, Mizrahi T, Barouch R, Agranov E, Schwartz M (2001b) Vaccination with a Nogo-A-derived peptide after incomplete spinal-cord injury promotes recovery via a T-cell-mediated neuroprotective response: comparison with other myelin antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15173-15178.
76. Hauben E, Nevo U, Yoles E, Moalem G, Agranov E, Mor F, Akselrod S, Neeman M, Cohen IR, Schwartz M (2000) Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury. *Lancet* 355:286-287.
77. Hausmann ON (2003) Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord* 41:369-378.
78. Heba G, Krzeminski T, Porc M, Grzyb J, mbinska-Kiec A (2001) Relation between expression of TNF alpha, iNOS, VEGF mRNA and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats. *J Physiol Pharmacol* 52:39-52.
79. Hebenstreit D, Wirnsberger G, Horejs-Hoeck J, Duschl A (2006) Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:173-188.
80. Hirschberg DL, Moalem G, He J, Mor F, Cohen IR, Schwartz M (1998) Accumulation of passively transferred primed T cells independently of their antigen specificity following central nervous system trauma. *J Neuroimmunol* 89:88-96.
81. Howard M, O'Garra A (1992) Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today* 13:198-200.
82. Huang Y, Anderson R (2003) A single amino acid substitution in a recombinant G protein vaccine drastically curtails protective immunity against respiratory syncytial virus (RSV). *Vaccine* 21:2500-2505.
83. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA (2001) Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 14:705-714.
84. Ibarra A, Correa D, Willms K, Merchant MT, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I (2003) Effects of cyclosporin-A on immune response, tissue protection and motor function of rats subjected to spinal cord injury. *Brain Res* 979:165-178.
85. Ibarra A, Garcia E, Flores N, Martinon S, Reyes R, Campos MG, Maciel M, Mestre H (2010) Immunization with neural-derived antigens inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury. *Neurosci Lett* 476:62-65.
86. 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.
87. 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.
88. Ikeda Y, Long DM (1990) Effects of the arachidonate lipoxygenase inhibitor BW755C on traumatic and peritumoural brain oedema. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 51:68-70.

89. Jameson SC, Bevan MJ (1995) T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity* 2:1-11.
90. Jones TB, Ankeny DP, Guan Z, McGaughy V, Fisher LC, Basso DM, Popovich PG (2004) Passive or active immunization with myelin basic protein impairs neurological function and exacerbates neuropathology after spinal cord injury in rats. *J Neurosci* 24:3752-3761.
91. Jones TB, Basso DM, Sodhi A, Pan JZ, Hart RP, MacCallum RC, Lee S, Whitacre CC, Popovich PG (2002) Pathological CNS autoimmune disease triggered by traumatic spinal cord injury: implications for autoimmune vaccine therapy. *J Neurosci* 22:2690-2700.
92. Kakita H, Aoyama M, Hussein MH, Kato S, Suzuki S, Ito T, Togari H, Asai K (2009) Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced nitric oxide production through NF-kappaB signaling in cultured astrocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 238:56-63.
93. Kandel Eric R, Schwartz James H, Jessell Thomas M. (2000) *Principles of Neural Science*.
94. 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* 184:1259-1268.
95. Kigerl KA, Popovich PG (2009) Toll-like receptors in spinal cord injury. *Curr Top Microbiol Immunol* 336:121-136.
96. Kim SU, de VJ (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81:302-313.
97. Kipnis J, Mizrahi T, Hauben E, Shaked I, Shevach E, Schwartz M (2002a) Neuroprotective autoimmunity: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15620-15625.
98. Kipnis J, Mizrahi T, Yoles E, Ben-Nun A, Schwartz M (2002b) Myelin specific Th1 cells are necessary for post-traumatic protective autoimmunity. *J Neuroimmunol* 130:78-85.
99. Kipnis J, Nevo U, Panikashvili D, Alexandrovich A, Yoles E, Akselrod S, Shohami E, Schwartz M (2003) Therapeutic vaccination for closed head injury. *J Neurotrauma* 20:559-569.
100. Kipnis J, Yoles E, Porat Z, Cohen A, Mor F, Sela M, Cohen IR, Schwartz M (2000) T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7446-7451.
101. Kipnis J, Yoles E, Schori H, Hauben E, Shaked I, Schwartz M (2001) Neuronal survival after CNS insult is determined by a genetically encoded autoimmune response. *J Neurosci* 21:4564-4571.
102. Kleinova M, Hewitt M, Brezova V, Madden JC, Cronin MT, Valko M (2007) Antioxidant properties of carotenoids: QSAR prediction of their redox potentials. *Gen Physiol Biophys* 26:97-103.
103. Kondo M, Takeshita T, Ishii N, Nakamura M, Watanabe S, Arai K, Sugamura K (1993) Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science* 262:1874-1877.
104. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY (2003) Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F178-F190.

105. Kovacic P, Jacintho JD (2001) Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem* 8:773-796.
106. Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
107. Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Dupont H, Widmann C, Lazdunski M (2000) Prevention of ischemic spinal cord injury: comparative effects of magnesium sulfate and riluzole. *J Vasc Surg* 32:179-189.
108. Lazarov-Spiegler O, Solomon AS, Zeev-Brann AB, Hirschberg DL, Lavie V, Schwartz M (1996) Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. *FASEB J* 10:1296-1302.
109. Lee JY, Chung H, Yoo YS, Oh YJ, Oh TH, Park S, Yune TY (2010) Inhibition of apoptotic cell death by ghrelin improves functional recovery after spinal cord injury. *Endocrinology* 151:3815-3826.
110. Lemke M, Demediuk P, McIntosh TK, Vink R, Faden AI (1987) Alterations in tissue Mg⁺⁺, Na⁺ and spinal cord edema following impact trauma in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 147:1170-1175.
111. Lewitus GM, Kipnis J, Avidan H, Ben-Nun A, Schwartz M (2006) Neuroprotection induced by mucosal tolerance is epitope-dependent: conflicting effects in different strains. *J Neuroimmunol* 175:31-38.
112. Libra M, Mangano K, Anzaldi M, Quattrocchi C, Donia M, di MR, Signorelli S, Scalia G, Zignego AL, de R, V, Mazzarino MC, Nicoletti F (2006) Analysis of interleukin (IL)-1beta IL-1 receptor antagonist, soluble IL-1 receptor type II and IL-1 accessory protein in HCV-associated lymphoproliferative disorders. *Oncol Rep* 15:1305-1308.
113. Liu C, Jin A, Zhou C, Chen B (2001) Gene expression of inducible nitric oxide synthase in injured spinal cord tissue. *Chin J Traumatol* 4:231-233.
114. Liu CL, Jin AM, Tong BH (2003) Detection of gene expression pattern in the early stage after spinal cord injury by gene chip. *Chin J Traumatol* 6:18-22.
115. Liu D, Xu GY, Pan E, McAdoo DJ (1999) Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neuroscience* 93:1383-1389.
116. Lopez-Jaramillo P (2000) Calcium, nitric oxide, and preeclampsia. *Semin Perinatol* 24:33-36.
117. Lotan M, Schwartz M (1994) Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. *FASEB J* 8:1026-1033.
118. Mabie PC, Mehler MF, Marmur R, Papavasiliou A, Song Q, Kessler JA (1997) Bone morphogenetic proteins induce astroglial differentiation of oligodendroglial-astroglial progenitor cells. *J Neurosci* 17:4112-4120.
119. Madden KS, Sanders VM, Felten DL (1995) Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:417-448.

120. Marsala M, Yaksh TL (1994) Transient spinal ischemia in the rat: characterization of behavioral and histopathological consequences as a function of the duration of aortic occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:526-535.
121. Martinon S, Garcia E, Flores N, Gonzalez I, Ortega T, Buenrostro M, Reyes R, Fernandez-Presas AM, Guizar-Sahagun G, Correa D, Ibarra A (2007) Vaccination with a neural-derived peptide plus administration of glutathione improves the performance of paraplegic rats. *Eur J Neurosci* 26:403-412.
122. Martinon S, Garcia 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:e32027.
123. Martinon S, Ibarra A (2008) Pharmacological neuroprotective therapy for acute spinal cord injury: state of the art. *Mini Rev Med Chem* 8:222-230.
124. Matsumoto A, Seki Y, Kubo M, Ohtsuka S, Suzuki A, Hayashi I, Tsuji K, Nakahata T, Okabe M, Yamada S, Yoshimura A (1999) Suppression of STAT5 functions in liver, mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2-containing protein 1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* 19:6396-6407.
125. Matsumoto H, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Tanaka E, Amitani R, Maeda A, Yamamoto K, Sasada M, Kuze F (1997) Interleukin-12 gene expression in human monocyte-derived macrophages stimulated with *Mycobacterium bovis* BCG: cytokine regulation and effect of NK cells. *Infect Immun* 65:4405-4410.
126. Matsushita K, Wu Y, Qiu J, Lang-Lazdunski L, Hirt L, Waeber C, Hyman BT, Yuan J, Moskowitz MA (2000) Fas receptor and neuronal cell death after spinal cord ischemia. *J Neurosci* 20:6879-6887.
127. Matute C, Alberdi E, Domercq M, Perez-Cerda F, Perez-Samartin A, Sanchez-Gomez MV (2001) The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends Neurosci* 24:224-230.
128. Mauter AE, Weinzierl MR, Donovan F, Noble LJ (2000) Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. *Phys Ther* 80:673-687.
129. McAdoo DJ, Xu GY, Robak G, Hughes MG (1999) Changes in amino acid concentrations over time and space around an impact injury and their diffusion through the rat spinal cord. *Exp Neurol* 159:538-544.
130. McKeon TA, Lyman ML (1991) Calcium ion improves electrophoretic transfer of calmodulin and other small proteins. *Anal Biochem* 193:125-130.
131. McNamee EN, Ryan KM, Griffin EW, Gonzalez-Reyes RE, Ryan KJ, Harkin A, Connor TJ (2010) Noradrenaline acting at central beta-adrenoceptors induces interleukin-10 and suppressor of cytokine signaling-3 expression in rat brain: implications for neurodegeneration. *Brain Behav Immun* 24:660-671.
132. McPhail LT, Oschipok LW, Liu J, Tetzlaff W (2005) Both positive and negative factors regulate gene expression following chronic facial nerve resection. *Exp Neurol* 195:199-207.

133. Mehler MF, Mabie PC, Zhang D, Kessler JA (1997) Bone morphogenetic proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 20:309-317.
134. Mendez DR, Cherian L, Moore N, Arora T, Liu PK, Robertson CS (2004) Oxidative DNA lesions in a rodent model of traumatic brain injury. *J Trauma* 56:1235-1240.
135. Mills KH (2011) TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 11:807-822.
136. Milner EC, Anolik J, Cappione A, Sanz I (2005) Human innate B cells: a link between host defense and autoimmunity? *Springer Semin Immunopathol* 26:433-452.
137. Mir M, Tolosa L, Asensio VJ, Llado J, Olmos G (2008) Complementary roles of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in inducible microglial nitric oxide generation. *J Neuroimmunol* 204:101-109.
138. 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.
139. Moore Keith I., Dalley Arthur F. (2002) *Anatomía con Orientación Clínica*.
140. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765.
141. Mueller CA, Schluesener HJ, Conrad S, Meyermann R, Schwab JM (2003) Lesional expression of a proinflammatory and antiangiogenic cytokine EMAP II confined to endothelium and microglia/macrophages during secondary damage following experimental traumatic brain injury. *J Neuroimmunol* 135:1-9.
142. Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S, Kurihara T (2001a) Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res* 65:322-331.
143. Nakajima K, Kohsaka S (2001) Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J Biochem* 130:169-175.
144. Nakajima K, Tohyama Y, Kohsaka S, Kurihara T (2001b) Ability of rat microglia to uptake extracellular glutamate. *Neurosci Lett* 307:171-174.
145. Nashmi R, Jones OT, Fehlings MG (2000) Abnormal axonal physiology is associated with altered expression and distribution of Kv1.1 and Kv1.2 K⁺ channels after chronic spinal cord injury. *Eur J Neurosci* 12:491-506.
146. 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.
147. Nestic O, Svrakic NM, Xu GY, McAdoo D, Westlund KN, Hulsebosch CE, Ye Z, Galante A, Soteropoulos P, Tolias P, Young W, Hart RP, Perez-Polo JR (2002) DNA microarray analysis of the contused spinal cord: effect of NMDA receptor inhibition. *J Neurosci Res* 68:406-423.
148. Neumann H, Schmidt H, Cavalie A, Jenne D, Wekerle H (1997) Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential

- regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *J Exp Med* 185:305-316.
149. Newman WS (2003) *Neurología y Neurofisiología Clínica*. México.
 150. Novikov L, Novikova L, Kellerth JO (1997) Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neuroscience* 79:765-774.
 151. Pal E, Tabira T (2002) Autonomic regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: the role of interferon-gamma. *Neuroimmunomodulation* 10:80-84.
 152. Parslow T.G, Stites D.P, Terr A.I., Imboden J.B (2002) *Inmunología básica y clínica*. México: Manual Moderno.
 153. Perry Zejdlik Cynthia (1992) *Management of spinal cord injury*. Boston: Jones and Bartlett.
 154. Plunkett JA, Yu CG, Easton JM, Bethea JR, Yezierski RP (2001) Effects of interleukin-10 (IL-10) on pain behavior and gene expression following excitotoxic spinal cord injury in the rat. *Exp Neurol* 168:144-154.
 155. Popovich PG, Guan Z, Wei P, Huitinga I, van RN, Stokes BT (1999) Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 158:351-365.
 156. Popovich PG, Stokes BT, Whitacre CC (1996a) Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. *J Neurosci Res* 45:349-363.
 157. Popovich PG, van RN, Hickey WF, Preidis G, McGaughy V (2003) Hematogenous macrophages express CD8 and distribute to regions of lesion cavitation after spinal cord injury. *Exp Neurol* 182:275-287.
 158. Popovich PG, Wei P, Stokes BT (1997a) Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol* 377:443-464.
 159. Popovich PG, Yu JY, Whitacre CC (1997b) Spinal cord neuropathology in rat experimental autoimmune encephalomyelitis: modulation by oral administration of myelin basic protein. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:1323-1338.
 160. Porter AG, Janicke RU (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6:99-104.
 161. Prass K, Meisel C, Hoflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, Volk HD, Meisel A (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.
 162. Presky DH, Minetti LJ, Gillessen S, Wilkinson VL, Wu CY, Gubler U, Chizzonite R, Gately MK (1998) Analysis of the multiple interactions between IL-12 and the high affinity IL-12 receptor complex. *J Immunol* 160:2174-2179.

163. Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S (2004) Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 15:415-436.
164. Putheti P, Soderstrom M, Link H, Huang YM (2003) Effect of glatiramer acetate (Copaxone) on CD4+CD25high T regulatory cells and their IL-10 production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 144:125-131.
165. Rabchevsky AG, Smith GM (2001) Therapeutic interventions following mammalian spinal cord injury. *Arch Neurol* 58:721-726.
166. Rao P, Segal BM (2004) Experimental autoimmune encephalomyelitis. *Methods Mol Med* 102:363-375.
167. Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M (1998) Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 4:814-821.
168. Reddi AH, Cunningham NS (1990) Bone induction by osteogenin and bone morphogenetic proteins. *Biomaterials* 11:33-34.
169. Reier PJ, Anderson DK, Thompson FJ, Stokes BT (1992) Neural tissue transplantation and CNS trauma: anatomical and functional repair of the injured spinal cord. *J Neurotrauma* 9 Suppl 1:S223-S248.
170. Reier PJ, Houle JD, Jakeman L, Winialski D, Tessler A (1988) Transplantation of fetal spinal cord tissue into acute and chronic hemisection and contusion lesions of the adult rat spinal cord. *Prog Brain Res* 78:173-179.
171. Revesz T, Kidd D, Thompson AJ, Barnard RO, McDonald WI (1994) A comparison of the pathology of primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Brain* 117 (Pt 4):759-765.
172. Rhoney DH, Luer MS, Hughes M, Hatton J (1996) New pharmacologic approaches to acute spinal cord injury. *Pharmacotherapy* 16:382-392.
173. Riegger T, Conrad S, Liu K, Schluesener HJ, Adibzahdeh M, Schwab JM (2007) Spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS). *Eur J Neurosci* 25:1743-1747.
174. Roitt I, Brostoff J, Male D.K (1997) *Inmunología*. Madrid: Harcourt Brace.
175. Rosenberg PA, Li Y, Ali S, Altiok N, Back SA, Volpe JJ (1999) Intracellular redox state determines whether nitric oxide is toxic or protective to rat oligodendrocytes in culture. *J Neurochem* 73:476-484.
176. Rothwell NJ, Relton JK (1993) Involvement of interleukin-1 and lipocortin-1 in ischaemic brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 5:178-198.
177. Santambrogio L, Benedetti M, Chao MV, Muzaffar R, Kulig K, Gabellini N, Hochwald G (1994) Nerve growth factor production by lymphocytes. *J Immunol* 153:4488-4495.
178. Sapolsky RM (2001) Cellular defenses against excitotoxic insults. *J Neurochem* 76:1601-1611.
179. Sattler R, Tymianski M (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med (Berl)* 78:3-13.

180. Schori H, Kipnis J, Yoles E, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, Schwartz M (2001a) Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3398-3403.
181. Schori H, Yoles E, Schwartz M (2001b) T-cell-based immunity counteracts the potential toxicity of glutamate in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 119:199-204.
182. Schwartz M (2001) Protective autoimmunity as a T-cell response to central nervous system trauma: prospects for therapeutic vaccines. *Prog Neurobiol* 65:489-496.
183. Schwartz M (2003) Macrophages and microglia in central nervous system injury: are they helpful or harmful? *J Cereb Blood Flow Metab* 23:385-394.
184. Schwartz M, Cohen I, Lazarov-Spiegler O, Moalem G, Yoles E (1999a) The remedy may lie in ourselves: prospects for immune cell therapy in central nervous system protection and repair. *J Mol Med (Berl)* 77:713-717.
185. Schwartz M, Cohen IR (2000) Autoimmunity can benefit self-maintenance. *Immunol Today* 21:265-268.
186. Schwartz M, Moalem G, Leibowitz-Amit R, Cohen IR (1999b) Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci* 22:295-299.
187. Sekhon LHS, Fehlings MG (2001) Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* 26.
188. Shaked I, Tchoresh D, Gersner R, Meiri G, Mordechai S, Xiao X, Hart RP, Schwartz M (2005) Protective autoimmunity: interferon-gamma enables microglia to remove glutamate without evoking inflammatory mediators. *J Neurochem* 92:997-1009.
189. Sharma HS (2005) Pathophysiology of blood-spinal cord barrier in traumatic injury and repair. *Curr Pharm Des* 11:1353-1389.
190. Sharma HS, Westman J, Olsson Y, Alm P (1996) Involvement of nitric oxide in acute spinal cord injury: an immunocytochemical study using light and electron microscopy in the rat. *Neurosci Res* 24:373-384.
191. Shibaki A, Katz SI (2002) Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Exp Dermatol* 11:126-134.
192. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW (1998) Basic neurochemistry molecular, cellular and medical aspects. New York: Lippincott.
193. Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5:146-156.
194. Sims JE (2002) IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr Opin Immunol* 14:117-122.
195. 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* 3:254-261.
196. Snell S.R (1994) Neuroanatomía clínica. Ed. Médica Panamericana.

197. Stubbs EB, Jr., Fisher MA, Siegel GJ (1998) Anti-tubulin antibodies in a sensorimotor neuropathy patient alter tubulin polymerization. *Acta Neuropathol* 95:302-305.
198. Subudhi SK, Alegre ML, Fu YX (2005) The balance of immune responses: costimulation versus coinhibition. *J Mol Med (Berl)* 83:193-202.
199. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, Naruo M, Okabe H, Takatsuki K (1997) Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 79:1177-1182.
200. Teitelbaum D, Sela M, Arnon R (1997) Copolymer 1 from the laboratory to FDA. *Isr J Med Sci* 33:280-284.
201. Tom VJ, Doller CM, Malouf AT, Silver J (2004) Astrocyte-associated fibronectin is critical for axonal regeneration in adult white matter. *J Neurosci* 24:9282-9290.
202. Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, Nencioni L, Labardi D, Rubartelli A, Cozzolino F, Aloe L, Garaci E (1996) Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 85:345-356.
203. Trivedi A, Olivas AD, Noble-Haeusslein LJ (2006) Inflammation and Spinal Cord Injury: Infiltrating Leukocytes as Determinants of Injury and Repair Processes. *Clin Neurosci Res* 6:283-292.
204. Uchida K, Nakajima H, Hirai T, Yayama T, Chen KB, Kobayashi S, Roberts S, Johnson WE, Baba H (2010) Microarray analysis of expression of cell death-associated genes in rat spinal cord cells exposed to cyclic tensile stresses in vitro. *BMC Neurosci* 11:84.
205. van Landeghem FK, Stover JF, Bechmann I, Bruck W, Unterberg A, Bührer C, von DA (2001) Early expression of glutamate transporter proteins in ramified microglia after controlled cortical impact injury in the rat. *Glia* 35:167-179.
206. Vercelli D (2003) Arginase: marker, effector, or candidate gene for asthma? *J Clin Invest* 111:1815-1817.
207. Verdier F, Rabionet R, Gouilleux F, Beisenherz-Huss C, Varlet P, Muller O, Mayeux P, Lacombe C, Gisselbrecht S, Chretien S (1998) A sequence of the CIS gene promoter interacts preferentially with two associated STAT5A dimers: a distinct biochemical difference between STAT5A and STAT5B. *Mol Cell Biol* 18:5852-5860.
208. Vladutiu AO (1995) Role of nitric oxide in autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 76:1-11.
209. Wagner I, Volbers B, Hilz MJ, Schwab S, Doerfler A, Staykov D (2011) Radiopacity of intracerebral hemorrhage correlates with perihemorrhagic edema. *Eur J Neurol*.
210. Wamil AW, Wamil BD, Hellerqvist CG (1998) CM101-mediated recovery of walking ability in adult mice paralyzed by spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13188-13193.
211. Wang J, Asensio VC, Campbell IL (2002) Cytokines and chemokines as mediators of protection and injury in the central nervous system assessed in transgenic mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 265:23-48.
212. Wong JM, Billiar TR (1995) Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. *Adv Pharmacol* 34:155-170.

213. Xu HL, Feng YP (2000) Inhibitory effects of chiral 3-n-butylphthalide on inflammation following focal ischemic brain injury in rats. *Acta Pharmacol Sin* 21:433-438.
214. Xu M, Ng YK, Leong SK (2000) Neuroprotective and neurodestructive functions of nitric oxide after spinal cord hemisection. *Exp Neurol* 161:472-480.
215. Yoles E, Hauben E, Palgi O, Agranov E, Gothilf A, Cohen A, Kuchroo V, Cohen IR, Weiner H, Schwartz M (2001) Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *J Neurosci* 21:3740-3748.
216. Yoshimura A, Naka T, Kubo M (2007) SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7:454-465.
217. Young W (1996) Spinal cord regeneration. *Science* 273:451.
218. Young W, Koreh I (1986) Potassium and calcium changes in injured spinal cords. *Brain Res* 365:42-53.
219. Yu WR, Fehlings MG (2011) Fas/FasL-mediated apoptosis and inflammation are key features of acute human spinal cord injury: implications for translational, clinical application. *Acta Neuropathol* 122:747-761.
220. Zeman RJ, Feng Y, Peng H, Etlinger JD (1999) Clenbuterol, a beta(2)-adrenoceptor agonist, improves locomotor and histological outcomes after spinal cord contusion in rats. *Exp Neurol* 159:267-273.
221. Zhang Z, Krebs CJ, Guth L (1997) Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. *Exp Neurol* 143:141-152.
222. Zhou Z, Peng X, Insolera R, Fink DJ, Mata M (2009b) IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury. *Exp Neurol* 220:183-190.
223. Zhou Z, Peng X, Insolera R, Fink DJ, Mata M (2009a) Interleukin-10 provides direct trophic support to neurons. *J Neurochem* 110:1617-1627.
224. Zhu M, John S, Berg M, Leonard WJ (1999) Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFNgamma-mediated signaling. *Cell* 96:121-130.
225. Zlotnik A, Fischer M, Roehm N, Zipori D (1987) Evidence for effects of interleukin 4 (B cell stimulatory factor 1) on macrophages: enhancement of antigen presenting ability of bone marrow-derived macrophages. *J Immunol* 138:4275-4279.