

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA**



**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA SALUD  
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Evaluación del efecto neuroprotector de A91  
sobre la apoptosis, en ratas con lesión  
traumática de médula espinal.**

**TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Presenta:**

**Biol. Exp. Roxana Haydee Rodríguez Barrera**

**CO- DIRECCIÓN DE TESIS**

**Dr. José Juan Antonio Ibarra Arias y Dra. Mina Königsberg Fainstein**

**ASESORÍA DE TESIS**

**Dra. Ana María Fernández Presas**

**México D.F., 3 de Diciembre del 2012**

## COMITÉ TUTORAL

Co- Director

**Dr. José Juan Antonio Ibarra Arias.**

Facultad de Ciencias de la Salud.

Universidad Anáhuac México Norte.

Centro de Investigación Camina.

Co- Directora

**Dra. Mina Königsberg Fainstein.**

Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular.

Depto. de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Asesora Externa

**Dra. Ana María Fernández Presas.**

Facultad de Medicina. Depto. de Microbiología y Parasitología.

Universidad Nacional Autónoma de México

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, en la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Anáhuac México Norte, en el en el Centro de Investigación Camina, y en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

*La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, forma parte del padrón de programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN002.*

El trabajo de investigación fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) durante el año 2010-2012 con el No. de becario 56958 y No. de proyecto 57204.

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis tutores*

*Gracias al Dr. Antonio Ibarra Arias por compartir sus conocimientos conmigo, por todo su apoyo, porque sin conocerme me brindo su confianza y por estimular mi gusto hacia la ciencia, A la Dra. Mina Königsberg por su paciencia, por brindarme la oportunidad de desarrollar mi formación académica en su laboratorio y permitirme trabajar en conjunto con ella, por explotar mis capacidades y exigirme el máximo. A la Dra. Ana María muchas gracias por sus sabios consejos y por sus palabras de aliento en todo este tiempo, por motivarme y contagiarme con su buen humor. A los tres les agradezco por inspirarme y ser mi modelo a seguir.*

*A mis compañeros de Laboratorio*

*A Elisa, Susana, Adrián, Viridiana, Adriana, Laura, Elizabeth, René y Cristóbal, todos los compañeros del Laboratorio de Bioenergética y de Proyecto Camina, por su apoyo, y sus consejos, por su compañía en largas horas de encierro. También quiero agradecer a mis compañeros de generación por motivarme y apoyarme durante mi formación académica.*

*A la Dra. Patricia Ostrosky del IIB, UNAM, el Dr. Armando Luna del INGER y a la Dra. Viridiana Yazmin González Puertos por su ayuda con los controles positivos. A la Dra. Edna Elisa García Vences, al MVZ Adrián Flores Romero y al MVZ José Agustín Jiménez Rodríguez, por su apoyo en el manejo y cuidado de animales. A la Químico Verónica Rodríguez Mata por su apoyo con los cortes en congelación.*

*Un agradecimiento especial a mi familia*

*Agradezco a mi Abuelito Víctor Casiano por ser mi fuente de inspiración para realizar una carrera científica sin él, mis primeros logros no hubieran culminado. A mis padres, hermanos y Esperanza porque día y noche velaron por mí, por su apoyo moral en las buenas y malas, por su comprensión y confianza, porque siempre están conmigo, gracias a ustedes herede la perseverancia, paciencia y entrega por mis sueños. Gracias a Oscar Víctor y a Iván por alegrar mis días e impulsarme día a día. A Luka por quedarse conmigo en mis desvelos. A mi abuelita y mis tías por creer en mí. A toda mi familia Gracias por existir en mi vida y por ser mi fortaleza. Por ultimo agradezco a mi gran amiga Guadalupe Sarmiento por estar conmigo desde hace mucho tiempo apoyándome incondicionalmente.*

*Me encanta Dios.*

*Me encanta Dios. Es un viejo magnifico que no se toma en serio. A él le gusta jugar y juega. Y a veces se le pasa la mano y nos rompe una pierna y nos aplasta definitivamente. Pero esto sucede porque es un poco cegatón y bastante torpe de las manos.*

*Nos ha enviado a algunos tipos excepcionales como Buda, o Cristo o Mahoma, o mi tía Chofi, para que nos digan que nos portemos bien. Pero eso a él no le preocupa mucho: nos conoce. Sabe que el pez grande se traga al chico, que la lagartija grande se traga a la pequeña, el hombre se traga al hombre. Y por eso inventó la muerte: para que la vida -no tú ni yo- la vida sea para siempre.*

*Ahora los científicos salen con su teoría del Bing Bang... Pero ¿qué importa si el universo se expande interminablemente o se contrae? Esto es asunto sólo para agencias de viajes.*

*A mi me encanta Dios. Ha puesto orden en las galaxias y distribuye bien el tránsito en el camino de las hormigas. Y es tan juguetón y travieso que el otro día descubrí que ha hecho -frente al ataque de los antibióticos- ¡bacterias mutantes!*

*Viejo sabio o niño explorador, cuando deja de jugar con sus soldaditos de plomo y de carne y hueso, hace campos de flores o pinta el cielo de manera increíble.*

*Mueve una mano y hace el mar, mueve otra y hace el bosque. Y cuando pasa por encima de nosotros, quedan las nubes, pedazos de su aliento.*

*Dicen que a veces se enfurece y hace terremotos, manda tormentas, caudales de fuego, vientos desatados, aguas alevosas, castigos y desastres. Pero esto es mentira.*

*Es la tierra que cambia -y se agita y crece- cuando Dios se aleja.*

*Dios siempre esta de buen humor. Por eso es el preferido de mis padres, el escogido de mis*

*hijos, el más cercano de mis hermanos, la mujer más amada, el perrito y la pulga, la  
piedra más antigua, el pétalo más tierno, el aroma más dulce, la noche insondable, el  
borboteo de luz, el manantial que soy.*

*A mi me gusta, a mi me encanta Dios.*

*Que Dios bendiga a Dios.*

*Jaime Sabines*

LISTA DE ABREVIATURAS	
<b>LME</b>	Lesión de médula espinal
<b>AP</b>	Autorreactividad protectora
<b>A91</b>	Péptido neural modificado de la PBM
<b>LTME</b>	Lesión traumática de médula espinal
<b>L1-2</b>	Segmento lumbar
<b>C1-5</b>	Segmento craneal
<b>T8-10</b>	Segmento torácico
<b>FasL</b>	Ligando de FAS
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TNFR</b>	Receptor de TNF
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex
<b>TCR</b>	Receptor de linfocitos T
<b>T<sub>H1</sub></b>	Fenotipo de linfocitos T pro-inflamatorio
<b>T<sub>H2</sub></b>	Fenotipo de linfocitos T anti-inflamatorio
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>IL</b>	Interleucina
<b>NO</b>	Oxido nítrico
<b>EAE</b>	Encefalomiелitis autoinmune Experimental
<b>PBM</b>	Proteína básica de la mielina
<b>APLs</b>	Ligando peptídico modificado
<b>K</b>	Lisina

<b>A</b>	Alanina
<b>MP</b>	Metilprednisolona
<b>EM</b>	Esclerosis múltiple
<b>ACF</b>	Adyuvante completo de Freud
<b>IGF-1</b>	Insulin-like growth factor-1
<b>iNOS</b>	Sintasa inducible del óxido nítrico
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de cerebro
<b>NT3</b>	Neurotrofina 3
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
<b>BBB</b>	Prueba locomotora a campo abierto de Basso, Beattie & Bresnahan
<b>T-PER</b>	Extracción de proteínas de tejido reactivo
<b>SDS</b>	Duodecil sulfato de sodio
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletildamina
<b>PVDF</b>	Membrana de polivinilidenedifluoruro
<b>BSA</b>	Albumina de suero bovino
<b>TBS</b>	Amortiguador TRIS salino
<b>PT</b>	Patas traseras
<b>PD</b>	Patas delanteras
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>DNasa1</b>	Deoxyribonucleasa I
<b>dpl</b>	Días post-lesión

<b>PMNs</b>	Neutrófilos polimorfonucleares
<b>NFκB</b>	Nuclear factor-kappaB
<b>STAT</b>	Signal transducer and activator of transcription 3
<b>SOC3</b>	Suppressor of cytokine signaling 3
<b>TRADD</b>	Adaptador protein TNFR1- associated death domain
<b>RIP1</b>	Receptor-interacting protein 1
<b>FLIP</b>	FLICE inhibitory protein
<b>IAP</b>	Inhibitor of apoptosis protein
<b>BCL-2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>DISC</b>	Death-inducing signaling complex
<b>NMDA</b>	Receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato

## ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Células nerviosas y sus conexiones.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.1 Neuronas .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.2 Células neurogliales .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Sistema Nervioso Central y Periférico .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.1 Neuronas aferentes, neuronas eferentes e interneuronas .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Médula espinal .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3.1 Anatomía Macroscópica de la Médula espinal .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.2 Estructura interna de la Médula espinal .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.3 Sustancia Gris y Blanca, núcleos y tractos .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.3.1 Grupo de células nerviosas en los cordones grises anteriores.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.3.2 Grupo de células nerviosas en los cordones grises posteriores .....</b>	<b>30</b>
<b>2.3.3.3 Sustancia blanca .....</b>	<b>31</b>
<b>2.4 Vías sensitivas y motoras.....</b>	<b>31</b>
<b>2.4.1 Vías ascendentes o sensitivas .....</b>	<b>31</b>
<b>2.4.2 Vías descendentes o motoras .....</b>	<b>34</b>
<b>2.5 Lesión de Médula Espinal.....</b>	<b>37</b>
<b>2.5.1 Eventos neurodegenerativos después de la Lesión de Médula espinal.....</b>	<b>38</b>

<b>2.6 Inflamación .....</b>	<b>39</b>
<b>2.7 Apoptosis .....</b>	<b>43</b>
<b>2.8 Estrategias neuroprotectoras .....</b>	<b>44</b>
<b>2.9 Autorreactividad Protectora .....</b>	<b>46</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>49</b>
<b>4. PREGUNTA A RESOLVER .....</b>	<b>51</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>51</b>
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>51</b>
<b>7. HIPÓTESIS.....</b>	<b>51</b>
<b>8. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>52</b>
<b>8.1 Técnica de lesión de médula espinal.....</b>	<b>52</b>
<b>8.2 Inmunización con A91 .....</b>	<b>53</b>
<b>8.3 Extracción en fresco de Médula Espinal .....</b>	<b>53</b>
<b>8.4 Extracción de proteínas totales.....</b>	<b>54</b>
<b>8.5 Determinación de la proteína total por el método de Bradford .....</b>	<b>54</b>
<b>8.6 Western blot .....</b>	<b>54</b>
<b>8.6.1 Electroforesis de proteínas totales en gel de Poliacrilamida-SDS .....</b>	<b>54</b>
<b>8.6.2 Transferencia de proteínas totales a la membrana de PVDF.....</b>	<b>55</b>
<b>8.6.3 Anticuerpo Primario, Secundario y Revelado .....</b>	<b>56</b>
<b>8.7 Técnica de DAPI .....</b>	<b>57</b>
<b>8.8 Prueba locomotora BBB .....</b>	<b>57</b>

<b>9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>60</b>
<b>10. RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
<b>10.1. Tinción nuclear .....</b>	<b>60</b>
<b>10.2 Detección de caspasa-3.....</b>	<b>62</b>
<b>10.3 Detección de TNF-<math>\alpha</math> .....</b>	<b>64</b>
<b>10.4 Prueba motora BBB.....</b>	<b>66</b>
<b>11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
<b>12. CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>13.PERSPECTIVAS.....</b>	<b>75</b>
<b>15. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>75</b>

## RESUMEN

La lesión de médula espinal (LME) son las alteraciones estructurales y funcionales, que van desde el bloqueo transitorio de la conducta eléctrica, hasta la falta total de la misma, dependiendo del sitio y el grado de lesión, y que puede culminar con la muerte. Después de una LME, se desencadenan una serie de fenómenos autodestructivos que incrementan el daño al tejido nervioso. Entre ellos se destaca la apoptosis que se presenta en todo el tejido neural. La cascada de apoptosis se activa por citocinas inflamatorias producto de la lesión, incremento de calcio libre intracelular, daño por radicales libres y excitotoxicidad, entre otros.

Existen varias estrategias terapéuticas para proteger el tejido neural, entre ellas la inmunización con péptidos neurales modificados, como el A91, ha demostrado efectos importantes sobre la respuesta autorreactiva. La *autorreactividad protectora* (AP) es un concepto innovador que propone modular mecanismos autorreactivos con el fin de promover la neuroprotección, activando células de la microglía bajo un fenotipo que se caracteriza por una baja producción de radicales libres. La inmunización activa con péptidos neurales modificados como “A91” puede reducir la degeneración secundaria de neuronas y promover una mejor recuperación motora en animales con LME. A la fecha no se conocen con exactitud los mecanismos por medio de los cuales, la AP promueve la protección del tejido sin embargo, se ha sugerido que uno de los mecanismos puede ser la disminución en la producción de radicales libres y citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  los cuales se asocian a la inhibición de la apoptosis. Por ello se estudió el efecto neuroprotector del péptido A91 sobre la apoptosis del tejido neural, en animales con lesión traumática en la médula espinal.

Se evaluó la apoptosis en 72 ratas hembras de la cepa *Sprague Dawley* a los 7 y 30 días pos lesión. Se formaron tres grupos: 1) Ratas SHAM; 2) Ratas con LTME + PBS y 3) Ratas con LTME + inmunización activa con “A91”. Se determinó la activación de caspasa-3 y TNF- $\alpha$  mediante inmunoensayo de Western blot. Los cambios apoptóticos como condensación de la cromatina y fragmentación nuclear se visualizaron por tinción de Diclorhidrato 4',6-diamidino-2-fenilindol. Se determinó la recuperación en la habilidad locomotora en ratas con LTME a los 7 días y 30 días post lesión

Los resultados mostraron una disminución en la expresión de TNF- $\alpha$  y en la activación de la caspasa-3 al inmunizar a las ratas con el péptido “A91” a los 7 días post lesión, así como una disminución de la apoptosis a este mismo tiempo. Al evaluar la locomoción mediante la escala de BBB, se observó que las ratas inmunizadas con “A91” presentaron una recuperación significativa en la capacidad motora. Lo anterior sugiere que el péptido “A91” ejerce un efecto neuroprotector al reducir la apoptosis en la fase aguda a los 7 días después de la LME.

## 1. INTRODUCCIÓN

La lesión de médula espinal (LME) es un término amplio que se refiere al daño causado en la médula espinal debido a innumerables causas, las cuales originan en el individuo paraplejía o cuadraplejía dependiendo del sitio y el grado de lesión, y que puede culminar con la muerte. La LME, origina una serie de fenómenos autodestructivos que incrementan el daño al tejido nervioso. Entre dichos fenómenos podemos mencionar la apoptosis que se presenta en todo el tejido neural. La cascada de apoptosis es activada por citocinas inflamatorias, producto de la lesión, por incremento de calcio intracelular libre, por daño inducido por radicales libres y excitotoxicidad. Existen varias estrategias terapéuticas para proteger el tejido neural después de la LME, entre ellas la autorreactividad protectora (AP). La inmunización activa con péptidos como el “A91” puede reducir la degeneración secundaria de neuronas y promover una mejor recuperación motora en animales con LME (Moalem *et al.*, 1999; Hauben y *et al.*, 2000). A la fecha no se conocen con exactitud los mecanismos por medio de los cuales, la AP promueve la protección del tejido. Existen varios datos que sugieren que uno de esos mecanismos podría ser la inhibición o neutralización de la apoptosis. El presente proyecto pretende evaluar el efecto de la AP sobre el fenómeno apoptótico en el sitio de lesión.

## 2. MARCO TEÓRICO

Los organismos unicelulares y pluricelulares simples reaccionan ante estímulos químicos y físicos, con respuestas receptoras, motrices y secretoras. En los animales más complejos, las células especializadas denominadas neuronas o células nerviosas, transfieren información con rapidez entre distintas partes del cuerpo de un animal. Todas las células

de un organismo junto con sus células de sostén constituyen su sistema nervioso (Snell, 2010).

## 2.1 CÉLULAS NERVIOSAS Y SUS CONEXIONES

### 2.1.1 Neurona

Para cumplir con su función de comunicación, la neurona, lleva a cabo dos actividades distintas pero acopladas entre sí: la conducción de una señal desde una parte de la célula a otra y la transmisión sináptica, que consiste en la comunicación de células adyacentes. El contacto entre la terminación axónica y su objetivo se denomina sinapsis, las sinapsis pueden tener lugar entre las células nerviosas, o entre un axón y una célula no neuronal, como una fibra muscular. Un impulso o potencial de acción es una onda de despolarización eléctrica que se propaga a lo largo de la superficie de la membrana de la neurona. Cuando se aplica un estímulo a una parte particular de una neurona, se desencadena un impulso que se transmite a las demás partes de la célula. El citoplasma de las neuronas suele poseer unas proyecciones largas denominadas neuritas, cuyo extremo se encuentra muy cerca de la superficie de otras células. Las neuritas o proyecciones neuronales de los animales superiores suelen especializarse para formar dendritas y axones (Crossman y Neary, 2007). Los axones pueden ser mielínicos o amielínicos. Los axones mielínicos están cubiertos por una gruesa capa de material lipídico, denominado mielina, la cual está formada por capas de membrana plasmática derivadas de células satélite específicas. La mielina se extiende a lo largo del axón y está interrumpida a intervalos regulares por aberturas conocidas como nódulos de Ranvier. En los nódulos de Ranvier la membrana del axón no está cubierta de mielina si no que se encuentra en contacto directo con el líquido extracelular (Pocock *et al.*, 2006).

Dentro del sistema nervioso central (SNC), las dendritas de las neuronas se ramifican extensamente, y de esta forma pueden recibir información procedente de muchas zonas diferentes. Cada célula nerviosa da lugar a un axón individual, que puede ramificarse para contactar con una serie de objetivos diferentes. Las ramificaciones se denominan colaterales del axón. Cada rama termina en una pequeña protuberancia, la terminación axónica también es llamada terminación nerviosa (Figura 1).

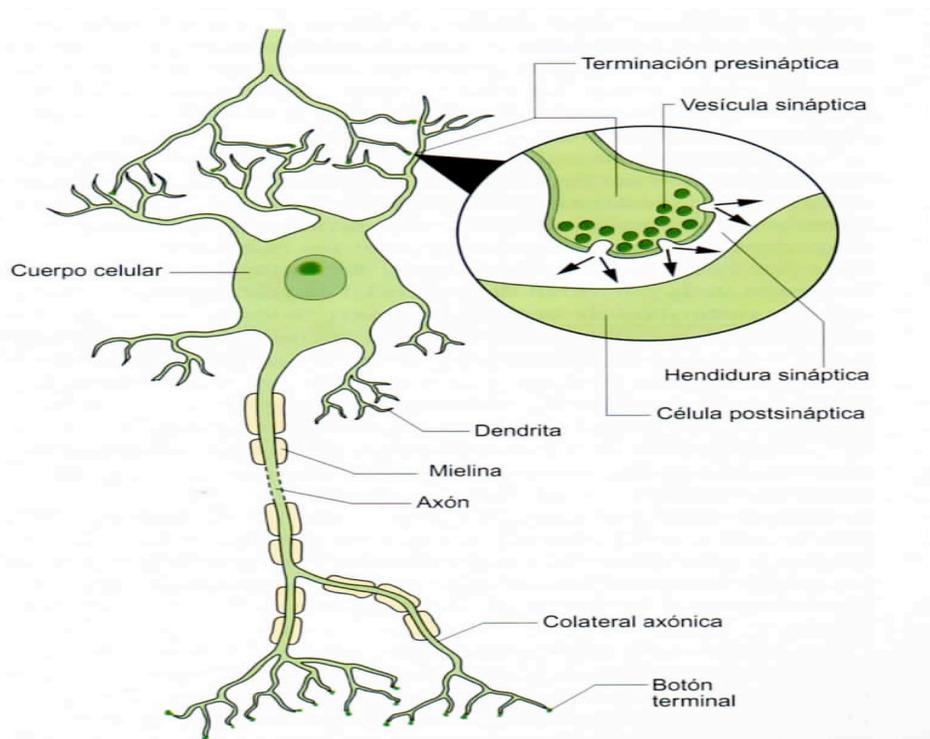


Figura 1. Representación esquemática de la neurona y la sinapsis.

La transmisión de la información a través de una sinapsis tiene lugar cuando un potencial de acción alcanza la terminación nerviosa presináptica. La terminación nerviosa se despolariza, y dicha despolarización da lugar a la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  dependientes de voltaje en la neurona presináptica. El  $\text{Ca}^{+2}$  penetra en la terminación nerviosa a favor de gradiente electroquímico con el consiguiente incremento del calcio

libre, que induce la fusión de una o mas vesículas sinápticas con la membrana presináptica (Pocock, *et al.*, 2006). De tal forma que la neurona al presentar un incremento en la concentración intracelular de este ion, forma el complejo Ca-calmodulina (CaCaM), que por sí mismo activa a una proteincinasa CaCaM- dependiente (PK-CaCaM). Este fenómeno conduce la fosforilación de la sinapsina-I, sustrato proteico, que en su forma sin fosforilar muestra una gran afinidad por las vesículas sinápticas evitando que sean liberadas del citoesqueleto; sin embargo, una vez que la sinapsina-I es modificada estructuralmente por la PK-CaCaM, pierde su afinidad por las vesículas sinápticas, que al separarse del citoesqueleto se fusionan entre sí en el espacio intersináptico, liberando al neurotransmisor (NT). En las terminaciones nerviosas, este proceso secretor es muy rápido y ocurre al cabo de 0,5 milisegundos (ms) de la llegada del potencial de acción (Mansilla-Olivares 2004).

Las células nerviosas utilizan una amplia variedad de moléculas de señalización como neurotransmisores, incluyendo la acetilcolina, la noradrenalina, el glutamato, el ácido g-aminobutirico (GABA), la serotonina (5-HT) y numerosos péptidos, como la sustancia P y la encefalina (Pocock, *et al.*, 2006).

El NT secretado difunde a través de la hendidura sináptica y se une a los receptores de la membrana postsináptica. Los acontecimientos ulteriores dependen del tipo de receptor presente. Si el receptor activa un canal iónico operado por un ligando, la transmisión sináptica suele ser rápida y de corta duración, y un ejemplo de ello es la acción de la acetilcolina en la unión neuromuscular. Si el NT activa un receptor acoplado a la proteína G, el cambio en la célula postsináptica es de inicio mucho más lento pero se prolonga durante un periodo mayor de tiempo, un ejemplo es la acción excitadora de la noradrenalina en los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos de los vasos sanguíneos periféricos. Cuando un NT (p.

ej., acetilcolina o glutamato) es liberado desde la terminación nerviosa presináptica y se une a canales catiónicos no selectivos abriéndolos, se produce una *transmisión sináptica excitadora rápida*. La apertura de estos canales provoca la despolarización de la célula postsináptica durante un periodo breve de tiempo. Esto cambia el potencial de membrana hasta el umbral requerido para la generación de un potencial de acción por lo que la célula postsináptica es más excitable, cuando la célula postsináptica es una neurona, la despolarización se denomina potencial postsináptico excitador, produce una sinapsis que se lleva a cabo de 1-5 ms (Pocock, *et al.*, 2006). El potencial de membrana está determinado por la distribución de los iones a través de la membrana plasmática y depende de la permeabilidad de membrana a dichos iones (Figura 2). En reposo, la membrana es mucho más permeable al potasio que al sodio y, por consiguiente, el potencial de membrana (aproximadamente -70mV) es parecido al potencial en equilibrio para el potasio (aproximadamente -90mV). Sin embargo, si la membrana tuviera la misma permeabilidad al sodio que al potasio, el potencial de membrana sería cero (es decir, la membrana estaría despolarizada). En consecuencia, cuando un NT como la acetilcolina abre un canal catiónico no selectivo en la membrana postsináptica, disminuye el potencial de membrana, es decir, la célula postsináptica se despolariza en el punto de estimulación. El valor exacto dependerá del número de canales que se hayan abierto, ya que esto determinará hasta qué punto ha aumentado la permeabilidad de la membrana al sodio en comparación con el potasio. (Pocock, *et al.*, 2006; Crossman y Neary, 2007; Elaine, 2008).

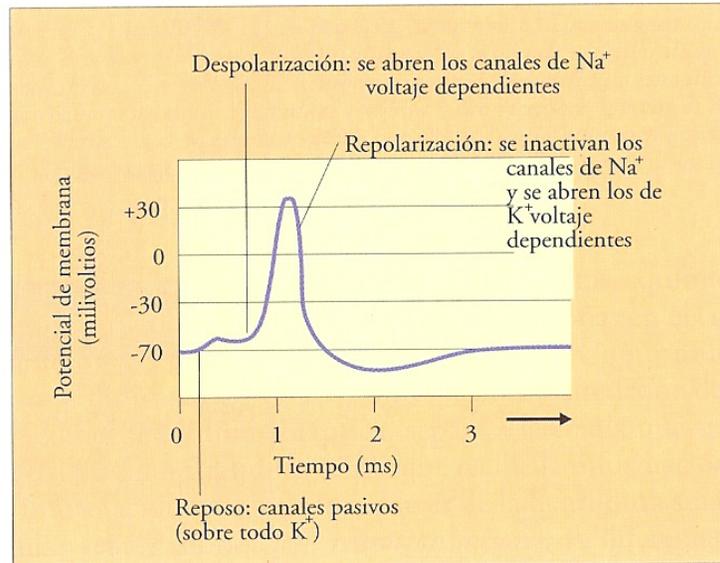


Figura 2. Potencial de membrana en reposo (Tomado de Curtis y Duarte, 2007).

*La transmisión sináptica inhibitoria rápida* tiene lugar cuando se libera un NT (como el GABA o la glicina), desde una terminación nerviosa presináptica y éste es capaz de unirse a su receptor ionotrópico, que al abrirse permiten la entrada de cloro. La apertura de dichos canales hace que la célula postsináptica se vuelva más negativa durante un periodo breve de tiempo (es decir, la membrana se *hiperpolariza*) (Pocock, *et al.*, 2006).

### 2.1.2 Células neurogliales

En el cerebro y la médula espinal se identifican cuatro clases principales de células no neuronales:

a) *Astroglía* o astrocitos. Estas son células con proyecciones prolongadas que efectúan uniones herméticas con los vasos sanguíneos. Las terminaciones de las proyecciones de los astrocitos se cierran herméticamente y forman una barrera adicional entre la sangre y el líquido extracelular del cerebro y la médula espinal. Esta barrera se conoce como barrera hematoencefálica (BHE) y sirve para prevenir los cambios en la composición de la sangre

que influyen en la actividad de las células nerviosas dentro del SNC (Snell, 2010). Además de mantener la integridad de la BHE (Sofroniew y Vinters, 2010), recientemente se les han adjudicado nuevas funciones como la capacidad de regular parte de la transmisión sináptica (Halassa *et al.*, 2009), así como el mantener la homeostasis del cobre (Scheiber y Dringen, 2012) y los niveles de colesterol (Chen *et al.*, 2012). Así mismo, protegen al SNC contra el estrés oxidante, principalmente porque producen y secretan enzimas antioxidantes (Dringen, 2000).

b) Los oligodendrocitos (oligodendroglía) presentan alrededor del 75% de todas las células gliales de la sustancia blanca, forman la vaina de mielina que rodea los axones neuronales, confiriendo un aumento de la velocidad de conducción de los potenciales de acción. En el sistema nervioso periférico, las vainas de mielina están formadas por las células de Schwann (Berghmans *et al.* 2012). Los oligodendrocitos son una de las principales células que mueren por apoptosis y son la causa de la rápida desmielinización, la gliosis y la activación de la microglía, que forman parte de las lesiones en la esclerosis múltiple y LME (Snell, 2010; Caprariello *et al.*, 2012).

c) La microglía son células diseminadas por toda la sustancia gris y la sustancia blanca. Desempeña un papel fagocitario en respuesta a una lesión dentro del SNC. La microglía/macrófagos localizados dentro del epicentro de la lesión producen factores neurotóxicos como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que contribuye a la desmielinización y regeneración axonal (Emmesberger y Tsirka, 2012).

d) Las células endoteliales tienen cilios que revisten los espacios centrales llenos de líquido del cerebro (los ventrículos cerebrales) y el canal central de la médula espinal.

Forman un epitelio cuboidal columnar que recibe el nombre de epéndimo (Pocock, *et al.*, 2006; Crossman y Neary, 2007; Snell, 2010).

## 2.2 Sistema Nervioso Central y Periférico

El Sistema Nervioso se divide en dos partes principales, con propósitos descriptivos: el SNC, que consiste en el encéfalo y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico (SNP), que consiste en nervios craneales y espinales y sus ganglios asociados.

Del SNC, el encéfalo y la medula espinal son los centros principales donde ocurre la correlación y la integración de la información nerviosa. Tanto el encéfalo como la médula espinal se encuentran protegidos por las meninges, suspendidos en el líquido cefalorraquídeo y por los huesos del cráneo y la columna vertebral. El interior del sistema nervioso está organizado en sustancia gris y sustancia blanca.

Mientras que en el SNP, son los nervios craneales y espinales, que consisten en haces de fibras nerviosas o axones, los que conducen información que ingresa en el SNC y que sale de él. Aunque están rodeados de vainas fibrosas en su trayecto hacia diferentes partes del cuerpo, se encuentran relativamente desprotegidos y es común que resulten dañados en traumatismos (Snell, 2010).

El sistema nervioso autónomo es la parte del sistema nervioso que proporciona inervación a las estructuras involuntarias del organismo, como corazón, músculo liso y glándulas. Se distribuye en todo el SNC y SNP. El sistema nervioso autónomo se divide en dos partes simpático y parasimpático, y en ambas partes existen fibras nerviosas aferentes y eferentes. Las actividades de la división simpática del sistema autónomo preparan al cuerpo para una emergencia. Las actividades de la división parasimpática están dirigidas a conservar y restablecer la energía (Crossman y Neary, 2007; Snell, 2010).

### 2.2.1 Neuronas aferentes, neuronas eferentes e interneuronas

Las células nerviosas que transportan información desde receptores periféricos al SNC se conocen como neuronas aferentes. Si la información que transportan alcanza finalmente un nivel consciente se denomina también neuronas sensitivas. No obstante, la gran mayoría de neuronas residen completamente dentro del SNC, las células que participan en los circuitos nerviosos locales se denominan **interneuronas**, a pesar de que muchas de ellas tienen unos axones muy largos. Existen tres categorías principales de neuronas en la sustancia gris medular. Las neuronas eferentes que conducen impulsos nerviosos en el asta anterior a lo largo del SNC y si inervan a algún músculo esquelético (motoneuronas); Los cuerpos celulares de las células de tractos, cuyos axones constituyen los fascículos ascendentes de la sustancia blanca, se encuentran principalmente en el asta posterior (motoneuronas alfa y gamma) (Kiernan, 2009; Snell, 2010).

### 2.3 MÉDULA ESPINAL

La médula espinal y los ganglios de la raíz posterior son los responsables de la inervación de la mayor parte del cuerpo. Las fibras aferentes sensoriales entran en la médula a través de las raíces posteriores de los nervios raquídeos, y las fibras motoras y otras fibras eferentes salen de ella por las raíces anteriores (ley de Bell-Mangendie). Las señales que se originan en las terminaciones nerviosas desencadenan reflejos en la médula espinal y son retransmitidos al tronco encefálico y al cerebelo y contribuyen a formar los circuitos que controlan la actividad motora y otras funciones.

La información sensorial se transmite también en sentido craneal hacia el tronco encefálico, el tálamo y la corteza cerebral donde entra a formar parte de la experiencia consciente y pueden generar respuestas conductuales inmediatas o diferidas. Las

motoneuronas de médula espinal pueden ser excitadas o inhibidas por impulsos que se originan en diversos niveles del encéfalo, desde el bulbo raquídeo hasta la corteza cerebral (Latarjet, 2005; Snell, 2010).

### 2.3.1 Anatomía macroscópica de la médula espinal

La médula espinal es una estructura cilíndrica y ligeramente aplanada en dirección anteroposterior, que está contenida en el canal raquídeo de la columna vertebral. La protección de la médula espinal la garantizan no solo las vértebras y sus ligamentos, sino también las meninges y la amortiguación que proporciona el líquido cefalorraquídeo (Puelles- López, 2008; Snell, 2010).

La capa mas interna de las meninges es la piamadre, una capa delgada que se adhiere a la superficie de la médula espinal. La duramadre es la capa más externa; forma un tubo grueso que se extiende desde la segunda vértebra sacra hasta el agujero occipital en la base del cráneo, donde se continúa con la duramadre que rodea al encéfalo.

La aracnoides se encuentra por el lado interno de la duramadre, donde forma el límite externo del espacio subaracnoideo, un área llena de líquido. La médula espinal está suspendida en la vaina de la duramadre por medio de ligamentos dentados a cada lado, unas estructuras de tejido pioaracnoideo en forma de cintas que están fijadas a la medula en un área media entre las raíces anteriores y posteriores (Latarjet, 2005).

La médula presenta agrandamientos fusiformes en la región cervical, donde da origen al plexo braquial, y en las regiones dorsal inferior y lumbar, donde da lugar al plexo lumbrosacro; los dos agrandamientos se conocen como intumescencia cervical y lumbar. En la porción inferior, la médula espinal se afina para formar el cono medular, desde cuyo

extremo desciende una prolongación de la piamadre, el filum terminal que acaba conectando con la superficie posterior del cóccix (Kiernan, 2009; Snell, 2010).

La naturaleza segmentaria de la médula espinal la demuestra la presencia de 31 pares de nervios raquídeos, pero su estructura interna apenas muestra indicios de segmentación. Cada raíz posterior se divide en una serie de raicillas que se fijan a la médula a la largo del segmento correspondiente. Del mismo modo, la raíz anterior surge como una serie de raicillas. Cada nervio raquídeo se divide en dos ramos primarios, uno anterior y otro posterior. El ramo primario posterior inerva la piel de la espalda y los músculos que se insertan en ambos extremos a diversas partes de la columna vertebral. En los plexos cervical, braquial, lumbrosacro, los ramos primarios anteriores se unen, intercambian fibras y se ramifican en nervios mixtos que llevan fibras nerviosas motoras y sensitivas hacia la piel y los músculos de las partes lateral y anterior del tronco y las extremidades (Puelles-López, 2008).

Hasta el tercer mes de vida fetal, la médula espinal ocupa la totalidad del conducto vertebral. En adelante, el ritmo de elongación de la columna vertebral excede al de la médula espinal; como resultado, al nacimiento la médula espinal termina a nivel de la tercera vértebra lumbar (L3) y en el adulto a nivel del disco intervertebral entre L1 y L2.

En el sujeto vivo, el nivel aproximado de los segmentos de la médula espinal puede identificarse por medio de la referencia de las apófisis espinosas posteriores de las vertebrae. Como regla general, los segmentos cervicales de la médula espinal se sitúan aproximadamente una apófisis espinosa por encima de sus correspondientes vertebrae (p. ej., el segmento medular C7 se sitúa adyacente a la vertebra C6), los segmentos torácicos se localizan aproximadamente dos apófisis espinosas por encima y los segmentos lumbares de

tres a cuatro apófisis espinosas por encima y los segmentos lumbares de tres a cuatro apófisis por encima de sus correspondientes vértebras.

### 2.3.2 Estructura interna de la médula espinal

La médula espinal se compone de un núcleo interno de sustancia gris, rodeado de una cubierta externa de sustancia blanca (Figura 3).

La sustancia gris aparece en una sección transversal como un pilar en forma de H, con columnas o cordones de sustancia gris anterior y posterior, unida por una comisura gris fina que contiene el pequeño canal central o conducto endimario. En los segmentos dorsales y lumbares superiores se añade un asta lateral, que contiene neuronas pre-ganglionares simpáticas (Crossman y Neary, 2007; Kiernan, 2009).

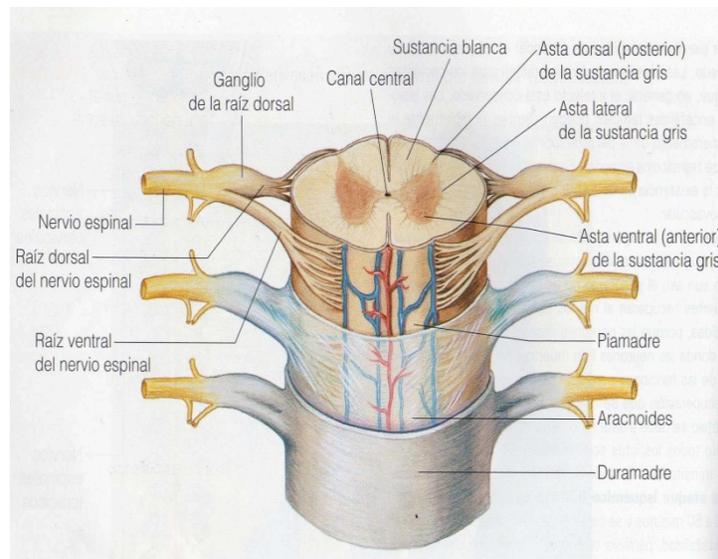


Figura 3. Estructura interna de la médula espinal

### 2.3.3 Sustancia gris y blanca, núcleos y tractos

#### 2.3.3.1 Grupo de células nerviosas en los cordones grises anteriores

La mayoría de las células nerviosas son grandes y multipolares, y sus axones pasan a las raíces anteriores de los nervios espinales como *eferentes alfa* que inervan los músculos esqueléticos. Las células nerviosas más pequeñas también son multipolares, y los axones de muchas de ellas pasan a las raíces anteriores de los nervios espinales como *eferentes gamma*, que inervan las fibras musculares intrafusales de los husos neuromusculares. Para fines prácticos, las células nerviosas del cordón gris anterior pueden clasificarse en tres grupos básicos: medial, central y lateral.

El grupo medial se halla presente en la mayoría de los segmentos de la médula espinal, y es responsable de la inervación de los músculos esqueléticos del cuello y del tronco, entre ellos la musculatura intercostal y la abdominal.

El grupo central es el más pequeño, y está presente en algunos segmentos cervicales lumbrosacros.

En la porción cervical de la médula, algunas de esas células nerviosas (segmentos C3-5) inervan de modo específico el diafragma, y son conocidas en conjunto como **núcleo frénico**. En los cinco o seis segmentos cervicales superiores, algunas células nerviosas inervan los músculos esternocleidomastoideo y trapecio, y son conocidas como **núcleo accesorio**. Los axones de estas forman la parte espinal del nervio accesorio. El **núcleo lumbrosacro**, presente desde el segundo segmento lumbar de la médula hasta el primero sacro, está constituido por células nerviosas cuyos axones tienen una distribución desconocida.

El grupo lateral se halla presente en los segmentos cervicales y lumbrosacro de la médula, y es responsable de la inervación de los músculos esqueléticos de los miembros (Crossman y Neary, 2007; Snell, 2010).

### 2.3.3.2 Grupos de células nerviosas en los cordones grises posteriores

Existen cuatro grupos de células nerviosas del cordón gris posterior dos de ellos se extienden a toda longitud de la médula, y otros dos están limitados a los segmentos dorsal y lumbar.

El grupo de la sustancia gelatinosa está situado en el ápex del cordón gris posterior en toda la longitud de la médula espinal. Está compuesto en gran parte por neuronas de tipo II de Golgi y recibe fibras aferentes relacionadas con el dolor, la temperatura y el tacto desde las raíces posteriores. Además, recibe información de fibras descendentes desde niveles supraespinales. Se cree que la información de las sensaciones del dolor y la temperatura son modificadas por la información excitadora o inhibitoria de otras fibras sensitivas y por la información procedente de la corteza cerebral.

El núcleo propio es un grupo de grandes células nerviosas, situado anterior a la sustancia gelatinosa a lo largo de la médula espinal. Constituye la masa principal de células en el cordón gris posterior, y recibe fibras del cordón blanco posterior relacionado con las sensaciones de posición y movimiento (propiocepción), la discriminación entre dos puntos y la vibración (Latarjet, 2005; Snell, 2010).

El núcleo dorsal (columna de Clarke) está formado por un grupo de células nerviosas situadas en la base de la columna gris posterior, que se extiende desde el octavo segmento cervical en sentido caudal hasta el tercer o cuarto segmento lumbar. La mayor parte de las células son relativamente grandes y guardan relación con terminales propioceptivas (husos neuromusculares y tendinosos).

El núcleo aferente visceral es un grupo de células nerviosas de tamaño medio, lateral al núcleo dorsal; se extiende desde el primer segmento dorsal hasta el tercer segmento lumbar

de la médula espinal. Se sugiere que está relacionado con la recepción de información visceral aferente. (Snell, 2010).

#### 2.3.3.3 Sustancia blanca

La sustancia blanca consiste en tres cordones. El cordón posterior está limitado por la línea media y el asta gris posterior; consiste en un fascículo grácil, que se prolonga en toda longitud de la médula, por encima del nivel dorsal medio, un fascículo cuneiforme en situación lateral. El resto de la sustancia blanca lo ocupan los cordones anterior y lateral, entre los cuales no hay demarcación anatómica. Las fibras nerviosas se decusan en la comisura blanca anterior. El tracto posterolateral (o de Lissauer) ocupa el área situada entre el vértice del asta posterior y la superficie de la médula. La sustancia blanca consiste en haces de fibras (tractos o fascículos) parcialmente superpuestas (Kiernan, 2009).

### 2.4 Vías sensitivas y motoras

En las actividades de la vida, la médula espinal es un intermediario entre la periferia y los centros nerviosos superiores. En ella se encuentran, fascículos que transportan impulsos sensitivos (ascendentes) y motores (descendentes).

#### 2.4.1 Vías ascendentes o sensitivas

Deben distinguirse las de sensibilidad exteroceptiva o cutánea, las de la sensibilidad propioceptiva o profunda, y las de sensibilidad interoceptiva o visceral.

Vías de sensibilidad exteroceptiva o cutánea. Se trata de una sensibilidad consciente, cuyo punto de partida se encuentra en los receptores sensoriales de la piel, cada uno de los cuales posee una especialización precisa (sensibilidad al calor, al contacto, al dolor, etc.). Estos

receptores están unidos a la neurona unipolar del ganglio espinal, cuya prolongación central puede tener un destino diferente:

- Sensibilidad termoanalgésica (temperatura y dolor): la prolongación central, llega a la cabeza del asta posterior donde se pone en contacto con una neurona, su axón atraviesa la línea mediana de la comisura gris y llega al cordón lateral del lado opuesto en las proximidades del asta anterior. Aquí el axón se dirige desde abajo, hacia arriba, en dirección a los centros superiores. El conjunto de estos axones forma el tracto espinotalámico lateral, situado por fuera de la cabeza del asta anterior de la médula espinal.

- Sensibilidad táctil protopática (grosera): el trayecto del axón es bastante semejante, pero el axón de la segunda neurona va a ubicarse en el tracto situado por delante y medial del precedente, por delante del asta anterior: es el tracto espinotalámico anterior. El conjunto de los dos tractos espinotalámicos forma el sistema anterolateral.

- Sensibilidad táctil epicrítica (fina): sus fibras pasan por el cordón posterior. No cruzan la línea media en la sustancia gris cercana al conducto central, lo que explica que en la agresión degenerativa de esta sustancia gris (siringomielia), la sensibilidad epicrítica persista, mientras que las otras sensibilidades exteroceptivas están suprimidas (disociación siringomiélica).

Vías de la sensibilidad propioceptiva o profunda. Es la de las articulaciones y de los músculos; desempeña una acción muy importante en las actividades musculares, ayudando al sentido de la actitud. Es una sensibilidad consciente e inconsciente:

- Sensibilidad consciente: transmite sensaciones propioceptivas. La primera neurona se encuentra en el ganglio espinal. Su prolongación central no pasa por el asta posterior, sino que penetra directamente en el cordón posterior del mismo lado y asciende, entonces, verticalmente hacia los centros superiores. A medida que estos axones llegan al cordón

posterior, rechazan hasta la línea media a los que han penetrado más abajo. Así en la parte alta de la médula espinal, las fibras de origen cervical son las más laterales, las de origen sacro, las más mediales. En la cara posterior de la médula espinal un surco longitudinal, el intermedio posterior, parece separar este fascículo posterior en dos porciones: la parte medial o fascículo grácil (fascículo de Goll), y la parte lateral o fascículo cuneiforme (fascículo de Burdach).

Sensibilidad profunda inconsciente: transmite esencialmente a los centros superiores (en especial el cerebeloso) impulsos concernientes a la posición de los diferentes segmentos de los miembros. Permite a los centros enviar impulsos concernientes a la posición de los diferentes segmentos de los miembros, así como a los centros enviar impulsos correctores de toda variación de esta posición. Se halla, en la base de la regulación del tono muscular, de la estática y del movimiento. El cuerpo de la primera neurona se encuentra en el ganglio espinal, su prolongación central termina en la parte media del asta posterior. Allí hace sinapsis con la segunda neurona, situada en el núcleo torácico posterior (núcleo de Clarke) para los miembros que corresponden a los miembros inferiores y al tronco. El axón atraviesa en seguida la sustancia gris para formar el tracto espinocerebeloso posterior, en la parte posterior del cordón lateral del mismo lado. Los núcleos provenientes de los miembros superiores hacen sinapsis en el núcleo de la región lateral de la sustancia gris medular. El axón cruza entonces la línea mediana situada en la sustancia gris, alrededor del conducto central, y llega a la parte anterior del cordón lateral del lado opuesto, formando el tracto espinocerebeloso anterior. Los axones de este haz terminan en el cerebelo.

Vías de sensibilidad interoceptiva. Transmiten la sensibilidad visceral, sus vías siguen un recorrido paralelo a las de la sensibilidad somática en la sustancia gris de la médula espinal

#### 2.4.2 Vías descendentes o motoras

Se distinguen de las vías motoras voluntarias, provenientes de la circulación precentral de la corteza cerebral, y las vías motoras involuntarias, originadas en diferentes centros nerviosos, profundos en relación con la corteza cerebral.

**Motricidad de origen cortical.** Vías piramidales: se originan en las grandes células de la circunvolución central. Sus axones se agrupan en la parte alta de la médula espinal en dos contingentes: uno que cruza la línea mediana en el bulbo raquídeo (del tracto corticoespinal lateral), y otro que desciende directamente en la médula espinal (el tracto corticoespinal anterior).

A. Tracto corticoespinal lateral (piramidal cruzado): desciende por la parte media del pedúnculo cerebral; es grueso, forma los 4/5 del haz piramidal, del que representa una de las divisiones que se producen en el bulbo raquídeo; en ella se aleja del tracto corticoespinal anterior, se dirige hacia atrás y medialmente cruza la línea mediana constituyendo la decusación de las pirámides, y luego se inflexiona para descender en el cordón lateral de la médula espinal, en contacto con el asta posterior. A la altura de cada mielómero penetran axones en la cabeza del asta anterior del mismo lado, y hacen sinapsis con el cuerpo celular de la segunda neurona. El axón de esta neurona deja entonces la médula espinal por la raíz anterior, para alcanzar el músculo estriado correspondiente.

B. Tracto corticoespinal anterior (piramidal directo): participa en la formación del cordón anterior de la médula espinal, en contacto con la fisura mediana, situado en la parte medial del cordón anterior. Sus axones lo abandonan en cada mielómero, atravesando la línea mediana para terminar en el asta anterior opuesta. Allí la segunda neurona que se encuentra es idéntica a la que ya se ha descrito precedentemente. Por lo tanto, todas las vías motrices

voluntarias son cruzadas, sea en el bulbo o en la médula espinal. A una lesión de la circunvolución precentral corresponde una parálisis del lado opuesto (hemiplejía).

Motricidad de origen subcortical. Vías extrapiramidales. En algunos casos no obedecen a la voluntad pero transportan impulsos que provienen de determinado número de centros situados a lo largo del neuroeje. Estos centros reciben impulsos sensitivos diversos a partir de los cuales envían impulsos motores correctos que animan la actividad motriz automática. Intervienen también en la preparación para efectuarlos movimientos “voluntarios”, colaborando con la vía piramidal. Se distinguen 5 tractos:

- Tracto rubroespinal: controla la función motora los músculos del hombro y brazo, y control fino del movimiento de los dedos, proviene del **núcleo rojo**; esta situado en el cordón lateral, delante del tracto piramidal cruzado.
- Tracto olivoespinal: se relaciona con el mantenimiento del equilibrio, esta constituido por neuronas cuyos cuerpos celulares asientan en el núcleo olivar inferior, sus axones terminan en el asta anterior homolateral y esta situado en el cordón anterior.
- Tracto reticuloespinal: controlan la posición del tronco y los músculos de las extremidades, facilitan o inhiben la actividad refleja, esta formado por neuronas cuyos cuerpos celulares asientan en la formación reticular del tronco cerebral. Sus axones descienden por el cordón anterior homolateral y terminan en el asta anterior del mismo lado. Otras fibras descienden en el cordón lateral de la médula espinal, por fuera de la cabeza del asta anterior.
- Tracto tectoespinal: orienta los movimientos de los ojos y de la cabeza hacia los estímulos, es estrecho y esta constituido por neuronas cuyos cuerpos asientan en el colículo superior; sus axones descienden entre el haz longitudinal medial, atrás, y el

lemnisco medial adelante. En la médula espinal, algunos haces se sitúan en el cordón anterior y otros en el cordón lateral, por fuera de la cabeza del asta anterior de la médula. En la curvatura de su trayecto esta acompañado por fibras del tracto tectobulbar.

- Tracto vestibuloespinal: participa en el control de los músculos antigravitatorios, sus fibras motoras se originan en el núcleo vestibular y participan en el control del equilibrio. Desde su origen se dividen en dos grupos de fibras, uno cruzado, más voluminoso, y el otro directo, delgado. En el bulbo raquídeo desciende detrás del núcleo olivar inferior y luego a lo largo del borde lateral del núcleo del nervio accesorio. En la médula espinal recorre el cordón anterior cerca de la fisura mediana. Termina en el asta anterior homolateral para las fibras cruzadas y del tracto contralateral, para las fibras directas. Las fibras provenientes de la parte ventrosuperior del núcleo vestibular lateral terminan en los segmentos medulares cervicales; las que provienen de la parte dorsoinferior de este núcleo terminan en los segmentos lumbrosacros, y las que se originan en la parte intermediaria del núcleo terminan en los segmentos medulares torácicos.
- En cada mielómero, los axones de estos tractos están en relación con una neurona motora del asta anterior, al igual que las vías de la motricidad voluntaria. Así las células del asta anterior de la médula forman la segunda neurona de todas las vías motrices piramidales y extrapiramidales. Es la vía final común (Latarjet, 2005; Crossman y Neary, 2007; Puellas-López, 2008; Elaine, 2008; Snell, 2010).

## 2.5 Lesión de Médula espinal

La médula espinal, como parte del SNC, también se encuentra protegida por el líquido cefalorraquídeo, meninges, por los huesos de la columna vertebral y el cráneo, pero si se le aplica una fuerza de suficiente magnitud, estas estructuras protectoras pueden verse superadas por el daño consecutivo del tejido nervioso subyacente. Además pueden lesionarse los nervios craneales y raquídeos, así como los vasos sanguíneos, haciendo que los daños sean irreversibles (Newmann *et al.*, 2003).

La lesión traumática en el SNC resulta de una interrupción de la BHE, que conlleva a la infiltración de macrófagos, neutrófilos y otros componentes del sistema inmune que pueden agravar la lesión y afectar subsecuentemente la reparación y la regeneración. (Beck *et al.*, 2010). Los daños mecánicos en la médula espinal generan procesos de autodestrucción que contribuyen a la neurodegeneración post-traumática (Martíñon e Ibarra, 2008).

La LME es un problema de salud pública que en la mayoría de los casos afecta a población en edad económicamente activa (20 a 35 años de edad). La LME tiene profundos efectos económicos, físicos y emocionales; se estima que el costo anual de atención médica para todos los pacientes lesión traumática de médula espinal (LTME) rebasa los seis billones de dólares en Estados Unidos de Norteamérica (Díaz-Ruiz *et al.*, 2002a). Con una incidencia anual de 40 casos por millón de habitantes y una relación 4:1 de hombres con respecto a las mujeres. En el Distrito Federal la incidencia anual de traumatismos medulares es aproximadamente 18.1 casos por millón de habitantes (Pardini, 1998; Mondaca-Estrada *et al.*, 2008).

De acuerdo con estudios epidemiológicos, la incidencia que se presenta es de 50% en accidentes automovilísticos, 22% en accidentes de trabajo o domésticos, 15% actos de violencia, 8% deportes y 5% por enfermedades (Guimarães y Freire, 2009).

### 2.5.1 Eventos neurodegenerativos después de una LTME

La LME, ocasiona alteraciones estructurales y funcionales que van desde el bloqueo transitorio de la conducta eléctrica, hasta la falta total de la misma, dependiendo del grado de lesión (Goodkin y Campbell, 1979; Newman *et al.*, 2003). Después de producirse una lesión medular se desencadena una serie de mecanismos autodestructivos que originan discontinuidad del parénquima medular con secuelas a largo plazo (Lemke *et al.*, 1987; Akdemir *et al.*, 2008).

La lesión primaria de la médula espinal inicia una secuencia de eventos que conducen a daños secundarios, sin embargo, los mecanismos exactos responsables de estos daños no se conocen con exactitud (Akdemir *et al.*, 2008). Después de la lesión, el daño en la médula espinal es provocado por dos eventos, el mecanismo de lesión por sí mismo y su intensidad. El mecanismo de lesión es conocido como lesión primaria y es el resultado directo del trauma inicial, causando una perturbación del tejido neural (principalmente axones) y vasos sanguíneos (Martíñon e Ibarra, 2008). Mientras que la intensidad también es importante, ya que es un factor que puede influir directamente sobre el resultado de algunos fenómenos secundarios (Braugher y Hall, 1992). Los estudios experimentales y las observaciones clínicas han establecido que la lesión secundaria de la médula espinal es originada por una serie de cambios fisiopatológicos dependientes del tiempo, que inician en los primeros minutos, días o semanas después de la LME sobreviene la muerte celular por apoptosis (Guizar-Sahagún *et al.*, 1994; Jou *et al.*, 1998).

Los procesos secundarios se propagan a través de múltiples mecanismos moleculares que se desarrollan inmediatamente después de la lesión primaria. Entre los mecanismos destructores secundarios se encuentra la pérdida de regulación iónica, en la que el exceso de calcio libre intracelular activa las proteasas neutras que destruyen los neurofilamentos

del citoesqueleto axonal, observándose en las primeras horas o días después de la lesión un colapso y fragmentación axonal (Young y Koreh, 1986). 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, dentro de los cuales se encuentran la producción de radicales libres, lipoperoxidación, intensidad de la respuesta inflamatoria, estando todos estos fenómenos altamente relacionados (Braugher y Hall, 1992; Santoscoy *et al.*, 2002). Además hay liberación de NT con efectos tóxicos, entre los NT más importantes se encuentran los aminoácidos excitatorios (glutamato y aspartato), las monoaminas y los neuropéptidos que también contribuyen a la lesión, ya que muchos de ellos originan la alteración del flujo sanguíneo, isquemia local, formación de edema, necrosis del tejido, desmielinización e inflamación así como incremento de calcio intracelular y perturbación de la función mitocondrial.

Además el calcio libre también activa proteasas y fosfolipasas que actúan sobre la mielina destruyéndola y activando mecanismos intracelulares de apoptosis (Goodkin y Campbell, 1979; Martiñon e Ibarra, 2008). La fase aguda de la inflamación celular en LME se compone principalmente de neutrófilos, macrófagos / microglía, y células T (Beck *et al.*, 2010).

## 2.6 Inflamación

La inflamación de un tejido lesionado recluta células y moléculas de la inmunidad innata que salen de la sangre y entran al tejido amplificando el sitio de lesión (Murphy *et al.*, 2008). El SNC se considera como un órgano inmune privilegiado, debido a la existencia de la BHE que regula el paso de células inflamatorias y mediadores del torrente sanguíneo al parénquima cerebral (Schwartz *et al.*, 1999). Actualmente se cuestiona este grado de

privilegio (Schwartz y Shechter, 2010). De hecho, se conoce la existencia de la activación del sistema inmune innato y se ha descrito la presencia de un número muy reducido de linfocitos (1-3/mm<sup>3</sup>) en el LCR de pacientes sanos (Cuenca- López *et al.*, 2010).

Por otro lado, el SNC dispone de células inflamatorias innatas, como la microglía y los macrófagos, las cuales poseen una función importante en la recepción y propagación de señales inflamatorias. La respuesta inflamatoria en el SNC se caracteriza por la activación de la microglía y astrocitos, y por la expresión de mediadores inflamatorios clave, con una limitada invasión de células inflamatorias circulantes. Este hecho puede aumentarse por la inducción rápida de la expresión de mediadores inflamatorios, como las citocinas, quimiocinas y prostaglandinas, que sobrerregulan las moléculas de adhesión y aumentan la permeabilidad de la BHE, facilitando la invasión de células inflamatorias circulantes, con la consecuente liberación de moléculas potencialmente tóxicas para las neuronas cerebrales.

En condiciones normales, la BHE evita que las células del sistema inmunológico entren al SNC. Sin embargo cuando las células de la BHE pierden su integridad producto de un traumatismo las células del sistema inmunológico invaden el tejido nervioso y desencadenan una respuesta celular mediada por neutrófilos, células T, macrófagos y monocitos. Los mediadores inflamatorios como las citocinas inducen la activación de macrófagos y microglía en el SNC después de una LME, polarizando una respuesta Th1 (Gaur *et al.*, 1997).

La coordinación de la respuesta inmune se lleva a cabo mediante la liberación de citocinas como IL-1 $\beta$  IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , dependiendo del tipo de citocinas producidas y la cantidad será el tipo de respuesta que tendrá el sistema inmunológico (Murphy *et al.*, 2008).

Las citocinas pro-inflamatorias activan a la microglía. La microglía son células inmunocompetentes derivadas de monocitos-macrófagos residentes del SNC, cuyas características morfofuncionales les confieren múltiples papeles en las patologías del SNC, sintetizan numerosas citocinas responsables de la regulación autocrina y la comunicación con neuronas, astrocitos e infiltrados leucocitarios (Zamorano *et al.*, 2001). Su activación incluye proliferación, transformación fagocítica, aumento de moléculas activas, liberación de citocinas y factores de crecimiento, y producción de mediadores como el óxido nítrico (NO) y eventualmente especies reactivas de oxígeno (ERO) (Díaz-Ruiz *et al.*, 2002b). La activación microglial probablemente es tanto beneficiosa como dañina. Inicialmente, la microglía activada es neuroprotectora. Sin embargo, cuando la activación es persistente, la microglía se hace citotóxica generando un aumento en las ERO contribuyendo al incremento del daño después de una lesión medular (Von Bernhardi, 2007). También la neurotoxicidad causada por el ataque de los radicales libres (RL) a las biomoléculas del tejido nervioso (estrés oxidante) en el SNC es particularmente sensible al ataque de los RL por varias razones. La membrana celular lipídica es rica en colesterol y ácidos grasos poliinsaturados los cuales son blanco preferencial de los RL de oxígeno. Además el SNC es rico en hierro, y éste es el principal inductor de la producción de RL después de una lesión en el propio SNC. Cuando ocurre una LME, los RL también atacan a otras biomoléculas como las proteínas, el DNA y el RNA provocando mutaciones o daños irreversibles que llevan a la muerte celular (Zwart *et al.*, 1998).

En el caso de las células T son activadas específicamente por unión al receptor de linfocitos T (TCR) con moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) (del inglés major histocompatibility complex) clase II y el antígeno, formando un complejo trimolecular sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno (astrocitos,

microglía activada) en asociación con factores coestimulantes apropiados. (Karin *et al.*, 1994). Los linfocitos T<sub>H1</sub> proliferan liberando citocinas pro-inflamatorias como son: TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-12 y los linfocitos T<sub>H2</sub> secretan otro repertorio de citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10 (Tran *et al.*, 2001).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es una sustancia química del grupo de las citocinas pro-inflamatorias se libera por células del sistema inmune. En el SNC, esta citocina constituye el principal mediador de inflamación que induce una cascada de eventos celulares que culminan con la muerte neuronal. El TNF- $\alpha$  posee una diversidad de funciones implicadas en la defensa inmunitaria, homeostasis celular y protección frente a varios tóxicos neurológicos. Las acciones biológicas de TNF- $\alpha$  están mediadas por dos tipos de receptores celulares: el receptor 1 (TNFR1, p55) y el receptor 2 (TNFR2, p75) por los que muestra una afinidad equivalente (Gupta y Gollapudi, 2005; Wajant y Scheurich, 2012). Durante el proceso inflamatorio TNF- $\alpha$  tiene un papel clave como mediador de muerte celular, activa a TNFR1, la proteína adaptadora FADD media la activación de la caspasa-8 (caspasa iniciadora). La caspasa-8 una vez activada, desencadena la activación de otras caspasas, entre las que se incluye la caspasa-3 (caspasa ejecutora). La caspasa-8 puede activar la vía apoptótica mitocondrial al activar la proteína Bid, la cual puede promover la salida del citocromo c de la mitocondria y activar a la caspasa-9. La caspasa-8 al igual que la caspasa-9 inicia una cascada de activación que conduce el desmantelamiento celular, la formación de cuerpos apoptóticos y la fagocitosis de la célula (Wajant y Scheurich, 2012).

## 2.7 Apoptosis

La apoptosis es una forma de muerte celular programada utilizada en el organismo para controlar de manera fisiológica el número de células de un tejido u órgano, para depurar células que ya han cumplido su función, o para eliminar células dañadas durante condiciones patológica (Gupta y Gollapudi 2007). Estudios recientes han demostrado que la muerte celular por apoptosis se produce en la lesión secundaria de la médula espinal contribuyendo a un mayor daño neuronal y pérdida funcional después de un traumatismo (Kan *et al.*, 2009).

La apoptosis es un proceso que afecta a determinadas células, no necesariamente contiguas y no a todas en un área tisular. La membrana celular no se destruye, lo que impide la liberación de su contenido al espacio extracelular, resultando un proceso "silencioso", sin inflamación (Cummings *et al.*, 1997; Lodish *et al.*, 2002; Kan *et al.*, 2009). Estudios recientes han mostrado que la necrosis posterior de la LME provoca muerte por apoptosis en las células adyacentes, siendo esta un mecanismo importante en la patogénesis de este daño secundario (Akdemir *et al.*, 2008).

Existen varios factores que pueden contribuir a la activación de la señal apoptótica como son: citocinas inflamatorias producto de la lesión, incremento de calcio libre intracelular, daño por radicales libres y excitotoxicidad (Emery *et al.*, 1998; Jou *et al.*, 1998; Martiñon e Ibarra, 2008).

Se ha descrito que la apoptosis en LME se produce a través de ligando FasL / receptor Fas, inducible por macrófagos por la producción de óxido nítrico sintasa o por daño mitocondrial por activación directa de la proenzima caspasa-3. (Gorgulu *et al.*, 2000; Matsushita *et al.*, 2000). Este evento contribuye en gran medida a la pérdida de células, que tiene un importante impacto negativo sobre efectos neurológicos como la pérdida de la

función motora. Las caspasas son las proteínas efectoras que llevan a la apoptosis, se activan proteolíticamente por las caspasas iniciadoras (caspasa-8 y 9), han sido objetivos para tratar de desarrollar algunas terapias; es por ello que, una serie de estrategias se basan en la utilización competitiva de inhibidores de caspasas con secuencia de aminoácidos similares a las de los sustratos naturales (Hausmann, 2003; Martiñon e Ibarra, 2008). En particular se ha estudiado a las caspasas 3 y 9, ya que son moléculas clave en la cascada apoptótica; otro objetivo han sido los inhibidores de caspasas y la terapia mediante péptidos neurales modificados que bloquean los fenómenos secundarios, por lo que pueden promover la inhibición de la apoptosis y la neuroprotección (Emery *et al.*, 1998; Matsushita *et al.*, 2000; Martiñon e Ibarra, 2008; Kan *et al.*, 2009; Ibarra *et al.*, 2010).

## 2.8 Estrategias neuroprotectoras

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. Eso es en parte el motivo de las recientes estrategias para estimular los mecanismos de autodefensa y contrarrestar el daño inducido por lesiones del SNC (Martiñon *et al.*, 2007).

Las terapias para promover la recuperación neurológica después de una LME se orientan a proteger las neuronas restantes que escaparon a la lesión inicial y restauración del tejido dañado. Sin embargo, no existen estrategias terapéuticas disponibles en la actualidad para disminuir o eliminar con éxito la lesión producida por los fenómenos secundarios (Ibarra y Díaz-Ruiz, 2006).

En estudios recientes, se ha observado presencia de núcleos apoptóticos a las 4 h después de la lesión y que la muerte por apoptosis se distribuye hacia ambos lados del epicentro de la LME hasta las 24 h y hasta las tres semanas después de la contusión (Jou *et al.*, 1998; Akdemir *et al.*, 2008; Kan *et al.*, 2009).

Las lesiones traumáticas del SNC dan lugar a la interrupción de la BHE que facilita la entrada de células inmunitarias y proteínas. La respuesta inmune celular ha ganado cada vez más atención debido a la acumulación de evidencias que sugieren un papel colaborador de estas células en la patología y reparación de la LME (Beck *et al.*, 2010; Ibarra *et al.*, 2010).

La infiltración de células inflamatorias se correlaciona significativamente con la cantidad de tejido dañado después de una LME. Sin embargo, hallazgos recientes han sugerido que la presencia y función de estas células es esencial para la protección y regeneración de tejidos del SNC (Beck *et al.*, 2010; Ibarra *et al.*, 2010).

Algunas evidencias indican que la modulación del sistema inmune puede ayudar a proteger o restaurar la integridad del SNC. Se ha demostrado que el sistema inmune innato, representado por macrófagos activados, puede facilitar el proceso de regeneración del SNC. También las células T del sistema inmune adaptativo son específicas contra la mielina y pueden proteger a las neuronas del SNC de la degeneración que se extiende del sitio de lesión hacia áreas adyacentes (Cohen y Schwartz, 1999; Hauben *et al.*, 2000).

Las células inflamatorias son parte esencial en el desarrollo y eficacia de la respuesta autorreactiva protectora (Schwartz *et al.*, 1999).

## 2.9 Autorreactividad Protectora

La interacción entre el sistema inmune y SNC es única, en parte porque este último se caracteriza por ser un sitio de privilegio inmune. En el SNC, bajo condiciones normales los linfocitos T activados pueden atravesar la BHE y entrar al parénquima del SNC, sin embargo, se restringe el paso a los linfocitos T capaces de reaccionar contra antígenos propios (Schwartz *et al.*, 1999; Hauben *et al.*, 2000).

Los linfocitos T autorreactivos no modulados contribuyen de manera importante al desarrollo desmielinizante de la lesión. Su contribución ha sido estudiada extensamente en Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE), que es una enfermedad desmielinizante inflamatoria contra la proteína básica de la mielina (PBM), la inmunización con el epitopo (MBP<sub>87-99</sub>) induce EAE (Karin *et al.*, 1994; Gaur *et al.*, 1996; Ibarra *et al.*, 2004).

La *autorreactividad protectora* (AP) es un nuevo concepto que se refiere a un enfoque innovador en modular mecanismos autorreactivos con el fin de promover la neuroprotección, activando células de la microglía bajo un fenotipo que se caracteriza por su baja producción de radicales libres (Ibarra *et al.*, 2010).

El epítopo inmunodominante VHFFKNIVTPRTP (PBM<sub>87-99</sub>), es el principal blanco de los linfocitos T en enfermedades del SNC. Por el momento sigue la controversia sobre el papel de las células T sobre los determinantes antigénicos o epítomos, sin embargo, es evidente que la modulación, en lugar de la eliminación de estas células es, probablemente, la estrategia más prometedora para promover la neuroprotección y neuroregeneración. (Ibarra *et al.*, 2010). La activación de los linfocitos T con fenotipo T<sub>H</sub>2 depende en gran parte del conjunto de señales de transducción originadas por diferentes moléculas estimuladoras y co-estimuladoras encontradas en la membrana celular. De todas estas señales, la emitida por el TCR es un evento importante ya que de acuerdo a algunos estudios, cambios en la

estructura del ligando del TCR resultan en efectos distintos sobre la activación de los linfocitos T. La presencia de aminoácidos diferentes en la región reconocida por el TCR promueve una respuesta diferente. Los ligandos peptídicos alterados (APLs) (del inglés *altered peptide ligand*) son análogos peptídicos de los epítomos que poseen una o varias sustituciones de aminoácidos que puestos en contacto con los TCR compiten con la unión de dicho receptor e interfieren con la cascada de activación de los linfocitos T (Genain y Zamvil, 2000; Hauben *et al.*, 2000). En 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 (Genain y Zamvil, 2000).

Una estrategia de inmunización activa con el copolimer-1 (Cop-1) que es un copolímero compuesto por L-alanina, L-ácido glutámico, L-lisina y L-tirosina, ha demostrado que puede reducir la degeneración secundaria de neuronas y promover una recuperación motora en animales con LTME (Ibarra *et al.*, 2007), este polímero sintético tiene similitudes inmunológicas a la PBM, ejerce efectos protectores en encefalomiелitis alérgica experimental y puede ser inducida por diferentes especies de antígenos encefalitogénicos (Ziemssen *et al.*, 2002; Ibarra *et al.*, 2004).

También se han desarrollado ensayos de inmunización activa y pasiva de linfocitos T específicos para la PBM y se ha observado una reducción del daño tisular así como una mejora de la recuperación motora después de la LME (Hauben *et al.*, 2000; Ibarra *et al.*, 2010). A la luz de este concepto, la inmunización con antígenos derivados neuronales como el A91 ha demostrado que modulan esta respuesta autorreactiva (Ibarra *et al.*, 2010).

El A91 es un péptido modificado obtenido de la secuencia básica de la PBM (aminoácidos 87-99) con un reemplazo en la posición 91 de una lisina (K) por una alanina (A), actúa como péptido agonista parcial y se ha observado que puede reducir la degeneración secundaria de neuronas y promover una mejor recuperación motora en animales con LME (Moalen *et al.*, 1999; Hauben *et al.*, 2000; Martiñon *et al.*, 2007; Katsara *et al.*, 2009; Ibarra *et al.*, 2010).

Se han realizado estudios comparativos para evaluar metilprednisolona (MP) vs A91 y se observó que la MP tiene un efecto transitorio sobre la respuesta inmune y que A91 promueve mejor recuperación motora que MP (Ibarra *et al.* 2004).

El péptido modificado A91 ha mostrado la producción de citocinas con un perfil de células de respuesta predominantemente T<sub>H</sub>2. Los ligandos peptídicos alterados como A91 son candidatos prometedores para la inmunoterapia en EM y LME (Gaur *et al.*, 1996; Katsara *et al.*, 2009).

En EAE la inmunización con APLs de la PBM<sub>87-99</sub> emulsificados con adyuvante completo de Freund (ACF) produce interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL-4 comparadas con el péptido nativo MBP<sub>87-99</sub> (Katsara *et al.*, 2009).

Después de una LME por contusión o compresión, la inmunización con A91 ha mostrado mejorar la recuperación motora de ratas con lesión traumática de médula espinal. La inmunización con A91 promueve una mejor protección que el antioxidante glutatión mono-etil éster. Más aún, la combinación de esta terapia con la administración de glutatión mono-etil éster, promueve una mejor protección del tejido y una mayor recuperación de la actividad motora que cuando se usan estas terapias por separado. La combinación

promueve un mayor número de axones mielinizados y una mejor sobrevivencia de las neuronas rubroespinales, que con la inmunización individual (Martíñon *et al.*, 2007).

Nuestro grupo de investigación ha demostrado el efecto benéfico de la inmunización con péptidos neurales modificados como A91 observando que los linfocitos T anti-A91 promueven la protección al tejido al inhibir la expresión de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS), disminuir la producción de NO (Shaked *et al.*, 2005; García *et al.*, 2012) y disminuir la lipoperoxidación después de una LME (Ibarra *et al.*, 2010). Además también se ha demostrado que estos linfocitos son capaces de liberar factores neurotróficos como BDNF (del inglés Brain-derived neurotrophic factor) y Neurotrófina 3 (NT3), creando así, un ambiente propicio para la regeneración neural (Martíñon *et al.*, 2012). Por otra parte, también se ha demostrado que todos estos efectos benéficos contribuyen a la preservación del tejido neural, la sobrevivencia de neuronas y a una mejor recuperación neurológica en modelos de LME y de isquemia cerebral focal (Ibarra *et al.*, 2007; Martíñon *et al.*, 2007).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La LME es un problema de salud pública que en la mayoría de los casos afecta a la población en edad económicamente activa (20 a 35 años de edad). En el Distrito Federal la incidencia anual de traumatismos medulares es aproximadamente 18.1 casos por millón de habitantes (Pardini, 1998; Mondaca-Estrada *et al.*, 2008).

Por lo anterior se han desarrollado terapias farmacológicas, sin embargo, casi todas han mostrado un efecto muy limitado para promover la recuperación neurológica. La AP, ha demostrado un efecto neuroprotector muy importante, sin embargo no se conocen aun los mecanismos para llevar a cabo dicho efecto. Ya que varios de los elementos que se originan como resultado de la activación de la autorreactividad protectora (BDNF, IL-10, IL-4,

disminución de radicales libres, el TNF $\alpha$ , y el IFN $\gamma$ .) podrían incidir sobre el fenómeno apoptótico pensamos que uno de los mecanismos neuroprotectores de la autorreactividad es a través de la inhibición de la apoptosis celular.

La inmunización con A91 promueve la diferenciación del linfocito hacia un fenotipo T<sub>H</sub>2 mismo que es capaz de liberar BDNF y producir citocinas como la IL-10 y la IL-4 mismas que ejercen un efecto importante sobre la modulación de citocinas pro-inflamatorias (Martíñon *et al.*, 2012). Así mismo la inmunización con A91, reduce la producción de NO (García *et al.*, 2012) y la liberación de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  (Karin *et al.*, 1994).

El BDNF es una molécula que es capaz de disminuir en forma importante el proceso de apoptosis. El óxido nítrico y el TNF- $\alpha$  se consideran factores importantes para la inducción del fenómeno apoptótico (Morgan *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2010; Fujita *et al.*, 2011; Khalatbary y Zarrinjoei, 2012) por ello evaluaremos como marcador inductor de apoptosis a TNF- $\alpha$  en este proyecto. Además las vías intrínseca y extrínseca de la cascada de apoptosis convergen en la caspasa-3 por ello se utilizara como marcador específico de daño por apoptosis.

Por todo lo anterior propusimos que la inmunización con A91 reduzca el fenómeno apoptótico observado después de una lesión en la médula espinal a través de reducir la formación de TNF- $\alpha$  y caspasa-3 como marcadores de daño.

El presente proyecto nos proporcionó información de utilidad para el mejor conocimiento de esta terapia. Al momento no existen estudios que evalúen el efecto neuroprotector de A91 sobre el fenómeno apoptótico desarrollado después de una LME.

#### **4. PREGUNTA A RESOLVER**

¿La inmunización con A91 disminuirá la apoptosis después de una lesión traumática en la médula espinal?

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto neuroprotector del péptido A91 sobre la apoptosis del tejido neural, en animales con lesión traumática en la médula espinal.

#### **6. OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Determinar el efecto de la inmunización con A91 sobre la apoptosis en el sitio de lesión de ratas con LTME inmunizadas con A91.
- Cuantificar la apoptosis en el nivel vertebral T9 de ratas sin lesión de médula espinal.
- Evaluar la inmunización con A91 en un marcador del proceso inflamatorio (TNF- $\alpha$ ) en ratas con LTME.
- Determinar la recuperación en la habilidad locomotora en ratas con LTME inmunizadas con A91.
- Correlacionar los niveles de TNF- $\alpha$  y caspasa-3 en la respuesta apoptótica.
- Comparar el fenómeno apoptótico de los grupos antes mencionados.

#### **7. HIPÓTESIS**

Si el péptido A91 es capaz de modular la respuesta autorreactiva, entonces la inmunización con A91, disminuirá la apoptosis en el sitio de lesión.

## 8. MATERIAL Y MÉTODOS

### Diseño experimental:

Se utilizaron un total de 72 ratas hembras de la cepa *Sprague Dawley* de 200 a 230 g que fueron proporcionadas por el Centro de investigación del Proyecto de Camina y se evaluó el fenómeno de apoptosis a los 7 y 30 días post-lesión (dpl).

Se formaron tres grupos de la siguiente manera:

Grupo 1: Ratas sin LME (SHAM n=12).

Grupo 2: Ratas con LME + inmunización activa con A91 + ACF (n=12)

Grupo 3: Ratas con LME + inmunización con PBS + ACF (n=12)

Se sacrificaron 36 ratas a los 7 días (d) y 36 ratas a los 30 d después de la lesión (n=6)

*Nota:* Inmunización activa con A91 (Grupo 2) o Grupo testigo con PBS (Grupo 1).

A los 7 dpl se tomaron 36 ratas al azar de cada grupo para analizar el fenómeno de apoptosis en el epicentro y 4mm sección caudal y cefálica, mediante las técnicas de DAPI (n=6). Además, con la técnica de Western Blot se detectaron los niveles de TNF- $\alpha$  y caspasa-3 (n=6). A los 30 d se realizaron las mismas evaluaciones con las 36 ratas restantes de cada grupo.

### 8.1 Técnica de lesión de médula espinal

Se anestesió a las ratas con una combinación de xilacina-ketamina en una solución 1:5, vía intramuscular. Se rasuró la región dorsal lateralmente hasta aproximadamente 1.5 cm bilateral a la columna vertebral.

Se realizó una incisión en piel sobre línea media, se disecciona la piel y se realizaron dos incisiones en músculo paralelas a la columna vertebral sobre las apófisis transversas.

Se localizó la T9 y se efectuó una incisión transversal entre T9 y T10 para que se retrajera hacia T8 en la porción craneal. Se diseccionaron perfectamente las vértebras cuidando los vasos sanguíneos que corren longitudinales a la columna para evitar una hemorragia. Se sujetaron las apófisis espinosas de T8 con una pinza de disección con dientes de ratón y con la gubia se fracturó la apófisis espinosa de T9 retirando el fragmento.

En el espacio intervertebral T9 y T10 se quitó la lámina de la vértebra con una pinza fina, con movimientos suaves y firmes, retirando poco a poco para evitar tocar la médula espinal; una vez concluido esto se procedió a fracturar con la gubia la apófisis espinosa de T8 retirando el fragmento, para ayudar a despejar el campo.

Finalmente se sometieron a 48 animales a una contusión moderada (25mm) con el Impactador marca NYU, New York (Basso *et al.*, 1996). Se alojaron a las ratas en una jaula y se llevaron a recuperación en el bioterio.

## 8.2 Inmunización con A91

Inmediatamente después de la lesión, se inmunizó al grupo 2 con el péptido neural modificado A91, éste se emulsificó en un volumen igual de ACF conteniendo 1mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*. El grupo 3 recibió el vehículo del ACF y PBS.

## 8.3 Extracción en fresco de médula espinal

Después de haber transcurrido los tiempos de lesión (7 d y 30 d), se sacrificaron a las ratas con una dosis letal de pentobarbital 1mL/2.5kg de peso. Las ratas se colocaron en posición dorsal para hacer un corte en la piel y dejar expuesta el área del sitio de la contusión. Se

corto el músculo a los lados del sitio de lesión, y la apófisis espinosa de las vertebras, para liberar poco a poco y exponer mediante laminectomía 2 cm de la médula espinal (el epicentro, 1 cm caudal y 1 cm craneal al sitio de lesión), posteriormente se retiró del canal vertebral. Los cortes de 1cm se incluyeron en Tissue Teck y se preservaron en congelación a -80°C.

#### 8.4 Extracción de proteínas totales

El tejido (médula espinal) se lavó con PBS antes de agregar 100 µL de solución de lisis (solución de lisis: 10 mL de T-PER: del inglés tissue protein extraction reagent (Thermo Scientific), 1 pastilla de inhibidor de proteasas (Complete Mini) 100 µL 0.1M PMSF y 100 µL 1M DTT). Se centrifugó a 24,000 g por 15 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante en donde se encontraba la proteína total y se guardó a – 20 ° C.

#### 8.5 Determinación de la proteína total por el método de Bradford

Las proteína total se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Como curva patrón se utilizó albúmina de suero bovino (BSA Sigma).

Se tomó 1 µL de la proteína total y se colocó en celdas para espectrofotómetro con 800 µL de agua destilada. Se agregaron 200 µL de reactivo de Bradford (BIO RAD) a cada celda y se mezcló por inversión. Cada muestra se leyó en un espectrofotómetro a 595 nm y se determinó la concentración de proteína usando la curva patrón.

#### 8.6 WESTERN BLOT

##### 8.6.1 Electroforesis de proteínas totales en gel de Poliacrilamida-SDS

Para el corrimiento de las proteínas totales se preparó 10 mL del gel de separación al 10 % (3.35 mL de agua destilada, 2.5 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 100 mL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, 4 mL de acrilamida/bis 30%, 50  $\mu$ L de persulfato de amonio 10%, 5  $\mu$ L de N,N,N',N'-tetrametiletilendmina (TEMED) y 10 mL del gel concentrador al 4% (6.1 mL de agua destilada, 2.5 mL de Tris 0.5 M pH 6.8, 100 mL de SDS 10%, 1.3 mL de bis-acrilamida al 30%, 50  $\mu$ L de persulfato de amonio al 10%, 10  $\mu$ L de TEMED). Se utilizó una cámara de electroforesis vertical (BIO RAD).

En tubos Eppendorf se colocaron 30  $\mu$ g de las proteínas totales de cada muestra, en un volumen final de 40  $\mu$ L con amortiguador 4X (2-mercaptoetanol, SDS, azul de bromofenol y glicerol) y agua destilada. Los tubos se colocaron en agua hirviendo durante 5 min y en hielo 5 min más, para relajar la estructura secundaria de las proteínas. Posteriormente, el marcador de peso molecular y las muestras de las proteínas totales se colocaron en los carriles del gel. En el carril uno se colocó el marcador de peso molecular y en el carril 2 el testigo positivo al cual eran fibroblastos de pulmón de ratón de línea celular L929 a los cuales se le indujo apoptosis con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 300 $\mu$ M por 30 min.

Para el corrimiento electroforético se utilizó un amortiguador de corrida (Tris 0.25, glicina 1.92 M, SDS 1%, pH 8.3). El corrimiento se realizó con un voltaje de 120 V durante 2 h.

#### 8.6.2 Transferencia de proteínas totales a la membrana de PVDF

El gel de acrilamida que contenía a las proteínas de interés se colocó cuidadosamente con pinzas entre papel filtro y la membrana de PVDF (GE HELDTHCARE), y sobre ésta otras 2 capas de papel filtro, todos cortados exactamente del mismo tamaño, formando un

emparedado. El emparedado se colocó sobre la placa de la cámara de transferencia que contenía el “buffer” de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.05%, metanol 20% y tween 20 1X) con hielo y agitación. La transferencia se realizó con un voltaje de 120 V durante 2 h.

### 8.6.3 Anticuerpo Primario, Secundario y Revelado.

Después de la transferencia, la membrana se bloqueó durante 60 min a temperatura ambiente con TBS-tween (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, tween 20 0.1%, pH 7.5) más 8 % de leche descremada. Después de este tiempo, se lavó 2 veces con TBS-tween.

La membrana se colocó en una solución con el anticuerpo primario Caspasa-3 (1:500) (Biovision) o bien TNF- $\alpha$  (1:100) (Tecnología Santa Cruz) en TBS-tween durante toda la noche y en agitación ligera. Como proteína control para la normalización se empleó actina (1:50)

La membrana se lavó durante 5 min con TBS-tween 3 veces. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario dependiendo del caso, “anti-conejo (1:100) para TNF- $\alpha$ , anti-cabra (1:100) para caspasa-3 y anti-ratón (1:100) para actina en TBS-tween, durante 1 h y en agitación. Después se lavaron las membranas durante 5 min con TBS-tween 2 veces durante 10 min.

Para el revelado se agregaron 2 mL de Luminol Super Signal West Pico y 2 mL de peróxido Super Signal West Pico Stable.

El revelado se realizó en un fotodocumentador (Gel Logic 1500 Imaging System) para observar la fluorescencia generada en la reacción de la peroxidasa, indicando la presencia de cada proteína (González-Puertos *et al.*, 2010).

#### 8.7 Técnica de DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato)

Se utilizó la técnica de DAPI, para observar los cambios morfológicos en los núcleos de las células apoptóticas mediante microscopía de fluorescencia.

Se realizaron cortes de 6 µm en el criostato de las diferentes condiciones experimentales y se depositaron en laminillas recubiertas con Silano-Acetona 2%. Se fijaron con solución de paraformaldehído al 4 % recientemente preparado en PBS pH 7.4 a temperatura ambiente por 20 min en agitación constante. Se lavaron tres veces por 10 min en PBS pH 7.4. Los cortes se cubrieron con DAPI al 10% y se lavaron con PBS 1X. Por último se contratiñó con azul de Evans 0.026%. Y se analizaron los testigos positivos y negativos mediante microscopía de fluorescencia (DAPI, Boehringer. Indianapolis, IN, USA). En cada muestra se contaron 20 campos para el epicentro, 2 mm hacia la posición cefálica y caudal del sitio de lesión con el objetivo de 60X.

#### 8.8 Evaluación clínica

Se realizó la prueba de habilidad locomotora a campo abierto “BBB” a los animales con LTME inmunizados con A91 y los tratados solo con PBS a los 7 d y 30 d, donde la recuperación se califica en una escala de 0 (parálisis completa) a 21 (movilidad completa) (Basso *et al.*, 1996).

## Escala BBB

- 0.- No se observa movimiento en patas traseras (PT).
1. Movimiento limitado (arco < 50%) de una o dos articulaciones, usualmente cadera y/o rodilla.
2. Movimiento amplio (arco > 50%) de una articulación con o sin movimiento limitado de la otra.
3. Movimiento amplio de dos articulaciones.
4. Movimiento limitado de las tres articulaciones de PT (cadera, rodilla y tobillo).
5. Movimiento limitado de dos articulaciones y amplio de la tercera.
6. Movimiento amplio de dos articulaciones y limitado de la tercera.
7. Movimiento amplio de las tres articulaciones de PT (cadera, rodilla y tobillo).
8. Movimiento rítmico (coordinado) de ambas PT sin soporte de peso o colocación de la planta pero sin soportar peso.
9. Colocación plantar con soporte de peso, no está caminando, pasos ocasionales (< ó = al 50%), frecuentes (51% a 94%), o constantes (95% a 100%), con soporte de peso dorsal, sin apoyo plantar.
10. Pasos ocasionales con soporte de peso plantar, sin coordinación entre patas delanteras (PD) y PT.

11. Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar, sin coordinación entre PD y PT.
12. Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar y coordinación ocasional entre PD y PT.
13. Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar y coordinación frecuente entre PD y PT.
14. Constantemente da pasos con soporte de peso plantar, coordinación constante entre PD y PT, y hay rotación interna o externa de la pata, principalmente al hacer contacto con el piso o al despegar. También pasos plantares frecuentes, coordinación constante entre PD y PT y pasos dorsales ocasionales.
15. Pasos plantares y coordinación entre PD y PT constantes. No separa los dedos o solo ocasionalmente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predominio la alineación paralela de la pata al cuerpo.
16. Pasos plantares y coordinación entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre frecuentemente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predominio la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero la rota al levantarla.
17. Lo mismo (núm. 16) pero al levantar la pata la mantiene alineada (sin rotar).
18. La separación de los dedos es constante durante la marcha. Al hacer contacto con el piso predominio la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero la rota al levantarla.

19. Pasos plantares y coordinación entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre constantemente durante la marcha. Al hacer contacto con el piso y levantar, predomina la alineación paralela de la pata al cuerpo. Arrastra la cola parte o todo el tiempo.
20. Pasos plantares, marcha coordinada y separación de dedos constantes. Al hacer contacto con el piso y levantar, predomina la alineación paralela de la pata al cuerpo, cola levantada constantemente e inestabilidad del tronco.
21. Igual pero tronco constantemente estable.

## **9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado en al menos tres eventos independientes. Los datos se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) de una vía. La comparación entre los grupos se realizó con la prueba complementaria de TUKEY-KRAMER. Se consideró una  $p < 0.05$  estadísticamente significativa. Se utilizó el programa Instat statistical program (GrapPad San Diego California).

## **10. RESULTADOS**

### 10.1 Tinción de Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)

En la figura 4 se presenta el testigo negativo (sin inducción de apoptosis) y el positivo (inducción de apoptosis con DNAsa I). La figura 5 muestra imágenes representativas de los grupos con LTME inmunizados con A91 y tratados solo con PBS a los 7 y 30 dpl en el epicentro de la lesión. Se observa una disminución del daño por apoptosis en las ratas con

LTME inmunizadas con A91 con respecto a las ratas tratadas solo con PBS, se notó un incremento de células dañadas por apoptosis, además de indirectamente un mayor infiltrado inflamatorio.

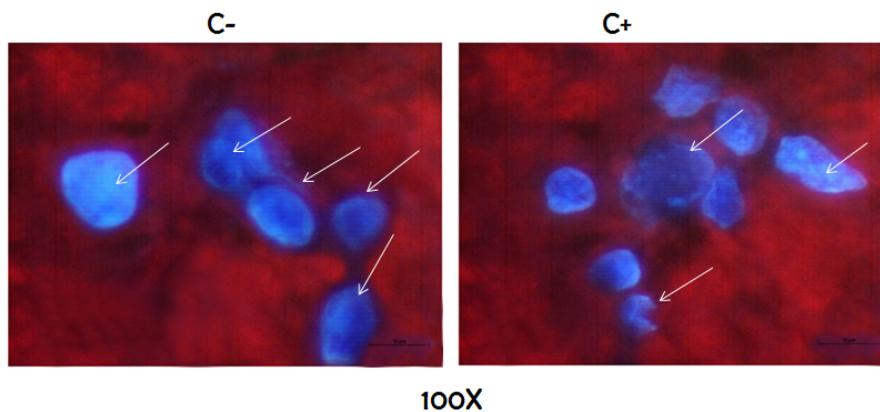
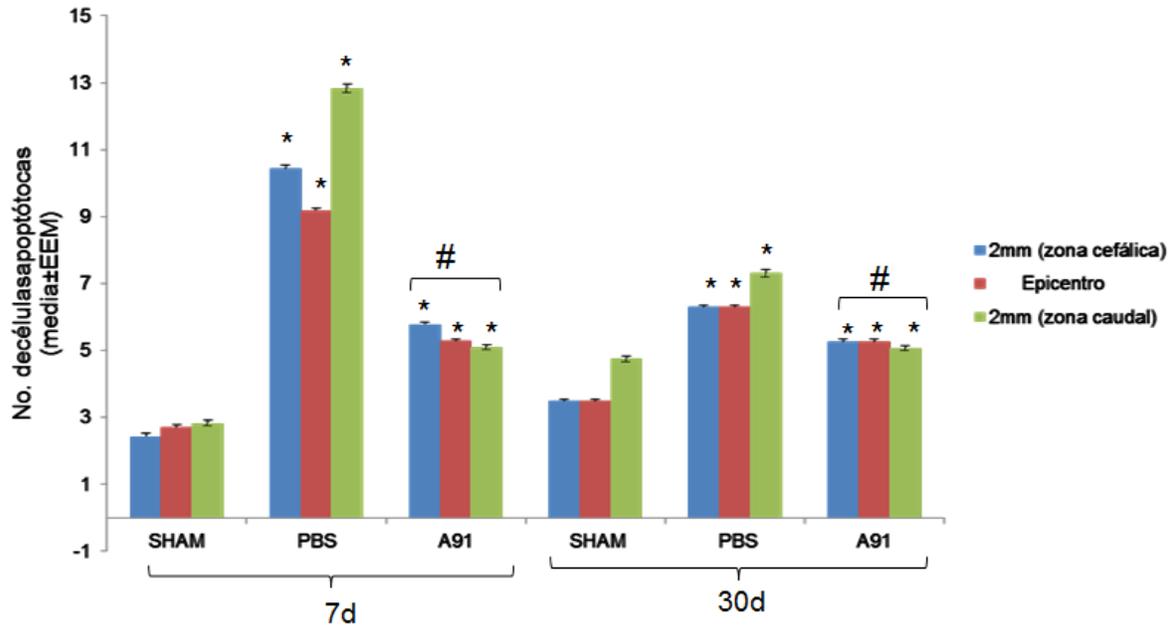


Figura 4 muestra imágenes representativas del testigo negativo (sin inducción de apoptosis) y positivo (inducción de apoptosis con DNAsa I) en tinción de DAPI para identificar cambios morfológicos en los núcleos de los 3 grupos experimentales. Las flechas indican la fragmentación del ADN y la condensación de la cromatina en las células apoptóticas en el testigo positivo.100X.

Se observó una menor cantidad de células apoptóticas en la fase aguda a los 7 d después de la lesión en los grupos inmunizados con A91, tanto en el epicentro de la lesión, 2 mm hacia la zona cefálica y 2 mm hacia la zona caudal (Grafico 1).



Grafica 1. Células apoptóticas en el epicentro, 2 mm hacia la posición Cefálica y 2 mm hacia la posición Caudal de la lesión a los 7 d y 30 dpl. Los datos muestran diferencias significativas entre los grupos respecto al control. Media  $\pm$  error estándar de la media (EEM), ANOVA de una vía, seguida de TUKEY-KRAMER. SHAM VS  $p < 0.05$ ; \* PBS VS  $P < 0.001$ .  $n = 6$ .

### 10.2 Detección de caspasa-3

En la Figura 6 se muestran los gels correspondientes para caspasa-3 y actina. Los resultados muestran que durante la fase aguda (a los 7 d después de la LTME) se presenta una disminución significativa de caspasa-3 cuando las ratas son inmunizadas con el péptido A91, con respecto al grupo tratado únicamente con PBS. A los 30 dpl no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En la grafica 2 se presentan las densitometrías que se realizaron normalizando con la proteína constitutiva actina. En las ratas inmunizadas con A91 se observa una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) en la detección de caspasa-3 con una protección de

50.1 % durante la fase aguda de 7 d comparado con las ratas tratadas únicamente con PBS con un 100% de daño después de la lesión. No se observaron diferencias significativas en la expresión de caspasa-3 en los grupos de estudio a los 30 dpl.

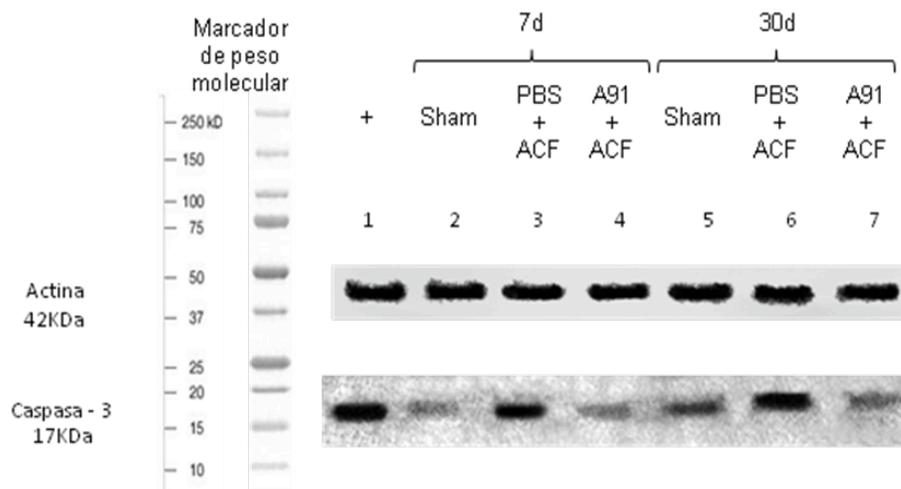
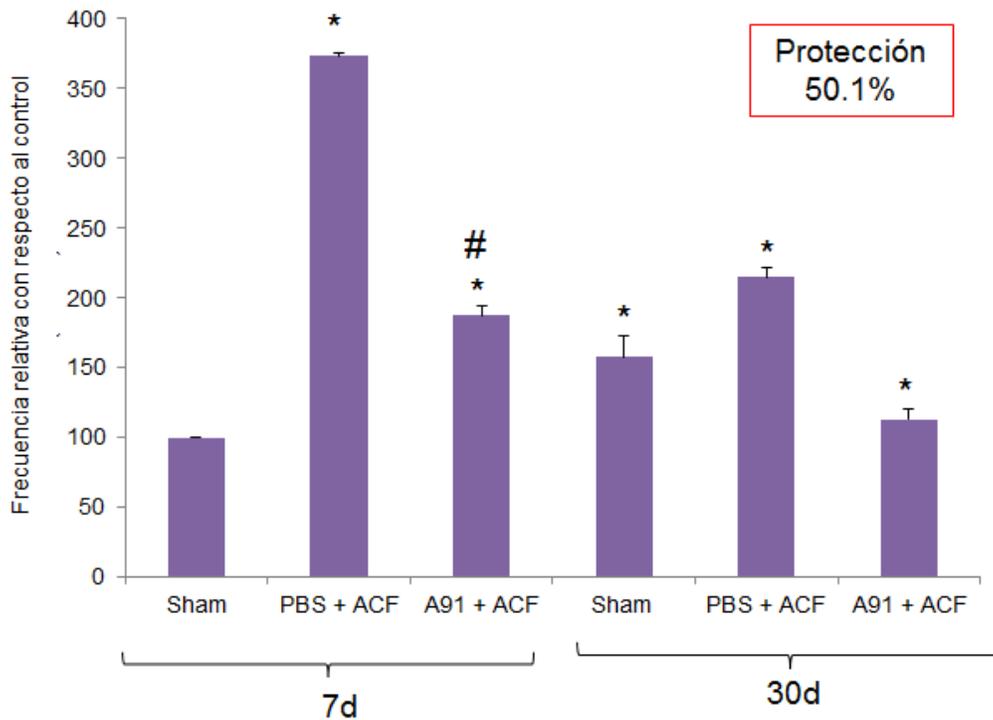


Figura 5, se muestran los geles correspondientes al Western blot realizados en médula espinal. Las bandas inferiores corresponden a la proteína constitutiva ( $\beta$  - actina) y el experimental con caspasa-3. En el carril 1 se indica el testigo positivo células Jurkat a estas se añadió 300  $\mu$ M de  $H_2O_2$  durante 30 min en el medio de cultivo para inducir apoptosis. En el carril 2 y 5 se muestran las ratas sin lesión (SHAM) a los 7 y 30 d después de la LTME. Carriles 3 y 6 (ratas con LME administradas con PBS + ACF a los 7 y 30 d respectivamente. Las ratas inmunizadas con A91 a los 7 y 30 d después de la lesión medular se indican en los carriles 4 y 7.



Grafica 2. Se muestra la frecuencia relativa para caspasa-3 con respecto al control (Media  $\pm$  EEM). Los resultados muestran diferencias significativas entre los grupos respecto al control., ANOVA seguida de TUKEY-KRAMER. SHAM VS  $p < 0.05$ ; \* PBS VS  $P < 0.001$ .  $n = 6$ .

### 10.3 Detección de TNF- $\alpha$

En la Figura 7 se muestran los geles correspondientes para TNF- $\alpha$  y actina. Los resultados muestran que durante la fase aguda (a los 7 d después de la LTME) disminuye la expresión de TNF- $\alpha$  cuando las ratas son inmunizadas con el péptido A91.

En la grafica 3 se presentan las densitometrías que se realizaron normalizando con la proteína constitutiva actina y se observa una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) en la detección de TNF- $\alpha$  en las ratas con A91 de 87.6% en comparación con los

animales no tratados, durante la fase aguda de 7 d. Sin embargo no se encontraron diferencias a los 30 d.

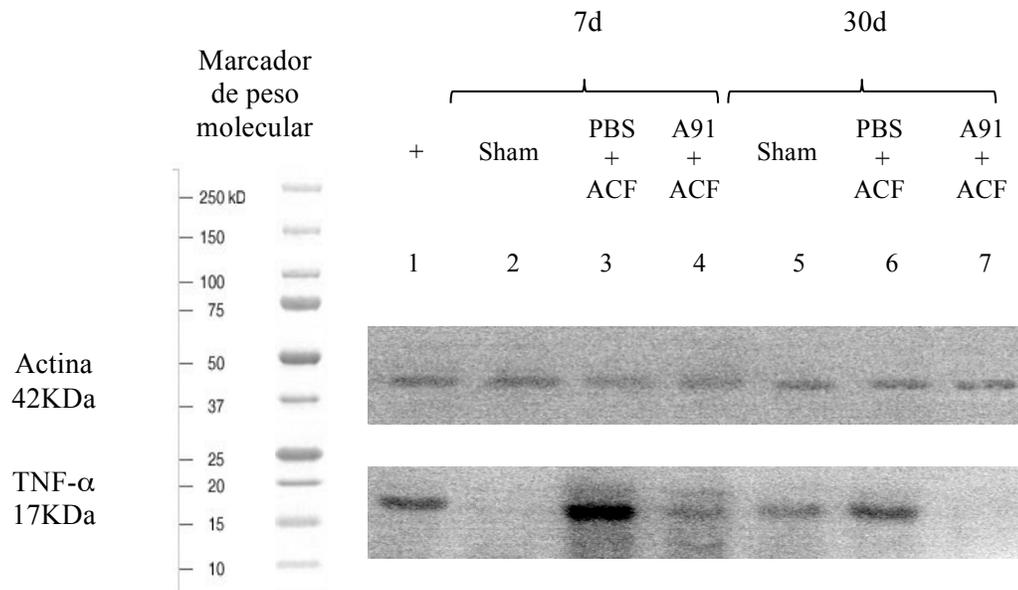
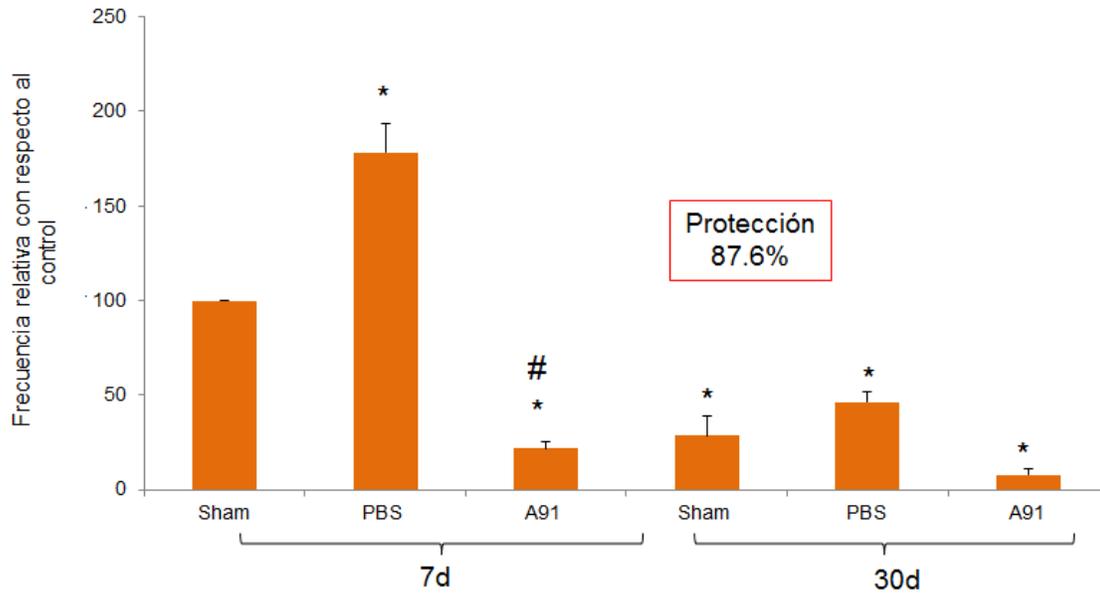


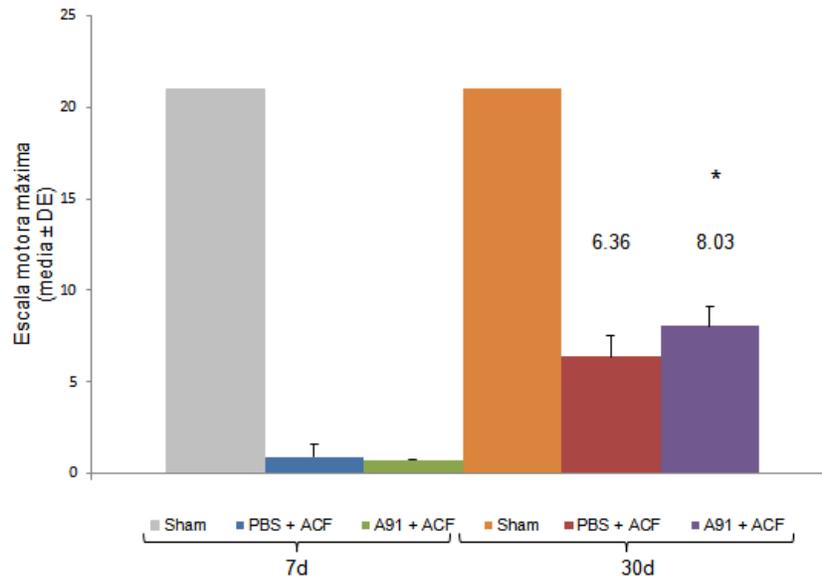
Figura 6, se exhiben los geles correspondientes al Western blot realizados en médula espinal. Las bandas de abajo corresponden a la proteína constitutiva actina y el experimental con TNF- $\alpha$ . En el carril 1 se indica el testigo positivo con células L929 a los cuales se les indujo apoptosis con 300  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min. En el carril 2 y 5 se muestran las ratas sin lesión (SHAM) a los 7 y 30 d después de la LTME. Carriles 3 y 6 (ratas con LME administradas con PBS + ACF a los 7 y 30 d respectivamente. Las ratas inmunizadas con A91 a los 7 y 30 d después de la lesión medular se muestran en los carriles 4 y 7.



Grafica 3. Se muestra el porcentaje de Frecuencia relativa con respecto al control, expresado en (media  $\pm$  EEM) para Western blot de TNF- $\alpha$ . Los resultados reportaron diferencias significativas entre los grupos con respecto al control. ANOVA seguida de TUKEY-KRAMER. SHAM VS  $p < 0.05$ ; \* PBS VS  $P < 0.001$ .

#### 10.4 Prueba motora BBB

En cuanto al comportamiento motor de los animales, se puede observar en el grupo inmunizado con A91, que el promedio de animales para la fase aguda no registró diferencias significativas en la calificación de la prueba motora BBB. Sin embargo en el grafico 6 se muestra la recuperación en los animales inmunizados con A91, a los 30 d después de la lesión y si se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo que solo recibió PBS + ACF, con 1.67 unidades de diferencia en la escala motora BBB.



Grafica 4. Evaluación motora en la escala BBB a los 7 y 30 dpl. Se compara el grupo inmunizado con A91+ ACF contra el grupo tratado con PBS+ ACF y son expresados en media  $\pm$  desviación estándar (DE). Los resultados reportaron diferencias significativas entre los grupos con respecto al control. Como prueba estadística se aplicó ANOVA de una vía, seguida de una prueba complementaria de TUKEY-KRAMER. SHAM VS  $p < 0.05$ ; \* PBS VS  $P < 0.001$ .  $n = 12$ .

## 11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio, se evaluó el efecto neuroprotector del péptido A91 sobre la apoptosis, en ratas con LTME. Los resultados demuestran que hay una disminución en la expresión de caspasa-3 y  $TNF-\alpha$  al inmunizar a las ratas con el péptido “A91” a los 7 dpl que correlaciona con una importante reducción del daño por apoptosis del tejido nervioso durante la fase aguda, no así durante tiempos largos (30 d).

Estudios recientes han puesto de manifiesto que la apoptosis juega un papel importante en los resultados neurológicos tras una LME (Emery *et al.*, 1998; Kan *et al.*, 2009; Khalatbary y Zarrinjoei 2012). La pérdida de células neuronales, después de una lesión medular, se

origina debido a mecanismos neurodegenerativos de daño primario y secundario durante un período de días o semanas después del evento traumático. Es por ello, que actualmente las terapias, como la AP, encaminadas a contrarrestar los eventos autodestructivos como la apoptosis, son un blanco terapéutico que podría propiciar la restauración y regeneración del tejido nervioso y ofrecer una mejor calidad de vida a los pacientes con LME. Varias de las moléculas que se originan como resultado de la activación de la AP (BDNF, IL-10, IL-4) y otras que se modifican en su expresión, (disminución de radicales libres, del TNF $\alpha$  y el IFN $\gamma$ ), tienen la capacidad de incidir sobre el fenómeno apoptótico, es posible pensar que uno de los mecanismos neuroprotectores de ésta pudiera ser a través de la inhibición de la apoptosis celular.

Las células que presentan apoptosis se han localizado en el epicentro y en las regiones aledañas a éste (a milímetros de distancia). Los resultados de la tinción de DAPI revelaron que la disminución del daño al tejido nervioso se ve reflejada en la reducción del número de células apoptóticas a los 7 y 30 d después de la lesión en las ratas inmunizadas con A91, y fue mayor el número de células apoptóticas en el grupo testigo tratado únicamente con PBS, como se indica en la grafica 1. Esta observación respalda la idea de que la apoptosis contribuye a la pérdida del tejido y, por lo tanto, al déficit neurológico a largo plazo. La caspasa-3 activada es capaz de digerir a las proteínas y cinasas que están implicadas en la estructura celular, el ciclo celular y la replicación del ADN. La caspasa-3 es una caspasa efectora que actúa sobre diversos sustratos proteínicos dentro de las células, afectando su integridad lo que da como resultado cambios morfológicos y bioquímicos que son característicos de la apoptosis (Sheng Lin *et al.*, 2012). En el presente trabajo se observó una disminución de la caspasa-3 (el fragmento escindido de 17 kDa) en el grupo lesionado

e inmunizado con A91. En este punto la inmunización con A91 disminuye 50.1% los niveles de caspasa-3, por lo que sugiere que está ejerciendo una protección significativa al compararse con el grupo lesionado tratado únicamente con PBS en el que se encontró un aumento de la apoptosis del tejido nervioso.

La búsqueda para mejorar las estrategias protectoras después de la lesión además de la apoptosis, deben tomar en consideración los factores que pueden contribuir a la activación de ésta como son: daño por radicales libres, excitotoxicidad, citocinas inflamatorias producto de la lesión y la entrada masiva de  $\text{Ca}^{+2}$ .

La respuesta inflamatoria y la respuesta autorreactiva exacerbada aumentan la cantidad de NO en el microambiente lesionado en la fase aguda a los 7 d después de la lesión lo que provoca el incremento de la muerte por apoptosis, el  $\text{Ca}^{+2}$  al difundirse hacia las neuronas vecinas provoca liberación de grandes cantidades de glutamato hacia los espacios extracelulares, generando un efecto neurotóxico, del mismo modo la entrada masiva de  $\text{Ca}^{+2}$  a la neurona mediante receptores NMDA provoca una sobreexcitación prolongada que conduce al tejido nervioso hacia un estado neurodegenerativo (Martíñon e Ibarra, 2008) que además estaría activando la expresión de iNOS a las 3, 4, 24 y 72 h e incluso 7 dpl, esto se relaciona con el fenómeno de lipoperoxidación, la activación de la cascada de apoptosis y la destrucción neuronal que afecta la recuperación motora (Liu *et al.*, 2001; Beck *et al.*, 2010). A su vez este ión divalente propicia la activación de calpainas, que incidirán sobre una vía alternativa de apoptosis independiente de caspasas, que generará incremento en el daño secundario y resultados neurológicos en las vías descendentes. Todo lo anterior se manifestó al realizarse la evaluación locomotora de los animales lesionados, como lo indica la grafica 4 a los 7 d después de la lesión; en donde ambos grupos, los inmunizados con A91 y los que únicamente fueron tratados con PBS se encuentran igualmente dañados. La

disminución en la producción de radicales libres debido al A91, podría ser uno de los factores principales que colaboran para reducir la apoptosis, ya que se ha reportado, que las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, juegan un papel fundamental en la inducción de la apoptosis. Después de la LME se ha reportado una importante producción de NO, el cual inicia el efecto citotóxico (Liu *et al.*, 2000).

Ya se ha documentado que los linfocitos T anti-A91 promueven la protección al tejido medular al disminuir la lipoperoxidación después de una LME (Ibarra *et al.*, 2010). La enzima iNOS es una de las tres isoformas que produce NO. El NO es un gas que actúa como un radical libre, tiene un papel crucial en el desarrollo de la respuesta secundaria inflamatoria y en la inducción de la apoptosis después de la LTME (Khalatbary y Zarrinjoei, 2012). Se ha reportado que la inmunización con A91 modula la respuesta autorreactiva, la respuesta T<sub>H</sub>2 induce la secreción de IL-10 (Gaur *et al.*, 1996; Tran *et al.*, 2001; Ibarra *et al.*, 2010). A su vez, la producción de IL-10 suprime la activación de los macrófagos y la maduración de las células dendríticas evitando que se propague el daño después de la lesión (Puntambekar *et al.*, 2011). IL-10 podría ayudar a disminuir la apoptosis al inhibir la expresión del gen de iNOS, por un lado la IL-10 estimula al activador de la molécula STAT3 (del inglés, signal transducer and activator of transcription 3), considerada un inhibidor de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e inhibe la liberación de NO y por otro lado, cuando la IL-10 interactúa con su receptor, activa a SOCS3 (del inglés suppressor of cytokine signaling 3), esta molécula es capaz de inhibir la vía NF $\kappa$ B, factor de transcripción indispensable para la expresión de iNOS (García *et al.*, 2012). Lo anterior nos sugiere un mecanismo por el cual se estaría modulando la respuesta

autorreactiva y esto se ve reflejado en la disminución de la apoptosis atenuando el daño en el tejido medular.

El fenotipo  $T_H2$  desarrollado después de la inmunización con A91 enriquece el microambiente lesionado con IL-4, una citocina que además de inhibir la expresión del gen de iNOS, promueve la expresión de enzimas intracelulares como la arginasa. La actividad de la enzima arginasa cataliza la hidrólisis de arginina a ornitina y compite con iNOS por su sustrato, la L-arginina. (Louis *et al.*, 1999).

Otro mecanismo por medio del cual la inmunización con A91 podría estar reduciendo la apoptosis celular, es a través de la acción de moléculas como BDNF. En estudios previos se ha mostrado que los linfocitos T anti-A91 son capaces de liberar cantidades significativas de BDNF (Martíñon *et al.*, 2012). Se ha encontrado que las neurotrofinas como BDNF y el IGF-1 (del inglés, insulin-like growth factor-1) protegen las células neurales de la apoptosis. Además los efectos anti-apoptóticos de la señalización de BDNF/TrkB contra el estrés oxidativo han sido fuertemente evidenciados (Fujita *et al.*, 2011). La manera como BDNF promueve el efecto anti-apoptótico parece ser a través de la vía PI3K/AKT a través de los receptores TrK. AKT fosforila e inhibe proteínas pro-apoptóticas como BAD y caspasa 9. Finalmente, la vía PI3K/AKT suprime la expresión de genes que previenen la muerte celular (Nguyen *et al.*, 2010).

En un esfuerzo para dilucidar otros posibles efectos anti-apoptóticos inducidos por la inmunización con derivados peptídicos neurales modificados, se evaluó la acción de este tratamiento sobre la expresión de TNF- $\alpha$ , una molécula pro-apoptótica que se produce después de la LME. El miembro de la superfamilia de receptores de muerte TNF-  $\alpha$  es una citocina pro-inflamatoria, producida por células del sistema inmune, principalmente

macrófagos y linfocitos T, en la forma soluble y unida a membrana, ambas constituidas por 3 cadenas de proteínas idénticas (homodímeros). La mayor parte de los linfocitos T expresan en la superficie miembros de la familia TNF como moléculas de superficie celular, los efectos negativos de esta citocina se sostienen cuando hay un aumento en la producción de radicales libres (Morgan *et al.*, 2008). Para esclarecer otro mecanismo implicado en la apoptosis se determinaron los niveles de TNF- $\alpha$  para observar los efectos de la inmunización con A91 sobre la apoptosis. Está bien documentado que las citocinas pro-inflamatorias, incluyendo al TNF- $\alpha$ , se sintetizan inmediatamente después de la lesión y desempeña un papel importante en la lesión al tejido neural y promueven la apoptosis (Khalatbary y Zarrinjoei, 2012). En el presente trabajo se observó un incremento en los niveles de TNF- $\alpha$  en las ratas tratadas únicamente con PBS comparadas con el grupo inmunizado con A91, a los 7 d después de la lesión. Nuestros resultados concuerdan con reportes previos ya que la primera fase de inflamación, que comprende principalmente neutrófilos PMNs (1 dpl), macrófagos/microglía (7 dpl) y células T (9 dpl), podrían estar secretando citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  (Beck *et al.*, 2010). Puesto que la mayoría de las reacciones inflamatorias son mediadas por citocinas, éstas pueden potenciar el daño producido después de la LTME. Cuando se trató a las ratas lesionadas únicamente con PBS, no se encontró ninguna protección y permitió determinar lo que ocurre en condiciones basales después de la lesión medular.

Aunque en el presente trabajo la reducción de TNF- $\alpha$  se asoció con una disminución de la apoptosis, es importante mencionar que el papel de esta citocina es controversial, ya que los receptores TNFR1 y TNFR2 interactúan con el TNF- $\alpha$  formando homotrímeros. TNFR1, contiene dominios de muerte asociados al receptor de TNF TRADD (del inglés, adaptador

protein TNFR1-associated death domain), que dependiendo del estímulo puede activar ya sea vías de supervivencia o bien de muerte.

La respuesta inmune es el resultado de interacciones complejas entre moléculas de superficie celular y factores solubles, además se ha reportado que IL-4 se produce cuando se inmunizan ratas con A91 (Gaur *et al.*, 1996; Tran *et al.*, 2001; Ibarra *et al.*, 2010) y que la IL-4 y el TNF- $\alpha$  actúan en sinergia activando a STAT6 para amplificar la activación de factores de transcripción de la familia NF- $\kappa$ B (del inglés, nuclear factor-kappaB), esto con el fin de proteger a las células de apoptosis (Zamorano *et al.*, 2001).

Asimismo, si TRADD se une a RIP1 (del inglés receptor-interacting protein 1), este complejo actúa como cinasa de treonina-serina e inducirá la fosforilación y degradación de IK $\alpha$ , liberando a NF- $\kappa$ B a fin de pueda ser trasladado hacia el núcleo y funcione como un factor de transcripción de diferentes genes anti-apoptóticos incluyendo a FLIP (del inglés FLICE inhibitory protein), o bien a ciertos miembros de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis IAP (del inglés inhibitor of apoptosis protein) y Bcl- 2 (del inglés B-cell lymphoma 2) (Gupta y Gollapudi, 2005; Wajant y Scheurich, 2012).

Por otro lado, se sabe que la vía extrínseca para inducir apoptosis está mediada por los receptores transmembranales tipo I (TNFR1), que estimulan el ensamble de un complejo intracelular formado por, el receptor activado, TRADD, y la pro-caspasa 8 conocido como DISC (del inglés Death-inducing signaling complex) que a su vez activa a la caspasa-3 (Hausmann, 2003; Gupta y Gollapudi, 2005; Wajant y Scheurich, 2012). Además, varios estudios han reportado que el TNF- $\alpha$  regula la activación de NF- $\kappa$ B y media la apoptosis en algunos tipos celulares (Wajant y Scheurich, 2011).

Los niveles de caspasa-3 y TNF- $\alpha$  se incrementan a los 7 d después de la lesión en los animales no tratados con A91, y esto concuerda con reportes previos que indican que la apoptosis en estadios tempranos tiene un pico máximo a las 4 h después de la LME y que las células inflamatorias migran hacia el sitio de lesión desde las primeras horas. Dichas células inflamatorias podrían estar generando estímulos pro-apoptóticos, así como la producción y liberación de NO contribuyendo a los mecanismos explicados con anterioridad.

Finalmente, la reducción de la apoptosis se asocia con una mejor recuperación motora en las ratas inmunizadas con A91 al séptimo día. Con respecto a la evaluación locomotora de los animales a los 30 dpl se observó una mejora en los animales con LTME inmunizados con A91 de 1.67 unidades con respecto a los animales tratados únicamente con PBS, cabe resaltar que la fase crónica de la lesión, se caracteriza por un periodo de estabilidad generalizada en la que están ausentes muchos de los elementos que se activaron como medios protectores o promotores de restauración durante la fase aguda de la lesión. En la etapa sub-crónica a los 30 d después de la lesión observamos una recuperación pero si se hubiera evaluado estadios crónicos a los 60 y 90 d después de la lesión más que una recuperación, se hubiera observado un periodo de estabilidad hacia los 3 meses (Beck *et al.*, 2010) y posteriormente un declive progresivo de la función neurológica en roedores. Lo anterior nos obliga a buscar estrategias terapéuticas que logren evitar este deterioro y que contribuyan a una mejor calidad de vida del paciente lesionado medular. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que la inmunización con A91 induce una mejoría neurológica significativa en la reducción de la lipoperoxidación y la producción de NO, dos elementos que están estrechamente relacionados con la apoptosis. Después de una LTME,

las células que presentan apoptosis son neuronas, células de la microglía y oligodendrocitos. Estas últimas células tienen como función recubrir los axones neuronales con una vaina de mielina y su pérdida o disminución contribuye a la desmielinización post-traumática que se desarrolla durante la primera semana y se prolonga hasta estadios crónicos (Bethea y Dietrich, 2002), la apoptosis de estas células puede contribuir en gran medida al déficit neurológico lo que sugiere que la modulación de la respuesta autorreactiva promueve una mejor recuperación neurológica.

## **12. CONCLUSIONES**

- El presente estudio apoya el efecto neuroprotector del péptido neural modificado A91 al disminuir la apoptosis, ejerciendo un efecto importante en la fase aguda a los 7d después de la lesión de médula espinal.
- La disminución de la apoptosis puede ser resultado del efecto de la inmunización con A91, al producir una disminución significativa en la expresión de caspasa-3 y TNF- $\alpha$ .

## **13. PERSPECTIVAS**

- Determinar los mecanismos exactos por medio de los cuales la inmunización con A91 disminuye la apoptosis como: la expresión de moléculas pro-apoptóticas Bax y Bad y moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2.
- Determinar que vías están activando a la caspasa-3, ya sea por activación de caspasa 8, 9 y/o 12.

- Evaluar la recuperación motora después de la lesión y hasta los 30 días semanalmente para tener una cronología de la evaluación del animal.
- Determinar el efecto de la inmunización con el péptido A91 con una estrategia de combinación, para potenciar su efecto restaurador sobre la recuperación funcional de ratas con LTME.

#### 14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akdemir O., Ucankale M., Karaoglan A., Baruf S., Sagmanligil A., Bilguvar K., Cirakoglu B., Sahan E., Colak A. 2008. Therapeutic efficacy of SJA6017, a calpain inhibitor, in rat spinal cord injury. *J Clin Neurosci.* 15: 1130-1136.
2. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. 1996. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol.* 139: 244-256.
3. Beck K.D., Nguyen H.X., Galvan M.D., Salazar D.L., Woodruff T.M., Anderson A. J. 2010. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain.* 133: 433-447.
4. Berghmans N., Heremans H., Li S., Martens E., Matthys P., Sorokin L., Van Damme J., Opdenakker G. 2012. Rescue from acute neuroinflammation by pharmacological chemokine-mediated deviation of leukocytes. *J Neuroinflammation.* 9: 243.

5. Bethea J.R., Dietrich W.D. 2002. Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. *Curr Opin Neurol*.15: 355-360.
6. Bradford M. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
7. Braughler J.M., Hall E.D. 1992. Involvement of lipid peroxidation in CNS injury. *J Neurotrauma.* 1: S1-S7.
8. Caprariello A.V., Mangla S., Miller R.H., Selkirk S.M. 2012. Apoptosis of oligodendrocytes in the central nervous system results in rapid focal demyelination. *Ann Neurol.* 2: 395-405.
9. Chen J., Zhang X., Kusumo H., Costa L.G., Guizzetti M. 2012. Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: Implications for brain cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* S1388-S1981
10. Cohen I.R., Schwartz M. 1999. Autoimmune maintenance and neuroprotection of the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 100: 111-114.
11. Crossman, A.R., Neary, D. 2007. Neuroanatomía: Texto y atlas en color. *Elsevier Masson.* 29-33 y 67-86.
12. Cuenca-López M.D., Brea D., Segura T., Galindo M.F., Antón-Martínez D., Águila J., Castillo J., Jordán J. 2010. La inflamación como agente terapéutico en el infarto

- cerebral: respuesta inflamatoria celular y mediadores inflamatorios. *Rev Neurol.* 50: 349-359
13. Cummings M.C., Winterford, C.M., Walker. N.I. 1997. Apoptosis. *Am J Surg Pat.* 2: 88-101.
14. Dringen R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 62: 649-671.
15. Díaz-Ruiz A., Guízar G., Ríos C. 2002a. Estrategias neuroprotectoras después de una lesión traumática de la médula espinal. *Rev Med. IMSS.* 40: 437-455.
16. Díaz-Ruiz. A., Ibarra A., Pérez-Severiano F., Guizar-Sahagun G., Grijalva I., Rios C. 2002b. Constitutive and inducible nitric oxide synthase activities after spinal cord contusion in rats. *Neurosci Lett.* 319: 129-132.
17. Elaine N., Marieb. 2008. Anatomía Y Fisiología Humana. Ed. *Addison-Wesley.* 45-55.
18. Emery E., Philipp A., Bartlett M., Puckett W., Srinivasan A., Keane R., Bethea J., Levi A. 1998. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg.* 89: 911-920.
19. Fujita K., Tatsumi K., Kondoh E., Chigusa Y., Mogami H., Fujii T., Yura S., Kakui K., Konishi I. 2011. Differential expression and the anti-apoptotic effect of human placental neurotrophins and their receptors. *Placenta.* 32:737-44.
20. García E., Silva-García R., Mestre H., Flores N., Martiñón S, Calderón-Aranda E.S., 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
21. Gaur A., Boehme S.A., Chalmers A., Crowe P.D., Pahuja A., Ling N., Brocke S., Steinman L., Conlon P.J. 1996. Amelioration of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with altered myelin basic protein peptides involves different cellular mechanisms. *J Neuroimmunol.* 74: 149–158.
22. Genain C.P., Zamvil S.S. 2000. Specific immunotherapy: one size does not fit all. *Nat Med.* 6: 1176-1182.
23. Geneser F., 2000. Histología sobre las bases biomoleculares. 3era. edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 200-205.
24. Goodkin R., Cambell J.B. 1979. Sequential pathologic changes in spinal cord injury. *Arch Neurol.* 30: 197-201.
25. González-Puertos V.Y., Hernández-Pérez E., Nuño-Lámbarri N., Ventura-Gallegos J.L., López-Díaz N.E., Robles-Díaz G., Gutiérrez-Ruiz M.C., Konigsberg M. 2010. Bcl-2 overexpression in hepatic stellate cell line CFSC-2G, induces a pro-fibrotic state. *J Gastroenterol Hepatol.* 25: 1306-1314.
26. Gorgulu A., Kiris T., Unal F., Turkoglu U., Kucuk M., Cobanoglu S. 2000. Superoxide dismutase activity and the effects of NBQX and CPP on lipid peroxidation in experimental spinal cord injury. *Res Exp Med.* 199: 285-293.

27. Guimarães J.S., Freire M.A. 2009. Mechanisms of secondary degeneration in the central nervous system during acute neural disorders and white matter damage. *Rev Neurol.* 48: 304-310.
28. Guizar-Sahagún G., Grijalva I., Madrazo I., Franco-Bourland R., Salgado H., Ibarra A., Oliva E., Zepeda A. 1994. Development of post-traumatic cysts in the spinal cord of rats-subjected to severe spinal cord contusion. *Surg Neurol.* 41: 241-249.
29. Gupta S., Gollapudi S. 2007. Susceptibility of naïve and subsets of memory T cells to apoptosis via multiple signaling pathways. *Autoimmunity Reviews.* 6: 476–481.
30. Halassa M.M., Fellin T., Haydon P.G. 2009. Tripartite synapses: roles for astrocytic purines in the control of synaptic physiology and behavior. *Neuropharmacology.* 57: 343–346.
31. Hauben E., Butovsky O., Nevo U., Yoles E., Moalem I., Agranov E., Mor F., Leibowitz R., Pevsner E, Akselrod S., Neeman M., Cohen I. R., Schwartz M. 2000. Passive or Active Immunization with Myelin Basic Protein Promotes Recovery from Spinal Cord Contusion. *J Neurosci.* 20: 6421–6430.
32. Hausmann O.N. 2003. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Int J Med.* 118: 32-36.
33. Ibarra A., García E., Flores N., Martiñon S., Reyes R., Campos M.G., Maciel M., Mestre H. 2010. Immunization with neural derived antigens inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury. *Neurosci Lett.* 476: 62-65.

34. Ibarra A., Díaz-Ruiz A. 2006. Protective effect of cyclosporin-A in spinal cord injury: an overview. *Curr Med Chem.* 13: 2703-2710.
35. 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.
36. Jou L., Lenke L.G., Ludwig F.J., O'Brien M.F. 1998. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord.* 36: 683-690.
37. Kan X., Qi-xin C., Fang- cai L., Wei-shan C., Min L., Qiong-hua W. 2009. Spinal cord decompression reduces rat neuronal cell apoptosis secondary to spinal cord injury. *J Zhejiang Univ Sci.* 10: 180-187.
38. Karin N., Mitchell D.J., Brocke S., Ling N., Steinman L. 1994. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis by a soluble peptide variant of a myelin basic protein epitope: T cell receptor antagonism and reduction of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med.* 180: 2227-2237.
39. Katsara M., Yuriev E., Ramsland P.A., Tselios T., Deraos G., Lourbopoulos A., Grigoriadis N., Matsoukas J., Apostolopoulos V. 2009. Altered peptide ligands of myelin basic protein (MBP87-99) conjugated to reduced mannan modulate immune responses in mice. *Immunology.* 128: 521-533.
40. Khalatbary A.R., Zarrinjoei G.R. 2012. Anti-Inflammatory Effect of Oleuropein in Experimental Rat Spinal Cord Trauma. *Iran Red Crescent Med J.* 14: 229-34.

41. Kiernan J.A. 2009. El sistema nervioso humano: Una perspectiva anatómica. 9a. ED *Editorial Lippincott*. 3-11 y 61-77.
42. Latarjet Ruiz Liard. 2005. Anatomía Humana. 4ª edición. *Panamericana*. Tomo 1. 141-153.
43. Lemke M., Demediuk P., McIntosh TK., Vink R., Faden A.I. 1987. Alterations in tissue Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> and spinal cord edema following impact trauma in rats. *Biochemical and Biochem. Bio-phys. Res. Commun.* 147: 1170-1175.
44. Lin H.S., Ji Z.S., Zheng L.H., Guo G.Q., Chen B., Wu H., Zhang G.W. 2012. Effect of methylprednisolone on the activities of caspase-3, -6, -8 and -9 in rabbits with acute spinal cord injury. *Exp Ther Med*. 4: 49-54.
45. 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.
46. Liu D., Xu G.Y., Pan E., McAdoo D.J. 1999. Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neuroscience*. 93: 1383-1389.
47. Lodish H., Berk A., Zipusky S., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.E. 2002. *Biología Celular y Molecular*. 4ª edición. *Editorial Médica Panamericana*. México. 924-931.

48. Louis C.A., Mody V., Henry W.L., Reichner J.J.S., Albina J.E. 1999. Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages, *Am. J Physiol.* 276:237-242.
49. Mansilla-Olivares A. 2004. El calcio, átomo detonante de la vida y la función celular. *Cir Ciruj.* 72: 139-151.
50. Matsushita K., Wu Y., Lang-Lazdunski., Hirt L., Waeber C., Hyman B. T., Yuan J., Moskowitz MA. 2000. Fas receptor an neuronal cell death after spinal cord. *J Neurosci.* 20: 6879-6887.
51. Martiñón S., García E., Gutiérrez-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.
52. Martiñón S., Ibarra A. 2008. Pharmacological neuroprotective therapy for acute spinal cord injury: state of the art. *Mini Rev Med Chem.* 8: 222-230.
53. Martiñón S., García E., Flores N., González I., Ortega T., Buenrostro M., Reyes R., Fernández-Presas A.M., Guizar-Sahagún., 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.
54. Moalem G., Leibowitz-Amit R., Yoles E., Mor F., Cohen I.R., Schwartz M. 1999. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med.* 5: 49-55.

55. Mondaca-Estrada S., Carreón-Rodríguez A., Parra-Cid M.C., Ibarra-Ponce de León C., Velasquillo-Martinez C., Vacanti C.A. Belkind-Gerson J. 2008. Lesión de médula espinal y medicina regenerativa. *Salud Pública México*. 49: 437-444.
56. Morgan M.J., Kim Y.S, Liu Z.G. 2008. TNF $\alpha$  and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Research*. 18: 343-349.
57. Murphy K, Travers P, Walport M. 2009. Inmunobiología de Janeway. 7<sup>a</sup> edición. *McGraw Hill México*. 10-12, 615,
58. Newman S.W., Gilman S., William J. 2003. Neuroanatomía y Neurofisiología clínicas de Manter y Gatz. 5<sup>a</sup> edición. *Editorial Manual Moderno. México*. 281:300-440.
59. Nguyen T.L., Kim C.K., Cho J.H., Lee K.H., Ahn J.Y. 2010. Neuroprotection signaling pathway of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor against staurosporine induced apoptosis in hippocampal H19-7/IGF-IR. *Exp Mol Med*. 42:583-95.
60. Pardini C.M. 1998. Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal. *Tesis doctoral, Secretaría de Salubridad y Asistencia, México*. 100.
61. Pocock G. 2006. Fisiología humana. La base de la medicina, *OUP Oxford*. 71,161
62. Presas A.M., Robert L., Jiménez J.A., Willms K. 2005. Apoptosis patterns in experimental *Taenia solium* and *Taenia crassiceps strobilae* from golden hamsters. *Parasitol Res*. 96: 1-5.
63. Puelles-Lopez., Martinez-Perez., Martínez de la Torre. 2008. Neuroanatomía. *Editorial Médica Panamericana*. 97-102.

64. Santocoy C., Rios C., Franco-Bourland R.E., Hong G., Guizar-Sahagún G. 2002. Lipid peroxidation by nitric oxide supplements after spinal cord injury: effect of antioxidants in rats. *Neurosci Lett.* 330: 94-98.
65. Schwartz M., Moalem G., Leibowitz-Amit R., Cohen IR. 1999. Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci.* 22: 295-9.
66. Schwartz M., Shechter R. 2010. Protective autoimmunity functions by intracranial immunosurveillance to support the mind: The missing link between health and disease. *Mol Psychiatry.* 15:342-54.
67. Scheiber I.F., Dringen R. 2012. Astrocyte functions in the copper homeostasis of the brain. *Neurochem Int.* S0197:284-287.
68. Shaked I., Tchoresh D., Gersner R., Meiri G., Mordechai S., Xiao X., Hart R.P., Schwartz M. 2005. Protective autoimmunity: interferon-gamma enables microglia to remove glutamate without evoking inflammatory mediators, *J. Neurochem.* 92: 997–1009.
69. Snell R.S. 2010. Neuroanatomía clínica. 7<sup>a</sup> edición. *Médica Panaméricana* 132-185.
70. Sofroniew M.V., Vinters H.V. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119: 7-35.
71. Tran G.T., Carter N., He X.Y., Spicer T.S., Plain K.M., Nicolls M., Hall B.M., Hodgkinson S.J. 2001. Reversal of experimental allergic encephalomyelitis with non-

- mitogenic, non-depleting anti-CD3 mAb therapy with a preferential effect on T (h) 1 cells that is augmented by IL-4. *Int Immunol*. 13:1109-1120.
72. Von Bernhardi R. 2007. Glial cell dysregulation: a new perspective on Alzheimer disease. *Neurotox Res*. 12:215-232.
73. Wajant H. y Scheurich P. 2011. TNFR1-induced activation of the classical NF-kB pathway. *FEBS Journal*. 278:862–876.
74. Young W., Koreh I. 1986. Potassium and calcium changes in injured spinal cords. *Brain Res*. 365:42-53.
75. Zamorano J., Mora A.L., Boothby M., Keegan A.D. 2001. NF-kappa B activation plays an important role in the IL-4-induced protection from apoptosis. *Int Immunol*. 13:1479-1487.
76. Zwart L.L., Meerman J.H., Commandeur J.N., Vermeulen N.P. 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med*. 26:202-26.
77. Ziemssen T., KuÈmpfel T., Wolfgang E. F., Klinkert., Neuhaus O., Hohlfeld R. 2002. Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. *Brain*. 125:2381-2391



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

Fecha : 30/11/2012

Página : 1/1

**CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO**

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL de la alumna ROXANA HAYDEE RODRIGUEZ BARRERA, matrícula 210380705, quien cumplió con los 176 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha tres de diciembre del 2012 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

EVALUACION DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE A91 SOBRE LA APOPTOSIS, EN RATAS CON LESION TRAUMATICA DE MEDULA ESPINAL

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 216 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

APROBADA

**JURADO**

Presidenta

DRA. HERLINDA BONILLA JAIME

Secretaria

DRA. ANA MARIA FERNANDEZ PRESAS

Vocal

DR. ARMANDO LUNA LOPEZ

Vocal

DRA. EDNA ELISA GARCIA VENCES

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**Coordinación de Sistemas Escolares**

Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México, DF, CP 09340 Apdo. Postal 555-320-9000, Tels. 5804-4880 y 5804-4883 Fax: 5804-4876