

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA**
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



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

**“Evaluación de ratas con lesión crónica de la
médula espinal tratadas con una estrategia de
combinación para mejorar el efecto restaurador de
la inmunización con el péptido A91”**

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

Presenta:

**Maestra en Biología Experimental
Roxana Haydee Rodríguez Barrera**

**CO- DIRECCIÓN DE TESIS
Dr. José Juan Antonio Ibarra Arias
Dra. Mina Königsberg Fainstein**

**ASESORÍA DE TESIS
Dra. Ana María Fernández Presas**

Ciudad de México., 27 de Abril del 2017

Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación de Ciencias de la Salud de la Universidad Anáhuac México Norte, en el Centro de Investigación Proyecto Camina y en el laboratorio de Bioenergética y envejecimiento celular de la UAM Iztapalapa.

El Doctorado 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 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

El trabajo de investigación fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) durante el año 2012-2016 con el No. de becario 56958 y No. de proyecto 178544.

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL de la alumna ROXANA HAYDEE RODRIGUEZ BARRERA, matricula 2131800938, quien cumplió con los 315 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio, 45 créditos de PUBLICACION y 45 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL. Con fecha veintisiete de abril del 2017 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

EVALUACIÓN DE RATAS CON LESIÓN CRÓNICA DE LA MÉDULA ESPINAL TRATADAS CON UNA ESTRATEGIA DE COMBINACIÓN PARA MEJORAR EL EFECTO RESTAURADOR DE LA INMUNIZACIÓN CON EL PÉPTIDO A91

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 45 créditos y el programa consta de 450 créditos.

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

1-PROBAR

JURADO

Presidenta

DRA. VIRIDIANA YASMIN GONZALEZ
PUERTOS

Secretaria

DRA. ANA MARIA FERNANDEZ PRESAS

Vocal

DR. RAUL SILVA GARCIA

Vocal

DRA. EDNA ELISA GARCIA VENCES

COMITÉ TUTORAL

Co- Director

Dr. José Juan Antonio Ibarra Arias.

Coordinador de Centro de Investigación 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

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a mi familia

Agradezco a mi familia por ser mi fuente de inspiración a cada momento, por estar conmigo en las buenas y en las malas sin titubear, su cariño en esta vida no podría pagar, su apoyo incondicional y aguantar mi mal humor. A mis padres, por darme la vida, por mostrarme humildad, por impulsarme y no dejarme sola. A mis hermanos y Esperanza por su apoyo moral en las buenas y malas, sus regaños, sus consejos diarios, comprensión y confianza, porque siempre están conmigo, les agradezco infinitamente por dejar que persiga mis sueños.

Gracias a Víctor y a Iván, los amo a los dos por que llegaron en el momento preciso para derramar en una sonrisa mucho amor e iluminar mi vida. Luka y Bibi.

A mi abuelita, gracias a enseñarme la fortaleza y que a pesar de los obstáculos hay que salir adelante no solos pisoteándose mutuamente, sino unidos como una familia. Gracias a mis tías y tíos por sus enseñanzas y compañía. A toda mi familia los quiero mucho.

A mis tutores

Gracias Dr. Antonio Ibarra por seguir confiando en mí brindándome su apoyo y ayuda en mi crecimiento académico y personal, por compartir los logros conmigo y sus enseñanzas que enriquecen mi conocimiento.

Dra. Ana María muchas gracias por su cariño, los valores y principios, pues su buen humor siempre está presente. Debido a usted he incrementado mi fe recordando día a día que Dios está ahora conmigo y en cada momento.

Dra. Mina Königsberg, gracias, porque me dejó seguir con usted, por la entrega que muestra cada que comparte su conocimiento y hacerme ver la inspiración que nace gracias a usted.

A mis compañeros de Laboratorio

Quiero agradecer especialmente a mis compañeros Adrián Flores y Liliana Espinoza su apoyo incondicional en las cirugías, manejo y cuidado de los animales y por su trabajo arduo día a día. Además, por ser mis amigos, por sus consejos, apoyarme y no dejarme sola, porque son parte de mi familia académica.

Gracias a Elisa, Viri, Yolanda, Vinni, Thalís, Eliud, Dulce, Alberto, Saúl, Blanquita, Rosmary, José Agustín y Guadalupe Sarmiento.

A mis alumnos

Quiero agradecerles a Karla y Samuel por la confianza que me brindaron y enseñarme otra faceta, por la necesidad de mantenerme siempre al día y entender la importancia de escuchar.

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC	Sistema Nervioso Central
Ca²⁺-Cam	Calcio - Calmodulina
PK- Ca²⁺-	proteína cinasa Calcio-Cam - dependiente
NT	Neurotransmisor
GABA	ácido γ aminobutirico
ME	médula espinal
BHE	barrera hematoencefálica
BHM	barrera hematomedular
LME	Lesión de médula espinal
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SNE	Sistema Nervioso Entérico
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
INF-γ	Interferón gama
Fgf-2	Factor de crecimiento para fibroblastos básico
GFAP	Proteína gliofibrilar ácida
CSPG	proteoglicanos de condroitin sulfato
IL-1β	Interleucina 1 beta
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos/macrófagos
NGF	Factor de crecimiento neural
EAE	Encefalomiелitis autoinmune Experimental
PBM	Proteína básica de la mielina

TCR	Receptor de células T
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
TH1	Fenotipo de linfocitos T pro-inflamatorio
TH2	Fenotipo de linfocitos T anti-inflamatorio
M1	Fenotipo de macrófagos/microglia reactivo
M2	Fenotipo de macrófagos/microglia anti-inflamatorio
IL	Interleucina
AP	Autorreactividad protectora
A91	Péptido neural modificado de la PBM
IPNM	inmunización con péptidos neurales modificados
K	lisina
A	alanina
Cop-1	copolimero-1
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
NT3	Neurotrofina 3
MP	Metilprednisolona
CTM	células troncales mesenquimales
DPY	$\alpha\alpha$,- dipiridilo
EGF	Factor de crecimiento epidermal
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
IGF-1	Factor de crecimiento parecido a la insulina 1
iNOS	Sintasa inducible del óxido nítrico
LCME	Lesión crónica de médula espinal

ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ACF	Adyuvante completo de Freud
ConA	Concanavalina A
³H	Timidina tritiada
GAP-43	Proteína asociada al crecimiento 43
PCR-TR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
ADNc	cadena complementaria
TH	hidroxilasa de tirosina
5-HT	serotonina o 5-hidroxitriptamina
ANOVA	análisis de varianza
DE	desviación estándar
RC	Remoción de cicatriz
BBB	Prueba locomotora a campo abierto de Basso, Beattie & Bresnahan
PT	Patas traseras
PD	Patas delanteras

ÍNDICE

1. RESUMEN	17
2. ABSTRACT	19
3. MARCO TEÓRICO	20
3.1 Neurona.....	20
3.2 Células neurogliales.....	25
3.3 Sistema nervioso central y periférico	28
3.4 Sistema nervioso entérico.....	29
3.5 Médula espinal.....	30
3.6 Anatomía macroscópica de la médula espinal	30
3.7 Estructura interna de la médula espinal	32
3.8 Líquido cefalorraquídeo.....	33
3.9 Vascularización de la médula espinal.....	34
3.10 Vías sensitivas y motoras.....	35
3.10.1 Vías ascendentes o sensitivas	35
3.10.2 Vías descendentes o motoras	38
3.11 Lesión de médula espinal.....	42
3.12 Eventos neurodegenerativos después de la lesión de médula espinal.....	43
3.13 Lesión crónica de médula espinal.....	45
3.14 Respuesta inflamatoria y respuesta autorreactiva después de la lesión.....	47
3.15 Autorreactividad Protectora	50
3.16 Autorreactividad Protectora en combinación con otras terapias	53

3.17. Estrategias terapéuticas en lesiones crónicas medulares	54
3.17.1. Remoción de la cicatriz glial.....	55
3.17.2. α,α -dipiridilo.....	56
3.17.3. Trasplante de células troncales mesenquimales.....	56
3.17.4 Matrices biocompatibles.....	58
4. JUSTIFICACIÓN	62
5. PREGUNTA A RESOLVER	63
6. HIPÓTESIS.....	64
7. OBJETIVO GENERAL	64
7.1. OBJETIVOS PARTICULARES	64
8. MATERIAL Y MÉTODOS	65
8.1. Animales y grupos de estudio.....	65
8.2. Técnica de lesión	67
8.3. Cuidados post operatorios.....	68
8.4. Inmunización activa.....	68
8.5. Ensayo de proliferación.....	68
8.6. Incorporación de timidina tritiada ^3H	70
8.7. Remoción e inhibición de la cicatriz fibrogliar	70
8.8. Obtención de células troncales mesenquimales.....	71
8.9. Trasplante de células troncales mesenquimales	71
8.10. Colocación del tissucol y de las CTM.....	72
8.11. Prueba de locomoción a campo abierto BBB	72

8.12. Tinción tricrómica de Masson.....	72
8.13. Análisis de expresión génica.....	73
8.14. Inmunohistoquímica	75
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	76
10. RESULTADOS	76
10.1 La IPNM con dosis de 200µg induce una mayor proliferación de linfocitos T _{A91} en la LCME.....	76
10.2. La remoción de cicatriz no induce un mayor déficit motor del que presentaban los animales antes de la intervención quirúrgica.....	77
10.3. La inmunización con péptidos neurales modificados más la remoción de cicatriz mejoró la recuperación motora después de la lesión crónica de la médula espinal.....	78
10.4. La inmunización con péptidos neurales modificados más la remoción de cicatriz presenta menos depósitos de fibras de colágena.....	80
10.5. La inmunización con péptidos neurales modificados más la remoción de cicatriz genera un microambiente donde la expresión de genes asociados a la inflamación y la regeneración prevalecen.....	82
10.6. La inmunización con péptidos neurales modificados más la eliminación de la cicatriz glial promueve la regeneración axonal.....	86

10.7. La sola inmunización con péptidos neurales modificados, también, incrementa la recuperación motora en la lesión crónica de la médula espinal.....	87
10.8. El microambiente generado por la inmunización con péptidos neurales modificados también es permisivo, aunque en menor grado que el inducido por la remoción de cicatriz + IPNM.....	88
10.9. La inmunización con péptidos neurales modificados promueve la regeneración axonal en menor grado comparado con la inmunización con péptidos neurales modificados más remoción de cicatriz.....	91
10.10. La estrategia de combinación mejora la recuperación motora en la lesión crónica de la médula espinal, aunque en menor grado que la remoción de cicatriz más IPNM.....	93
10.11. El microambiente generado por la terapia de combinación, también es permisivo, aunque en menor grado que la inducida por la remoción de cicatriz + IPNM.....	94
10.12. La inmunización con péptidos neurales modificados más la remoción de cicatriz no promueve la regeneración axonal cuando se usa en combinación con las células troncales mesenquimales.....	98
11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	99
12. CONCLUSIONES.....	108
14. PERSPECTIVAS.....	109
15. ANEXOS.....	109

15.1. Secuencia de cebadores PCR-Tiempo Real.....	109
15.2. Escala BBB.....	110
15.3. Tinción tricrómica de Masson.....	112
16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura interna de la médula espinal
Figura 2	Eventos neurodegenerativos después de una LME
Figura 3	Representación esquemática de la lesión por contusión en fase crónica
Figura 4	Inmunización con péptidos neurales modificados como A91.
Figura 5	Incorporación de Timidina ³ H en linfocitos T de ratas con LCME.
Figura 6	Comparación de la prueba motora BBB antes y después de la remoción quirúrgica de la cicatriz glial.
Figura 7	Recuperación motora antes y después de la intervención terapéutica (1er. experimento).
Figura 8	Micrografía que muestra la Tinción Tricrómica de Masson en el sitio de lesión.
Figura 9	Expresión relativa de genes asociados a la inflamación en el sitio de lesión.
Figura 10	Expresión relativa de genes asociados a la regeneración en el sitio de lesión.
Figura 11	Se observa el número de axones en la porción caudal de ratas con LME después de la intervención terapéutica.
Figura 12	Recuperación motora antes y después de la intervención terapéutica (2do. experimento).
Figura 13	Expresión relativa de genes asociados a la inflamación en el sitio de lesión
Figura 14	Expresión relativa de genes asociados a la regeneración en el sitio de lesión.
Figura 15	Se observa el número de axones en la porción caudal de ratas con LME después de la intervención terapéutica.

Figura 16	Recuperación motora antes y después de la intervención terapéutica (3er. experimento).
Figura 17	Expresión relativa de genes asociados a la inflamación en el sitio de lesión.
Figura 18	Expresión relativa de genes asociados a la regeneración en el sitio de lesión.
Figura 19	Se observa el número de axones en la porción caudal de ratas con LME después de la intervención terapéutica.

1. RESUMEN

La Inmunización con péptidos neurales modificados (IPNM) así como la remoción de cicatriz y la matriz de fibrina impregnada con células troncales mesenquimales (CTM) por separado han demostrado que inducen una mejora funcional y morfológica después de una lesión de médula espinal (LME). En esta tesis se evaluó el efecto de la remoción de cicatriz (RC) + IPNM, la IPNM sola o en combinación con RC ó RC + IPNM + matriz de fibrina impregnada con CTM sobre la recuperación motora, la expresión de moléculas relacionadas con la regeneración axonal y la modulación inmunológica y regeneración axonal después de una LME crónica. La cicatriz de cada experimento fue removida mediante un La cicatriz fibrogliosa se retiró mediante un corte de 3 mm de espesor de cada muñón con un bisturí adecuado para cortar solo el espesor antes mencionado y una vez removida la cicatriz se inhibió su nueva formación adicionando α,α' -dipiridilo (DPY).

Los experimentos fueron realizados en 69 ratas hembras adultas de la cepa Sprague-Dawley (SD) con LME crónica. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos: 1) Ratas con LME crónica inmunizadas con adjuvante completo de Freud + PBS (vehículo); 2) Ratas con RC; 3) Ratas con RC + IPNM. En el primer experimento se evaluó el efecto de la RC + IPNM sobre la recuperación motora por medio de la prueba motora BBB. Se realizaron evaluaciones semanales hasta los 60 días después de aplicar la estrategia terapéutica. A los 60 días después de la re-intervención, se evaluó la expresión génica de TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β , BDNF, IGF-1, y GAP-43, por medio de PCR-tiempo real. Finalmente, se determinaron el número de axones positivos a fibras catecolaminérgicas y serotoninérgicas. Los resultados de la prueba motora demostraron una mejor recuperación motora en el grupo de RC + IPNM. Además, este grupo presentó un aumento significativo en la expresión de IL-4, IL-10, TGF- β , BDNF, IGF-1 y GAP-43 y

una disminución en TNF- α e IFN- γ . Para determinar si efectivamente el microambiente permisivo anti-inflamatorio generado por la RC + IPNM tuvo efecto positivo sobre la regeneración axonal; se evaluó el porcentaje de fibras inmunorreactivas a serotonina y tirosina hidroxilasa en la porción caudal al sitio de lesión de las ratas después de la re-intervención. En el segundo y tercer experimento nosotros comparamos el efecto de la RC + IPNM con la sola IPNM y RC + IPNM + matriz de fibrina impregnada con CTM, ambas terapias inducen un incremento en la recuperación motora, la expresión de moléculas relacionadas con la regeneración axonal y la modulación inmunológica y regeneración axonal, en menor grado comparadas con la RC + IPNM.

Estos hallazgos sugieren conjuntamente, nuestros resultados sugieren que la terapia de combinación que consistió en la remoción de cicatriz + IPNM, incluso la IPNM por sí sola y la remoción de cicatriz + IPNM + CTM podría modificar sustancialmente el microambiente no permisivo que prevalece en la fase crónica de LME; proporcionando la oportunidad de promover una mayor recuperación motora.

La remoción de cicatriz + IPNM mostró el mejor efecto benéfico en la respuesta locomotora.

2. ABSTRACT

Immunization with neural derived peptides (INDP) as well as scar removal and fibrin glue with mesenchymal stem cells (MSC) -separately- have shown to induce morphological and functional improvement after spinal cord injury (SCI). In the present study, we evaluated the effect of INDP alone or combined with scar removal or scar removal + INDP + fibrin glue with MSC on motor recovery, the expression of regeneration-associated and cytokine genes as well as axonal regeneration and axonal regeneration after chronic SCI. The scar from each stump was removed by a single incision with a double-bladed scalpel and its renewal was halted by adding α, α' -dipyridyl.

Three studies were designed; each one performed during the chronic stage of injury. In the first experiment, we tested the therapeutic effect of combining scar removal + INDP. Sixty days after therapeutic intervention, the expression of genes encoding for TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β , BDNF, IGF-1, and GAP-43 was evaluated at the site of injury. Tyrosine hydroxylase and 5-hydroxytryptamine positive fibers were also studied. Locomotor evaluations showed a significant recovery in the group treated with scar removal + INDP. Moreover; this group presented a significant increase in IL-4, IL-10, TGF- β , BDNF, IGF-1, and GAP-43 expression, but a decrease of TNF- α and IFN- γ . Also, the spinal cord of animals receiving both treatments presented a significant increase of serotonergic and catecholaminergic fibers as compared to other the groups.

In the second and third experiment, we compared the effect of scar removal + INDP versus INDP alone and versus scar removal + INDP + fibrin glue with MSC. Unexpectedly, INDP and scar removal + INDP + fibrin glue with MSC promoted motor recovery; however, it had a lower effect than the one observed in rats receiving the scar removal + INDP. Inflammation and regeneration-associated gene expression, as well as, the percentage of

serotonergic and catecholaminergic fibers in INDP treated or scar removal + INDP + fibrin glue with MSC were also increased; but the effect was lower than the one observed in the scar removal + INDP-treated group.

These findings suggest that INDP alone or in combination with scar removal could modify the non-permissive microenvironment prevailing at the chronic phase of SCI, providing the opportunity of improving motor recovery.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Neurona

Las células nerviosas, o neuronas, son las unidades estructurales y funcionales del sistema nervioso central (SNC). Generan y conducen cambios eléctricos en forma de impulsos nerviosos (Fitzgerald, 2012). 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 (Crossman, A., 2007). La región de comunicación entre la neurita o prolongación citoplasmática de una neurona se denomina sinapsis, las sinapsis (Fitzgerald *et al.*, 2012) 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 neurona, se desencadena un impulso que se transmite a través del axón (Crossman, A., 2007). Todas las neuronas están formadas por microtúbulos y neurofilamentos. Las neuronas poseen proyecciones denominadas neuritas que se especializan para formar dendritas y axones (Crossman, A., 2007). En algunas neuronas, los tallos de las dendritas son lisos, en otras, presentan numerosas espinas cortas (Fitzgerald, 2012). Los axones pueden ser mielínicos o amielínicos. Los axones mielínicos están cubiertos por una gruesa capa de material lipoproteico, 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, 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 que también se conoce como terminación nerviosa.

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 Ca^{+2} dependientes de voltaje en la neurona presináptica. El Ca^{+2} penetra en la terminación nerviosa a favor de gradiente electroquímico con el consiguiente incremento del Ca^{+2} libre, que induce la fusión de una o más vesículas sinápticas con la membrana presináptica (Pocock, 2006). De tal forma que la neurona al presentar un incremento en la concentración intracelular de este ion, forma el complejo Ca^{+2} -calmodulina (Ca^{+2}CaM), que por sí mismo activa a una proteincinasa Ca^{+2}CaM - dependiente (PK- Ca^{+2}CaM). 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 gaminobutirico (GABA), la serotonina y numerosos péptidos, como la sustancia P y la encefalina (Pocock, 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 β_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 (Fitzgerald, 2012; Pocock, 2006). La apertura de estos canales provoca la despolarización de la célula postsináptica durante un periodo de tiempo breve. 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, 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. 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 una 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 (Elaine. Marieb, 2008). 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 (Crossman, A., 2007; Elaine. Marieb, 2008; Pocock, 2006).

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, 2006).

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). 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 (Kiernan, 2009)..

Las neuronas del SNC están sostenidas por células no excitables que en conjunto se denominan neuroglia.

3.2 Células neurogliales

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

a) *Astroglía o astrocitos*. Los astrocitos son células con una morfología de estrellas con decenas de finas prolongaciones (Fitzgerald, 2012) o proyecciones prolongadas que efectúan uniones herméticas con los vasos sanguíneos y con otras células del SNC (Snell, 2010; Fitzgerald, 2012). Poseen un citoplasma con numerosos filamentos intermedios; estos les confieren un grado de rigidez y les ayudan a soportar el encéfalo en su conjunto y gránulos de glucógeno, que también son abundantes, ofrecen glucosa inmediata a las neuronas (Fitzgerald, 2012). 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 ME. Esta barrera se conoce como barrera hematoencefálica (BHE) en encéfalo y barrera hematomedular (BHM) y sirve para impedir que los cambios en la composición de la sangre influyan en la actividad de las células nerviosas dentro del SNC (Snell, 2010). Además de mantener la integridad de la BHE y BHM (Sofroniew & Vinters, 2010), recientemente se les han adjudicado nuevas funciones como la capacidad de regular parte de la transmisión sináptica (Halassa & Haydon, 2010), así como el mantener la homeostasis del cobre (Scheiber & Dringen, 2013) y los niveles de colesterol (Pfrieger & Ungerer, 2011). Así mismo, protegen al SNC contra el estrés oxidante, principalmente porque producen y secretan enzimas antioxidantes (Dringen, Gutterer, & Hirrlinger, 2000).

Los astrocitos utilizan canales específicos para eliminar la acumulación de iones K^+ en el espacio extracelular durante los periodos de intensa actividad neural. Participan en la recaptura y reciclado de determinados NT, sobre todo del transmisor excitador del SNC, el glutamato y el principal transmisor inhibitor, el GABA.

Los astrocitos pueden proliferar en cualquier momento. Como parte del proceso de curación después de una lesión del SNC, la proliferación de los astrocitos y sus prolongaciones da lugar a un tejido de la cicatriz glial denso (gliosis), cabe destacar sobre todo que la proliferación local espontánea de los astrocitos puede originar un tumor cerebral (Fitzgerald, 2012). Recientemente, se ha demostrado que participan activamente en la modulación de la actividad neural (Halassa & Haydon, 2010), en la transmisión sináptica, en la formación de la memoria a largo plazo (Suzuki et al., 2011), en la plasticidad sináptica (Ota, Zanetti, & Hallock, 2013), diferenciación neuronal (Gimsa, Mitchison, & Brunner-Weinzierl, 2013) y en la respuesta inmune innata del SNC (Shastri, Bonifati, & Kishore, 2013).

b) Los *oligodendrocitos* (oligodendroglía) representan 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 (Snell, 2010). En la sustancia gris, forman a las células satélite que parecen participar en el intercambio iónico con las neuronas (Fitzgerald, 2012). En el sistema nervioso periférico (SNP), las vainas de mielina están formadas por las células de Schwann y en el SNC por los oligodendrocitos.

La mielinización comienza aproximadamente en la 16va. semana de vida intrauterina y continúa en el período posnatal hasta que prácticamente todas las fibras nerviosas están mielinizadas en el momento en que el niño comienza a caminar (Snell, 2010). Un

oligodendrocito deposita mielina sobre tres docenas de axones mediante un proceso en espiral a través del cual las caras interna y externa de la membrana plasmática forman las líneas densas alternantes mayores y menores que se ven en las secciones transversales de la vaina de mielina (Berghmans et al., 2012). La mielinización incrementa enormemente la velocidad de la conducción del impulso, ya que el proceso de despolarización salta de un nódulo a otro. Durante la mielinización se eliminan canales K^+ del axolema subyacente (Fitzgerald, 2012).

Los oligodendrocitos son una de las principales células que mueren por apoptosis y esto genera una rápida desmielinización, la gliosis y la activación de la microglía, que forman parte de las lesiones en la esclerosis múltiple y lesión de ME (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 (Emmetsberger & Tsirka, 2012). Las células de la microglía en reposo son diminutas (de ahí su nombre) y se han encontrado dos fenotipos M1 y M2, cuando se activan por inflamación se agrandan para convertirse en fagocitos móviles (Fitzgerald, 2012). Las células de la microglía, están distribuidas en el SNC, sirviendo como un sensor patológico y comienza a activarse en respuesta a un estímulo de daño. La microglía activada migra hacia los sitios de lesión invadido por patógenos y se transforma desde el fenotipo en reposo en células ameboides (fagocíticas) o M1 (Jin & Yamashita, 2016). La microglía activada puede liberar una serie de citocinas, quimiocinas y enzimas, las cuales dependen del estímulo de activación, dentro de estas podemos encontrar Interleucina 1 beta ($IL-1-\beta$), $IL-6$, factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$), factor de crecimiento transformante ($TGF-\beta 1$), Factor estimulante de colonias de Monocitos/macrófagos (M-CSF), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) , factor de

crecimiento neural (NGF), NT-3 y factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Nakajima et al., 2001) que estimulan la proliferación de células endoteliales capilares del SNC y cambios reactivos en los astrocitos, por ejemplo, la microglía/macrófagos localizados dentro del epicentro de la lesión producen factores neurotóxicos como el TNF- α que contribuye a la desmielinización (Emmetsberger & Tsirka, 2012). El fenotipo de macrófagos M2 ejerce un efecto neuroprotector por la estimulación de factores tróficos y aumenta la producción de IL-10 regulando la respuesta inflamatoria posterior al trauma (Jin & Yamashita, 2016). Por ultimo promueve remodelación axonal de fibras corticoespinales y dopaminérgicas incrementando la recuperación motora (Gensel & Zhang, 2015).

d) *Las células ependimarias* revisten el sistema ventricular encefálico, los cilios en su superficie libre ayudan a la propulsión del líquido cefalorraquídeo (LCR) a través de los ventrículos (Fitzgerald, 2012) y el canal central de la ME. Forman un epitelio cuboidal columnar que recibe el nombre de epéndimo (Crossman, A., 2007; Elaine. Marieb, 2008; Pocock, 2006).

3.3 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 ME, y el sistema nervioso periférico (SNP), que consiste en nervios craneales, espinales y sus ganglios asociados.

Del SNC, el encéfalo y la ME son los centros principales donde ocurre la correlación y la integración de la información nerviosa. Tanto el encéfalo como la ME se encuentran protegidos por las meninges, suspendidos en el LCR y por los huesos del cráneo y la

columna vertebral. El interior del sistema nervioso está organizado en sustancia gris y sustancia blanca (Fitzgerald, 2012).

Mientras en el SNP, se encuentran 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, A., 2007; Snell, 2010). El sistema nervioso parasimpático adapta los ojos a la visión cercana, ralentiza el corazón, favorece la secreción de saliva y secreciones intestinales y acelera el peristaltismo intestinal, a través del Sistema nervioso entérico.

3.4 Sistema nervioso entérico

El sistema nervioso entérico (SNE), se extiende desde la región media del esófago hasta el conducto anal. A través de todo su recorrido controla la actividad peristáltica, la secreción glandular y la transferencia de iones y agua. Además, el SNE inerva el páncreas, el hígado y la vesícula biliar. El número de neuronas intrínsecas en la pared del tubo digestivo se ha equiparado al número existente en toda la ME (Fitzgerald, 2012).

3.5 Médula espinal

La ME ocupa los dos tercios superiores del conducto vertebral (Fitzgerald, 2012) y los ganglios de la raíz posterior son los responsables de la inervación de la mayor parte del cuerpo (Snell, 2010). Presenta 31 pares de nervios espinales unidos a través de las raíces anteriores y posteriores de los nervios espinales vertebral (Fitzgerald, 2012). 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 ME y son retransmitidos al tronco encefálico y al cerebelo, y contribuyen a formar los circuitos que controlan la actividad motora y otras funciones (Snell, 2010).

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

3.6 Anatomía macroscópica de la médula espinal

La ME 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 ME la garantizan no solo las vértebras y sus ligamentos, sino también las meninges y la amortiguación que proporciona el LCR (Puelles-Lopez., Martinez-Perez., Martínez de la Torre, 2008; Snell, 2010).

El saco dural espinal es como una probeta; esta insertado en el borde del agujero magno y llega hasta el nivel de la segunda vértebra sacra. La superficie externa del tubo se adhiere al ligamento longitudinal posterior de las vértebras en la línea media; en los restantes niveles está rodeado por la grasa que en vuelve el plexo venoso vertebral interno epidural.

La superficie interna de la duramadre esta revestida por la aracnoides. La piamadre reviste la superficie de la ME y se fija a la duramadre a intervalos regulares a través del ligamento dentado (Fitzgerald, 2012). La capa más interna de las meninges es la piamadre, una capa delgada que se adhiere a la superficie de la ME.

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 (Latarjet, 2005). La duramadre espinal (con su revestimiento aracnoide) en ocasiones recibe el nombre de saco tecal (del griego, cápsula circundante) (Fitzgerald, 2012).

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 ME 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 médula 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 ME 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).

Hasta el tercer mes de vida fetal, la ME ocupa la totalidad del conducto vertebral. En adelante, el ritmo de elongación de la columna vertebral excede al de la ME; como resultado, al nacimiento la ME 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 ME puede identificarse por medio de la referencia de las apófisis espinosas posteriores de las vértebras. Como regla general, los segmentos cervicales de la ME se sitúan aproximadamente una apófisis espinosa por encima de sus correspondientes vértebras (p. ej., el segmento medular C7 se sitúa adyacente a la vértebra 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 vértebra (Crossman, A., 2007; Kiernan, 2009)

3.7 Estructura interna de la médula espinal

La ME se compone de un núcleo interno de sustancia gris, rodeado de una cubierta externa de sustancia blanca (Figura 1).

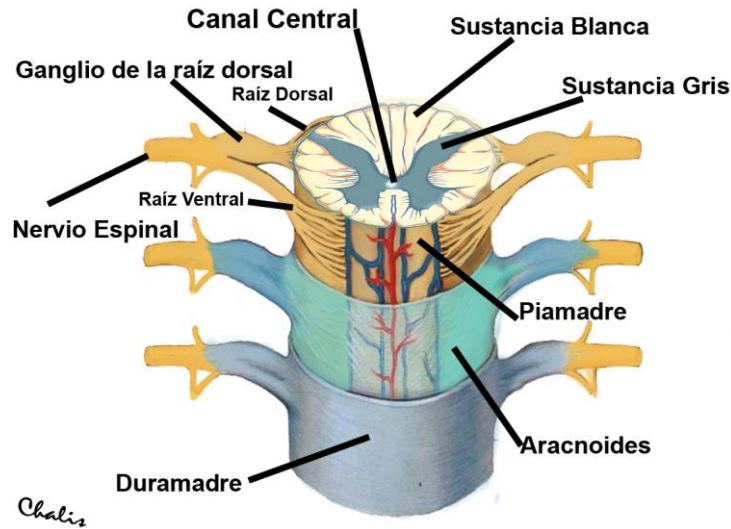


Figura 1. Estructura interna de la médula espinal

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 ependimario. En los segmentos dorsales y lumbares superiores se añade un asta lateral, que contiene neuronas pre-ganglionares simpáticas (Crossman, A., 2007; Kiernan, 2009). Como la ME solo llega al nivel de la primera o segunda vértebra lumbar, se crea una enorme cisterna lumbar, que contiene las raíces motoras y sensitivas de los nervios espinales sacros y lumbares inferiores, que flotan libremente. La cisterna lumbar puede puncionarse con objeto de tener muestras para el análisis del LCR, o bien para administrar una anestesia espinal (Fitzgerald, 2012).

3.8 Líquido Cefalorraquídeo

La mayor parte del LCR es secretada por los plexos coroideos, estructuras formadas por una gran red de capilares rodeados por un epitelio y situadas en las paredes de los ventrículos laterales, aunque también se forman pequeñas cantidades de LCR en los espacios subaracnoideos y perivasculares (Latarjet, 2005).

El LCR secretado por los plexos coroideos escapa hacia el interior del espacio subaracnoideo a través de tres aberturas del cuarto ventrículo. Una parte desciende hacia la cisterna lumbar. La cisterna lumbar contiene las raíces de nervios espinales y es accesible para la punción lumbar (Fitzgerald, 2012).

La fuente principal de LCR es la secreción de los plexos coroides al interior de los ventrículos encefálicos. Desde los ventrículos laterales, el LCR entra en el tercer ventrículo a través del agujero interventricular. Desciende al cuarto ventrículo a través del acueducto mesenfálico y escapa hacia el espacio subaracnoideo a través de las aberturas medias y laterales (el flujo hacia el interior del conducto central de la ME es insignificante). Dentro del espacio subaracnoideo, parte del LCR desciende a través del agujero magno y alcanza la cisterna lumbar en unas 12h (Fitzgerald, 2012). Entre las funciones del LCR está la de servir de soporte y amortiguación contra los traumatismos. Proporciona al encéfalo el soporte hidroneumático necesario contra la excesiva presión local.

3.9 Vascularización de la médula espinal

a) Arterias

Cerca del agujero magno, las dos arterias vertebrales se distribuyen en ramas espinales anteriores y posteriores. Las ramas anteriores se fusionan para formar una única arteria espinal anterior delante de la fisura media anterior. Sus ramas se originan alternativamente a izquierda y derecha de la ME. Las arterias espinales posteriores descienden a lo largo de la línea de inserción de las raíces posteriores de los nervios espinales a cada lado.

Las tres arterias espinales son alimentadas por diversas ramas radiculoespinales de las arterias vertebrales y las intercostales. Son diferentes a las pequeñas arterias radicales que entran en cada agujero intervertebral para nutrir las raíces de los nervios. La arteria

radiculoespinal más grande es la arteria de Adamkiewicz, que sale de una arteria intercostal inferior o una arteria lumbar superior en el lado izquierdo e irriga la intumescencia lumbar y el cono medular (Fitzgerald, 2012).

b) Venas

El drenaje venoso de la ME se produce a través de las venas espinales anteriores y posteriores que drenan externamente a lo largo de las raíces de los nervios. Cualquier obstrucción en el drenaje venoso puede llegar a producir un edema medular con pérdida progresiva de la función (Fitzgerald, 2012).

3.10 Vías sensitivas y motoras

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

3.10.1 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.

a) 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 ME (Snell, 2010).

- Sensibilidad táctil protopática (gruesa): 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 anteriores, 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) (Fitzgerald, 2012; Snell, 2010).

b) Vías de la sensibilidad propioceptiva o profunda. Son las 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 ME, las fibras de origen cervical son las más laterales, las de origen sacro, las más mediales. En la cara posterior de la ME 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) (Elaine. Marieb, 2008; Snell, 2010).

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 (Latarjet, 2005). 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 (Elaine. Marieb, 2008; Fitzgerald, 2012; Snell, 2010).

c) 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 ME (Elaine. Marieb, 2008; Snell, 2010).

El tracto espinotectal discurre al lado de la vía espinotalámica, de origen y composición funcional similares. Termina en el colículo superior, en donde se reúne con aferencias visuales cruzadas que están implicadas en los movimientos de giro de los ojos/cabeza/tronco hacia las fuentes de estimulación sensitiva (reflejo visuoespinal).

El tracto espinoolivario envía información táctil al núcleo olivar inferior en la médula oblongada. El núcleo olivar inferior posee una importante función en el aprendizaje motor a través de su acción en la corteza cerebelosa contralateral. Las descargas espinoolivarias pueden modificar la actividad del cerebelo en respuesta a cambios ambientales (p. ej., al subir por una escalera sorprendentemente empinada). Esta característica se denomina adaptación motora. Por otro lado, el aprendizaje para realizar automáticamente programas motores rutinarios es una función de los ganglios basales.

En el gato, el tracto espinocervical está muy desarrollado, mientras que las vías espinotalámicas son pequeñas. En el ser humano parece que sólo quedan vestigios de este tracto, o bien está ausente (Fitzgerald, 2012).

3.10.2 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.

a) 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 ME en dos contingentes: uno que cruza la línea mediana en el bulbo raquídeo (del tracto corticoespinal lateral), y otro que desciende directamente en la ME (el tracto corticoespinal anterior) (Snell, 2010).

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 ME, 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 ME por la raíz anterior, para alcanzar el músculo estriado correspondiente (Elaine. Marieb, 2008; Snell, 2010).

Tracto corticoespinal anterior (piramidal directo): participa en la formación del cordón anterior de la ME, 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 ME. A una lesión de la circunvolución precentral corresponde una parálisis del lado opuesto (hemiplejía).

b) 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 (Elaine. Marieb, 2008; Latarjet, 2005; Snell, 2010). 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.

Tracto rubroespinal: controla la función motora los músculos del hombro y brazo, y control fino del movimiento de los dedos, proviene del **núcleo rojo**; está situado en el cordón lateral, delante del tracto piramidal cruzado (Elaine. Marieb, 2008; Latarjet, 2005; Snell, 2010). El tracto rubroespinal es una vía motora importante en gatos y perros, en los que se origina en el núcleo rojo contralateral y desciende por delante del tracto corticoespinal. En monos, el tracto es pequeño, y en humanos, bastante insignificante.

Tracto rafe espinal: Este tracto se origina en y al lado del núcleo del rafe situado en la línea media de la médula oblongada. Desciende a ambos lados dentro del tracto posterolateral de Lissauer. Su función es la de modular la transmisión sensitiva entre las neuronas de primer y segundo orden en el asta posterior, sobre todo con respecto al dolor (Fitzgerald, 2012).

Tracto olivoespinal: se relaciona con el mantenimiento del equilibrio, está constituido por neuronas cuyos cuerpos celulares asientan en el núcleo olivar inferior, sus axones terminan en el asta anterior homolateral y está situado en el cordón anterior (Elaine. Marieb, 2008; Latarjet, 2005; Snell, 2010).

Tracto reticuloespinal: controlan la posición del tronco y los músculos de las extremidades, facilitan o inhiben la actividad refleja, está 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 ME, por fuera de la cabeza del asta anterior (Snell, 2010).

Tracto tectoespinal: orienta los movimientos de los ojos y de la cabeza hacia los estímulos, es estrecho y está 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 ME, 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

está acompañado por fibras del tracto tectobulbar (Elaine. Marieb, 2008; Fitzgerald, 2012; Latarjet, 2005; Snell, 2010).

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 ME 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 (Elaine. Marieb, 2008; Latarjet, 2005; Snell, 2010). 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 (Crossman, A., 2007; Elaine. Marieb, 2008; Latarjet, 2005; Puelles-Lopez., Martinez-Perez., Martínez de la Torre, 2008; Snell, 2010).

Vías autónomas centrales: Las fibras simpáticas y parasimpáticas centrales descienden al lado de la sustancia gris intermedia. En parte, se originan en los centros de control autónomo en el hipotálamo y, en parte, de varios grupos nucleares en el tronco del encéfalo. Terminan en las columnas celulares intermediolaterales que emiten las fibras simpáticas y parasimpáticas preganglionares del sistema autónomo periférico (Fitzgerald, 2012; Snell, 2010).

La actividad refleja barorreceptora normal requiere la vía simpática central. Si la ME es aplastada por una lesión cervical, el paciente perderá la conciencia si en la primera semana se le levanta de la posición de decúbito, o bien porque una caída de la presión arterial en el seno carotídeo al sentarse normalmente causa un incremento compensatorio de la actividad simpática para mantener el flujo sanguíneo para el encéfalo (Fitzgerald, 2012).

La función normal de la vejiga (y del recto) requiere una vía parasimpática central. Las fibras implicadas se originan en la formación reticular, sobre todo en el puente. El centro pontino de la micción posee una acción inhibitoria tónica en la porción sacra del sistema parasimpático. Una lesión grave en la ME o la cola de caballo origina un vaciado reflejo cuando la vejiga sólo está medio llena (Fitzgerald, 2012; Snell, 2010).

3.11 Lesión de médula espinal

La lesión de médula espinal (LME) es un tipo de trauma del SNC, que a la fecha tiene limitadas oportunidades terapéuticas (Devivo, 2012; Lee & Thumbikat, 2015). Los eventos que ocurren inmediatamente después de la LME incluyen daño a las fibras neuronales, eventos isquémicos, necrosis y apoptosis de células neurales, destrucción de microvasculatura, inflamación, peroxidación de lípidos, producción de radicales libres, desmielinización y formación de cicatrices gliales (Bareyre & Schwab, 2003; Fehlings, Tator, & Linden, 1989; Rolls, Shechter, & Schwartz, 2009). La LME eventualmente conduce a la muerte de neuronas, oligodendrocitos, astrocitos y precursores celulares; todas las cavidades y cicatrices resultantes pueden interrumpir el tracto axonal ascendente y descendente (Bareyre & Schwab, 2003).

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 ME rebasa los seis billones de dólares en Estados Unidos de Norteamérica (Díaz-Ruiz et al., 2002). Con una incidencia anual de 40 casos por millón de habitantes y una relación 4:1 de hombres con respecto a las mujeres. En la Ciudad de México la incidencia anual de traumatismos medulares es aproximadamente 18.1 casos por millón de habitantes, sin embargo, estos datos son mayores, pues no se toman en cuenta dichos caso en los que la víctima muere (Cummings., Winterford.,Walker. 1997; Estrada-Mondaca et al., 2007).

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 (Guimaraes et al., 2009)

3.12 Eventos neurodegenerativos después de una lesión de médula espinal

Los daños mecánicos en la ME generan procesos de autodestrucción que contribuyen a la neurodegeneración post-traumática (Martíñón & Ibarra, 2008).

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 & Campbell, 1969; Newman S.W., Gilman S., 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 ME 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 ME es

provocado por tres eventos: la lesión primaria, secundaria y la lesión crónica. La lesión primaria es el resultado directo del trauma inicial, causando una perturbación del tejido neural (principalmente axones) y vasos sanguíneos (Martíñón & 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 (Hall, McCall, Chase, Yonkers, & Braugher, 1987). Los estudios experimentales y las observaciones clínicas han establecido que la lesión secundaria de la ME es originada por una serie de cambios fisiopatológicos dependientes del tiempo (Figura 2), que inician en los primeros minutos, y continúan días o semanas después de la LME cuando sobreviene la muerte celular por apoptosis (Emery et al., 1998; Guizar-Sahagun et al., 1994; Lou, Lenke, Ludwig, & O'Brien, 1998). Basado en algunos estudios previos de la lesión medular (Dumont et al., 2001; Fehlings & Nguyen, 2010; Oyinbo, 2011; Rossignol, Schwab, Schwartz, & Fehlings, 2007), el mecanismo secundario puede dividirse en cinco procesos: (1) vasoespasmo y muerte celular por impacto directo y formación inmediata de hematoma inmediato que en conjunto con: acumulación de calcio intracelular y de potasio extracelular (Rowland, Hawryluk, Kwon, & Fehlings, 2008; Schwab & Bartholdi, 1996) e incremento en las concentraciones de glucosa y la disminución en la síntesis de ATP, generan una interrupción en el flujo eléctrico causando choque medular (2) propagación de la lesión, debido a lesiones vasculares, tales como, hemorragia y reperfusión isquémica; (3) reacciones inmunitarias/inflamatorias, apoptosis, desmielinización de axones sobrevivientes y muerte celular mediada por inmunidad; (4) las respuestas oxidativas que potencian la destrucción neural y la respuesta inflamatoria y (5) la estabilización, caracterizada por la cavitación central y la formación de una cicatriz crónica.

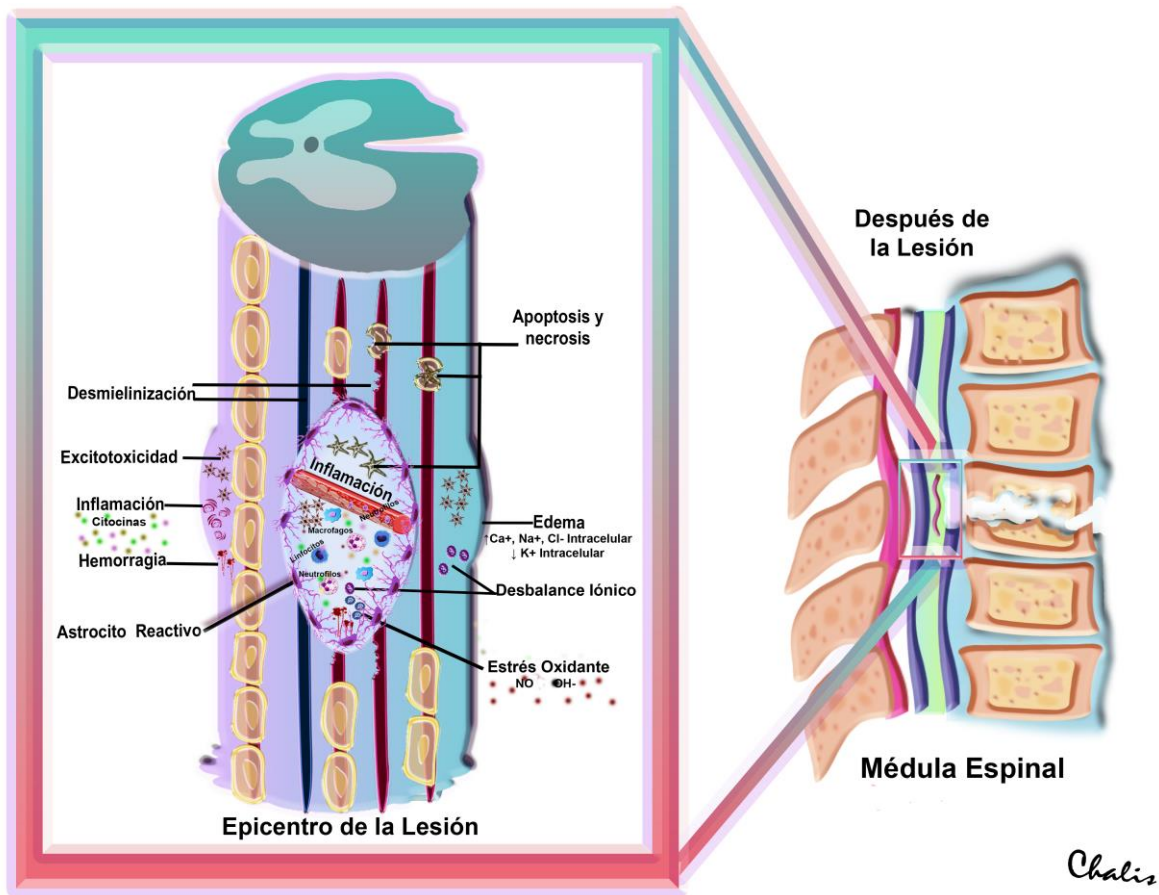


Figura 2. Eventos neurodegenerativos después de una LME

3.13 Lesión crónica de médula espinal

Durante la tercera fase o fase crónica se observan disturbios en la organización de las fibras como son la desmielinización, degeneración Walleriana, apoptosis de oligodendrocitos y la formación de una cicatriz de fibras de colágena (Fitch & Silver, 2008; Göritz et al., 2011; Klapka & Müller, 2006). Durante esta etapa se presenta una interacción no regulada entre el SNC y Sistema Inmune (SI) muy pronunciada que no solo se limita a la pérdida del tejido originalmente lesionado, sino también a las innervaciones vegetativas hacia tejidos linfáticos y endócrinos que potencian la progresión de la degeneración de las funciones a un nivel mayor .

La cicatriz fibrosa que se desarrolla después de una lesión al SNC se considera un impedimento para la regeneración axonal (Klapka & Müller, 2006). Aunque, tradicionalmente se considera perjudicial para la regeneración, los astrocitos reactivos de la cicatriz glial también tienen efectos benéficos, incluyendo la ayuda en la reparación de la BHE y la modulación de la respuesta inmune (Faulkner et al., 2004).

La cicatriz glial está compuesta por una densa red de astrocitos fibrosos alrededor del sitio de lesión (Haan, Zhu, Wang, Wei, & Song, 2015). Esta cicatriz fibrogliosa se conforma por astrocitos y colágena, que libera proteoglicanos, neurofilamentos como vimentina y nestina que actúan como moléculas inhibitorias del crecimiento neural (Klapka & Müller, 2006). Ver figura 3.

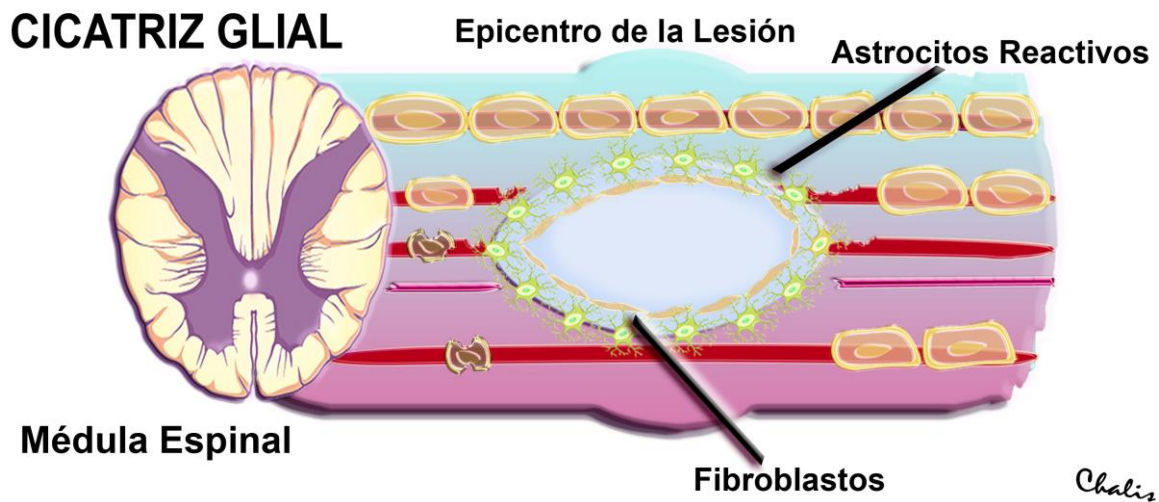


Figura 3. Representación esquemática de la lesión por contusión en fase crónica.

Los astrocitos presentan una respuesta gradual a la lesión que incluye cambios en la expresión génica, hipertrofia y extensión del proceso y, en algunos casos, división celular (Eng & Ghirnikar, 1994; Mucke & Eddleston, 1993). Los factores conocidos por aumentar la formación de cicatrices gliales en la ME incluyen TGF- β (Kohta, Kohmura, & Yamashita, 2009) y al interferón gama (INF- γ) (DiProspero, Meiners, & Geller, 1997),

entre otros. También se ha sugerido que el Factor de crecimiento para fibroblastos básico (Fgf-2), puede ser utilizado para disminuir la formación de cicatrices y mejorar la permisividad axonal (Goldshmit et al., 2014). Estudios *in vitro* han demostrado que los factores neurotróficos pueden sustentar la supervivencia y la correcta diferenciación de las células madre hacia neuronas (Faulkner et al., 2004).

Un aumento anormal en el número de astrocitos se conoce como, astrogliosis. La astrogliosis reactiva es una característica prominente de los astrocitos adyacentes a la lesión y también se caracteriza por una rápida síntesis de Filamentos intermedios (GFAP), filamentos intermedios, vimentina, nestina, secreción excesiva de componentes de matriz extracelular como proteoglicanos de condroitin sulfato (CSPG), tenasinas y colágeno tipo IV, con el fin de formar una cicatriz glial que selle la zona agraviada. Sin embargo, esto se convierte en una barrera fibrosa que no permite la regeneración de las conexiones nerviosas que se encontraban previos a la lesión, aunado a esto, los astrocitos reactivos también contribuyen a la liberación de citocinas pro-inflamatorias e anti-inflamatorias como TNF- α , INF- γ , IL-1 β e IL-6 que inhiben procesos de diferenciación en los precursores neurales (Gallo & Deneen, 2014) y contribuyen a el incremento de la respuesta inflamatoria crónica.

3.14 Respuesta inflamatoria y respuesta autorreactiva después de la lesión medular

La inflamación es una respuesta celular y molecular frente al estrés, infecciones o lesiones (Frank, Baratta, Sprunger, Watkins, & Maier, 2007). La LME también provoca, desde las etapas tempranas y hasta los estadios crónicos, activación del SI (Beck et al., 2010) por lo que durante las primeras horas o días después de la lesión medular se genera una reacción celular mediada por macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y astrogliía reactiva generando un

proceso inflamatorio y autorreactivo exacerbado que provoca un daño importante al tejido neural (Bethea & Dietrich, 2002; Popovich, Yu, & Whitacre, 1997).

La respuesta inflamatoria en el SNC se caracteriza por la activación de células de la respuesta innata, adaptativa y expresión de mediadores inflamatorios (Cuenca- López *et al.*, 2010). Después de la exposición a un antígeno, el proceso inflamatorio se inicia por activación de células residentes de microglía y astrocitos, así como la infiltración de linfocitos y monocitos periféricos, desarrollando una serie de estímulos inflamatorios en varios tipos de células (Carson *et al.*, 2006) que a su vez producen diferentes tipos de citocinas anti y pro-inflamatorias, (por ejemplo: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , NT, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (peróxido de hidrogeno y óxido nítrico) y quimiocinas. Las neuronas expresan varios receptores de mediadores inmunológicos, tales como: CCR3, CXCR4, CXCR2, y CX3CR1, mientras que los astrocitos expresan principalmente CXCR4, lo que los hace sensibles a los gradientes de quimiocinas en el SNC (Gabuzda & Wang, 1999) . Estos factores interrumpen la BHE, ya que reclutan monocitos y linfocitos y los translocan a través de la BHE al sitio de inflamación, lo que determina la extensión del daño tisular y celular secundario. Esta respuesta puede verse aumentada por la inducción rápida de la expresión de 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, todos estos fenómenos en conjunto, estimulan la muerte neuronal. 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 (Hauben, Nevo, et al., 2000; Schwartz, Moalem, Leibowitz-Amit, & Cohen, 1999).

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 epítipo inmunodominante VHFFKNIVTPRTP (PBM₈₇₋₉₉) induce EAE (Gaur et al., 1997; Ibarra, Hauben, Butovsky, & Schwartz, 2004; Karin, Mitchell, Brocke, Ling, 1994).

El epítipo PBM₈₇₋₉₉, es el principal blanco de los linfocitos T en enfermedades del SNC. Por el momento sigue la controversia sobre el papel de los linfocitos T sobre los determinantes antigénicos o epítipos, no obstante, es evidente que la modulación, en lugar de la eliminación de estas células es, probablemente, la estrategia más prometedora para promover la neuroprotección (Ibarra et al., 2010) y neuroregeneración (Cruz et al., 2015). Los linfocitos T son activados específicamente por unión al receptor de linfocitos T (TCR) con moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) 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 co-estimulantes apropiados (Karin, Mitchell, Brocke S, Ling, 1994). Los linfocitos TH1 proliferan liberando citocinas pro-inflamatorias como son: IL-1 β , INF- γ , IL- 12 y los linfocitos TH2 secretan citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10 (Gaur et al., 1997). Actualmente, las terapias se han encaminado a tratar de preservar el tejido neuronal y la sobrevivencia de neuronas, tratando de que exista una mejor recuperación neurológica después de una lesión medular; para ello se han diseñado diversas estrategias terapéuticas.

3.15 Autorreactividad Protectora

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 naturaleza del SNC como tejido no permisivo y la creencia de que la infiltración de células inmunes es un signo de patología estaba firmemente establecida; sin embargo, a lo largo de los años, investigación de la Dra. Schwartz y colaboradores ayudaron a transformar esta noción obsoleta de la comprensión del privilegio inmune del SNC como tejido inmunológicamente especializado (Schwartz & Shechter, 2010; Shechter, London, & Schwartz, 2013). Según este punto de vista, la inflamación inicial es seguida de una fase activa de resolución; estos eventos son complementarios y necesarios para la reparación (Shechter et al., 2009). En contraste, si la respuesta inmune fisiológica es insuficiente o no se resuelve, se lleva al consiguiente fracaso en la promoción de la regeneración y reparación de tejidos (Schwartz y Baruch, 2014; Shechter y Schwartz, 2013).

Los linfocitos T, los macrófagos y las células dendríticas pueden entrar bajo condiciones fisiológicas normales (Engelhardt y Sorokin, 2009). Actualmente, hay más evidencia de la comunicación entre el SNC y el SI. La investigación ha demostrado que las células inmunes pueden entrar al SNC a través del plexo coroideo y residir en el espacio perivascular (Shrestha, Millington, Brewer, & Bushell, 2013). Por consiguiente, el efecto benéfico de las células inmunitarias dependerá en gran medida de la ruta de entrada al SNC (Kunis et al., 2013; Ravid Shechter et al., 2013). Por ejemplo, los monocitos que entran al SNC a través del plexo coroideo del cerebro encuentran un ambiente anti-inflamatorio del líquido cefalorraquídeo, que los desviará hacia un fenotipo anti-inflamatorio M2. Por otro

lado, los monocitos que entran al SNC lesionado a través de las leptomeninges adyacentes al sitio de la lesión adquieren un fenotipo pro-inflamatorio M1 (Shechter et al., 2013).

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 (Ibarra et al., 2010) y regeneración (Cruz et al., 2015; Rodríguez-Barrera et al., 2017), activando células de la microglía bajo un fenotipo que se caracteriza por su baja producción de radicales libres.

El péptido neural modificado A91 es un péptido modificado obtenido de la secuencia básica de la PBM₈₇₋₉₉ con un remplazo en la posición 91 de una lisina (K) por una alanina (A), actúa como péptido agonista parcial, es no encefalitogénico y modula la respuesta inmune autorreactiva favoreciendo el fenotipo TH2 con secreción de citocinas IL-4 e IL-10. También, se ha observado que puede reducir la degeneración secundaria de neuronas y promover una mejor recuperación motora en animales con LME (Gaur et al., 1997; Ibarra et al., 2010; Martiñon et al., 2007). La activación de los linfocitos T con fenotipo TH2 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 resulta en efectos distintos sobre la activación de los linfocitos T (Karin N., Mitchell D.J., Brocke S., Ling N., 1994). La presencia de aminoácidos diferentes en la región reconocida por el TCR promueve una respuesta diferente. Los péptidos neurales modificados, son análogos peptídicos de los epítomos que poseen una o varias sustituciones de aminoácidos que puestos en contacto con el TCR compiten con la unión de dicho receptor e interfieren con la cascada de activación de los linfocitos T (Genain , 2000; Hauben, Butovsky, et al., 2000; Hauben, Nevo, et al.,

2000). En los péptidos neurales modificados 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 , 2000).

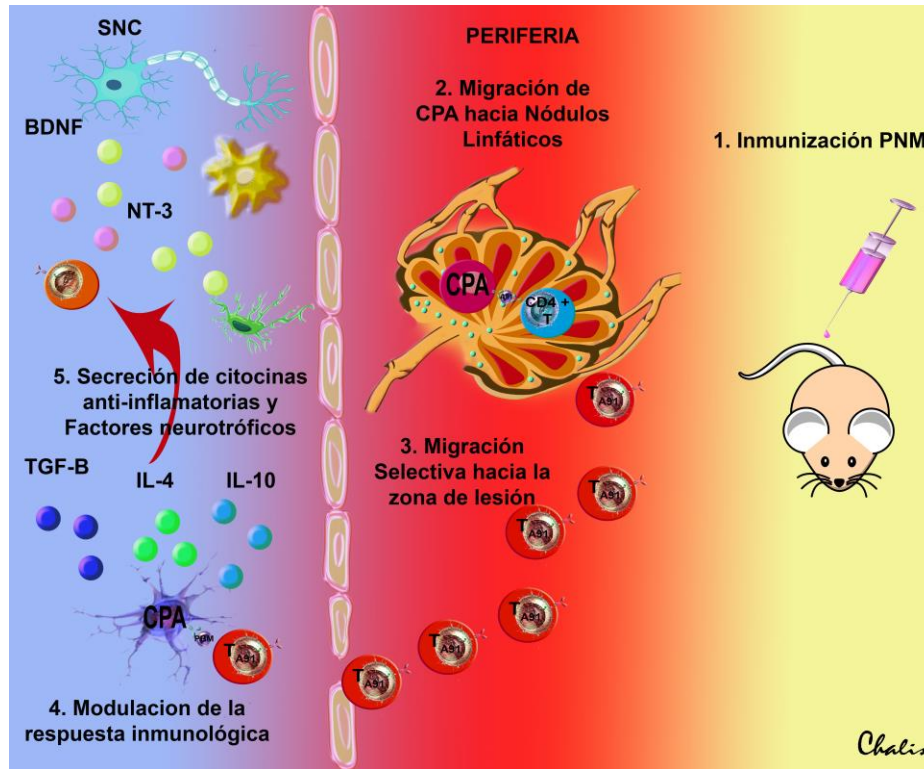


Figura 4. Inmunización con péptidos neurales modificados como A91.

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, Butovsky, et al., 2000; Ibarra et al., 2010). La inmunización con péptidos neurales modificados como Copolimero-1 (Ibarra, Avendaño, & Cruz, 2007) y A91 (Ibarra et al., 2010, 2004) han confirmado modular la respuesta autorreactiva.

El copolimero-1 (Cop-1) es un copolímero compuesto por L-alanina, L-ácido glutámico, L-lisina y L-tirosina, Una estrategia de inmunización activa con Cop-1, ha demostrado que puede reducir la degeneración secundaria de neuronas y promover una recuperación motora en animales con LME (García et al., 2012). Por tal motivo, los péptidos neurales modificados como A91 y Cop-1 son candidatos prometedores para la inmunoterapia en esclerosis múltiple y LME (Gaur et al., 1997).

3.16 Autorreactividad Protectora en combinación con otras terapias

Nuestro grupo de investigación ha demostrado el efecto benéfico de la Inmunización con péptidos neurales modificados (IPNM) con A91 observando que los linfocitos T anti-A91 promueven la protección al tejido al inhibir la expresión de la iNOS, disminuir la producción de óxido nítrico (García et al., 2012; Shaked et al., 2005) y disminuir la lipoperoxidación después de una LME (Ibarra et al., 2010). Además, se ha demostrado que estos linfocitos son capaces de liberar factores neurotróficos como BDNF y NT3, creando así, un ambiente propicio para la regeneración neural (Martíñón et al., 2016; Martíñón, García, Gutierrez-Ospina, Mestre, & Ibarra, 2012). Por otra parte, 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 (Martíñón et al., 2007) y de isquemia cerebral focal (Ibarra et al., 2007).

Se han realizado estudios comparativos para evaluar metilprednisolona (MP) vs A91 y se obtuvo que A91 promueve mejor recuperación motora y se demostró que la MP tiene un efecto transitorio sobre la respuesta inmune. Sin embargo, al combinar MP con A91 se observó que la MP al ser un agente anti-inflamatorio elimina el efecto benéfico de A91 (Ibarra et al., 2004).

Nuestro grupo de trabajo reportó que el efecto neuroprotector de 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, genera una mayor protección del tejido y un incremento en la recuperación 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 (del Rayo Garrido et al., 2013; Martiñón et al., 2007). Por último, un estudio reciente demostró que la estimulación de la respuesta autorreactiva es capaz de promover la regeneración axonal, aunque, los axones no logran atravesar, por la presencia de la cicatriz fibrogliosa (Martiñón et al., 2012) que actúa como una barrera física y química impidiendo el establecimiento de nuevas conexiones (Göritz et al., 2011).

3.17 Estrategias terapéuticas en lesiones crónicas medulares

En comparación con los tratamientos agudos en la lesión medular, la eficacia de las terapias que promueven la regeneración axonal parecen afectadas en modelos crónicos (Houle & Tessler, 2003), ya 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 esta etapa, más que una recuperación, se ha observado un periodo de estabilidad hacia los 3 meses (Beck et al., 2010) y posteriormente un declive progresivo de la función neurológica en roedores sometidos a una LME (Bravo, Ibarra, Guizar-Sahagún, Rojas, & Hong, 2007). A nivel clínico, este fenómeno también se ha descrito (Dietz & Müller, 2004). Lo anterior nos obliga a buscar estrategias terapéuticas regenerativas que logren evitar este deterioro y que contribuyan a una mejor calidad de vida del paciente crónico lesionado

medular. La reconexión funcional y altamente eficiente de los axones regenerados puede estar inhibida por la cicatriz fibrogliosa misma, que se tiene que remover mediante procedimientos mecánicos o químicos para permitir el crecimiento axonal. El trasplante de células troncales en el sitio de lesión es un área muy estudiada. En algunos trabajos las células troncales mesenquimales (CTM), han demostrado que remielinizan y regeneran de vías motoras importantes como la corticoespinal. Otro método que puede favorecer la restauración del tejido dañado en animales con LME es la colocación de matrices biocompatibles. Los hidrogeles han proporcionado sostén al crecimiento axonal en procesos de regeneración y funcionar como transportadores de sustancias, factores de crecimiento e incluso células que participen en el proceso de regeneración.

2.17.1 Remoción de la cicatriz glial

Algunos estudios han demostrado que la remoción de la cicatriz glial promueve el desarrollo de axones en la porción de la ME lesionada sugiriendo que es factible la reconexión axonal (Estrada et al., 2014; P. Lu, Jones, & Tuszynski, 2007). No obstante, otro estudio indica que el uso de resecciones quirúrgicas de la cicatriz glial por sí mismas no ofrece resultados positivos, debido a que en el momento de incidir y retirar el tejido cicatrizante, se activan los mismos mecanismos que son activados durante la fase aguda generando una segunda lesión (Rasouli et al., 2009).

La digestión enzimática de las cadenas de CSPG, mediante el uso de agentes con capacidad de degradar las cadenas de glucosaminoglucanos de la cicatriz glial como la Condroitinasa ABC ha mostrado efectos positivos en la regeneración axonal (Bradbury et al., 2002; Burnside & Bradbury, 2014; Rasouli et al., 2009).

3.17.1 α,α' -dipiridilo

El α,α' -dipiridilo DPY a quelación de hierro ha demostrado previamente que disminuye la síntesis de colágena en un nivel posttranscripcional mediante la inhibición de 4- proli hidroxilasa, una de las enzimas clave en el metabolismo del colágeno (Ikeda, Wu, & Wu, 1992). Se han usado quelantes de hierro para inhibir a biosíntesis de colágeno en modelos agudos de lesión medular y se ha demostrado la supresión transitoria de cicatrices (Klapka et al., 2005). En un estudio con ratones adultos y postnatales (de 14 días) con transección unilateral se aplicó 2-2' dipiridilo en el sitio de lesión y se observó que disminuyen los depósitos de colágena tipo IV y se demostraron axones positivos a tirosina hidroxilasa se extienden a través del sitio de lesión reinnervando el cuerpo estriado (Kawano et al. 2005). Sin embargo, en lesiones crónicas de la ME los quelantes de hierro suprimen las cicatrices fibróticas, pero no las degradan, por ello en fases crónicas este tratamiento no es factible por la existencia de una cicatriz madura con moléculas inhibitorias de crecimiento axonal (Davies, Tang, Denning, Archibald, & Davies, 2004; Niclou, Ehlert, & Verhaagen, 2006). Un estudio demostró que la resección quirúrgica cuidadosa de la cicatriz y el relleno de la cavidad resultante con matrices biocompatibles promueve una mejora funcional en un modelo de sección completa (Estrada et al., 2014).

Por consiguiente, se puede mejorar el tratamiento de lesiones medulares si se modula el comportamiento de la cicatriz glial con la combinación de trasplantes (Rasouli et al., 2009), quelantes de hierro (Klapka et al., 2005; Schiwy, Brazda, & Müller, 2009) y matrices biocompatibles (Estrada et al., 2014).

2.17.3 Trasplante de Células Troncales Mesenquimales

Las CTM se detectaron y aislaron en médula ósea. En este órgano existen dos sistemas de manera primordial, el sistema hematopoyético que es capaz de formar a todas las células de la sangre y el sistema estromal, el cual se ha definido de manera tradicional como el soporte sobre el cual proliferan y se diferencian las células hematopoyéticas (Deans & Moseley, 2000). En el sistema estromal existe una población heterogénea de células que incluyen células reticulares, adipocitos, osteoblastos, células endoteliales vasculares, células de músculo liso de las paredes de los vasos sanguíneos y macrófagos; todas ellas participan de manera activa en la producción hematopoyética, debido a su capacidad de secreción de proteínas de matriz extracelular y citocinas, tanto inhibitoras como estimuladoras, y con ello conforman lo que se conoce como nicho hematopoyético (Pelayo, Santa-Olalla, 2013). Si consideramos al sistema estromal como un tejido, en muchas especies de mamíferos incluyendo roedores y humanos, este tejido es capaz de regenerarse después de haber sufrido daños severos por agentes como radiación, drogas citotóxicas o lesiones mecánicas (Patt & Maloney, 1975).

De acuerdo con la Sociedad Internacional para la Terapia Celular, existen criterios para la identificación de las poblaciones de CTM, como son: la adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar; expresión positiva de marcadores específicos como CD73, CD90, CD105, y expresión negativa de marcadores hematopoyéticos tal como CD34, CD45, HLA-DR, CD14, o CD11B, CD79 α o CD19; y diferenciación *in vitro* en al menos osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Teixeira, Carvalho, Sousa, & Salgado, 2013).

Se ha demostrado que las CTM tienen la capacidad de modular muchos de los efectos nocivos después de LME agudas y crónicas (Oliveri, Bello, & Biering-Sørensen, 2014).

Las CTM, son capaces de modular el microambiente lesionado del SNC para promover la reparación, ya que secretan moléculas anti-inflamatorias, factores tróficos capaces de

apoyar el crecimiento axonal, promover la angiogénesis, favorecer la remielinización y proteger de la muerte celular apoptótica (Quertainmont et al., 2012). También, se incluyen la protección de neuronas a la excitotoxicidad por glutamato (Lu et al., 2011; Voulgari-Kokota et al., 2012), reducción en los niveles de proteínas asociadas al estrés y especies reactivas de oxígeno (Lanza et al., 2009) y citocinas pro-inflamatorias (Zhou et al., 2009), polarización de macrófagos de M1 al fenotipo activado pro-reparador M2 (Nakajima et al., 2012), secreción de factores neurotróficos (Crigler, Robey, Asawachaicharn, Gaupp, & Phinney, 2006; Hawryluk et al., 2012), estabilización de la BHE mediante la regulación de los astrocitos (Janzer & Raff, 1987; Park et al., 2015) formación de filamentos de guiado axonal a través del sitio de lesión (Hofstetter et al., 2002). Asimismo, la investigación sugiere que las CTM pueden transdiferenciarse en linajes neuronales (Chen et al., 2007; Chopp et al., 2000; Huang, Chang, Zhang, & Gao, 2012; Woodbury, Schwarz, Prockop, & Black, 2000), astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann y microglia (Chopp et al., 2000; Woodbury et al., 2000) *in vitro*, aunque, el potencial de transdiferenciación exacta *in vivo* sigue siendo debatida (Chen et al., 2007; Krabbe & Zimmer, 2005). La combinación de CTM con una matriz de fibrina es un enfoque muy prometedor en medicina regenerativa.

2.17.4 Matrices biocompatibles

Otro método que puede favorecer la restauración del tejido dañado en animales con LME es la colocación de matrices biocompatibles. Los biomateriales son estructuras de origen sintético o natural, que son utilizadas en los sistemas biológicos para reemplazar o ayudar en la función de un tejido u órgano. Estos biomateriales deben tener ciertas características para que sean considerados para su posible aplicación clínica (Parra Cid *et al.*, 2014). La

porosidad de éstos es importante, ya que el tamaño y la microestructura del poro influyen con el crecimiento axonal, motilidad, morfología y la adhesión celular (Mata et al., 2009) así como en el espacio que hay entre los poros, ya que interviene en la adhesión celular y la velocidad en la que las células se propagan. Otro aspecto importante es el proceso de degradación, puesto que el biomaterial tiene que ser sustituido por los componentes naturales del tejido. Esta propiedad influye sobre la migración celular, proliferación, diferenciación e incluso sobre la morfología celular. La elasticidad del biomaterial debe ser adecuada según el tejido del que se trate, ya que permite que el biomaterial no se deforme con facilidad y pierda la estructura, además, interviene en la organización de las células (Mitragotri & Lahann, 2009). La biocompatibilidad es un aspecto muy importante, pues cada organismo reacciona de manera diferente ante un implante. Cuando nos referimos a “biocompatible” se busca que no cause efectos adversos dentro del organismo, es decir, que sea un material inerte, no tóxico y que el organismo no lo rechace (Wang, 2013). Por último, la compartimentalización que presentan algunos biomateriales es frecuentemente utilizada para que se liberen moléculas en el tejido donde se implantan; generalmente es utilizado para la liberación de fármacos o factores de crecimiento que ayudan a la recuperación del tejido (Mitragotri & Lahann, 2009; Wang, 2013).

a) Matriz de fibrina (Tissucol)

El tissucol es un compuesto de fibrinógeno y trombina, es un vehículo biológico potencialmente adecuado para trasplante de células, ya que ha demostrado biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad de unión a las células (Parra- Cid, Tiscareño-Perez & Gomez-Garcia).

El sistema adhesivo de la fibrina imita la última fase de la coagulación sanguínea fisiológica. La conversión de fibrinógeno en fibrina tiene lugar por división del fibrinógeno en monómeros de fibrina y fibrinopéptidos. Los monómeros de fibrina se agregan y forman un coágulo de fibrina. El Factor XIIIa generado a partir del Factor VIII por la acción concertada de la Trombina y los iones de calcio, estabiliza el coágulo por cruzamiento de las fibras de fibrina. Al progresar la curación de la herida, la plasmina y la formación de productos de la degradación de la fibrina dan inicio a una mayor actividad fibrinolítica. Esta degradación proteolítica de la fibrina es inhibida por los anti-fibrinolíticos. La Aprotinina es parte de Tissucol como anti-fibrinolítico, a fin de evitar la degradación prematura del coágulo.

Se ha confirmado que la matriz de fibrina propicia el crecimiento e incorporación de axones aferentes primarios mielinizados y no mielinizados; interviene en el soporte y direccionalidad de estos con las células de Schwann (Li & Zhao, 2008; S. Lu et al., 2011). El factor estabilizador de la fibrina XIII contenido en el pegamento de fibrina favorece la migración de CTM sobre la estructura altamente reticulada del pegamento y aumenta la proliferación de estas células (Liu et al., 2013).

b) Alginato.

Es un biomaterial obtenido de las algas pardas y algunas bacterias. Este compuesto está formado por la unión del ácido α -L-glucorónico y β -D-manurónico. Es utilizado también para la liberación de fármacos, encapsulación celular y como vehículo en trasplantes celulares. Presenta, además, biocompatibilidad con el SNC, es de baja toxicidad y su durabilidad es variable, ya que no se degrada enzimáticamente en mamíferos, por lo que su degradación puede ser controlada. También, se pueden adicionar moléculas de adhesión

celular que faciliten la migración celular, colonización y crecimiento axonal (Parra-Cid *et al.*, 2014). En un estudio se utilizaron diferentes componentes de la matriz extracelular como fibronectina, laminina, colágena y poliornitina para la colonización de las células con la adición de células progenitoras neuronales en el biopolímero que facilitó el guiado axonal y la adhesión celular en un modelo de lesión medular en rata (Prang *et al.*, 2006).

c) Ácido hialurónico.

Es un polisacárido lineal que se encuentra en la matriz extracelular. Compuesto por ácido D-glucorónico y N-acetil-D-glucosamina, y producido por una enzima llamada hialuronano sintasa. Por sus características químicas pueden formarse redes o fibras, dando estructuras porosas capaces de retener líquidos; lo cual ayuda en la liberación gradual de factores de crecimiento, encapsulamiento celular o liberación de fármacos (Parra-Cid *et al.*, 2014). Se ha demostrado que este tipo de biomaterial minimiza la formación de la cicatriz glial y promueve la migración de astrocitos y microglía (Preston & Sherman, 2011).

d) Polietilenglicol

Este biomaterial es un polímero hidrofílico y ha sido utilizado ampliamente para la reparación de las membranas de las células del sistema nervioso al sellar las membranas dañadas y permitir que el núcleo lipídico de las membranas se reensamben. Sin embargo, una desventaja es que este material no brinda el soporte preciso para la organización celular en tres dimensiones, la cual es necesaria en las lesiones medulares (Parra-Cid *et al.*, 2014).

e) Matrigel.

Esta matriz sintética se obtiene de una línea celular de Engelbreth-Holm-Swarm (Cassell et al., 2001). Se compone de laminina, colágeno IV, heparan sulfato proteoglicano y entactina; además posee factores de crecimiento de baja concentración, tales como Factor de crecimiento epidermal (EGF), Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), TGF- β , Factor de crecimiento parecido a la insulina 1 (IGF-1), entre otros. Estos componentes facilitan la adhesión celular y su diferenciación. El matrigel ha sido aplicado para el crecimiento de células de Schwann y en la regeneración axonal, tal vez por el efecto que tienen los factores de crecimiento que pueden ser aplicados, ya que se ha visto que alguno de los componentes de este biomaterial tiene efecto inhibitorio para el crecimiento axonal como la laminina y el heparan sulfato proteoglicano (Parra- Cid *et al.*, 2014).

4. JUSTIFICACIÓN

Al momento no existe un tratamiento efectivo para los pacientes con lesión crónica de la médula espinal (LCME). Es importante entonces realizar estudios encaminados a desarrollar estrategias que brinden alguna esperanza. La modulación de la autorreactividad contra constituyentes neurales mediante la IPNM como A91, la remoción de la cicatriz fibrogliar, la utilización de CTM y el manejo de una matriz biocompatible impregnada con las mismas; han demostrado por separado promover un efecto significativo sobre la regeneración del tejido medular en fases agudas de la lesión; sin embargo, a la fecha no existen estudios que hayan evaluado el efecto que en conjunto pueden tener estas estrategias especialmente en la fase crónica. En etapas crónicas predomina un proceso degenerativo que incrementa el déficit neurológico. Lo anterior hace muy factible la activación de mecanismos que promuevan la restauración del tejido neural y una probable recuperación de la función neurológica en esta etapa. Por las condiciones que cada una de

las terapias origina y la sinergia que se podría generar al ser administradas en conjunto, pensamos que se mejorarán las condiciones de restauración y esto provocará una mejor regeneración funcional, misma que redituará en una mejor recuperación neurológica en los individuos tratados. Los resultados de este proyecto serán de gran relevancia para el diseño de estudios clínicos donde se aplique este mismo tratamiento en pacientes con LCME. Esto último incidirá de manera importante en la calidad de vida de estos pacientes y de aquellos con otro tipo de enfermedad neurodegenerativa crónica. La aplicación a nivel clínico de los procedimientos que forman parte de esta estrategia de combinación es muy factible ya que en manos de un buen especialista, incluso la remoción de la cicatriz fibrogliar no debe dejar más secuelas que las que ya experimenta el paciente. En nuestro laboratorio hemos perfeccionado un método quirúrgico en roedores que garantiza la eliminación de la cicatriz sin incrementar el déficit neurológico. Este diseño es interesante porque en un futuro podría ser extrapolable en forma inmediata al humano.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A la fecha no existe un tratamiento que promueva en forma significativa la regeneración funcional del tejido neural en los pacientes con LCME. Tampoco se ha reportado el efecto que puede generar la utilización conjunta de la modulación de la autorreactividad contra constituyentes neurales, la eliminación de la cicatriz fibrogliar, el uso de CTM y el manejo de una matriz biocompatible (estrategia de combinación) sobre la regeneración funcional de la ME en etapas crónicas de lesión. Por lo anterior la pregunta a contestar en este proyecto es la siguiente:

¿La estrategia de combinación promoverá una mejor recuperación funcional, restauración morfológica y mayor expresión de genes relacionados con la restauración

neural en animales con LCME en comparación con aquellos tratados con los procedimientos por separado o no tratados?

6. HIPÓTESIS

La estrategia de combinación promoverá una mejor recuperación funcional, restauración morfológica y expresión de genes relacionados con la restauración neural en animales con LCME en comparación con aquellos tratados con los procedimientos por separado o no tratados.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la estrategia de combinación sobre la recuperación motora en la LCME.

7.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la recuperación neurológica de los diferentes grupos estudiados.
- Determinar la existencia o ausencia de la cicatriz fibrogliar en los grupos estudiados.
- Evaluar la expresión de ARNm de moléculas asociadas a la inflamación y regeneración.
- Determinar la cantidad y la longitud de axones sobrevivientes y/o regenerados en el sitio de lesión en los grupos estudiados.
- Evaluar la estrategia de combinación tomando como base la IPNM, adicionando la remoción de la cicatriz fibrogliar, la utilización de CTM y el manejo de una matriz biocompatible impregnada con las mismas.

8 MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Animales y grupos de estudio

El tamaño de la muestra fue calculado utilizando un valor alfa de 0.05 y un valor de beta de 0.20. Se utilizaron 101 ratas hembras de la cepa Sprague Dawley de 12 a 15 semanas de edad con un peso de 230 a 250 g. proporcionadas por el Centro de Investigación Camina. Se indujo una LME por contusión moderada. Los experimentos se realizaron sesenta días después de la contusión y el análisis se realizó a lo largo de los dos meses siguientes a la intervención terapéutica.

Se realizaron dos experimentos para estandarizar y tres experimentos para evaluar la estrategia de combinación.

ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES

1. Estandarización de la dosis del péptido A91 que se emplearía en la fase crónica de la lesión medular. Se utilizaron 12 ratas y se indujo una LME por contusión moderada. Sesenta días después los animales fueron distribuidos de forma aleatoria (GraphPad QuickCalcs: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/>). La distribución de los 12 animales, tres por grupo, se llevó a cabo en 4 grupos de la siguiente manera:

Grupo 1: Ratas con LCME tratadas con Adyuvante Completo de Freund (ACF) +PBS (vehículo).

Grupo 2: Ratas con LCME inmunizadas con 150ug de A91.

Grupo 3: Ratas con LCME inmunizadas con 200 ug de A91.

Grupo 4: Ratas con LCME inmunizadas con 250ug de A91

2. Estandarización del proceso de remoción quirúrgica. Se emplearon 20 ratas *Sprague Dawley*, se realizó prueba BBB antes y después de la remoción de cicatriz para demostrar

que la remoción no induce mayor déficit neurológico en el animal. La distribución de los 20 animales se llevó a cabo en 2 grupos que se muestran a continuación:

Grupo 1: LCME + PBS (n = 10)

Grupo 2: Ratas con RC (n = 10).

GRUPOS EXPERIMENTALES PARA EVALUAR LA ESTRATEGIA DE COMBINACIÓN

Experimento 1. Se usaron 21 ratas con LCME que se asignaron aleatoriamente en tres grupos de la siguiente manera (GraphPad QuickCalcs: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/>):

Grupo 1: LCME las ratas se trataron con PBS (n = 9)

Grupo 2: Ratas con RC (n = 7)

Grupo 3: Ratas con RC + IPNM (n = 7).

Experimento 2. Se utilizaron 24 ratas con LCME se asignaron aleatoriamente en tres grupos diferentes:

Grupo 1: LCME + PBS (n = 4)

Grupo 2: Ratas con IPNM (n = 8)

Grupo 3: Ratas con RC + IPNM (n = 8).

Experimento 3. Se usaron 24 ratas con LCME se asignaron aleatoriamente en tres grupos diferentes:

Grupo 1: LCME + PBS (n = 8)

Grupo 2: Ratas con RC + CTM (n = 8)

Grupo 3: Ratas con RC + IPNM +CTM (n = 8).

Después de la intervención, la recuperación motora fue evaluada semanalmente por un período de 60 días. Al final de cada experimento, las ratas fueron sacrificadas con dosis letal de pentobarbital sódico y la ME fue analizada para la expresión de genes asociados a la inflamación y regeneración. Adicionalmente, se determinó el número de axones regenerados hacia la porción caudal de la zona de lesión.

8.2 Técnica de lesión

Se anestesió 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 disecó la piel y se realizaron dos incisiones en músculo paralelas a la columna vertebral sobre las apófisis transversas. Se localizó T-9 y se realizó una incisión transversal entre T-9 y T-10. Se disecaron perfectamente las vértebras cuidando los vasos sanguíneos que corren longitudinales a la columna para evitar una hemorragia. Se sujetaron las apófisis espinosas de T-8 con una pinza de disección con dientes de ratón y con la gubia se fracturó la apófisis espinosa de T-9 retirando el fragmento. Se retiró la lámina de las vértebras T9 y T10 del espacio intervertebral con una pinza fina, con movimientos suaves y firmes, poco a poco para evitar lesionar la ME, una vez retirada la lámina completa se procedió a fracturar con la gubia la apófisis espinosa de T-8 retirando el fragmento, para ayudar a despejar el campo. Finalmente se sometió a los animales a una contusión moderada (25mm) con el Impactador marca NYU, New York (Basso, Beattie, & Bresnahan, 1996).

8.3 Cuidados post operatorios

Después de la lesión, los animales se alojaron en una jaula y se llevaron a recuperación en el bioterio. Se revisaron 3 veces al día durante 2 semanas, para vaciar la vejiga de manera manual y en caso de haber retención urinaria se dio un ligero masaje en la zona abdominal para estimular la micción y también la defecación. Para evitar la aparición de problemas infecciosos se administró enrofloxacin (5 mg/kg) disuelto en el agua de bebida y para minimizar las molestias derivadas de la cirugía, se administró paracetamol (100mg/kg) por vía oral durante dos semanas.

8.4 Inmunización activa

Se inmunizó a los 60 días, después de la lesión por contusión moderada con el péptido neural modificado A91, éste se emulsificó en un volumen igual de ACF conteniendo 1mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*. En los grupos control se administró PBS 0.15M a un pH de 7.4 más ACF. Se inmunizó en la base de la cola vía subcutánea con la dosis indicada de acuerdo al diseño experimental.

8.5 Ensayo de proliferación

A los 11 días después de inmunizar, se anestesió a cada rata con una dosis letal de pentobarbital sódico. Se rasuró el área de obtención de ganglios cervicales, se procedió a bañar con agua tibia y jabón, se secó y se aplicó alcohol 70%- Cloruro de Benzalconio.

Se colocó a la rata en decúbito dorsal sobre un campo estéril, cercano al mechero encendido, se incidió sobre línea media, se localizaron los ganglios linfáticos cervicales, se extrajeron y se colocaron de manera individual en 5ml de RPMI-1640 en una caja de Petri.

Posteriormente, en una campana de flujo laminar, los ganglios, de cada una de las ratas se transfirieron en una nueva caja de Petri con 5 ml de RPMI-1640 se disgregaron mecánicamente con el émbolo de una jeringa de 3 ml en una taza de disociación con movimientos suaves, se enjuagó con 5 ml de RPMI-1640 el macerado se recuperó en un tubo cónico de 15ml, este se almaceno a -4°C hasta su uso.

Una vez obtenidas las 12 muestras, se centrifugaron a 1500 rpm/5 min/ 4°C , se retiró el sobrenadante, se resuspendió el botón de células en 3 ml de RPMI, el proceso se repitió una vez más, posteriormente la resuspensión celular se agregó lentamente con una pipeta Pasteur esteril sobre 3ml de Lymphoprep (en un tubo cónico de 15 ml), se centrifugó a 2000rpm/30 min, se recolecto el anillo blanco despegando por las paredes que contiene células mononucleares. se lavaron dos veces a 15000rpm/15min, el botón se resuspendió en 500 μl de RPMI, y se cuantifico la viabilidad con azul tripano 1:1 en la cámara de NeuBauer y se hace el sembrado en placas de 96 pozos (300,000 células viables/190 μl RPMI por pozo de 200 μl).

Se tomó una alícuota de 20 μl de suspensión de células y se colocaron en un tubo de 1.5ml, se le adicionan 20 μl de azul de tripan y se procede a contar en la cámara de NeuBauer.

Una vez conocida la concentración de células se hizo el sembrado en placas de 96 pozos, 300,000 por pozo.

Grupo experimental: (190 μl de suspensión de células + 10 μl de solución de antígeno= 200 μl de capacidad del pozo, en RPMI-1640/SFB 10%). Las tres dosis 150, 200 y 250 μg se reestimularon con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de A91.

Se utilizó como control negativo solo RPMI-1640 (200 μl) y como control positivo Concanavalina A (ConA) 10 μg , 5 μg y 2.5 μg . Todos los experimentos se hicieron por triplicado. Se incubó a 37°C con 5% de O_2 48 h.

8.6 Incorporación de timidina tritiada ³H

Transcurrido el tiempo, se incubó con Timidina tritiada (³H) de 16 a 18 h con 20 µl del stock de Timidina ³H dilución 1:20.

Se tomó 100 µl del stock de Timidina ³H + 1900 µl de RPMI completo y se inyectó 20 µl de esta solución en cada pozo

Transcurrido el tiempo los linfocitos fueron cosechados sobre papel filtro Whatman 934-AH y fueron lavadas con agua utilizando un cosechador y se añadió 5 ml de solución de centelleo (PPO 9.8 g, POPO 0.2g, Tolueno 1.5L Etanol absoluto 250ml).

Finalmente, se colocaron en el contador de centelleo y la radioactividad se mide en cuentas por millón (cpm) de incorporación de Timidina ³H.

8.7 Remoción e inhibición de la cicatriz fibrogliol

Dos meses después de la lesión, se anestesiaron nuevamente los animales. Treinta minutos después de la inducción y previa asepsia de la región toraco-lumbar, se realizó un corte longitudinal por planos hasta encontrar el tejido fibroso que forma parte de la cicatriz del procedimiento quirúrgico anterior. Bajo observación con microscopio quirúrgico, se retiró la fibrosis hasta alcanzar las meninges del sitio de la lesión. Con una navaja de bisturí se realizó una incisión longitudinal en las meninges mismas que se referenciarán con una sutura de 9-0 hacia los músculos aledaños. Se lavó el sitio de lesión con solución fisiológica y se retiró el tejido necrótico. La cicatriz fibrogliol se retiró mediante un corte de 0.5 mm de espesor de cada muñón con un bisturí adecuado para cortar solo el espesor antes mencionado. La persona que realizó este corte estaba perfectamente entrenada para realizar remociones altamente reproducibles. Este procedimiento ayudó a retirar la cicatriz pero

además promovió una ligera lesión que permitió generar nuevamente la producción de factores de crecimiento y el microambiente en el que los diferentes tratamientos a utilizar. Una vez removida la cicatriz se inhibió su nueva formación adicionando DPY que es un inhibidor de la prolil-4-hidroxilasa enzima que participa importantemente en la formación de la colágena de triple hélice. El DPY se inyectó directamente (6 inyecciones) a cada muñón de la médula. Cada inyección fue de un volumen de 2 μ L de DPY 16 nmol diluido en PBS.

8.8 Obtención de las CTM

Las CTM se obtuvieron de ratas de la misma cepa que se encontraban en las mismas condiciones de peso y edad que las ratas tratadas. A partir de 12-15 semanas de edad se extrajo la médula ósea de tibia y fémur. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min en PBS, las células se sembraron en placas de cultivo de 75cm² y se utilizó el medio (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC). Las células se mantuvieron en incubación a 37° C, con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad, se realizó cambio de medio cada tercer día (Buzoianu-Anguiano et al., 2015).

8.9 Trasplante CTM

Sesenta días después de la lesión, las CTM fueron teñidas con el colorante de membrana PKH26, se trasplantaron 2,5X10⁶ CTM en 5 μ l y fueron inyectadas en el epicentro de la lesión utilizando una microjeringa Hamilton Para evaluar la tasa de supervivencia y la distribución de las CTM, se examinaron al azar secciones longitudinales de la ME, 3 días después del trasplante.

8.10 Colocación del Tissucol y de las CTM

Inmediatamente después de la remoción de la cicatriz, el espacio resultante entre los segmentos medulares rostral y caudal será llenado con la matriz de Tissucol (IMMUNO), el cual se aplicará por separado en dos gotas: una contendrá trombina humana (4 UI/ml) y otra que contendrá fibronectina, ambas gotas de entre 5 a 10 μ l. Antes de que el Tissucol alcance su estado de gelificación, se colocaron en el mismo sitio 2.5×10^6 CTM suspendidas en un volumen total de 5 μ L.

8.11 Prueba de locomoción a campo abierto BBB

Se realizó antes y después de la intervención terapéutica y hasta el final del estudio mediante evaluaciones semanales, para ello se colocó a la rata por un periodo de 4 min en un campo abierto y se calificaron por 2 observadores ciegos para el estudio. La recuperación se calificó en una escala de 0 (parálisis completa) a 21 (movilidad completa). Ver ANEXO (Basso *et al.*, 1996).

8.12 Tinción tricrómica de Masson

Los animales se sacrificaron con una dosis letal de pentobarbital sódico (80 mg/kg) y con perfusión intracardiaca se fijaron con paraformaldehído al 4%. El tejido se embebió en Tissue Tek. Se realizaron cortes de 40 μ m en el criostato de las diferentes condiciones experimentales y se depositaron en laminillas recubiertas con Silano-Acetona 2%. 1. Se hidrataron los tejidos de Xilol hasta agua destilada y posteriormente se colocó en solución precalentada de Bouin por 1 hora a 56°C. Se enfrió y se lavó con agua corriente hasta que el color amarillo desapareció. Después, se incubó en solución de Hematoxilina férrica de Weigert por 10min, se lavó y se enjuagó en agua corriente por 10 min y a continuación con

agua destilada. Inmediatamente, se colocó en solución de escarlata de Biebrich por 2 min y se enjuago con agua destilada. Seguidamente, se depositó en solución de fosfotungstico-fosfomolibdico por 12 min. Posteriormente, se dejó 5 min en azul de anilina y se enjuago con agua destilada. Finalmente, se colocó durante 3 min en solución de ácido acético glacial, se deshidrata en dos cambios de alcohol al 95%, dos de alcohol absoluto y dos de Xilol, se montó y se fijó con resina a base de Xilol. El área teñida de azul de Masson se determinó el área teñida con Masson (%) con el software ImageJ versión 1.6.0_24.

8.13 Análisis de expresión génica

Se obtuvo ARN total para TNF- α , INF- γ , IL-1 β , Interleucina 17 (IL-17), IL-4, IL-10, TGF- β 3, BDNF, NT3, IGF-1, Proteína asociada al crecimiento 43 (GAP-43), β -actina y HPRT [hypoxanthine phosphoribosyl transferase (housekeeping gene)] a partir de 1cm de tejido macerado. El tejido proveniente del sitio lesionado fue sometido a lisis con solución caotrópica (500ul) de trizol (GIBCO). Posteriormente se llevó a cabo el aislamiento del ARN por medio de soluciones orgánicas: cloroformo, isopropanol y etanol. Seguidas de periodos de centrifugación a baja temperatura (4°C). Al obtener el precipitado de ARN total se evaluó su integridad y aspecto en geles de agarosa y formaldehido; la concentración de ARN total y pureza fue evaluada por medio de espectrofotometría UV leyendo a una longitud de onda de 280nm.

Se realizó la retrotranscripción a partir de 2 μ g de ARN total con 1 μ l de Oligo dT, 1 μ l de dNTP's 10 mM y agua a un volumen final de 13 μ l que fueron sometidos a 65°C por 5 min, para posteriormente ser agregados a la mezcla: 4 μ l de Buffer de reacción 5X, 1 μ l de DTT 0.1 M, 1 μ l de RNAsa OUT Recombinant RNAsa Inhibidor y 1 μ l de Enzima Super Script. La mezcla final de 20 μ l fue incubada a 25°C por 5 min, posteriormente a 50°C por

1h y finalmente a 70°C por 20 min para ser inactivado. Los primers fueron diseñados por OligoPerfect™ (<http://tools.invitrogen.com>) y se confirmó su diseño por medio del software Oligo (Molecular Biology Insights, Inc). La cadena iniciadora (F) y reversa (R), longitud del producto y códigos de entrada al GeneBank se encuentran indicadas en la tabla 1 (ver ANEXO 1).

Para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) se generó un total de 10 µl de mezcla compuesto de: 1µl de ADNc (cadena complementaria), 1µl de primer (.5µl para cadena F y .5µl para la R) y 8µl de FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Diagnostics, Indianapolis, USA). La amplificación fue detectada por medio del instrumento LightCycler 96 (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) el cual calculó la fluorescencia emitida por el intercalante SYBR Green. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización a 95°C/10 min seguido por 35-40 ciclos de desnaturalización a 95°C/7s, alineación de 60°C/7 s, extensión a 72°C/10 s, curva de disociación a 65°C/1 min., y un ciclo de enfriamiento a 40°C/30 s.

El software utilizado para llevar a cabo el análisis de amplificación fue el LightCycler 96 versión 2.0 (Roche Molecular Biochemicals). La identificación del producto de la PCR fue confirmado por un análisis de curva de disociación, la reacción para cada muestra fue llevada a cabo por duplicado, con una reacción sin cDNA como control. La expresión relativa fue calculada por el método Cq (número de ciclo en el cual inicia la amplificación exponencial del templado) por medio de la segunda derivada. Se obtuvo el valor medio de cada muestra, en donde, el valor de expresión de cada gen analizado fue comparado con la del gen constitutivo (β -actina) mediante la asignación de un valor igual a uno a este último, para la normalización de la expresión.

8.14 Inmunohistoquímica

Después de 8 semanas de haber dado los tratamientos correspondientes a cada grupo, los animales fueron sacrificados con una sobredosis por vía intraperitoneal de pentobarbital sódico (80 mg/kg), una vez que los animales perdieron completamente la consciencia se hizo pasar una solución de paraformaldehído al 4% por vía intracardiaca. Inmediatamente se extrajo la ME y se dio un tratamiento de post fijación con paraformaldehído al 4% durante 24 h, posteriormente se introdujo el tejido en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% y se dejó en ella durante una semana.

Con ayuda de un criostato se realizaron cortes transversales de 30 μ , 1 centímetros detrás del epicentro de la lesión, las secciones obtenidas se mantuvieron en una solución de PB 0.01M. La técnica de inmunohistoquímica por flotación se realizó con la intención de contabilizar el número de fibras positivas a hidroxilasa de tirosina (TH) y serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) presentes en las médulas estudiadas. Los cortes fueron incubados con anticuerpos primarios durante 24 h: anticuerpo monoclonal producido en cabra dirigido contra TH (1:2,000; Chemicon); anticuerpo policlonal producido en conejo contra 5-HT (1:8,000; Sygma). Posteriormente se realizaron lavados en PBS durante 30 min, al finalizar este paso se incubó durante 2h con anticuerpos secundarios conjugados a una molécula de biotina: Anticuerpo IgG producido burro anti IgG de Cabra (1:500; Chemicon); anticuerpo IgG producido en cabra anti IgG de conejo. Al final de este tiempo se lavó el tejido con PBS 0.01M durante 30 min y finalmente se procedió a la visualización de fibras positivas a TH y 5-HT mediante la incubación durante 5 min con el kit Vector de DAB. Las fibras positivas son de un color café oscuro que resalta del fondo.

9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron por triplicado en al menos tres eventos independientes. Los datos de la prueba motora se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los datos de la expresión génica y la regeneración axonal se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. Se consideró una $p < 0.05$ estadísticamente significativa. Se utilizó el software 5.0 GraphPad Prism.

10 RESULTADOS

10.1 La IPNM con dosis de 200 μ g induce una mayor proliferación de linfocitos T_{A91} en la LCME

Nuestro grupo de investigación ha trabajado con la dosis de 150 μ g después de la lesión medular en la fase aguda (García et al., 2012; Ibarra et al., 2010, 2004; Martiñón et al., 2007; Martiñón et al., 2016, 2012; Rodríguez-Barrera et al., 2013) con esta dosis se ha demostrado el efecto neuroprotector del péptido A91, no obstante, en la lesión crónica medular los animales tienen mayor peso y la capacidad inmunogénica del péptido A91 puede ser diferente. Por lo cual, se realizó un ensayo de proliferación para corroborar la expansión clonal de linfocitos T_{A91} y conocer la dosis del péptido que se emplearía en la LCME. La figura 5 muestra que la incorporación de Timidina ^3H fue significativamente mayor en las ratas IPNM con 200 μ g (2284 ± 277.4) en comparación con lo observado en el grupo inmunizado con 150 μ g (196.5 ± 45.68) y 250 μ g (135.8 ± 120.8) respectivamente, ($p < 0.05$, Prueba de ANOVA de una sola vía seguido de la prueba Post hoc de Tukey-Kramer).

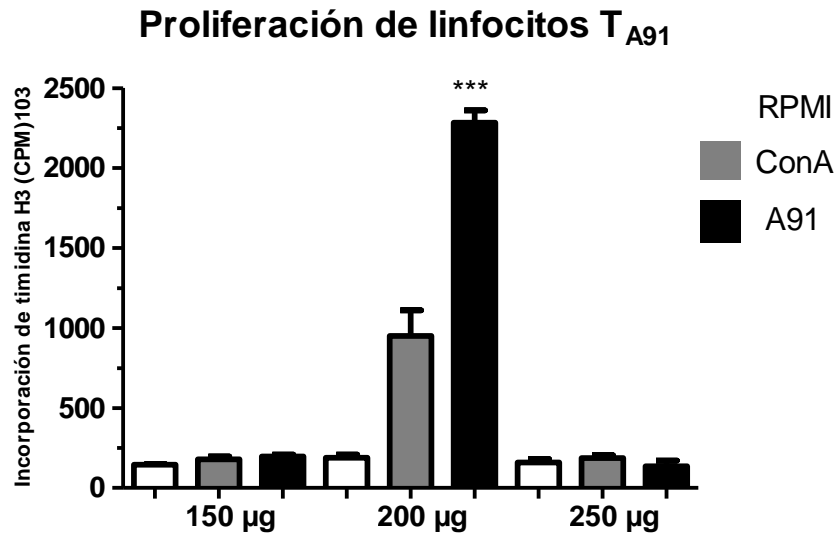


Figura 5. Incorporación de Timidina ³H en linfocitos T de ratas con LCME. La barra blanca muestra el control negativo (linfocitos T con RPMI-1640). Control positivo (linfocitos T estimulados con ConA) señalado en la barra gris. La barra negra indica que la LCME + 200µg incremento significativamente la proliferación de linfocitos T^{A91} comparada con las dosis de 150µg y 250 µg. Los resultados son expresados en media ± desviación estándar (DE), ANOVA de una vía, seguida de Tukey-Kramer. 200µg vs. 150 y 250µg, p<0.001***n=3.

10.2 La remoción de cicatriz no induce un mayor déficit motor del que presentaban los animales antes de la intervención quirúrgica

La comparación de la prueba motora antes y después de la intervención quirúrgica muestra en la figura 6 que no existen diferencias significativas al concluir el estudio 60 días después de la intervención, al comparar el grupo de LCME (6.250±0.1414) contra el grupo de RC (6.075±0.1768) respectivamente (p>0.05, Prueba de T student p= 0.8591; cada punto

representa la media \pm DE con una n=10). Lo anterior demostró mediante la evaluación locomotora a campo abierto, que la RC no induce mayor déficit neurológico en el animal transcurridos los 60 días de intervención quirúrgica.

Con estos resultados se confirmó la dosis a emplear en la fase crónica y se determinó que la remoción quirúrgica de la cicatriz glial es un método seguro no invasivo, que no genera mayor déficit neurológico al que ya padecía el individuo, por lo que puede utilizarse como parte de esta terapia de combinación en LCME.

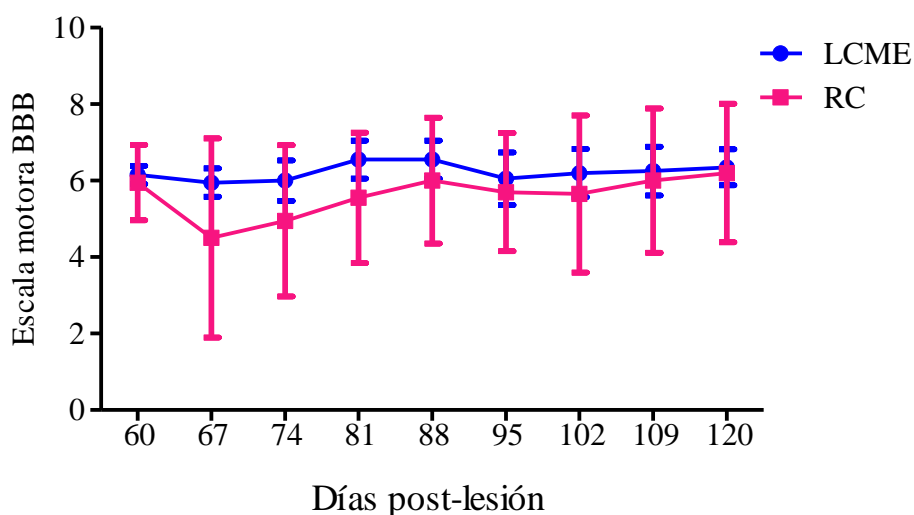
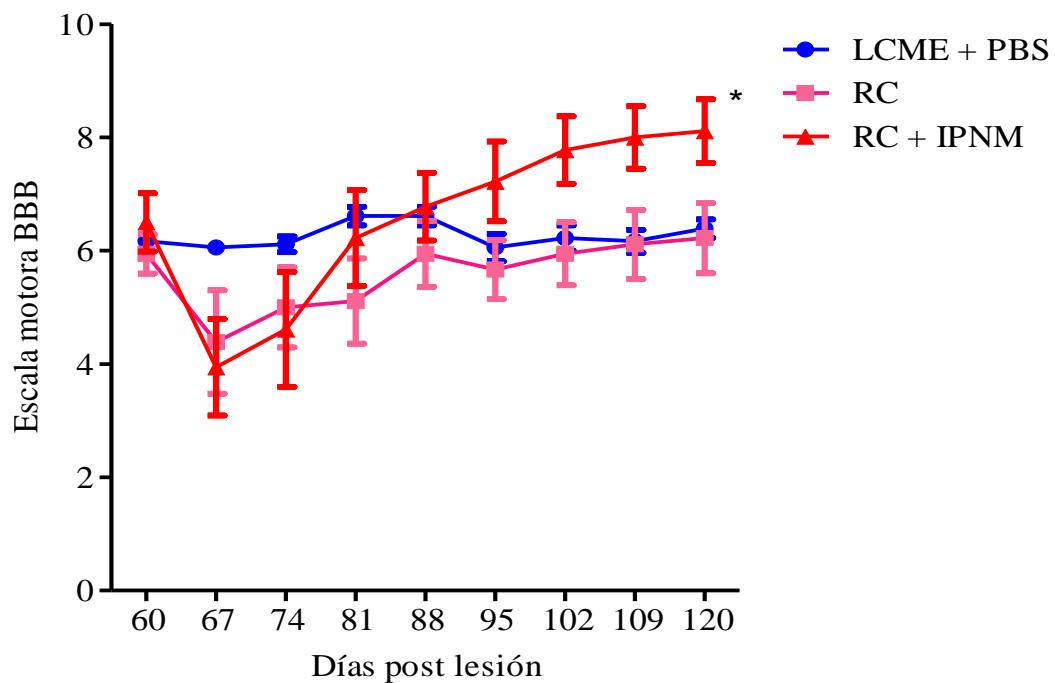


Figura 6. Comparación de la prueba motora BBB antes y después de la remoción quirúrgica de la cicatriz glial. No se mostraron diferencias significativas después de la intervención quirúrgica. $p > 0.05$ vs RC. Prueba de T student $p = 0.8591$. Media \pm DE se representa para cada grupo. n=10; RC: Remoción de cicatriz.

10.3 La inmunización con péptidos neurales modificados más la remoción de cicatriz mejoró la recuperación motora después de la lesión crónica de la médula espinal

La evaluación de la recuperación motora antes de la intervención terapéutica demostró que la puntuación BBB fue similar en los 3 grupos (RC: 6.00 ± 1.03 , LCME + PBS: 6.16 ± 0.25 , RC + IPNM: 6.33 ± 1.47 , media \pm DE Figura (6A). Sesenta días después de la intervención (120 días después de la LME), las ratas sometidas a la RC + IPNM mostraron un incremento significativo en la recuperación motora (8.11 ± 1.69 , $p < 0.05$, ANOVA para medidas repetidas con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, Figura 7A). En comparación con la sola RC (6.22 ± 1.85) o la inmunización con PBS (6.38 ± 0.48). Cabe destacar que el 33.3% de los animales sometidos a RC + IPNM mostraron una mejora locomotora igual o superior a 9 en la puntuación de BBB (colocación de pata plantar con soporte de peso). Este porcentaje de animales fue significativamente diferente ($p < 0,05$) en comparación con el grupo solo de RC (0%) o LCME + PBS (0%) (Figura 7B).

A



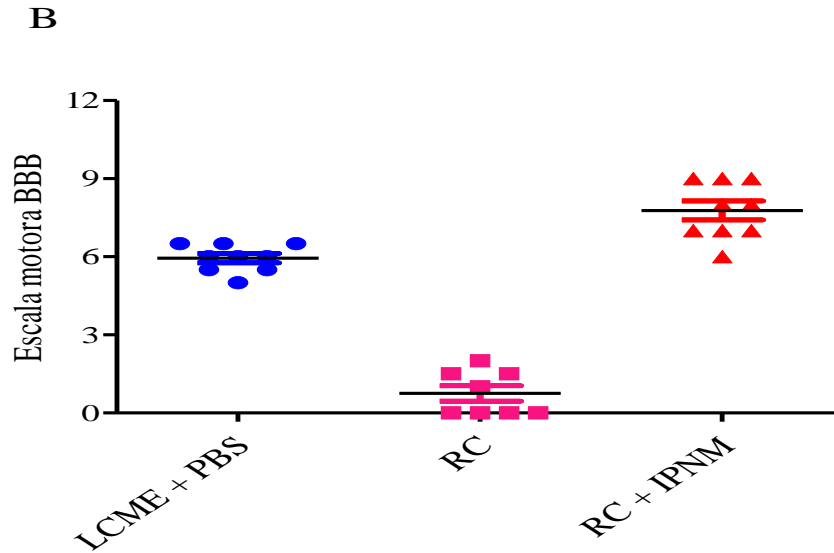


Figura 7. Recuperación motora antes y después de la intervención terapéutica. A) Después de la aplicación de los tratamientos se observó una mejor recuperación motora en el grupo de RC + IPNM. * $p < 0.05$, ANOVA para medias repetidas *post hoc* Bonferroni. Cada punto representa la media \pm DE, $n = 9$ ratas (B) Comparación de la prueba al día 120 donde se demuestra que hay un 33.3% de animales con una BBB mayor o igual a 9.

LCME: Lesión crónica de médula espinal; RC: Remoción de cicatriz; IPNM: Inmunización con péptidos neurales modificados.

10.4 La inmunización con péptidos neurales modificados más la remoción de cicatriz presenta menos depósitos de fibras de colágena

La tinción Tricrómica de Masson reveló menos depósitos de colágena en el sitio de la LCME en los tejidos tratados con la remoción de cicatriz + IPNM (Fig. 8c) en comparación con las secciones de tejido sin tratamiento (el grupo de LCME + PBS (Figura 8a)) y el grupo solo de remoción de cicatriz que presenta la cavidad (Figura 8b). Esto estaría indicando que la intervención quirúrgica fue efectiva y que el uso del quelante de hierro

DPY evitó la formación de los depósitos de colágena contribuyendo a la formación de una nueva cicatriz fibrogliosa.

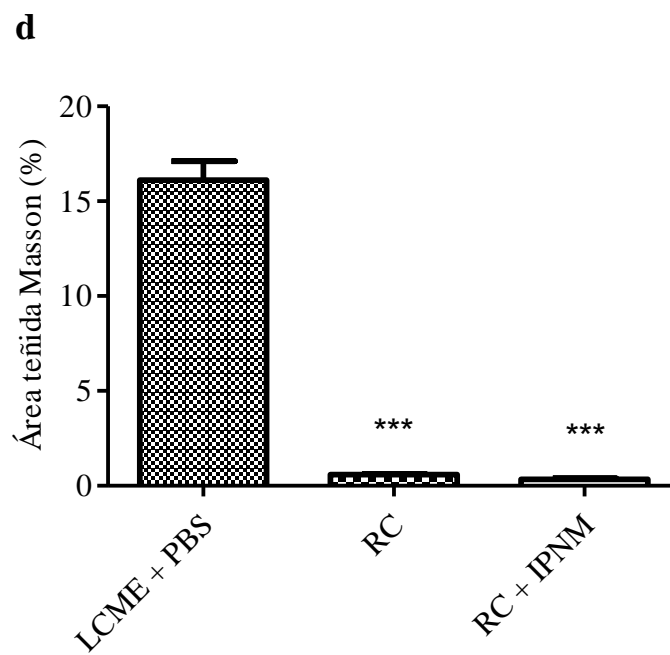
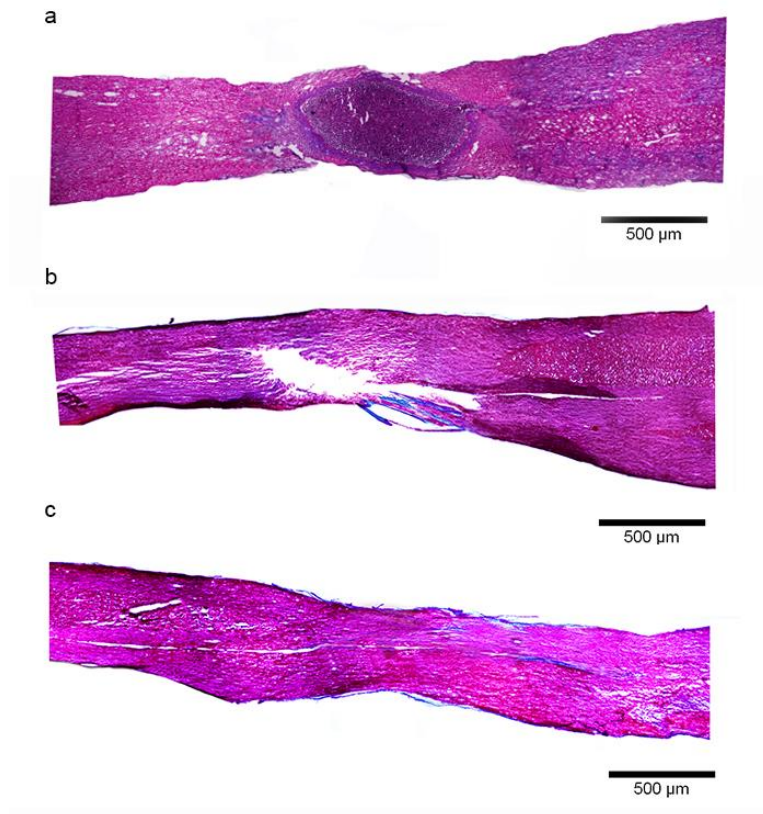


Figura 8. Micrografía que muestra la Tinción Tricrómica de Masson en el sitio de lesión. Imagen representativa que muestra la RC + IPNM, ésta presenta menos depósitos de fibras de colágena con respecto al grupo LCME + PBS. a) LCME + PBS, b) RC, c) RC + IPNM, d) Área teñida de Masson (%). ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, media \pm DE n=3.

10.5 La inmunización con péptidos neurales modificados más la remoción de cicatriz genera un microambiente donde la expresión de genes asociados a la inflamación y la regeneración prevalecen

Para confirmar que la remoción de la cicatriz + IPNM proporcionan un microambiente permisivo para la regeneración neural; la expresión de genes inflamatorios como (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-17) y anti-inflamatorios (IL-4, IL-10 y TGF- β) además, de genes asociados a la regeneración fueron evaluados en el sitio de lesión.

La Figura 9a muestra la expresión relativa de TNF- α , la cual se redujo significativamente en el grupo de remoción de cicatriz + IPNM (0.02 \pm 0.58) cuando fue comparada con el grupo de LCME + PBS (1.00 \pm 0.62) o la remoción de cicatriz (0.64 \pm 0.84; $p < 0.05$, ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer).

La expresión del gen que codifica para IFN γ fue incrementada significativamente en los animales solo con remoción de cicatriz (12.04 \pm 0.55; $p < 0.05$ ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Tukey-Kramer; Figura 9B), pero disminuyó su expresión en las ratas con remoción de cicatriz + IPNM (8.40 \pm 0.35). En lo que respecta a IL-1 β no reveló diferencias significativas (Figura 9c).

Además, la remoción de la cicatriz + IPNM induce un incremento significativo en los genes que codifican para IL-4 (12.0 ± 0.34), IL-10 (26.33 ± 0.59), TGF- β 3 (58.77 ± 0.59) e IL-17 (8.40 ± 0.35), cuando se compararon con el grupo de LCME + PBS (1.00 ± 2.06 ; 1.00 ± 0.19 ; 1.00 ± 1.76 ; 1.00 ± 0.16 , respectivamente) y el grupo solo de remoción de cicatriz (0.004 ± 0.26 ; 4.56 ± 0.09 ; 0.61 ± 2.31 ; 2.19 ± 0.65 , respectivamente) (Figuras 9d, e, f y g); $p < 0.05$, ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer).

Los genes asociados a la regeneración (BDNF, IGF-1 y GAP-43) también fueron examinados. La expresión relativa de (a) BDNF (2.80 ± 1.71 ; $p < 0.05$, ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer), b) IGF-1 (93.60 ± 0.74 ; $p < 0.05$, ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Tukey-Kramer) y c) GAP-43 (123.22 ± 0.2 , ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer), fueron significativamente incrementados en el grupo de ratas con remoción de cicatriz + IPNM cuando fueron comparados con el grupo de LCME + PBS (1.00 ± 1.18 ; 1.00 ± 0.10 ; 1.00 ± 1.55 , respectivamente) y los grupos de remoción de cicatriz (0.12 ± 0.35 ; 0.87 ± 0.51 ; 23.48 ± 0.33 , respectivamente) (Ver Figuras 10a, b y c).

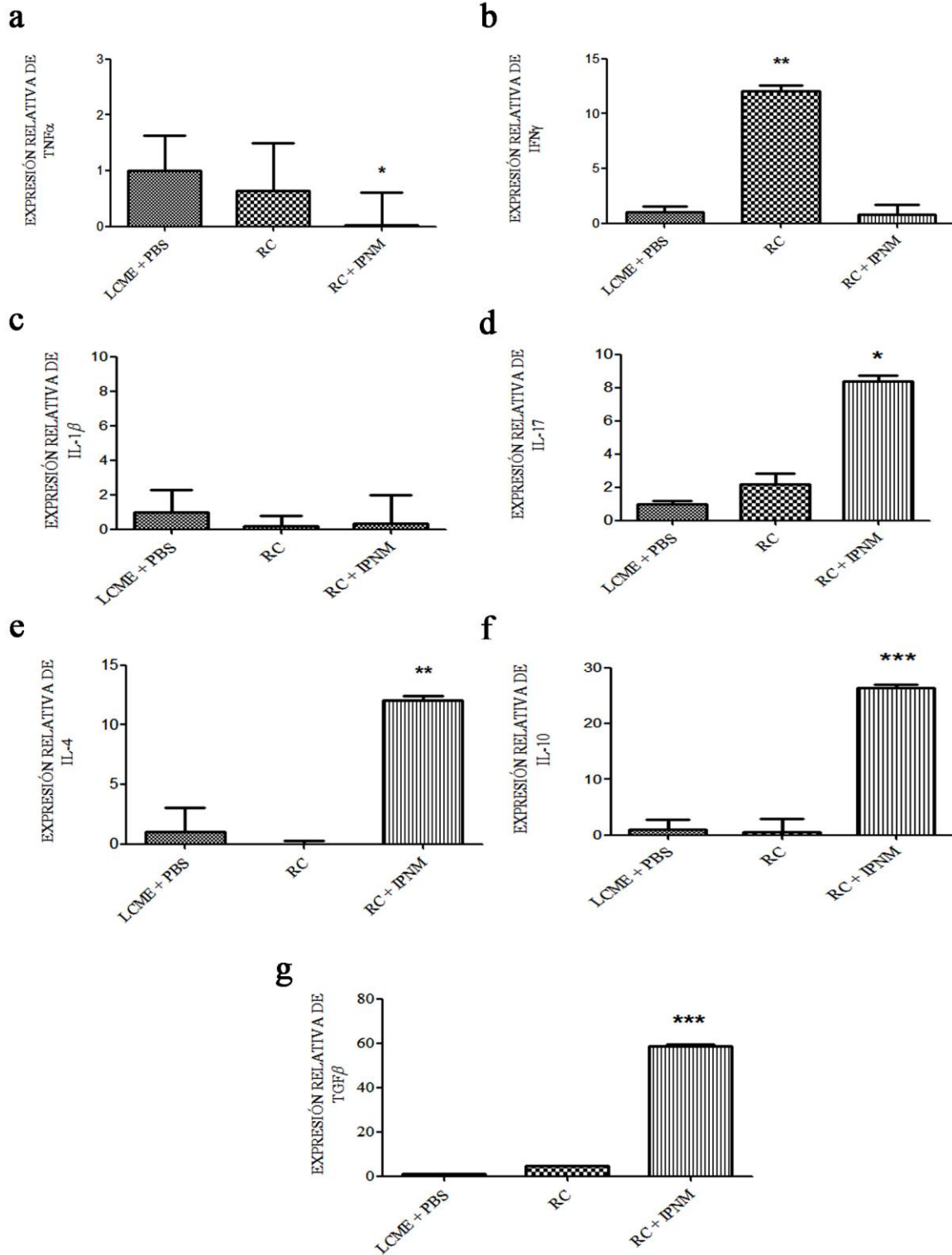


Figura 9. Expresión relativa de genes asociados a la inflamación en el sitio de lesión. La expresión de TNF- α e IFN- γ se redujo significativamente en el grupo de RC + IPNM. Con

respecto a IL-4, IL-10, TGF- β e IL-17, incremento significativamente en el grupo de RC + IPNM. La expresión de IL-1 β no mostraron diferencias significativas $p > 0.05$. ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. Cada barra representa la media \pm DE, (n=4). * $p < 0.05$ vs Todos los grupos, ** $p > 0.05$ vs LCME +PBS, *** $p = 0.001$ vs LCME + PBS.

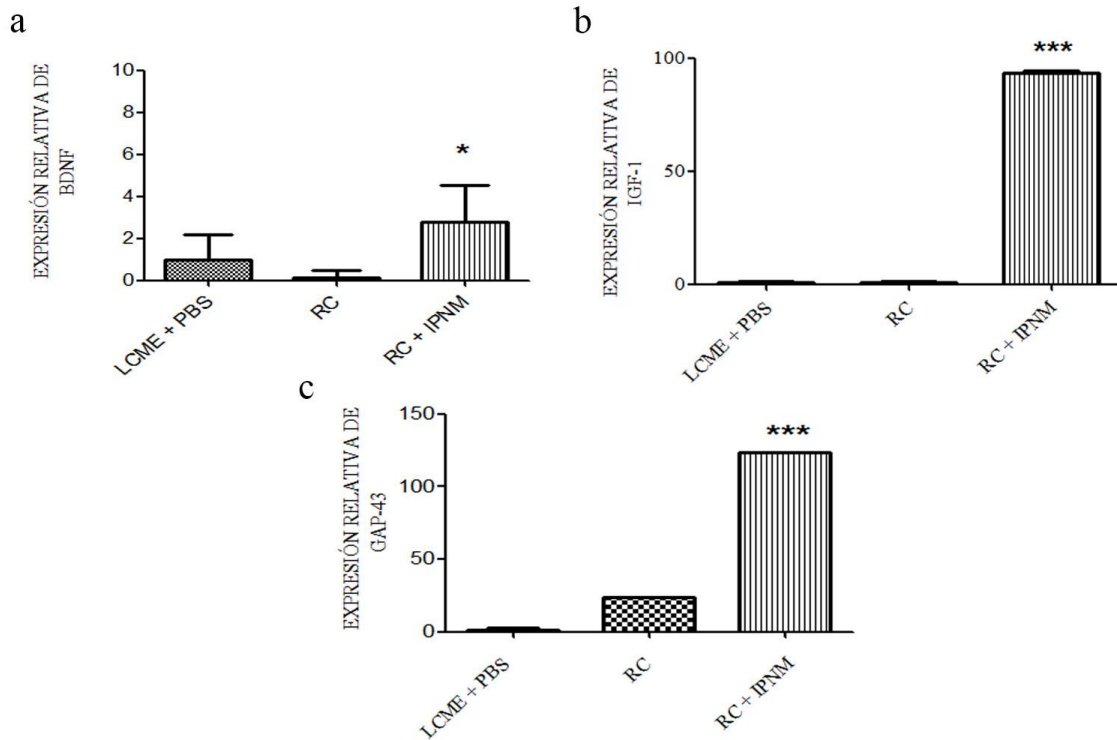


Figura 10. Expresión relativa de genes asociados a la regeneración en el sitio de lesión. La expresión de a) BDNF, b) IGF-1 y c) GAP43 incremento de manera significativa en el grupo de RC + IPNM. ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. * $p > 0.05$ vs LCME +PBS, *** $p = 0.001$ vs LCME + PBS. Cada barra representa la media \pm DE, de 4 ratas.

10.6 La inmunización con péptidos neurales modificados más la eliminación de la cicatriz glial promueve la regeneración axonal

Para determinar si el microambiente permisivo anti-inflamatorio generado por la remoción de cicatriz + IPNM tuvo efecto positivo sobre la regeneración axonal; nosotros evaluamos el porcentaje obtenido del número total de fibras inmunorreactivas a 5-HT y TH en la porción caudal al sitio de lesión de las ratas después de la intervención.

La figura 11a muestra un incremento significativo en la cantidad de axones +TH (1mm detrás del epicentro de la lesión) en el grupo sometido a la remoción de cicatriz + IPNM (33.17 ± 2.68), esta regeneración no se observó en el grupo con LCME + PBS (25.50 ± 3.93) ni en el grupo con la remoción de cicatriz (17.83 ± 1.70 ; $p < 0.05$, prueba ANOVA de una sola vía seguida de la prueba *Post hoc* Tukey-Kramer). En figura 11b, el conteo de axones positivos a 5-HT mostró la misma tendencia, se observó una mayor cantidad de axones en la porción caudal a la zona de lesión en el grupo de remoción de cicatriz glial + IPNM (51.33 ± 8.30 , $p < 0.05$, prueba ANOVA de una sola vía seguida de la prueba *post hoc* Tukey-Kramer) comparado con el grupo inmunizado con PBS (14.50 ± 2.52) y con el grupo con eliminación de la cicatriz glial (13.17 ± 1.66).

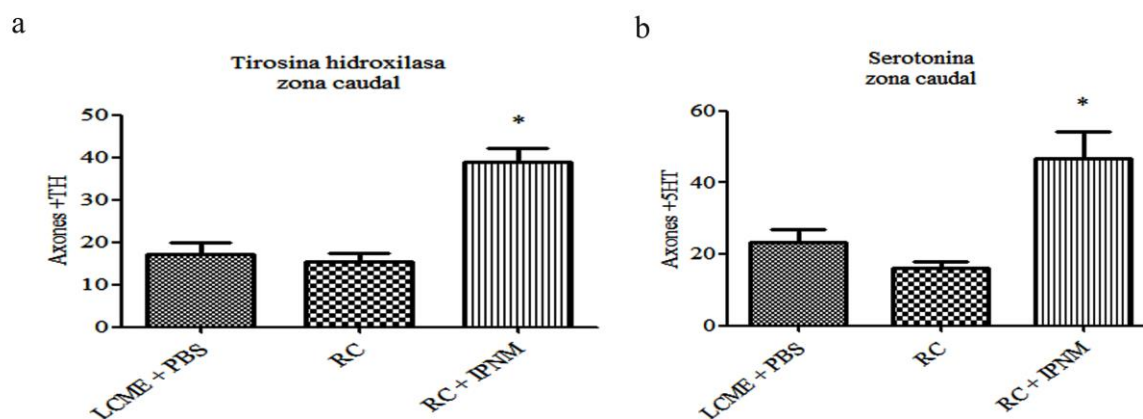


Figura 11. Se observa el número de axones en la porción caudal de ratas con LME después de la intervención terapéutica. El porcentaje fue obtenido del número de axones totales al mismo nivel con el grupo LCME +PBS. (a) Las ratas tratadas con RC + IPNM presentan un incremento significativo en el conteo total de axones positivos a TH y axones positivos a serotonina (b). * $p < 0.05$, vs LCME + PBS. ANOVA de una vía seguida de Tukey- Kramer. Cada barra representa la media \pm DE, de 4 ratas.

10.7 La sola inmunización con péptidos neurales modificados, también, incrementa la recuperación motora en la lesión crónica de la médula espinal

El segundo experimento tuvo como objetivo determinar si era necesario realizar una ligera lesión para activar el efecto benéfico de la AP, o si la sola IPNM es suficiente para promover la restauración neural en la fase crónica de la lesión medular. La población de estudio de este experimento consistió en veinticuatro ratas sometidas LME. Dos meses después de la lesión, las ratas fueron divididas en tres grupos de la siguiente manera: 1) Ratas con LCME + PBS (n=8); 2) ratas con RC + IPNM (n = 8); 3) ratas IPNM más operación simulada sin eliminación de la cicatriz (n = 8). Las ratas tratadas solo con IPNM (7.8 ± 0.8) mejoraron la recuperación de la locomoción, aunque el efecto no fue tan marcado como el observado el grupo de RC + IPNM (9 ± 0.3) o los del grupo con LCME + PBS (5.75 ± 0.2). (Figura 12).

A

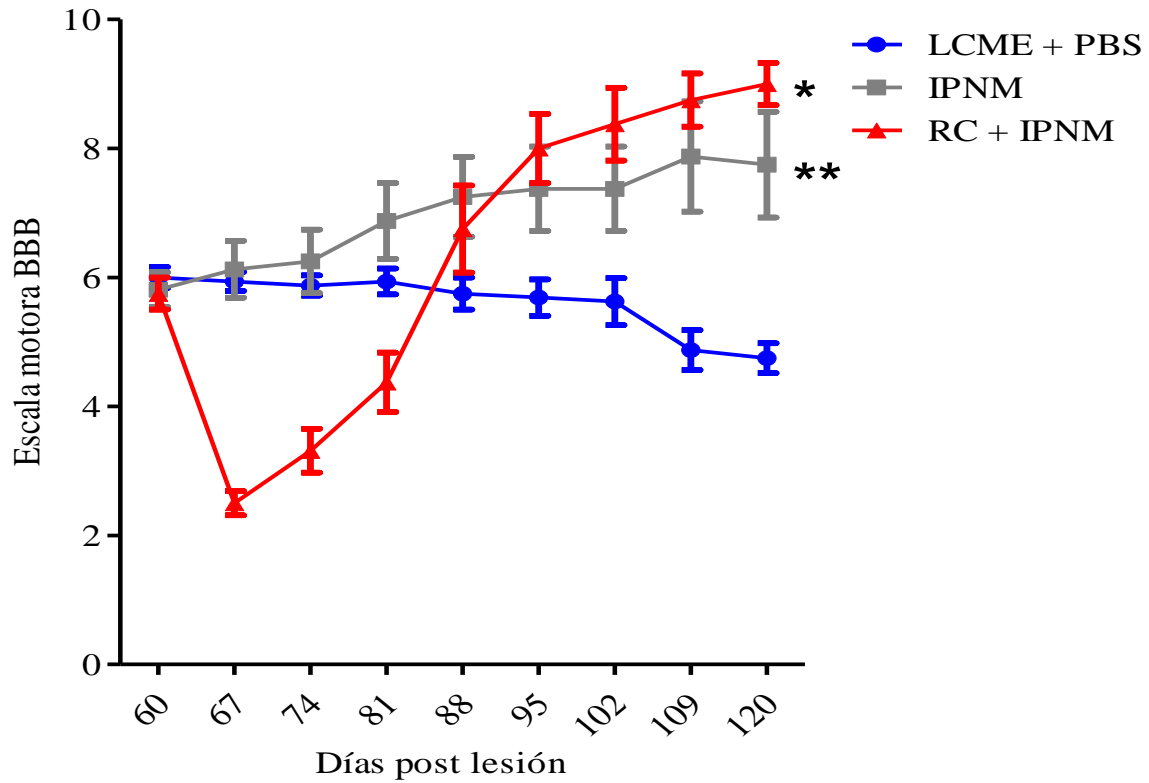


Figura 12. Recuperación motora antes y después de la intervención terapéutica. Después de la aplicación de los tratamientos se observó una mejor recuperación motora en el grupo de IPNM, RC + IPNM. * $p < 0.05$, ANOVA para medias repetidas *post hoc* Bonferroni. Cada punto representa la media \pm DE, (n=9). * $p < 0.001$ vs LCME + PBS y $p < 0.05$ vs IPNM, ** $p < 0.05$ vs LCME +PBS.

10.8 El microambiente generado por la inmunización con péptidos neurales modificados también es permisivo, aunque en menor grado que el inducido por la remoción de cicatriz + IPNM

La expresión génica de IFN- γ y TNF- α se redujo significativamente en las ratas tratadas con la sola IPNM cuando se comparó con el grupo de LCME +PBS (0.18 ± 2 y 0.21 ± 2 , respectivamente); $P < 0,05$, ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer). De la misma manera, hubo una reducción en la expresión de estos genes en animales con RC + IPNM (0.21 ± 3 y 0.17 ± 2 , respectivamente; Fig. 13a, b, $p < 0,05$ vs. grupo LCME + PBS). La expresión génica de IL-4 y TGF- β fue significativamente mayor en las ratas IPNM frente a LCME + PBS (6.6 ± 1 , y 32.6 ± 4 , respectivamente. Figura 13 c y e; $p < 0,05$, ANOVA de una vía seguido por una prueba *post hoc* de Tukey-Kramer), es importante mencionar que los resultados son sobresalientes en el grupo de RC + IPNM para IL-4, IL-10 y TGF- β (11.4 ± 2 , 26.33 ± 0.59 y 56.8 ± 7 , respectivamente, $***p < 0,001$ vs. ratas LCME + PBS y $p < 0,05$ vs. solo la IPNM; fig. 13c, d y e).

La expresión de los genes asociados a la regeneración incrementó significativamente en las ratas tratadas con la IPNM (figura 14a, b y c) en GAP-43 (65.8 ± 6). Con respecto a BDNF (1.98 ± 0.3) e IGF-1 (39.2 ± 8) no hubo diferencias significativas; sin embargo, también fue inferior la sola IPNM comparado con el grupo de RC + IPNM (BDNF: 3.2 ± 0.4 ; IGF-1: 70.9 ± 0.9 ; GAP-43: 105.8 ± 9 , $p < 0,05$ ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey-Kramer, $**p > 0.05$ vs LCME +PBS, $***p = 0.001$ vs LCME + PBS.).

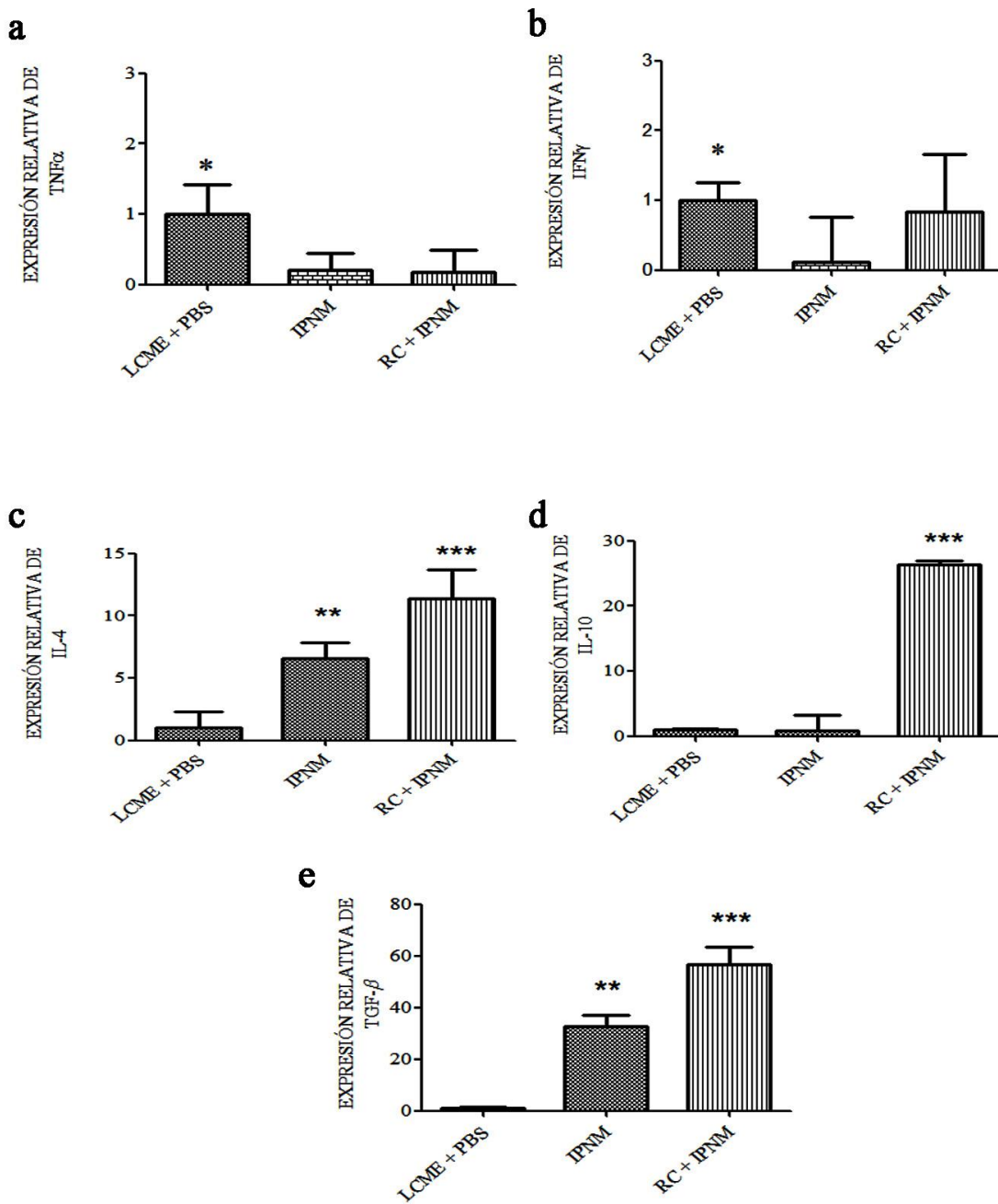


Figura 13. Expresión relativa de genes asociados a la inflamación en el sitio de lesión. La expresión de TNF- α e IFN- γ se redujo significativamente en el grupo de RC + IPNM y solo IPNM. Con respecto a IL-4, IL-10 y TGF- β incremento significativamente en el grupo de RC + IPNM. ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de

Tukey-Kramer. Cada barra representa la media \pm DE, (n=4). *p<0.05 vs Todos los grupos, **p<0.05 vs LCME + PBS, ***p=0.001 vs LCME + PBS.

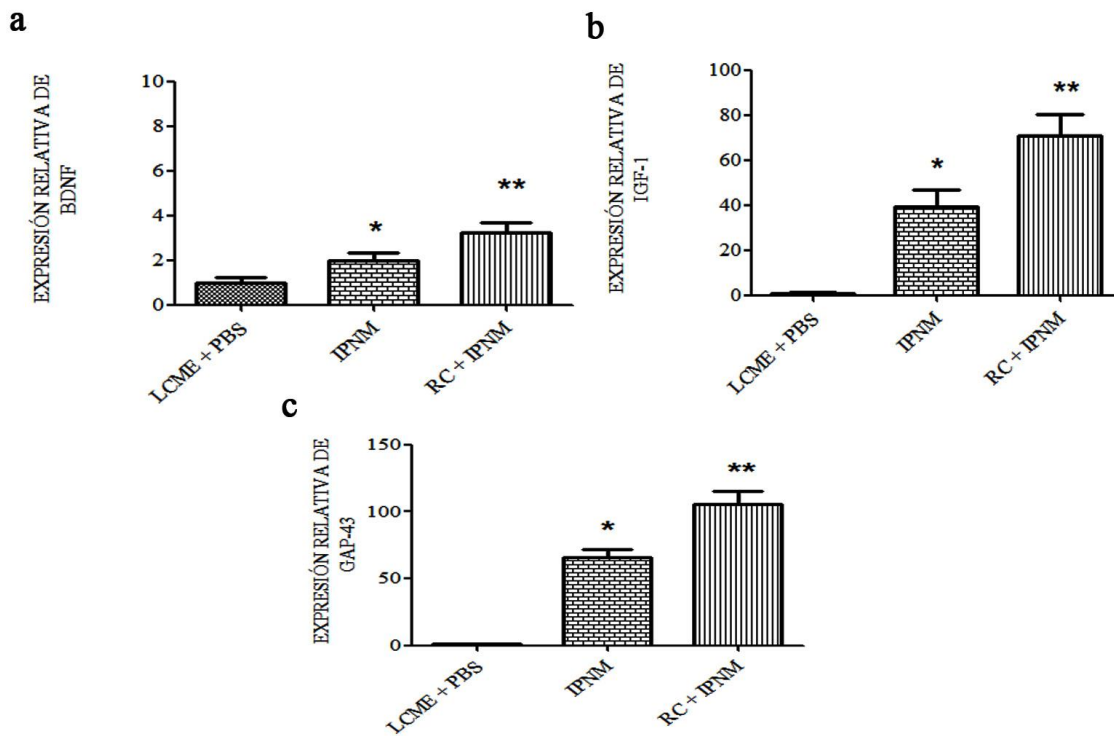


Figura 14. Expresión relativa de genes asociados a la regeneración en el sitio de lesión. Los genes para BDNF, IGF-1 y GAP-43 incrementaron de manera significativa en el grupo de RC + IPNM y en el grupo solo IPNM. ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. Cada barra representa la media \pm DE, (n=4). *p>0.05 vs. Todos los grupos, **p>0.05 vs. LCME + PBS, ***p=0.001 vs. LCME + PBS.

10.9 La inmunización con péptidos neurales modificados promueve la regeneración axonal en menor grado comparado con la inmunización con péptidos neurales modificados más remoción de cicatriz

Para determinar si el microambiente permisivo anti-inflamatorio generado por la IPNM por si solo tiene efecto positivo sobre la regeneración axonal; se evaluó el porcentaje obtenido del número total de fibras catecolaminérgicas y serotoninérgicas en la ME de las ratas después de la intervención.

La Figura 15a y b muestra un aumento significativo de las fibras inmunorreactivas +TH y 5-HT en la porción caudal en el grupo de remoción de cicatriz + IPNM. El porcentaje de fibras en este grupo fue significativamente mayor (43.53 ± 7.69 , 45.61 ± 19.77 , respectivamente) que el observado en el grupo LCME + PBS (14.50 ± 6.189) ($p < 0,05$, ANOVA de una sola vía seguida de la prueba *post hoc* Tukey-Kramer). Sin embargo, el porcentaje de axones presentado por la sola IPNM fue menor que el observado en la remoción de cicatriz + IPNM (30.39 ± 9.30 , 28.64 ± 10.30).

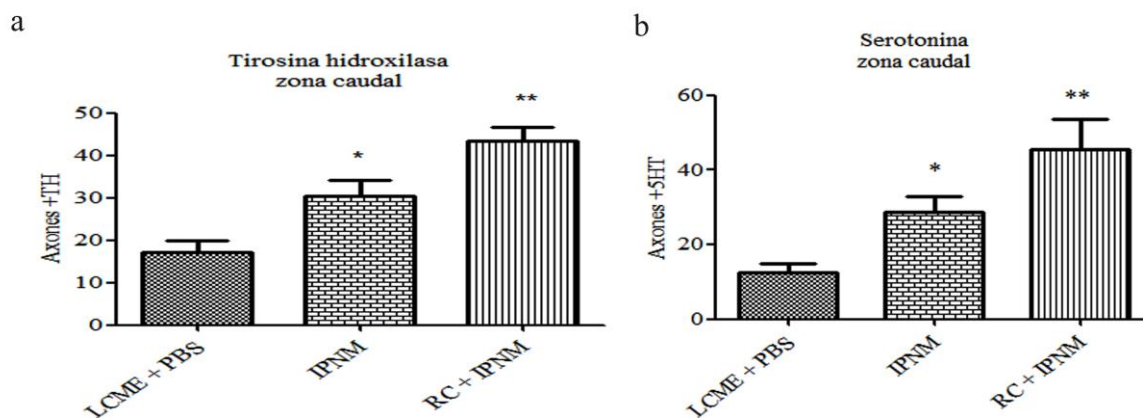


Figura 15. Se observa el número de axones en la porción caudal de ratas con LME después de la intervención terapéutica. El porcentaje fue obtenido del número de axones totales al mismo nivel con el grupo LCME + PBS. En el segundo experimento, a) el grupo tratado con IPNM muestra un incremento significativo en los axones +TH b) y en axones +5-HT aunque en menor grado que la remoción de cicatriz + IPNM. * $p < 0.05$, vs LCME + PBS,

**p>0.001 vs LCME + PBS. ANOVA de una vía seguida de Tukey- Kramer. Cada barra representa la media± DE, de 4 ratas.

10.10 La estrategia de combinación mejora la recuperación motora en la lesión crónica de la médula espinal, aunque en menor grado que la remoción de cicatriz más IPNM

Finalmente, en el último experimento se determinó si la adición de una terapia a la RC + la IPNM podría tener un efecto regenerador más efectivo en la LCME. Para ello se evaluó si la RC + IPNM + el trasplante de una matriz de fibrina impregnada con CTM (terapia de combinación) podrían actuar en sinergia y potenciar el efecto regenerador de la AP. La población de estudio de este experimento consistió en 24 ratas sometidas a la LME. Dos meses después de la lesión, las ratas fueron divididas en tres grupos de la siguiente manera: 1) Ratas con LCME + PBS (n = 8); 2) ratas con RC + CTM (n = 8); 3) ratas con RC + IPNM + CTM (n = 8). Las ratas tratadas con la estrategia de combinación presentaron una mejor recuperación de la locomoción, (Figura 16). Al final del período de seguimiento tras la intervención, los animales del grupo de RC + IPNM + CTM (7.25 ± 0.6) presentaron mayor recuperación motora que aquellos con solo la RC + CTM (7.15 ± 0.6) o los del grupo con LCME + PBS ($6,45 \pm 0.2$). (Ver Figura 16).

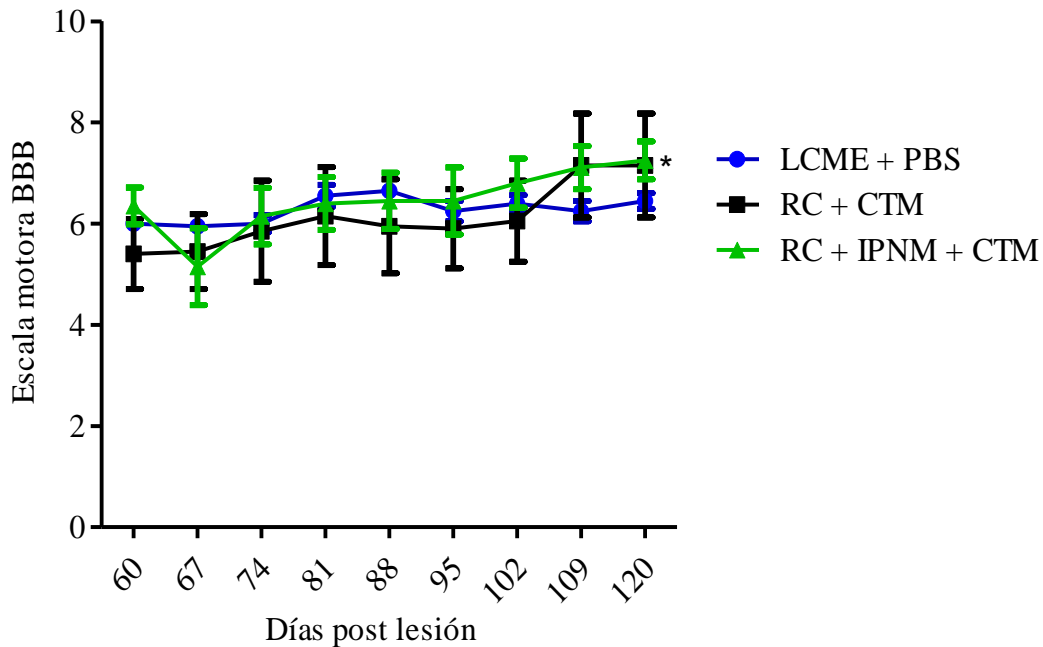


Figura 16. Recuperación motora antes y después de la intervención terapéutica. Después de la aplicación de los tratamientos se observó una mejor recuperación motora en el grupo de RC + CTM, RC + IPNM + CTM. * $p < 0.05$, ANOVA para medias repetidas *post hoc* Bonferroni. Cada punto representa la media \pm DE, (n=8).

10.11 El microambiente generado por la terapia de combinación, también es permisivo, aunque en menor grado que la inducida por la remoción de cicatriz + IPNM

La expresión génica de IFN- γ y TNF- α se redujo significativamente en las ratas tratadas con la terapia de combinación cuando se comparó con el grupo de LCME +PBS (0.18 ± 2 y 0.21 ± 2 , respectivamente); $p < 0,05$, ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer. De la misma manera, hubo una reducción en la expresión de estos genes en animales con RC + CTM (0.21 ± 3 y 0.17 ± 2 , respectivamente; Fig. 17a, b, $p < 0,05$ vs. grupo LCME + PBS). La expresión génica de IL-4 fue

significativamente mayor en el grupo de la terapia de combinación frente a LCME + PBS (2.37 ± 0.34 y 1.00 ± 0.12 , respectivamente; $P < 0,05$, ANOVA de una vía seguido por una prueba *post hoc* de Tukey-Kramer). Para IL-10 (3.69 ± 0.55) incremento significativamente en el grupo de RC + CTM comparado con el grupo control (1.00 ± 0.06), ver figura 17d.

La expresión de los genes asociados a la regeneración incremento significativamente en las ratas tratadas con la terapia de combinación con respecto al grupo control LCME + PBS, en la Figura 18a solo en GAP-43 (18.03 ± 0.34), para IGF-1 (1.77 ± 0.25) se observó un incremento significativo (figura 18b) con respecto a BDNF no hubo diferencias significativas (figura 18c), $p < 0,05$ ANOVA de una vía Seguido de la prueba de Tukey-Kramer).

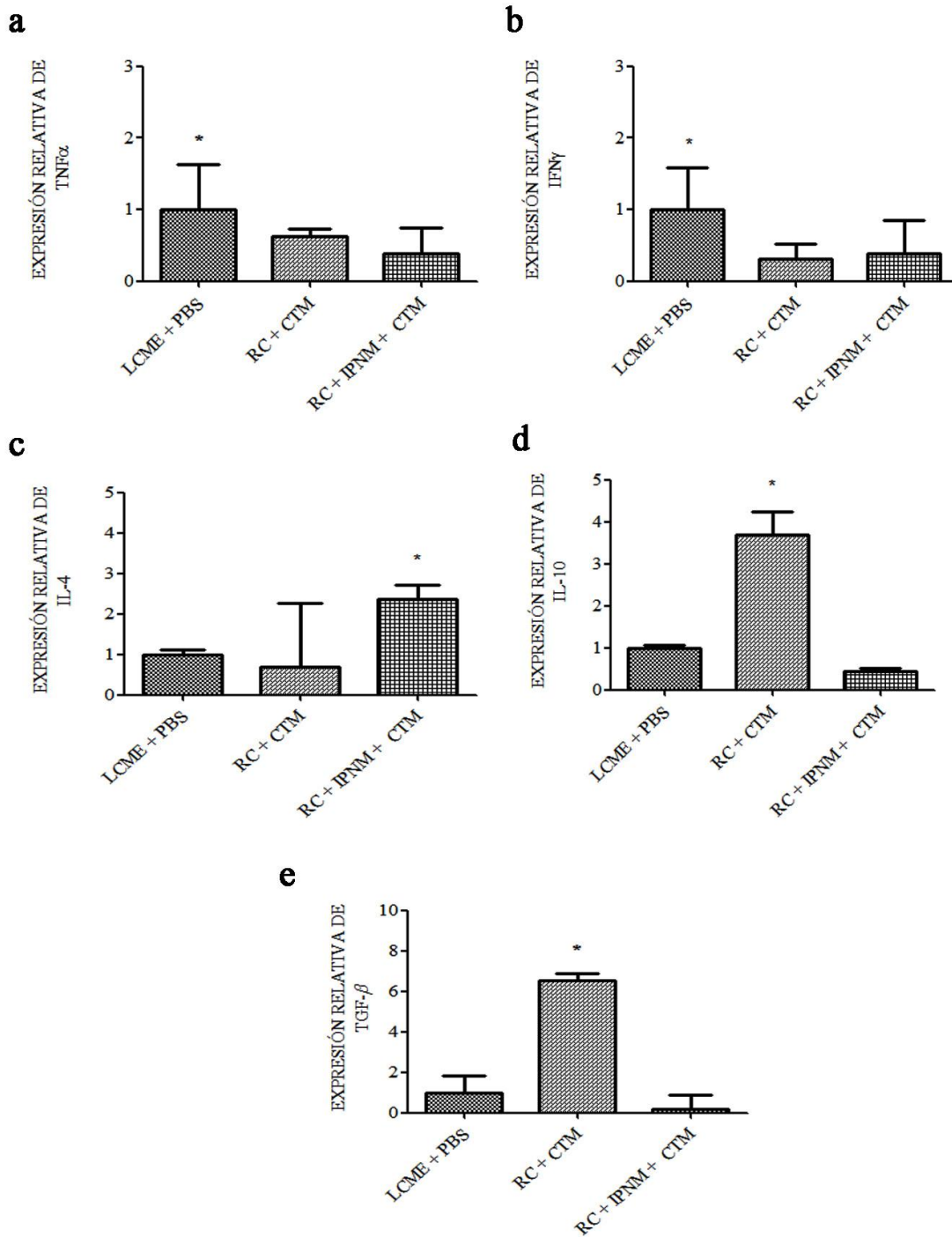


Figura 17. Expresión relativa de genes asociados a la inflamación en el sitio de lesión. La expresión de TNF- α e IFN- γ se redujo significativamente en el grupo de RC + IPNM + CTM. Con respecto a IL-4 incremento significativamente en el grupo de RC + IPNM CTM. La expresión de TGF- β no mostró diferencias significativas en el grupo de RC +

IPNM +CTM $p>0.05$, pero, si incrementó en el grupo de RC + CTM. ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. Cada barra representa la media \pm DE (n=4). * $p<0.05$ vs Todos los grupos,

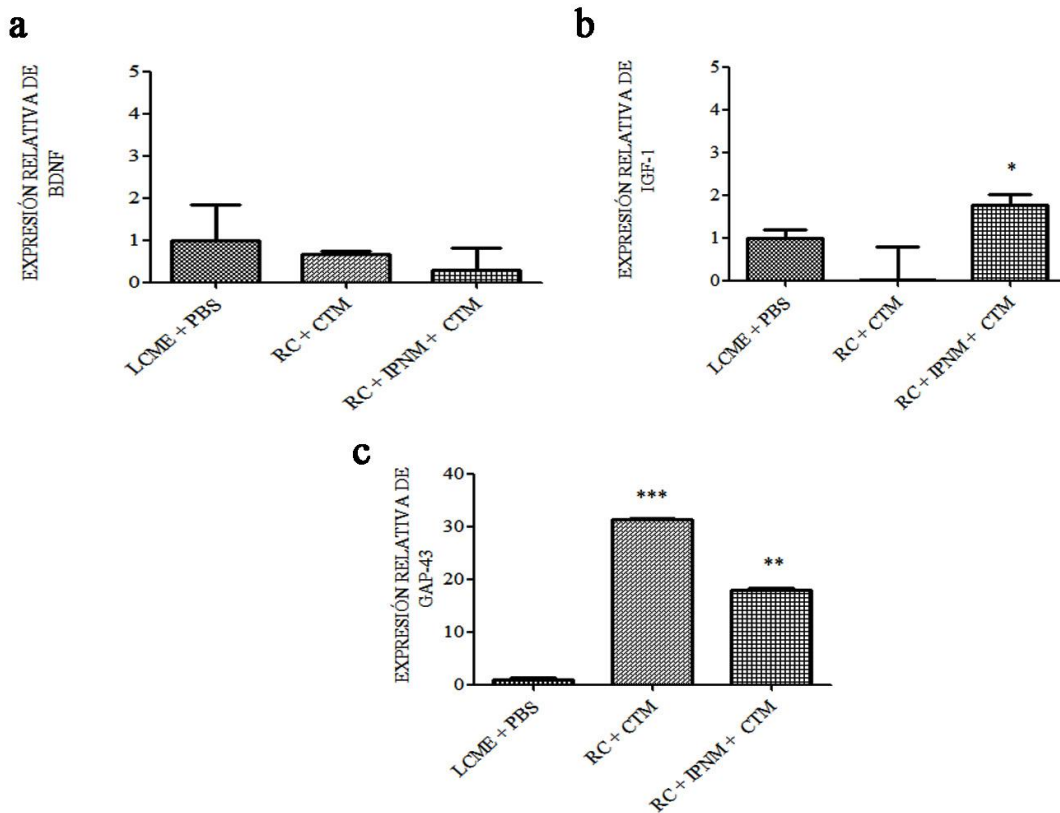


Figura 18. Expresión relativa de genes asociados a la regeneración en el sitio de lesión. a) Con respecto a la expresión de BDNF no mostró diferencias significativas $p>0.05$. ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. b) y c) La expresión de GAP-43 e IGF-1 incremento de manera significativa en el grupo de RC + IPNM + CTM. El grupo con solo RC + CTM incremento de manera significativa solo en GAP-43. Cada barra representa la media \pm DE, (n=4). * $p<0.05$ vs Todos los grupos, ** $p>0.05$ vs LCME +PBS, *** $p=0.001$ vs LCME + PBS.

10.12 La inmunización con péptidos neurales modificados más la remoción de cicatriz no promueve la regeneración axonal cuando se usa en combinación con las células troncales mesenquimales

Para conocer si el trasplante de la matriz de fibrina impregnada con CTM potencia el efecto regenerador de la IPNM + RC, también, se determinaron las fibras positivas a TH y 5-HT.

En este experimento, no se encontraron diferencias significativas en las fibras inmunoreactivas a TH y 5-HT en el grupo de la combinación RC + IPNM + CTM (Figura 19 a y b).

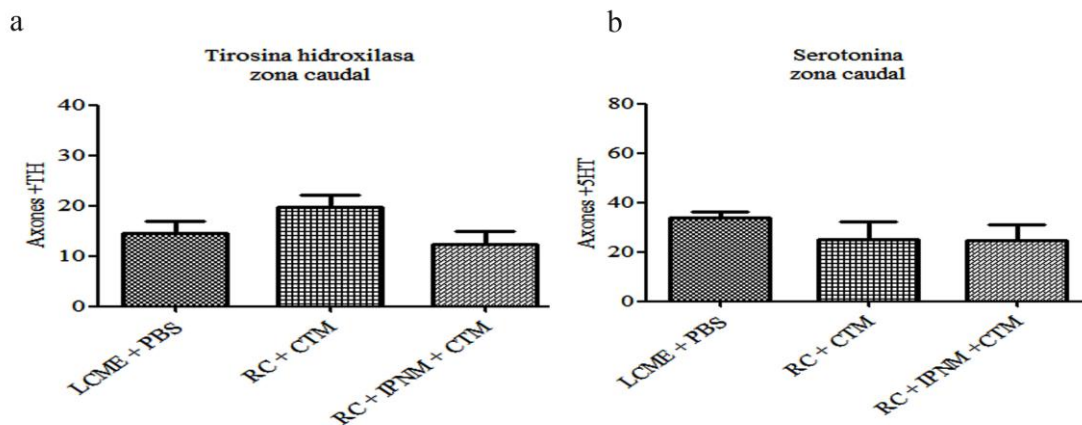


Figura 19. Se observa el número de axones en la porción caudal de ratas con LME después de la intervención terapéutica. El porcentaje fue obtenido del número de axones totales al mismo nivel con el grupo LCME +PBS. En el tercer experimento, no se mostraron diferencias significativas en el grupo de combinación RC + IPNM +CT en (a) fibras catecolaminérgicas y fibras serotoninérgicas (b). $p < 0.05$, vs todos los grupos. ANOVA de una vía seguida de Tukey - Kramer. Cada barra representa la media \pm DE, de 4 ratas.

11 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Estudios previos han demostrado que la IPNM promueve neuroprotección después del daño al SNC (García et al., 2012; Martiñón et al., 2007). Además, se ha demostrado que esta estrategia es capaz de inducir restauración neural (Cruz et al., 2015; Martiñón et al., 2016). Estos efectos benéficos son observados especialmente cuando la IPNM es administrada después de la lesión (Faulkner et al., 2004).

En este estudio se exploró el efecto de la IPNM en la fase crónica de la lesión, esta última 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 la restauración. Durante esta fase, los elementos del SI disminuyen su actividad; aunque continúan con su remodelación (Beck et al., 2010).

Para romper con esta fase latente, y al mismo tiempo, eliminar la barrera física presentada por la gliosis y las fibras de colágena, se demostró, con la tinción de Masson, una disminución en los depósitos de colágena en el grupo de remoción de cicatriz + IPNM; en el primer experimento se propuso eliminar la cicatriz glial y modular la respuesta inmune con la IPNM. A la luz de esta afirmación, el presente trabajo llevo por objetivo elucidar el efecto del tratamiento de combinación en la fase crónica de la lesión medular. Colectivamente nuestros resultados muestran que la remoción de cicatriz + IPNM induce un incremento en la recuperación motora. Este efecto benéfico fue acompañado de un incremento en la expresión de genes anti-inflamatorios (IL-4, IL-10 y TGF- β 3) y genes asociados a la regeneración (BDNF, IGF-1 y GAP-43). Estos resultados podrían ser de notable significado ya que revelan que la estabilidad y la degeneración progresiva observada en la fase crónica de la LME pueden ser interrumpidas y, en consecuencia, podría revertirse en un microambiente adecuado para la recuperación neurológica.

A través del segundo experimento, se demostró que la sola IPNM tiene la habilidad de revertir la estabilidad y la degeneración progresiva observada en la fase crónica de la lesión medular. En contraste, el efecto fue en menor grado comparado con el grupo de remoción de cicatriz + IPNM. Las diferencias observadas entre estos dos grupos pueden ser resultado de diversos factores: Primero, la remoción de cicatriz provee la posibilidad de otorgar un microambiente permisivo para una actividad mayor de la IPNM, sin embargo, la carencia de la remoción de cicatriz restringe el efecto benéfico ejercido por la IPNM bajo condiciones de un ambiente menos permisivo. Otro posible factor que contribuyó a la disminución del efecto en las ratas tratadas solo con la IPNM es el obstáculo físico y químico que por sí mismo representa la cicatriz glial. En cuanto a esto, se ha demostrado que la cicatriz podría ser una barrera importante para el crecimiento axonal. Estudios recientes, han confirmado que la remoción de cicatriz facilita la restauración neural (Goncalves et al., 2015; Jefferson, Tester, & Howland, 2011; Yoshioka et al., 2011; Zhang et al., 2007). A pesar de estos hallazgos, se ha sugerido que la cicatriz no necesariamente es un obstáculo para la regeneración y - en lugar de ser deletérea - protege el tejido (Faulkner et al., 2004) y podría incluso ser necesaria para la restauración neural (Kawano, Li, Sango, Kawamura, & Raisman, 2005; Sekiya et al., 2015). En este trabajo, se demostró que la IPNM por sí sola promueve la recuperación motora; pero se potencia si se remueve la cicatriz glial. En adición, el método de remoción quirúrgica que se diseñó puede modularse con la adición de una terapia ya sea el trasplante de una matriz de fibrina impregnada con CTM o la IPNM e inclusive la combinación.

En el último experimento, se pretendió demostrar si el adicionar una terapia a la remoción de cicatriz + IPNM como lo es el trasplante de una matriz de fibrina impregnada con CTM

podría restaurar en mayor grado el tejido lesionado en la fase crónica. Numerosos estudios sugieren que las CTM modulan muchos de los efectos nocivos asociados con el daño agudo y crónico después de una LME (Nakajima et al., 2012; Teixeira et al., 2013; Uccelli, 2013; Wright, Masri, Osman, Chowdhury, & Johnson, 2011) y que el uso de CTM después de una LME es capaz de incrementar la recuperación motora (Oliveri et al., 2014). Asimismo, si se añade un biomaterial proporcionan sostén al crecimiento axonal en procesos de regeneración y funcionan como transportadores de sustancias, factores de crecimiento e incluso células que participan en el proceso de regeneración (Koning, Kooij, de Vries, Nolte, & Mebius, 2013). En este trabajo se propone que la IPNM y las CTM no actuaron en sinergia. Estudios previos en nuestro grupo de trabajo han demostrado que la IPNM requiere la activación de linfocitos T y la interacción con otras células inmunes (Ibarra et al., 2004). Cuando se ha utilizado un agente anti-inflamatorio como MP o un agente inmunosupresor como Ciclosporina A se elimina el efecto de la IPNM (Ibarra et al., 2004). Esto podría estar ocurriendo con las CTM ya que estas no expresan MHC clase II (Le Blanc, Tammik, Rosendahl, Zetterberg, & Ringdén, 2003) o moléculas co-estimuladoras (Tse, Pendleton, Beyer, Egalka, & Guinan, 2003), además, reportes indican que las CTM inhiben la expansión de linfocitos T (Chiossone et al., 2016; Tse et al., 2003). Estudios en un futuro deben llevarse a cabo con más detalle para evaluar si la eliminación de la cicatriz es, de hecho, necesaria o si la IPNM podría llevarse a cabo sin ella e incluso saber el mecanismo exacto de la IPNM más el trasplante de CTM.

Se demostró en este trabajo, que más del 50 % de las ratas tratadas con la remoción de cicatriz + IPNM presentaron una mejora en el puntaje de locomoción igual o superior a 9 en la escala de calificación BBB (Colocación plantar con soporte de peso). Notablemente,

todos los grupos mostraron un puntaje de 6 en la escala BBB antes del tratamiento (60 días después de la LME). Este efecto alentador sólo puede ser el resultado de un proceso regenerativo, ya que después de la terapia algunos animales recuperaron no sólo la capacidad de soportar su peso, sino que recuperaron la capacidad de soportar el peso y dar pasos con apoyo plantar (puntaje BBB de 10). A diferencia del grupo con la sola IPNM y la combinación remoción de cicatriz + IPNM + CTM.

Dado que estos hallazgos sugieren la aparición de un proceso regenerativo como el responsable de generar la mejora motora, se investigó si el microambiente generado en los grupos (remoción de cicatriz + IPNM, solo la IPNM y remoción de cicatriz + IPNM + CTM) fue propicio para inducir este resultado favorable. De esta manera encontramos una cantidad significativa de IL-4, IL-10 y TGF- β , en el grupo de remoción de cicatriz + IPNM, las cuales están fuertemente relacionadas con procesos neuroprotectores y regeneradores. Por ejemplo, IL-4 puede ejercer efectos neuroprotectores regulando las respuestas agudas y crónicas de los macrófagos (Lee et al., 2010). De la misma manera esta citocina promueve el crecimiento, actividad fagocítica y proliferación de células microgliales. IL-4 también, inhibe la producción de óxido nítrico y las citocinas inflamatorias tal como TNF- α y INF- γ (Butovsky et al., 2006; Opal & DePalo, 2000; Vidal, Lemmens, Dooley, & Hendrix, 2013). Por otro lado, IL-4 provee efectos benéficos sobre la restauración neural. Se ha señalado que IL-4 incrementa la ramificación de oligodendrocitos y su maduración a través de la interacción con la microglía (Butovsky et al., 2006). Además, está bien confirmado que esta citocina es capaz de inducir crecimiento axonal en modelos *ex vivo*. La incubación de neuronas con IL-4 promueve aumento de la elongación axonal, en este mismo estudio, se demostró que la recuperación de neuronas lesionadas a través de la activación de receptores

neuronales de IL-4 amplifica la señalización de neurotrofinas vía AKT y MAPK (Walsh et al., 2015). En adición, se demostró que IL-4 aumenta la expresión de IGF-1, una molécula importante que contribuye en la extensión de neuritas (Butovsky et al., 2006), igualmente, es un factor importante para el mantenimiento de tejidos, viabilidad de células supervivientes y crecimiento axonal (Carro, Trejo, Núñez, & Torres-Aleman, 2003). Nuestro trabajo indicó que la IPNM indujo un microambiente favorable de IL-4; por lo tanto, podríamos sugerir sus acciones favorables en el sitio de la lesión. Aparte de esta citocina la modulación de la respuesta autorreactiva con la IPNM, ha inducido un incremento en la secreción de IL-10. Aquí, se encontró que IL-10 aumentó en las fases crónicas cuando se remueve la cicatriz + IPNM. Se ha demostrado en estudios previos que los linfocitos Th2, linfocitos B, microglía (M2), astrocitos y oligodendrocitos la secretan ejerciendo así sus efectos proliferativos e inmunosupresores (Opal & DePalo, 2000). Asimismo, se ha observado que IL-10 trabaja cooperativamente con linfocitos T CD4 +, linfocitos T implicadas en el mantenimiento glial en las proximidades de la lesión (Xin et al., 2011). También, funciona como una citocina bloqueadora de cascadas apoptóticas al aumentar los niveles de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-x que conducen a la disminución de Caspasa-3 en motoneuronas; se ha observado que la liberación de IL-10 en modelos de LME induce la recuperación de las funciones motoras, disminución del dolor y daño al tejido (Shechter et al., 2013).

TGF- β también podría estar contribuyendo en los mecanismos de restauración después de la LME, ya que participa en la regulación de la supervivencia de las neuronas y orquesta los procesos de reparación en el SNC (Krieglstein *et al.*, 2002). TGF- β es una molécula pleiotrópica con funciones clave específicas en la diferenciación celular, proliferación,

migración, metabolismo de la matriz extracelular e inmunosupresión (Dobolyi, Vincze, Pál, & Lovas, 2012; Heupel et al., 2008; Matejuk, Dwyer, Hopke, Vandenbark, & Offner, 2004). Las isoformas de TGF- β se expresan extensamente en células del SNC, tales como neuronas, astrocitos y microglia (Kokaia, Martino, Schwartz, & Lindvall, 2012; Matejuk et al., 2004). Previamente se ha visto que una inyección con TGF- β reduce la activación microglial y aumenta la supervivencia neural; lo que apunta un papel neuroprotector para esta molécula (Prewitt, Niesman, Kane, & Houlé, 1997). TGF- β 1 suprime la proliferación de astrocitos (Lindholm, Castrén, Kiefer, Zafra, & Thoenen, 1992), también está involucrado en la formación de la cicatriz glial. Se ha informado que una isoforma de TGF- β tiene efectos sobre la activación de linfocitos T autorreactivos (Letterio & Roberts, 1998), más tarde, (Matejuk et al., 2004) demostró que TGF- β 3 inhibe la activación de linfocitos T encefalitogénicos. Además, la evidencia sugiere que TGF- β tiene un papel importante en la regulación de la neurogénesis en la etapa adulta (Dobolyi *et al.*, 2012). Incluso, en este trabajo se encontró que la expresión del gen de IL-17 se incrementó significativamente en el grupo de remoción de cicatriz + IPNM. Está claro que IL-17 es una citocina presente en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, pero su patogenicidad está determinada por el perfil de citocinas que fomenten su expresión; la diferenciación de Th17 es inducida por citocinas como IL-1 β , IL-6 e IL-23 (Jäger, Dardalhon, Sobel, Bettelli, & Kuchroo, 2009), por lo que este estudio es inconcluso para sugerir un efecto perjudicial. En contraste, se encontró un incremento de la IL-17 como posible mecanismo de regulación a la respuesta inmunológica tras inmunizar con un péptido que actúa como agonista parcial de la proteína básica de la mielina.

El incremento de IL-4, IL-10 y TGF- β , así como la reducción de TNF- α e INF- γ , contribuyen a la inducción del microambiente permisivo que es favorable para la acción de moléculas restauradoras. Con estos hallazgos y los estudios en nuestro laboratorio ya se ha confirmado que la IPNM promueve una producción *in vitro* e *in vivo* de factores neurotróficos (Cruz et al., 2015; Martiñon et al., 2007). Notablemente, se ha demostrado que la producción de estas moléculas podría durar hasta etapas crónicas de la LME (Martiñon et al., 2016). En este estudio se observó un incremento significativo de genes asociados a la regeneración en el primer experimento, BDNF, IGF-1 y GAP-43 en ratas con remoción de cicatriz + IPNM, en el segundo experimento, solo con la IPNM incremento GAP-43 y finalmente en la estrategia de combinación (remoción de cicatriz + IPNM + CTM) solamente incremento GAP-43 e IGF-1. Este hallazgo podría explicar, al menos en parte, la recuperación motora observada en los grupos sometidos a la remoción de cicatriz + IPNM, solo IPNM y remoción de cicatriz + IPNM +CTM, ya que estos animales presentaron un aumento significativo en la expresión de genes que codifican moléculas que están íntimamente relacionadas con la restauración neural.

BDNF presenta una función relevante en la reparación del tejido neural y la plasticidad en el SNC, tal como neurogénesis, rebrote axonal, mielinización y plasticidad simpática (Harvey et al., 2014; Weishaupt, Blesch, & Fouad, 2012). De hecho, otorga acciones inmediatas que tienen un impacto directo en la transmisión sináptica (Kovalchuk, Holthoff, & Konnerth, 2004). Por otro lado, IGF-1 promueve el rebrote de neuritas en varias poblaciones neurales tanto *in vitro* como *in vivo* (Bondy, 1991). Además, la expresión de ARNm del receptor de IGF-1 promueve la supervivencia de neuronas motoras espinales (Ozdinler & Macklis, 2006) e incrementa la extensión de neuritas en neuronas simpáticas

(Sullivan, Kim, & Feldman, 2008). La microglía y los macrófagos después de la LME incrementan la liberación de BDNF e IGF-1, esto se ha asociado a un aumento en la neurogénesis de células precursoras neurales endógenas. BDNF puede asociarse a la inducción de GAP-43 (Gupta et al., 2009; Wei, Zeng, Chen, Chen, & Gu, 2011), un mediador común del efecto regenerativo de BDNF (Madinier et al., 2009). Interesantemente, GAP-43 es esencial para las funciones neurotróficas de BDNF (Gupta et al., 2009); en modelos de axotomía cervical, la inyección de BDNF estimula la expresión de GAP-43, en consecuencia, induce axogénesis y reparación (Kobayashi et al., 1997). Estos hallazgos pueden explicar el incremento de GAP-43 observado en el grupo de ratas con remoción de cicatriz + IPNM. Simultáneamente, GAP-43 está relacionado en la transducción de señales para el crecimiento y guiado axonal (Frey, Laux, Xu, Schneider, & Caroni, 2000). Asimismo, varios estudios apuntan a un posible papel de GAP-43 en la regulación de la liberación de NT (Benowitz, Goldberg, Madsen, Soni, & Irwin, 1999; Donovan, Mamounas, Andrews, Blue, & McCasland, 2002; Gupta et al., 2009). En resumen, GAP-43 es un marcador útil, y juega un papel importante en la formación de neuritas, regeneración y neuroplasticidad (Wei et al., 2011). En conjunto, todos estos resultados soportan la idea de que BDNF, IGF-1 y GAP-43 contribuyen en la restauración neural.

Para determinar si efectivamente el microambiente permisivo anti-inflamatorio generado por la remoción de cicatriz + IPNM tuvo efecto positivo sobre la regeneración axonal; nosotros evaluamos el porcentaje de fibras inmunorreactivas a 5-HT y TH en la porción caudal al sitio de lesión de las ratas después de la intervención.

Los axones positivos para 5-HT y TH en la ME se derivan de regiones cercanas al tallo cerebral y se distribuyen a lo largo de la ME, estas fibras descienden de neuronas localizadas en el núcleo del Raphe y en el Locus Coeruleus, respectivamente. Después de una LME las porciones distales del axón quedan aisladas de los núcleos neuronales, provocando una degeneración por la falta de factores neurotróficos (Goncalves et al., 2015). Por este motivo, ambas poblaciones son útiles para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la regeneración axonal. La serotonina es una monoamina sintetizada en varias poblaciones neuronales del tronco encefálico, juega un papel importante en la actividad de la columna vertebral modulando la locomoción de vertebrados (Ghosh & Pearce, 2015). Este NT participa en la regulación de poblaciones neuronales en las astas ventrales de la ME (K. Nakajima, Obata, Iriuchijima, & Saito, 2012; Reimer et al., 2013). La TH es una enzima limitante en la producción de las catecolaminas. La dopamina tiene efectos profundos y diversos sobre las redes motoras. Estas acciones son el resultado de una modulación compleja de las propiedades celulares intrínsecas y la conectividad sináptica (Harris-Warrick et al., 1998). Podría sugerirse que el microambiente observado en las ratas tratadas con remoción de cicatriz + IPNM fue asociado al incremento significativo en el número de fibras del segmento caudal de la ME favoreciendo la actividad locomotora. A diferencia, con la combinación (remoción de cicatriz + IPNM +CTM) en la cual no hubo diferencia en estas fibras. Estos hallazgos sustentan la idea de un microambiente permisivo que promueve la formación de nuevas fibras.

Finalmente, este estudio demostró un aumento en la expresión génica de INF- γ en ratas que fueron sometidas únicamente a remoción de cicatriz. Esta observación provee la evidencia del efecto modulador provocado por la IPNM (en el caso de las ratas tratadas con remoción

de cicatriz + IPNM) e incluso enfatiza que después de una mínima lesión (remoción de cicatriz) se genera una respuesta inflamatoria significativa que podría tener un papel relevante en la degeneración del tejido y también en la falta de regeneración funcional. Hay evidencia que demuestra que los estímulos pro-inflamatorios suprimen la producción de factores de crecimiento neurales (Sekiya et al., 2015). Estos hallazgos fueron parcialmente sustentados por nuestros resultados; los animales tratados únicamente con remoción de cicatriz no presentaron un aumento significativo en la expresión génica de BDNF o IGF-1. Sin embargo, la remoción de cicatriz provocó un incremento significativo en la expresión del gen que codifica a GAP-43, a pesar de que ninguno de los animales alcanzó una puntuación de 9 en la escala BBB. Lo anterior demuestra que, de alguna forma, el microambiente inducido por la IPNM es necesario para alcanzar mejores condiciones que promueven una mayor recuperación neurológica.

12 CONCLUSIONES

Conjuntamente, nuestros resultados sugieren que la terapia de combinación que consistió en la remoción de cicatriz + IPNM, incluso la IPNM por sí sola y la remoción de cicatriz + IPNM + CTM podría modificar sustancialmente el microambiente no permisivo que prevalece en la fase crónica de LME; proporcionando la oportunidad de promover una mayor recuperación motora. La remoción de cicatriz + IPNM mostró el mejor efecto benéfico en la respuesta locomotora.

13 PERSPECTIVAS

- Analizar la expresión proteica de moléculas asociadas a la inflamación y la regeneración.
- Analizar el número de CTM, neuronas de nueva formación, células gliales (astrocitos y oligodendrocitos) y células inflamatorias en el epicentro y sitios aledaños al epicentro de la lesión.
- Determinar el número de neuronas de nueva formación en el sitio de lesión en los grupos estudiados. correlacionarlo con las CTM y analizar si hubo diferenciación.

14 ANEXOS

TABLA 1. Secuencia de cebadores PCR-Tiempo Real

Tabla 1. Secuencia de cebadores PCR-Tiempo Real			
Gen	GenBank	Secuencia de cebador	Longitud del producto (bp)
β -ACTINA	NM_007393	F agggccaaccgtgaaaag R gtggtacgaccagaggcatac	110
HPRT	NM_012583.2	F aagcttgctggtgaaaagga R caaagcctaaaagacagcgg	192
TNF- α	MN_012675	F tgacccccattactctgacc R ttcagcgtctcgtgtgttc	152
INF- γ	MN_138880	F agcatggatgctatggaagg R ctgatggcctggtgtcttt	146
IL-1 β	MN_031512	F aggaccaagcaccttcttt R agacagcacgaggcattttt	152
IL-17	MN_001106897	F actttccgggtggagaagat R cttaggggctagcctcaggt	104
IL-4	MN_201270	F gaaaaagggactccatgcac R tcttcaagcacggagggtaca	145
TGFB3	NM_013174.1	F cccaacccccagctccaagcg R cagccactctgcggtggctc	132

IL-10	MN_012854	F aaggaccagctggacaacat R tctcccaggggaattcaaag	170
GAP 43	NM_017195.3	F ctaaggaaagtgcccgacag R gcaggagagacaggggtcag	117
IGF-1	MN_001082477	F cttaggggctagcctcaggt R gttccgatgtttgcaggt	158
BDNF	MN_001270630	F tggcctaacaatgtttgcag R cagctccacttagcctccac	114
NT-3	MN_031073 MN_001270868 MN_001270870	F gggggattgatgacaaacac R gggggattgatgacaaacac	135

II. 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 predomino 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 predomino 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, predomino 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, predomino la alineación paralela de la pata al cuerpo, cola levantada constantemente e inestabilidad del tronco.

21. Igual pero tronco constantemente estable.

ANEXO III TINCIÓN DE MASSON

Se recomienda cortar a 6µm

Soluciones:

Solución de Bouin:

Solución acuosa saturada de ácido pícrico. 750ml

Formalina al 37-40%. 250ml

Ácido acético glacial. 50ml

Hematoxilina ferrita de Weigert:

Solución A

Hematoxilina en cristal. 1g

Alcohol al 96%. 100ml

Solución B

Cloruro férrico acuoso al 29%. 4 ml

Agua destilada 95 ml

Ácido clorhídrico concentrado. 1 ml

Se utilizan en concentraciones 1:1 y se deben de preparar justo para utilizarse y desechar el sobrenadante

Solución de escarlata de Biebrich-Fuchina ácida:

Escarlata de Briebrich acuosa 1% 90 ml

Fuchina ácida acuosa 1%. 10 ml

Ácido acético glacial. 1 ml

Solución de ácido fosfotungstico-fosfomolibdico:

Ácido fosfomolibdico. 5 g

Ácido fosfotungstico 5 g

Agua destilada. 200 ml

Solución de azul de anilina:

Azul de anilina. 1,5g

Ácido acético glacial. 2 ml

Agua destilada. 100 ml

Solución de ácido acético glacial 1%

Ácido acético glacial. 1 ml

Agua destilada. 1000 ml

15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akdemir, O., Uçankale, M., Karaoğlan, A., Barut, S., Sağmanligil, A., Bilguvar, K., ... Colak, A. (2008). Therapeutic efficacy of SJA6017, a calpain inhibitor, in rat spinal cord injury. *Journal of Clinical Neuroscience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 15(10), 1130–6. doi:10.1016/j.jocn.2007.08.011
- Bareyre, F. M., & Schwab, M. E. (2003). Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *Trends in Neurosciences*, 26(10), 555–63. doi:10.1016/j.tins.2003.08.004
- 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. *Experimental Neurology*, 139(2), 244–56. doi:10.1006/exnr.1996.0098
- 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 : A Journal of Neurology*, 133(Pt 2), 433–47. doi:10.1093/brain/awp322
- Benowitz, L. I., Goldberg, D. E., Madsen, J. R., Soni, D., & Irwin, N. (1999). Inosine stimulates extensive axon collateral growth in the rat corticospinal tract after injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(23), 13486–90. doi:10.1073/pnas.96.23.13486
- Berghmans, N., Heremans, H., Li, S., Martens, E., Matthys, P., Sorokin, L., ... Opendakker, G. (2012). Rescue from acute neuroinflammation by pharmacological chemokine-mediated deviation of leukocytes. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 243. doi:10.1186/1742-2094-9-243
- Bethea, J. R., & Dietrich, W. D. (2002). Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. *Current Opinion in Neurology*, 15(3), 355–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045737>
- Bondy, C. a. (1991). Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 11(November), 3442–3455.
- Bradbury, E. J., Moon, L. D. F., Popat, R. J., King, V. R., Bennett, G. S., Patel, P. N., ... McMahon, S. B. (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416(6881), 636–40. doi:10.1038/416636a

- Bravo, G., Ibarra, A., Guizar-Sahagún, G., Rojas, G., & Hong, E. (2007). Indorenate improves motor function in rats with chronic spinal cord injury. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *100*(1), 67–70. doi:10.1111/j.1742-7843.2007.00004.x
- Burnside, E. R., & Bradbury, E. J. (2014). Review: Manipulating the extracellular matrix and its role in brain and spinal cord plasticity and repair. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *40*(1), 26–59. doi:10.1111/nan.12114
- Butovsky, O., Ziv, Y., Schwartz, A., Landa, G., Talpalar, A. E., Pluchino, S., ... Schwartz, M. (2006). Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *31*(1), 149–60. doi:10.1016/j.mcn.2005.10.006
- Buzoianu-Anguiano, V., Orozco-Suárez, S., García-Vences, E., Caballero-Chacón, S., Guizar-Sahagún, G., Chavez-Sanchez, L., & Grijalva, I. (2015). The Morphofunctional Effect of the Transplantation of Bone Marrow Stromal Cells and Predegenerated Peripheral Nerve in Chronic Paraplegic Rat Model via Spinal Cord Transection. *Neural Plasticity*, 2015. doi:10.1155/2015/389520
- C.M., P. (1998). *Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal*.
- Carro, E., Trejo, J. L., Núñez, A., & Torres-Aleman, I. (2003). Brain repair and neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *Molecular Neurobiology*, *27*(2), 153–162. doi:10.1385/MN:27:2:153
- Cassell, O. C., Morrison, W. A., Messina, A., Penington, A. J., Thompson, E. W., Stevens, G. W., ... Knight, K. R. (2001). The influence of extracellular matrix on the generation of vascularized, engineered, transplantable tissue. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *944*, 429–42. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03853.x
- Chen, X., McClurg, A., Zhou, G.-Q., McCaigue, M., Armstrong, M. A., & Li, G. (2007). Chondrogenic Differentiation Alters the Immunosuppressive Property of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, and the Effect Is Partially due to the Upregulated Expression of B7 Molecules. *Stem Cells*, *25*(2), 364–370. doi:10.1634/stemcells.2006-0268
- Chiossone, L., Conte, R., Spaggiari, G. M., Serra, M., Romei, C., Bellora, F., ... Bottino, C. (2016). Mesenchymal Stromal Cells Induce Peculiar Alternatively Activated Macrophages Capable of Dampening Both Innate and Adaptive Immune Responses. *Stem Cells*, *34*, 1909–1921. doi:10.1002/stem.2369
- Chopp, M., Zhang, X. H., Li, Y., Wang, L., Chen, J., Lu, D., ... Rosenblum, M. (2000). Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport*, *11*(13), 3001–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11006983>

- Crigler, L., Robey, R. C., Asawachaicharn, A., Gaupp, D., & Phinney, D. G. (2006). Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Experimental Neurology*, *198*(1), 54–64. doi:10.1016/j.expneurol.2005.10.029
- Crossman, A., N. D. (2007). *Neuroanatomía: Texto y atlas en color*.
- Cruz, Y., Lorea, J., Mestre, H., Kim-Lee, J. H., Herrera, J., Mellado, R., ... Ibarra, A. (2015). Copolymer-1 promotes neurogenesis and improves functional recovery after acute ischemic stroke in rats. *PloS One*, *10*(3), e0121854. doi:10.1371/journal.pone.0121854
- Cuenca-López, MD., Brea, D., Segura, T., Galindo, M., Martínez, D., Agulla, J., Castillo, J., J. J. (2010). La inflamación como agente terapéutico en el infarto cerebral: respuesta inflamatoria celular y mediadores inflamatorios. *Revista de Neurología*, *50*(6), 349–359.
- Davies, J. E., Tang, X., Denning, J. W., Archibald, S. J., & Davies, S. J. a. (2004). Decorin suppresses neurocan, brevican, phosphacan and NG2 expression and promotes axon growth across adult rat spinal cord injuries. *European Journal of Neuroscience*, *19*(5), 1226–1242. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03184.x
- Deans, R. J., & Moseley, A. B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*, *28*(8), 875–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10989188>
- Del Rayo Garrido, M., Silva-García, R., García, E., Martiñón, S., Morales, M., Mestre, H., ... Ibarra, A. (2013). Therapeutic Window for Combination Therapy of A91 Peptide and Glutathione Allows Delayed Treatment After Spinal Cord Injury. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *112*(5), 314–318. doi:10.1111/bcpt.12023
- Devivo, M. J. (2012). Epidemiology of traumatic spinal cord injury: trends and future implications. *Spinal Cord*, *50*(5), 365–72. doi:10.1038/sc.2011.178
- Díaz-Ruiz, A., Ibarra, A., Pérez-Severiano, F., Guízar-Sahagún, G., Grijalva, I., & Ríos, C. (2002). Constitutive and inducible nitric oxide synthase activities after spinal cord contusion in rats. *Neuroscience Letters*, *319*(3), 129–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834310>
- Dietz, V., & Müller, R. (2004). Degradation of neuronal function following a spinal cord injury: mechanisms and countermeasures. *Brain : A Journal of Neurology*, *127*, 2221–2231. doi:10.1093/brain/awh255
- DiProspero, N. A., Meiners, S., & Geller, H. M. (1997). Inflammatory cytokines interact to modulate extracellular matrix and astrocytic support of neurite outgrowth. *Experimental Neurology*, *148*(2), 628–39. doi:10.1006/exnr.1997.6700

- Dobolyi, A., Vincze, C., Pál, G., & Lovas, G. (2012). The neuroprotective functions of transforming growth factor beta proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8219–8258. doi:10.3390/ijms13078219
- Donovan, S. L., Mamounas, L. A., Andrews, A. M., Blue, M. E., & McCasland, J. S. (2002). GAP-43 is critical for normal development of the serotonergic innervation in forebrain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(9), 3543–3552. doi:20026295
- Dringen, R., Gutterer, J. M., & Hirrlinger, J. (2000). Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *European Journal of Biochemistry*, 267(16), 4912–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931173>
- Dumont, R. J., Okonkwo, D. O., Verma, S., Hurlbert, R. J., Boulos, P. T., Ellegala, D. B., & Dumont, a S. (2001). Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clinical Neuropharmacology*, 24(5), 254–64. doi:10.1097/00002826-200109000-00002
- Elaine. Marieb. (2008). *Anatomía Y Fisiología Humana*.
- Emery, E., Aldana, P., Bunge, M. B., Puckett, W., Srinivasan, A., Keane, R. W., ... Levi, a D. (1998). Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*, 89(6), 911–920. doi:10.3171/jns.1998.89.6.0911
- Emmetsberger, J., & Tsirka, S. E. (2012). Microglial inhibitory factor (MIF/TKP) mitigates secondary damage following spinal cord injury. *Neurobiology of Disease*, 47(3), 295–309. doi:10.1016/j.nbd.2012.05.001
- Eng, L. F., & Ghirnikar, R. S. (1994). GFAP and astrogliosis. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 4(3), 229–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7952264>
- Estrada, V., Brazda, N., Schmitz, C., Heller, S., Blazyca, H., Martini, R., & Müller, H. W. (2014). Long-lasting significant functional improvement in chronic severe spinal cord injury following scar resection and polyethylene glycol implantation. *Neurobiology of Disease*, 67, 165–179. doi:10.1016/j.nbd.2014.03.018
- Estrada-Mondaca, S., Carreón-Rodríguez, A., Parra-Cid, M. D. C., Ibarra-Ponce De León, C., Velasquillo-Martínez, C., Vacanti, C. A., & Belkind-Gerson, J. (2007). Lesión de médula espinal y medicina regenerativa. *Salud Publica de Mexico*. doi:10.1590/S0036-36342007000600011
- Faulkner, J. R., Herrmann, J. E., Woo, M. J., Tansey, K. E., Doan, N. B., & Sofroniew, M. V. (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord

- injury. *Journal of Neuroscience*, 24(9), 2143–2155. doi:10.1523/jneurosci.3547-03.2004
- Fehlings, M. G., & Nguyen, D. H. (2010). Immunoglobulin G: A potential treatment to attenuate neuroinflammation following spinal cord injury. *Journal of Clinical Immunology*. doi:10.1007/s10875-010-9404-7
- Fehlings, M. G., Tator, C. H., & Linden, R. D. (1989). The relationships among the severity of spinal cord injury, motor and somatosensory evoked potentials and spinal cord blood flow. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 74(4), 241–259. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2471626>
- Fitch, M. T., & Silver, J. (2008). CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Experimental Neurology*. doi:10.1016/j.expneurol.2007.05.014
- Fitzgerald, M. J. T. (2012). *NEUROANATOMIA CLINICA Y NEUROCIENCIA*.
- Frank, M. G., Baratta, M. V., Sprunger, D. B., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2007). Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(1), 47–59. doi:10.1016/j.bbi.2006.03.005
- Frey, D., Laux, T., Xu, L., Schneider, C., & Caroni, P. (2000). Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. *Journal of Cell Biology*, 149(7), 1443–1453. doi:10.1083/jcb.149.7.1443
- Gabuzda, D., & Wang, J. (1999). Chemokine receptors and virus entry in the central nervous system. *J Neurovirol*, 5, 643–658. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10602405>
- Gallo, V., & Deneen, B. (2014). Glial development: The crossroads of regeneration and repair in the CNS. *Neuron*. doi:10.1016/j.neuron.2014.06.010
- 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. *Journal of Neuroscience Research*, 90(3), 656–663. doi:10.1002/jnr.22771
- Gaur, A., Boehme, S. A., Chalmers, D., Crowe, P. D., Pahuja, A., Ling, N., ... Conlon, P. J. (1997). Amelioration of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with altered myelin basic protein peptides involves different cellular mechanisms. *Journal of Neuroimmunology*, 74(1-2), 149–158. doi:10.1016/S0165-5728(96)00220-2

- Genain C.P., Z. S. . (2000). Specific immunotherapy: one size does not fit all. *Nat Med.*, 6, 1176–1182.
- Ghosh, M., & Pearse, D. D. (2015). The role of the serotonergic system in locomotor recovery after spinal cord injury. *Frontiers in Neural Circuits*, 8, 151. doi:10.3389/fncir.2014.00151
- Gimsa, U., Mitchison, N. A., & Brunner-Weinzierl, M. C. (2013). Immune privilege as an intrinsic CNS property: Astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation. *Mediators of Inflammation*. doi:10.1155/2013/320519
- Goldshmit, Y., Frisca, F., Pinto, A. R., Pébay, A., Tang, J. K. K. Y., Siegel, A. L., ... Currie, P. D. (2014). Fgf2 improves functional recovery-decreasing gliosis and increasing radial glia and neural progenitor cells after spinal cord injury. *Brain and Behavior*, 4(2), 187–200. doi:10.1002/brb3.172
- Goncalves, M. B., Malmqvist, T., Clarke, E., Hubens, C. J., Grist, J., Hobbs, C., ... Corcoran, J. P. T. (2015). Neuronal RAR β Signaling Modulates PTEN Activity Directly in Neurons and via Exosome Transfer in Astrocytes to Prevent Glial Scar Formation and Induce Spinal Cord Regeneration. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(47), 15731–45. doi:10.1523/JNEUROSCI.1339-15.2015
- Goodkin, R., & Campbell, J. B. (1969). Sequential pathologic changes in spinal cord injury: a preliminary report. *Surgical Forum*, 20, 430–2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5383108>
- Görnitz, C., Dias, D. O., Tomilin, N., Barbacid, M., Shupliakov, O., & Frisé, J. (2011). A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6039), 238–242. doi:10.1126/science.1203165
- Guimaraes, J. S., Freire, M. A., Lima, R. R., Souza-Rodrigues, R. D., Costa, A. M., dos Santos, C. D., ... Gomes-Leal, W. (2009). Mechanisms of secondary degeneration in the central nervous system during acute neural disorders and white matter damage. *Rev Neurol*, 48(6), 304–310. doi:rn2008512 [pii]
- Guizar-Sahagun, G., Grijalva, I., Madrazo, I., Franco-Bourland, R., Salgado, H., Ibarra, A., ... Zepeda, A. (1994). Development of post-traumatic cysts in the spinal cord of rats subjected to severe spinal cord contusion. *Surgical Neurology*, 41(3), 241–249. doi:10.1016/0090-3019(94)90131-7
- Gupta, S. K., Mishra, R., Kusum, S., Spedding, M., Meiri, K. F., Gressens, P., & Mani, S. (2009). GAP-43 is essential for the neurotrophic effects of BDNF and positive AMPA receptor modulator S18986. *Cell Death and Differentiation*, 16(4), 624–37. doi:10.1038/cdd.2008.188

- Haan, N., Zhu, B., Wang, J., Wei, X., & Song, B. (2015). Crosstalk between macrophages and astrocytes affects proliferation, reactive phenotype and inflammatory response, suggesting a role during reactive gliosis following spinal cord injury. *Journal of Neuroinflammation*, *12*(1), 109. doi:10.1186/s12974-015-0327-3
- Halassa, M. M., & Haydon, P. G. (2010). Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annual Review of Physiology*, *72*(2), 335–55. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135843
- Hall, E. D., McCall, J. M., Chase, R. L., Yonkers, P. A., & Braughler, J. M. (1987). A nonglucocorticoid steroid analog of methylprednisolone duplicates its high-dose pharmacology in models of central nervous system trauma and neuronal membrane damage. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, *242*(1), 137–142.
- Harris-Warrick, R. M., Johnson, B. R., Peck, J. H., Kloppenburg, P., Ayali, A., & Skarbinski, J. (1998). Distributed effects of dopamine modulation in the crustacean pyloric network. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 860, pp. 155–167). doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09046.x
- Harvey, A. R., Lovett, S. J., Majda, B. T., Yoon, J. H., Wheeler, L. P. G., & Hodgetts, S. I. (2014). Neurotrophic factors for spinal cord repair: Which, where, how and when to apply, and for what period of time? *Brain Research*, 1–36. doi:10.1016/j.brainres.2014.10.049
- Hauben, E., Butovsky, O., Nevo, U., Yoles, E., Moalem, G., Agranov, E., ... Schwartz, M. (2000). Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(17), 6421–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10964948>
- Hauben, E., Nevo, U., Yoles, E., Moalem, G., Agranov, E., Mor, F., ... Schwartz, M. (2000). Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury. *Lancet*, *355*(9200), 286–287. doi:10.1016/S0140-6736(99)05140-5
- Hawryluk, G. W. J., Mothe, A., Wang, J., Wang, S., Tator, C., & Fehlings, M. G. (2012). An in vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury. *Stem Cells and Development*, *21*(12), 2222–38. doi:10.1089/scd.2011.0596
- Heupel, K., Sargsyan, V., Plomp, J. J., Rickmann, M., Varoqueaux, F., Zhang, W., & Kriegstein, K. (2008). Loss of transforming growth factor-beta 2 leads to impairment of central synapse function. *Neural Development*, *3*, 25. doi:10.1186/1749-8104-3-25
- Hofstetter, C. P., Schwarz, E. J., Hess, D., Widenfalk, J., El Manira, A., Prockop, D. J., & Olson, L. (2002). Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord

- and promote recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 2199–2204. doi:10.1073/pnas.042678299
- Houle, J. D., & Tessler, A. (2003). Repair of chronic spinal cord injury. *Experimental Neurology*. doi:10.1016/S0014-4886(03)00029-3
- Huang, Y., Chang, C., Zhang, J., & Gao, X. (2012). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells increase dopamine synthesis in the injured striatum. *Neural Regeneration Research*, 7(34), 2653–62. doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2012.34.002
- Ibarra, A., Avendaño, H., & Cruz, Y. (2007). Copolymer-1 (Cop-1) improves neurological recovery after middle cerebral artery occlusion in rats. *Neuroscience Letters*, 425(2), 110–3. doi:10.1016/j.neulet.2007.08.038
- Ibarra, A., García, E., Flores, N., Martiñón, S., Reyes, R., Campos, M. G., ... Mestre, H. (2010). Immunization with neural-derived antigens inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury. *Neuroscience Letters*, 476(2), 62–65. doi:10.1016/j.neulet.2010.04.003
- 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. *European Journal of Neuroscience*, 19(11), 2984–2990. doi:10.1111/j.0953-816X.2004.03402.x
- Ikeda, H., Wu, G. Y., & Wu, C. H. (1992). Evidence that an iron chelator regulates collagen synthesis by decreasing the stability of procollagen mRNA. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 15(2), 282–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1735531>
- Jäger, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E., & Kuchroo, V. K. (2009). Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(11), 7169–77. doi:10.4049/jimmunol.0901906
- Janzer, R. C., & Raff, M. C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325(6101), 253–7. doi:10.1038/325253a0
- Jefferson, S. C., Tester, N. J., & Howland, D. R. (2011). Chondroitinase ABC promotes recovery of adaptive limb movements and enhances axonal growth caudal to a spinal hemisection. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(15), 5710–5720. doi:10.1523/JNEUROSCI.4459-10.2011
- Jin X, Yamashita T (2016). Microglia in central nervous system repair after injury. *The Journal of Biochemistry*. 159(5):491-6. doi: 10.1093/jb/mvw009. Epub 2016 Feb 8.

- Karin N., Mitchell D.J., Brocke S., Ling N., S. 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.
- Kawano, H., Li, H. P., Sango, K., Kawamura, K., & Raisman, G. (2005). Inhibition of collagen synthesis overrides the age-related failure of regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons. *Journal of Neuroscience Research*, 80(2), 191–202. doi:10.1002/jnr.20441
- Kiernan. (2009). *El sistema nervioso humano: Una perspectiva anatómica*.
- Klapka, N., Hermanns, S., Straten, G., Masanneck, C., Duis, S., Hamers, F. P. T., ... Müller, H. W. (2005). Suppression of fibrous scarring in spinal cord injury of rat promotes long-distance regeneration of corticospinal tract axons, rescue of primary motoneurons in somatosensory cortex and significant functional recovery. *European Journal of Neuroscience*, 22(12), 3047–3058. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04495.x
- Klapka, N., & Müller, H. W. (2006). Collagen matrix in spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 23(3-4), 422–435. doi:10.1089/neu.2006.23.422
- Kobayashi, N. R., Fan, D. P., Giehl, K. M., Bedard, A. M., Wiegand, S. J., & Tetzlaff, W. (1997). BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and Talpha1-tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(24), 9583–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9391013>
- Kohta, M., Kohmura, E., & Yamashita, T. (2009). Inhibition of TGF- β 1 promotes functional recovery after spinal cord injury. *Neuroscience Research*, 65(4), 393–401. doi:10.1016/j.neures.2009.08.017
- Kokaia, Z., Martino, G., Schwartz, M., & Lindvall, O. (2012). Cross-talk between neural stem cells and immune cells: the key to better brain repair? *Nature Neuroscience*, 15(8), 1078–1087. doi:10.1038/nn.3163
- Koning, J. J., Kooij, G., de Vries, H. E., Nolte, M. a., & Mebius, R. E. (2013). Mesenchymal stem cells are mobilized from the bone marrow during inflammation. *Frontiers in Immunology*, 4(MAR), 1–11. doi:10.3389/fimmu.2013.00049
- Kovalchuk, Y., Holthoff, K., & Konnerth, A. (2004). Neurotrophin action on a rapid timescale. *Current Opinion in Neurobiology*. doi:10.1016/j.conb.2004.08.014
- Krabbe, & Zimmer, M. (2005). Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells - a critical review. *APMIS*, 113(11-12), 831–844. doi:10.1111/j.1600-0463.2005.apm_3061.x

- Kunis, G., Baruch, K., Rosenzweig, N., Kertser, A., Miller, O., Berkutzki, T., & Schwartz, M. (2013). IFN- γ -dependent activation of the brain's choroid plexus for CNS immune surveillance and repair. *Brain*, *136*(11), 3427–3440. doi:10.1093/brain/awt259
- Lanza, C., Morando, S., Voci, A., Canesi, L., Principato, M. C., Serpero, L. D., ... Vergani, L. (2009). Neuroprotective mesenchymal stem cells are endowed with a potent antioxidant effect in vivo. *Journal of Neurochemistry*, *110*(5), 1674–1684. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06268.x
- Latarjet. (2005). *Anatomía Humana*.
- Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., & Ringdén, O. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, *31*(10), 890–896. doi:10.1016/S0301-472X(03)00110-3
- Lee, J., & Thumbikat, P. (2015). Pathophysiology, presentation and management of spinal cord injury. *Surgery (Oxford)*, *33*(6), 238–247. doi:10.1016/j.mpsur.2015.04.003
- Lee, J. Y., Chung, H., Yoo, Y. S., Oh, Y. J., Oh, T. H., Park, S., & Yune, T. Y. (2010). Inhibition of apoptotic cell death by ghrelin improves functional recovery after spinal cord injury. *Endocrinology*, *151*(8), 3815–3826. doi:10.1210/en.2009-1416
- Letterio, J. J., & Roberts, a B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review of Immunology*, *16*(1), 137–161. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.137
- Li, Y., & Zhao, Q. (2008). [The effects of fibrin glue on acute complete transection spinal cord injury]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi = Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi = Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, *22*(7), 828–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18681284>
- Lindholm, D., Castrén, E., Kiefer, R., Zafra, F., & Thoenen, H. (1992). Transforming growth factor- β 1 in the rat brain: Increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *Journal of Cell Biology*, *117*(2), 395–400. doi:10.1083/jcb.117.2.395
- Liu, J., Chen, Q., Zhang, Z., Zheng, Y., Sun, X., Cao, X., ... Jiang, P. (2013). Fibrin scaffolds containing ectomesenchymal stem cells enhance behavioral and histological improvement in a rat model of spinal cord injury. *Cells Tissues Organs*, *198*(1), 35–46. doi:10.1159/000351665
- Lou, J., 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*(10), 683–90. doi:10.1038/sj.sc.3100632

- Lu, P., Jones, L. L., & Tuszynski, M. H. (2007). Axon regeneration through scars and into sites of chronic spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 203(1), 8–21. doi:10.1016/j.expneurol.2006.07.030
- Lu, S., Lu, C., Han, Q., Li, J., Du, Z., Liao, L., & Zhao, R. C. (2011). Adipose-derived mesenchymal stem cells protect PC12 cells from glutamate excitotoxicity-induced apoptosis by upregulation of XIAP through PI3-K/Akt activation. *Toxicology*, 279(1-3), 189–195. doi:10.1016/j.tox.2010.10.011
- Madinier, A., Bertrand, N., Mossiat, C., Prigent-Tessier, A., Beley, A., Marie, C., & Garnier, P. (2009). Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats. *PLoS One*, 4(12), e8101. doi:10.1371/journal.pone.0008101
- Mansilla-Olivares. (2004). El calcio, átomo detonante de la vida y la función celular. *Cir Ciruj*, 72, 139–151.
- Martiñón, S., García, E., Flores, N., Gonzalez, I., Ortega, T., Buenrostro, M., ... Ibarra, a. (2007). Vaccination with a neural-derived peptide plus administration of glutathione improves the performance of paraplegic rats. *European Journal of Neuroscience*, 26(2), 403–412. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05650.x
- Martiñón, S., García, E., Gutierrez-Ospina, G., Mestre, H., & Ibarra, A. (2012). Development of protective autoimmunity by immunization with a neural-derived peptide is ineffective in severe spinal cord injury. *PLoS ONE*, 7(2), 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0032027
- Martiñón, S., García-Vences, E., Toscano-Tejeida, D., Flores-Romero, A., Rodriguez-Barrera, R., Ferrusquia, M., ... Schwab, M. (2016). Long-term production of BDNF and NT-3 induced by A91-immunization after spinal cord injury. *BMC Neuroscience*, 17(1), 42. doi:10.1186/s12868-016-0267-6
- Martiñón, S., & Ibarra, A. (2008). Pharmacological neuroprotective therapy for acute spinal cord injury: state of the art. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(3), 222–30.
- Mata, A., Kim, E. J., Boehm, C. A., Fleischman, A. J., Muschler, G. F., & Roy, S. (2009). A three-dimensional scaffold with precise micro-architecture and surface micro-textures. *Biomaterials*, 30(27), 4610–4617. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.05.023
- Matejuk, A., Dwyer, J., Hopke, C., Vandenbark, A. a., & Offner, H. (2004). Opposing roles for TGF- β 1 and TGF- β 3 isoforms in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cytokine*, 25(2), 45–51. doi:10.1016/j.cyto.2003.09.007
- Mitragotri, S., & Lahann, J. (2009). Physical approaches to biomaterial design. *Nature Materials*, 8(1), 15–23. doi:10.1038/nmat2344

- Mucke, L., & Eddleston, M. (1993). Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7, 1226–1232.
- Nakajima K, Tohyama Y, Kohsaka S, Kurihara T (2001) Ability of rat microglia to uptake extracellular glutamate. *Neuroscience Letter* 307:171-174.
- Nakajima, H., Uchida, K., Guerrero, A. R., Watanabe, S., Sugita, D., Takeura, N., ... Baba, H. (2012). Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Promotes an Alternative Pathway of Macrophage Activation and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*, 29(8), 1614–1625. doi:10.1089/neu.2011.2109
- Nakajima, K., Obata, H., Iriuchijima, N., & Saito, S. (2012). An increase in spinal cord noradrenaline is a major contributor to the antihyperalgesic effect of antidepressants after peripheral nerve injury in the rat. *Pain*, 153(5), 990–997. doi:10.1016/j.pain.2012.01.029
- Newman S.W., Gilman S., W. J. (2003). *euroanatomía y Neurofisiología clínicas de Manter y Gatz. Editorial Manual Moderno.*
- Niclou, S. P., Ehlert, E. M. E., & Verhaagen, J. (2006). Chemorepellent axon guidance molecules in spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 23(3-4), 409–421. doi:10.1089/neu.2006.23.409
- Oliveri, R. S., Bello, S., & Biering-Sørensen, F. (2014). Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: Systematic review with meta-analyses of rat models. *Neurobiology of Disease*, 62, 338–353. doi:10.1016/j.nbd.2013.10.014
- Opal, S. M., & DePalo, V. A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117(4), 1162–1172. doi:10.1378/chest.117.4.1162
- Ota, Y., Zanetti, A. T., & Hallock, R. M. (2013). The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation. *Neural Plast*, 2013, 185463. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24369508
- Oyinbo, C. A. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: A nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. doi:7128 [pii]
- Ozdinler, P. H., & Macklis, J. D. (2006). IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nature Neuroscience*, 9(11), 1371–1381. doi:10.1038/nn1789

- Park, H. J., Shin, J. Y., Kim, H. N., Oh, S. H., Song, S. K., & Lee, P. H. (2015). Mesenchymal stem cells stabilize the blood-brain barrier through regulation of astrocytes. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 187. doi:10.1186/s13287-015-0180-4
- Patt, H. M., & Maloney, M. A. (1975). Bone marrow regeneration after local injury: a review. *Experimental Hematology*, 3(2), 135–148.
- Pelayo R, Santa-Olalla J, V. I. (2013). *Células troncales y medicina regenerativa*.
- Pfriefer, F. W., & Ungerer, N. (2011). Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Progress in Lipid Research*. doi:10.1016/j.plipres.2011.06.002
- Pocock. (2006). *Fisiología humana. La base de la medicina*.
- Popovich, P. G., Yu, J. Y., & Whitacre, C. C. (1997). Spinal cord neuropathology in rat experimental autoimmune encephalomyelitis: modulation by oral administration of myelin basic protein. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 56(12), 1323–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9413281>
- Prang, P., Müller, R., Eljaouhari, A., Heckmann, K., Kunz, W., Weber, T., ... Weidner, N. (2006). The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. *Biomaterials*, 27(19), 3560–3569. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.053
- Preston, M., & Sherman, L. S. (2011). Neural stem cell niches: roles for the hyaluronan-based extracellular matrix. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 3, 1165–79. doi:10.2741/218
- Prewitt, C. M., Niesman, I. R., Kane, C. J., & Houlié, J. D. (1997). Activated macrophage/microglial cells can promote the regeneration of sensory axons into the injured spinal cord. *Experimental Neurology*, 148(2), 433–443. doi:10.1006/exnr.1997.6694
- Puelles-Lopez., Martinez-Perez., M. de la T. (2008). *Neuroanatomía*.
- Quertainmont, R., Cantinieaux, D., Botman, O., Sid, S., Schoenen, J., & Franzen, R. (2012). Mesenchymal stem cell graft improves recovery after spinal cord injury in adult rats through neurotrophic and pro-angiogenic actions. *PLoS ONE*, 7(6). doi:10.1371/journal.pone.0039500
- Raposo, C., & Schwartz, M. (2014). Glial scar and immune cell involvement in tissue remodeling and repair following acute CNS injuries. *Glia*, 1895–1904. doi:10.1002/glia.22676

- Rasouli, A., Bhatia, N., Dinh, P., Cahill, K., Suryadevara, S., & Gupta, R. (2009). Resection of glial scar following spinal cord injury. *Journal of Orthopaedic Research*, 27(7), 931–936. doi:10.1002/jor.20793
- Reimer, M. M., Norris, A., Ohnmacht, J., Patani, R., Zhong, Z., Dias, T. B., ... Becker, C. (2013). Dopamine from the Brain Promotes Spinal Motor Neuron Generation during Development and Adult Regeneration. *Developmental Cell*, 25(5), 478–491. doi:10.1016/j.devcel.2013.04.012
- Rodríguez-Barrera, R., Fernández-Presas, A. M., García, E., Flores-Romero, A., Martiñón, S., González-Puertos, V. Y., ... Ibarra, A. (2013). Immunization with a neural-derived peptide protects the spinal cord from apoptosis after traumatic injury. *BioMed Research International*, 2013, 827517. doi:10.1155/2013/827517
- Rodríguez-Barrera, R., Flores-Romero, A., Fernández-Presas, A. M., García-Vences, E., Silva-García, R., Konigsberg, M., ... Ibarra, A. (2017). Immunization with neural derived peptides plus scar removal induces a permissive microenvironment, and improves locomotor recovery after chronic spinal cord injury. *BMC Neuroscience*, 18(1), 7. doi:10.1186/s12868-016-0331-2
- Rolls, A., Shechter, R., & Schwartz, M. (2009). The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(3), 235–241. doi:10.1038/nrn2591
- Rossignol, S., Schwab, M., Schwartz, M., & Fehlings, M. G. (2007). Spinal cord injury: time to move? *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(44), 11782–92. doi:10.1523/JNEUROSCI.3444-07.2007
- Rowland, J. W., Hawryluk, G. W. J., Kwon, B., & Fehlings, M. G. (2008). Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurgical Focus*, 25(5), E2. doi:10.3171/FOC.2008.25.11.E2
- Scheiber, I. F., & Dringen, R. (2013). Astrocyte functions in the copper homeostasis of the brain. *Neurochemistry International*, 62(5), 556–565. doi:10.1016/j.neuint.2012.08.017
- Schiwy, N., Brazda, N., & Müller, H. W. (2009). Enhanced regenerative axon growth of multiple fibre populations in traumatic spinal cord injury following scar-suppressing treatment. *European Journal of Neuroscience*, 30(8), 1544–1553. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06929.x
- Schwab, M. E., & Bartholdi, D. (1996). Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiological Reviews*, 76(2), 319–370. doi:10.1006/exnr.2001.7734

- Schwartz, M., Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., & Cohen, I. R. (1999). Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends in Neurosciences*, 22(7), 295–9.
- Schwartz, M., & Shechter, R. (2010). Protective autoimmunity functions by intracranial immunosurveillance to support the mind: The missing link between health and disease. *Molecular Psychiatry*, 15(4), 342–54. doi:10.1038/mp.2010.31
- Sekiya, T., Holley, M. C., Hashido, K., Ono, K., Shimomura, K., Horie, R. T., ... Ito, J. (2015). Cells transplanted onto the surface of the glial scar reveal hidden potential for functional neural regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(26), E3431–E3440. doi:10.1073/pnas.1501835112
- Shaked, I., Tchoresh, D., Gersner, R., Meiri, G., Mordechai, S., Xiao, X., ... Schwartz, M. (2005). Protective autoimmunity: Interferon- γ enables microglia to remove glutamate without evoking inflammatory mediators. *Journal of Neurochemistry*, 92(5), 997–1009. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02954.x
- Shastri, A., Bonifati, D. M., & Kishore, U. (2013). Innate immunity and neuroinflammation. *Mediators of Inflammation*. doi:10.1155/2013/342931
- Shechter, R., London, A., & Schwartz, M. (2013). Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nat Rev Immunol*, 13(3), 206–218. doi:10.1038/nri3391
- Shechter, R., London, A., Varol, C., Raposo, C., Cusimano, M., Yovel, G., ... Schwartz, M. (2009). Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Medicine*, 6(7). doi:10.1371/journal.pmed.1000113
- Shechter, R., Miller, O., Yovel, G., Rosenzweig, N., London, A., Ruckh, J., ... Schwartz, M. (2013). Recruitment of Beneficial M2 Macrophages to Injured Spinal Cord Is Orchestrated by Remote Brain Choroid Plexus. *Immunity*, 38(3), 555–569. doi:10.1016/j.immuni.2013.02.012
- Shrestha, R., Millington, O., Brewer, J., & Bushell, T. (2013). Is central nervous system an immune-privileged site? *Kathmandu University Medical Journal*, 11(41), 102–107.
- Snell. (2010). *Neuroanatomía clínica*.
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
- Sullivan, K. A., Kim, B., & Feldman, E. L. (2008). Insulin-like growth factors in the peripheral nervous system. *Endocrinology*, 149(12), 5963–5971. doi:en.2008-1020 [pii]n10.1210/en.2008-1020

- Suzuki, A., Stern, S. A., Bozdagi, O., Huntley, G. W., Walker, R. H., Magistretti, P. J., & Alberini, C. M. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, *144*(5), 810–823. doi:10.1016/j.cell.2011.02.018
- Teixeira, F. G., Carvalho, M. M., Sousa, N., & Salgado, A. J. (2013). Mesenchymal stem cells secretome: A new paradigm for central nervous system regeneration? *Cellular and Molecular Life Sciences*. doi:10.1007/s00018-013-1290-8
- Tse, W. T., Pendleton, J. D., Beyer, W. M., Egalka, M. C., & Guinan, E. C. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, *75*(3), 389–397. doi:10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9 [doi]
- Uccelli, A. (2013). Mesenchymal stem cells exert a remarkable regenerative effect requiring minimal CNS integration. *Experimental Neurology*, *247*, 292–295. doi:10.1016/j.expneurol.2013.01.028
- Vidal, P. M., Lemmens, E., Dooley, D., & Hendrix, S. (2013). The role of “ anti-inflammatory” cytokines in axon regeneration. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. doi:10.1016/j.cytogfr.2012.08.008
- Voulgari-Kokota, A., Fairless, R., Karamita, M., Kyrargyri, V., Tseveleki, V., Evangelidou, M., ... Probert, L. (2012). Mesenchymal stem cells protect CNS neurons against glutamate excitotoxicity by inhibiting glutamate receptor expression and function. *Experimental Neurology*, *236*(1), 161–170. doi:10.1016/j.expneurol.2012.04.011
- Walsh, J. T., Hendrix, S., Boato, F., Smirnov, I., Zheng, J., Lukens, J. R., ... Kipnis, J. (2015). MHCII-independent CD4+ T cells protect injured CNS neurons via IL-4. *The Journal of Clinical Investigation*, *125*(2), 699–714. doi:10.1172/JCI76210
- Wang, X. (2013). *Overview on biocompatibilities of implantable biomaterials*. In: Rosario Pignatello. *Advances in biomaterials science and biomedical applications*. INTECH.
- Wei, H. F., Zeng, B. F., Chen, Y. F., Chen, L., & Gu, Y. D. (2011). BDNF and GAP43 contribute to dynamic transhemispheric functional reorganization in rat brain after contralateral C7 root transfer following brachial plexus avulsion injuries. *Neuroscience Letters*, *500*(3), 187–191. doi:10.1016/j.neulet.2011.06.029
- Weishaupt, N., Blesch, a., & Fouad, K. (2012). BDNF: The career of a multifaceted neurotrophin in spinal cord injury. *Experimental Neurology*, *238*(2), 254–264. doi:10.1016/j.expneurol.2012.09.001
- Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., & Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research*, *61*(4), 364–370. doi:10.1002/1097-4547(20000815)61:4<364::aid-jnr2>3.0.co;2-c

- Wright, K. T., Masri, W. El, Osman, A., Chowdhury, J., & Johnson, W. E. B. (2011). Concise Review: Bone Marrow for the Treatment of Spinal Cord Injury: Mechanisms and Clinical Applications. *STEM CELLS*, 29(2), 169–178. doi:10.1002/stem.570
- Xin, J., Wainwright, D. A., Mesnard, N. A., Serpe, C. J., Sanders, V. M., & Jones, K. J. (2011). IL-10 within the CNS is necessary for CD4+ T cells to mediate neuroprotection. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(5), 820–829. doi:10.1016/j.bbi.2010.08.004
- Yoshioka, N., Kimura-Kuroda, J., Saito, T., Kawamura, K., Hisanaga, S. I., & Kawano, H. (2011). Small molecule inhibitor of type I transforming growth factor- β receptor kinase ameliorates the inhibitory milieu in injured brain and promotes regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons. *Journal of Neuroscience Research*, 89(3), 381–393. doi:10.1002/jnr.22552
- Zhang, S., Kluge, B., Huang, F., Nordstrom, T., Doolen, S., Gross, M., ... Holmberg, E. G. (2007). Photochemical scar ablation in chronically contused spinal cord of rat. *Journal of Neurotrauma*, 24(2), 411–420. doi:10.1089/neu.2006.0065
- Zhou, C., Zhang, C., Chi, S., Xu, Y., Teng, J., Wang, H., ... Zhao, R. (2009). Effects of human marrow stromal cells on activation of microglial cells and production of inflammatory factors induced by lipopolysaccharide. *Brain Research*, 1269, 23–30. doi:10.1016/j.brainres.2009.02.049