



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Análisis de la presencia de factores de crecimiento y  
proliferación de células madre en ratas enucleadas y no  
enucleadas sometidas a lesión medular**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I O L O G A**

**P R E S E N T A:**

**ITZEL SÁNCHEZ GALDOZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Microb. Ind. Ana Cecilia Rivas Caicedo  
2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Análisis en la presencia de factores de crecimiento y proliferación de células madre en ratas enucleadas y no enucleadas sometidas a lesión medular**

realizado por **Sánchez Galdoz Itzel** con número de cuenta **3-0010723-2** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Luis Felipe Jiménez García

Propietario Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

Propietario Microb. Ind. Ana Cecilia Rivas Caicedo  
Tutora

Suplente Dr. José Juan Antonio Ibarra Arias

Suplente M. en C. Julio Alejandro Prieto Sagredo

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, D. F., a 01 de diciembre de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

## **Agradecimientos**

A la UNAM, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Investigaciones Biomédicas por brindarme un espacio para mi formación académica.

Al Dr. Gabriel Gutierrez por facilitarme el apoyo necesario para la realización de mi tesis. A Anix, lalo y Mi-hell por su paciencia, apoyo e interés durante mi estancia en el laboratorio. A kele y a la chapis por los años de comadreo.

A mi familia y amigos por estar ahí siempre conmigo en las buenas y en las malas. Por decir siempre lo necesario en el momento preciso y por aparecer y reaparecer justo cuando más se les necesita, por las alegrías, las risas, y por los regaños también cómo no!!!.

".....El río corría hacia su meta. Siddharta observaba ese río formado por él, por los suyos, por todas las personas que había visto. Todas las corrientes de agua se deslizaban con prisa, sufriendo, hacia sus fines, y en cada meta se encontraban con otra, y llegaban a todos sus objetivos, y siempre seguía otro más; y el agua se convertía en vapor, subía al cielo, se transformaba en lluvia, se precipitaba desde el cielo, se convertía en fuente, en torrente, en río, y de nuevo se deslizaba corriendo hacia su próximo fin."

Herman Hesse, Siddharta, OM, Capítulo XI.

## Tabla de contenidos

- 1.- Resumen
- 2.- Introducción
- 3.- Antecedentes
  - 3.1.- Sistema Inmune
  - 3.2.- Sistema Nervioso Central
  - 3.3.- Neurotrofinas y GAP-43
  - 3.4.- Sistema Inmune y Daño medular
  - 3.5.- Sistema inmune y regeneración medular
- 4.- Objetivos
- 5.- Materiales y Método
- 6.- Resultados
- 7.- Discusión
- 8.- Conclusiones
- 9.- Bibliografía

## RESUMEN

El sistema inmune responde ante lesiones mecánicas de la médula espinal siguiendo un patrón organizado en fases. En la fase aguda/subaguda, la respuesta conduce a un proceso inflamatorio que conlleva a muerte celular necrótica mediada por isquemia y citotoxicidad, así como a la degradación de la matriz extracelular. En una fase más tardía, la respuesta inmune favorece la regeneración neural. No obstante ello, el efecto de la respuesta aguda/subaguda es tal que en muchas ocasiones impide la regeneración de los tractos nerviosos. Una manera por la que se podría atenuar la intensidad de la fase aguda/subaguda de la respuesta inmune asociada al daño medular es la inducción de un fenómeno de tolerancia a antígenos neurales durante la fase de selección de clonas autoreactivas de linfocitos T. Este proceso de tolerancia facilitaría la expresión de moléculas pro-regenerativas que pudieran ayudar a mejorar la recuperación neurológica después de infringido un segundo daño. En este contexto, durante el presente trabajo se enuclearon ratas al nacimiento con la idea de que la degeneración del nervio óptico expusiese al sistema inmune en desarrollo a moléculas derivadas del sistema nervioso de manera temprana. Así, tras una segunda lesión al SNC, el sistema inmune entraría en contacto con antígenos ante los cuales ya ha estado expuesto, lo que podría conducir a una disminución en la intensidad de su respuesta. Utilizando un modelo de enucleación perinatal seguido de la ejecución de una lesión medular en la vida adulta, evaluamos si el primer procedimiento modificaba en el largo plazo la expresión de factores que proveen el crecimiento y regeneración neuronales en respuesta a una lesión medular.

Nuestros resultados muestran que la expresión de GAP-43 y neurotrofinas es significativamente mayor en ratas adultas enucleadas en comparación con las no enucleadas a los 7 días después de la lesión medular. Esta diferencia tiende a abatirse 2 meses más tarde. Adicionalmente, se cuantificó el efecto de ambas manipulaciones sobre la población de células madre medulares por medio del inmunomarcaje para el factor transcripcional SOX2. Los resultados mostraron que existe una mayor presencia de dicho factor transcripcional en ratas no enucleadas. De esta forma, nuestros resultados sugieren que la enucleación neonatal modifica la expresión tardía de factores pro-regenerativos del sistema nervioso cuando éste es sometido a una segunda lesión en la vida adulta. Desafortunadamente, dicha respuesta no mejora la respuesta regenerativa en el sistema nervioso adulto.



## **Introducción**

Las lesiones en la médula espinal son una de las mayores causas de discapacidad. En la actualidad no existe algún tratamiento aceptado que ofrezca una recuperación completa. La pérdida de movilidad después de un daño medular es causada por la lesión mecánica y por mecanismos fisiopatológicos secundarios consecuentes al trauma inicial. Estos mecanismos conllevan a daño necrótico del tejido medular. Durante un daño medular se encuentran presentes algunas moléculas implicadas en la regeneración. Estas moléculas, sin embargo, parecen insuficientes para promoverla quizás por su incapacidad de modular a los elementos del sistema inmune. Por esta razón, actualmente existen investigaciones enfocadas a analizar y comprender la interacción entre el sistema nervioso y la respuesta inmune, con el propósito de incrementar las posibilidades de regeneración del SNC tras una lesión.

Se ha propuesto que una exposición primaria a proteínas liberadas como consecuencia de una lesión en el sistema nervioso central pudiese atenuar la respuesta inflamatoria durante una segunda exposición asociada con daño neural. Hipotéticamente la ausencia de la fase inflamatoria tardía permitiría que tanto el sistema inmune como el sistema nervioso actuaran de manera concertada en pro de procesos regenerativos en este último. Es este el contexto en que el presente trabajo fue pensado.

## **Antecedentes**

### **3.1 Sistema Inmune**

El sistema inmune se compone de un conjunto de células y órganos que impiden que los organismos sean afectados por sustancias propias y extrañas potencialmente nocivas. Este conjunto de acciones de defensa permite la identificación y eliminación de agentes nocivos. El tipo de defensa ante estos agentes puede estar dado con base en dos componentes del sistema inmune: la inmunidad innata y la inmunidad adquirida.

#### **Inmunidad innata**

Consiste en mecanismos de defensa celulares y bioquímicos que se encuentran en el lugar incluso antes de que exista alguna sustancia extraña en el organismo, de esta manera se tiene una respuesta inmediata. Este tipo de inmunidad no genera memoria inmunológica por lo que responde de la misma manera e intensidad ante agentes extraños de forma repetida. Este tipo de defensa distingue patrones, pero no tiene la especificidad de la inmunidad adaptativa. Algunos de los componentes de la inmunidad innata son: barreras bioquímicas y físicas, células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos; células "asesina naturales" (sub-linaje de los linfocitos) y citocinas.

Un evento relacionado con la inmunidad innata es la inflamación. En ella, se produce un aumento en el flujo sanguíneo y en la permeabilidad del endotelio en el tejido afectado. Este cambio es mediado por la acción de las aminas y citocinas vasoactivas. Esta última familia de proteínas incluye a las interleucinas, proteínas que actúan como mensajeros químicos a corta distancia, se sintetizan principalmente por leucocitos, y bajo ciertas condiciones por células endoteliales y por células del estroma del timo o de la médula ósea.

Las interleucinas regulan la activación, diferenciación o proliferación celulares, la secreción de anticuerpos, la quimiotaxis, y la producción de otras citocinas y factores de crecimiento. Durante la inflamación también pueden liberarse factores de crecimiento y factores citotóxicos (1).

### **Inmunidad adquirida**

Este tipo de inmunidad se presenta en respuesta a la presencia de un agente extraño y se torna específica para el mismo en ocasiones subsecuentes. La inmunidad adaptativa se compone de las respuestas celular y humoral, y requiere del reconocimiento de antígenos durante un proceso conocido como presentación de antígenos. Este último proceso es el resultado de modificaciones genómicas que surgen en pro de la generación de respuestas que se adapten a moléculas específicas por medio de la selección de clonas TRC específicas de Linfocitos T y Linfocitos B para dicho antígeno. Las respuestas específicas se mantienen en el organismo gracias a las células de memoria, las cuales se encargan de identificar las características de determinados patógenos y responder ante un nuevo ataque de manera más severa y eficiente.

Las células que participan en la inmunidad adquirida son los linfocitos, los cuales se dividen en dos clases, a las que conocemos como células B y células T. Las células B están involucradas en la respuesta inmune humoral, mientras que las células T se encargan de la acción inmune realizada por células. Tanto las células B como las T portan moléculas receptoras que reconocen blancos específicos (2).

### **3.2 Sistema Nervioso Central**

Las células que componen al tejido nervioso son de dos tipos básicos: las neuronas y la neuroglia. Anatómicamente el sistema nervioso de los vertebrados está constituido por el encéfalo y la médula espinal, los cuales se encuentran protegidos por un complejo óseo y por las meninges (3).

El sistema nervioso ejerce diferentes grados de control sobre la totalidad de los órganos del cuerpo, por lo cual está en permanente comunicación con ellos por medio de impulsos nerviosos conducidos por prolongaciones axónicas de las neuronas. Debido a que las neuronas sensoriales (dorsales) y motoras (ventrales) tienen que relacionar al sistema nervioso con los órganos periféricos, existen proyecciones nerviosas que salen y entran de la médula espinal a distintos niveles del neuro-eje: ocho cervicales, doce torácicos, cinco lumbares, cinco sacros y un segmento coccígeo (4).

Para que exista una adecuada formación del sistema nervioso es necesaria la participación de diversas moléculas que contribuyan tanto al estímulo y crecimiento de neuronas y axones, como a su orientación y reconocimiento de blancos específicos. Experimentos recientes han sugerido que la señalización que permite la organización espacial en el sistema nervioso solo está presente por un periodo limitado durante el desarrollo, para ser suprimidas después de que una proyección se ha consolidado. Algunas de estas moléculas de orientación han sido identificadas tanto en las etapas de desarrollo como después de daños al sistema nervioso. Algunas de estas moléculas se encuentran formando familias y son: las netrinas, las semaforinas, las efrinas y los slits. Todas estas proteínas cumplen funciones como quimio-atrayentes, quimio-repelentes y/o moléculas de adhesión ayudan al establecimiento de proyecciones topográficas (5).

Durante la construcción del sistema nervioso se encuentran presentes las células progenitoras neurales que preservan su amplio potencial de desarrollo y replicativo para producir una vasta gama de tipos celulares neuronales y gliales. El mecanismo responsable del destino de las células progenitoras o células madre está dado por la expresión de factores transcripcionales; estos pueden pertenecer a la familia de los factores de transcripción SOX, que son claves para mantener la identidad de los progenitores neurales promoviendo en ellos la auto renovación,

proliferación y diferenciación. Es importante mencionar que además de estas proteínas también es necesaria la acción de algunas otras moléculas, tales como factores de crecimiento, e inductores de muerte celular, esto para poder permitir un buen desarrollo del sistema nervioso, y para la regeneración del mismo (6, 7).

### **3.3 Neurotrofinas**

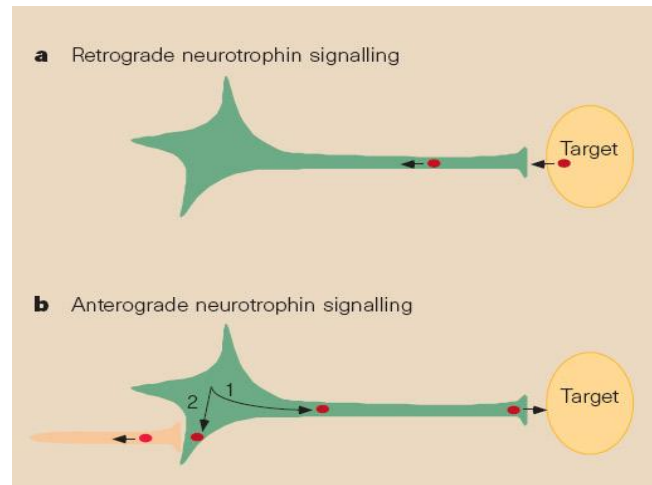
Dentro de los grupos de factores que fomentan el crecimiento neural más destacado se encuentran las neurotrofinas (8, 9).

Las neurotrofinas son proteínas endógenas solubles consideradas como factores de crecimiento, presentes en el sistema nervioso en distintas especies de vertebrados. La familia de las neurotrofinas está compuesta por factor de crecimiento neuronal (NGF; por sus siglas en inglés), las neurotrofinas 3, 4 y 6 (NT3, NT4 y NT6, respectivamente) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Todos ellos se encargan de mantener un balance entre la muerte, la supervivencia, morfología, plasticidad y crecimiento neuronales en distintas poblaciones de células tanto en el desarrollo como en el resto de la vida (10, 11, 12).

Algunas neurotrofinas, como el NGF, son sintetizadas y secretadas por órganos blancos simpáticos y sensoriales, donde se une a su receptor el cual se endocita con el ligando transportando a la neurotrofina a través de los axones hacia los cuerpos neuronales donde actúan promoviendo la supervivencia y diferenciación (13, 14, 15). Algunas otras fuentes de neurotrofinas no son blancos fijos neuronales. Por ejemplo, se ha demostrado que los macrófagos las pueden producir en condiciones de activación.

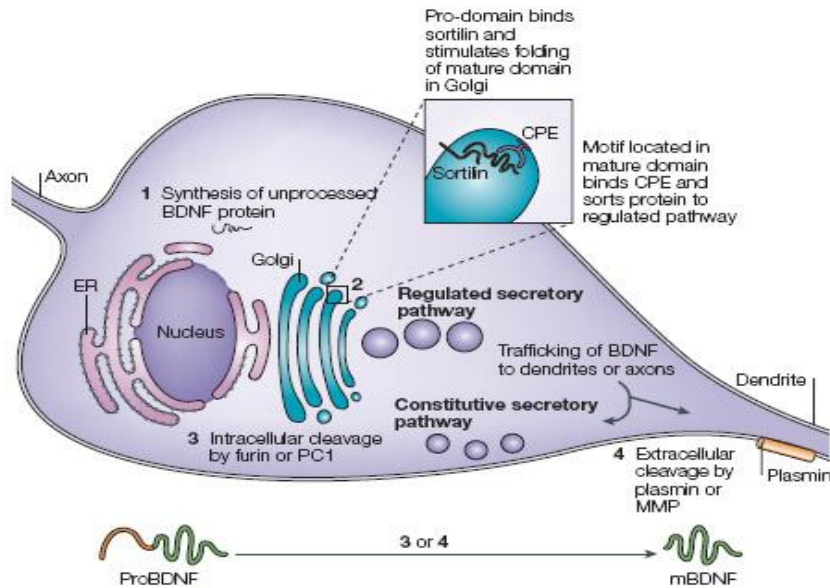
Una neurotrofina provista por una célula no solo es efectiva dando soporte a neuronas cuyos axones se encuentran en esa región, sino que también pueden proveer soporte a neuronas por medio del transporte transcelular (16). Estos factores de crecimiento promueven la supervivencia de las neuronas presinápticas

a través de la señalización retrógrada (del objetivo hacia la neurona), y recientemente se descubrió que la misma proteína puede actuar por la vía de señalización autocrina anterógrada (de la neurona al objetivo) (17), (figura 1).



**Figura 1: Señalización Retrógrada y Anterógrada.** Tipos de transporte por medio de los cuales las neurotrofinas pueden ser translocadas desde su sitio de unión con su receptor. El círculo rojo representa a la neurotrofina, la cual será transportada desde la célula blanco por el axón hasta el cuerpo celular (transporte retrógrado), o desde el soma celular se transportará por el axón para ser liberada hacia la célula blanco (transporte anterógrado).

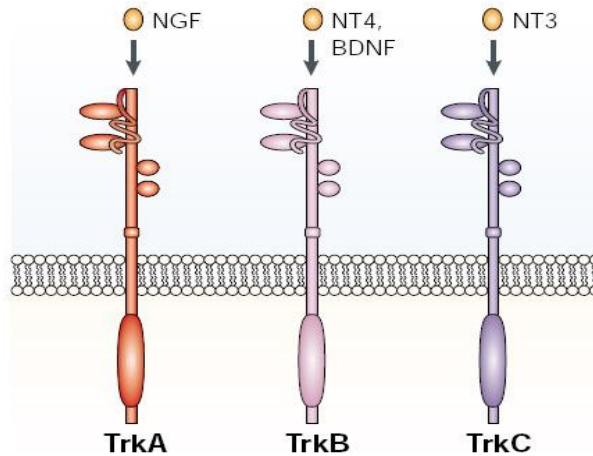
Las neurotrofinas son sintetizadas como precursores o pro-neurotrofinas, las cuales son cortadas para obtener proteínas maduras. Estos precursores promueven la muerte celular. Existen dos tipos de secreciones por las cuales las neurotrofinas pueden ser conducidas, la secreción regulada que es un proceso celular en el cual la fusión de las vesículas y la secreción de las proteínas que contienen es activada por señales extracelulares; y la secreción constitutiva que es un mecanismo por el cual las vesículas se fusionan de manera espontánea con la membrana plasmática para liberar su contenido proteico en el espacio extracelular (18), (Fig 2).



**Figura 2: Síntesis y clasificación de BDNF.** Síntesis de BDNF en una neurona canónica. Se muestran la vía de secreción constitutiva y la vía de secreción regulada, los dos procesos por medio de las cuales las neurotrofinas pueden ser liberadas. Dependiendo de la vía de secreción de la neurotrofinas, se les adicionarán o no motivos que se agregarán al dominio maduro de la neurotrofina.

Tanto los precursores como las neurotrofinas maduras tienen una afinidad específica para unirse a las dos clases de receptores existentes para estas proteínas. La activación de los receptores de la familia TrK se da por medio de la unión de neurotrofinas maduras, y favorece la supervivencia celular, proliferación, la diferenciación de precursores neurales, el crecimiento y la definición del patrón de axones y dendritas, la expresión y actividad de importantes proteínas funcionales como canales de iones y receptores de neurotransmisores. En el sistema nervioso adulto, los receptores TrK regulan la plasticidad sináptica. En contraste, la activación del receptor p75NTR se da por la unión con pro-neurotrofinas, llevándose a cabo la apoptosis (19).

La familia de receptores TrK está conformada por al menos tres miembros conocidos como TrkA, TrkB y TrkC, cada uno de los cuales tiene una afinidad específica para distintas neurotrofinas (Fig.3).

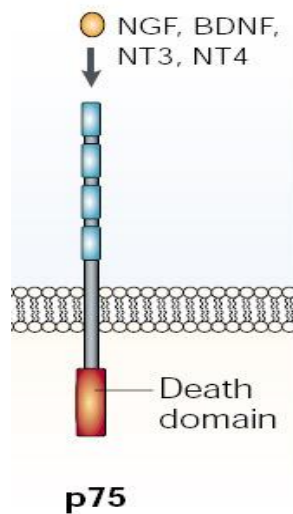


**Figura 3: Modelos de los tres tipos de receptores Trk.** Los receptores Trk se conocen como los receptores de supervivencia celular, cada uno de estos receptores tiene una afinidad de unión para cada neurotrofina. Contienen un dominio intracelular tirosin cinasa el cual se fosforilará y provocará una cascada de señalización que conduce la supervivencia celular.

El receptor TrkA muestra una mayor afinidad de unión por el NGF, el receptor TrkB se une de manera específica con NT4 y BDNF, mientras que el receptor TrkC tiene una unión preferencial con NT3.

El receptor p75NTR es un miembro distante de la familia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNF). Este receptor tiene un dominio citoplásmico que activa a las cascadas apoptóticas su porción citoplásmica, y que es estructuralmente similar a la de los demás miembros de esta familia de receptores (Fig.4). El receptor p75NTR puede unirse con aproximadamente la misma afinidad a cada neurotrofina. La porción extracelular de p75NTR contiene cuatro repeticiones de cisteína importantes para su estabilidad estructural.



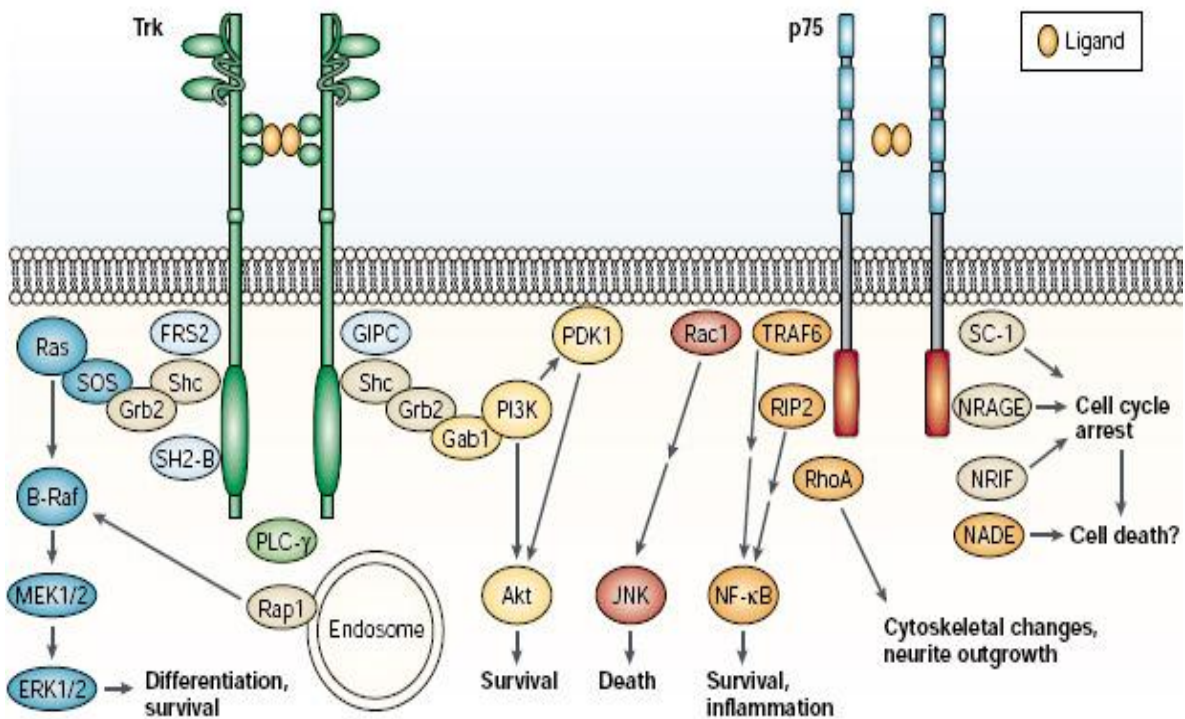


**Figura 4: Modelo del receptor p75.** Tienen un dominio intracelular conocido como Dominio de muerte celular, no existe afinidad por una neurotrofina determinada por lo que el receptor es promiscuo.

Estudios recientes han mostrado que p75NTR interactúa con el receptor Nogo como una subunidad de transmisión de señal que medía efectos inhibitorios en el crecimiento axonal de tres glicoproteínas asociadas a mielina (nogo, MAG y Omgp) (20).

La unión de neurotrofinas con p75NTR promueve la supervivencia celular en algunas células y apoptosis en otras. El receptor p75NTR ejerce estas acciones duales a través de una serie de vías de señalización diferentes a las asociadas con los receptores TrK. Las vías pro-supervivencia activadas por p75NTR son mediadas por NF $\kappa$ B y Akt. La vías apoptóticas se transducen mediante la cascada de señalización de la cinasa Jun-N terminal (JNK) y de ceramidas y a través de su asociación con distintos adaptadores (NRAGE Y NADE) que directamente promueven el arresto del ciclo celular y la apoptosis. El p75NTR puede también activar proteínas G como Rac y Rho, afectando directamente la motilidad y el crecimiento de conos (20), (Fig.5).

La función apoptótica del p75NRT provee de un medio que permite refinar a las poblaciones neuronales y a la invasión de los órganos blancos durante el desarrollo. La apoptosis mediada por la acción de p75NRT también se da en presencia de inflamación o daño; así se ha observado que durante un daño medular existe una muerte de oligodendrocitos, directamente inducida por este receptor (19).



**Figura 5: Cascadas de señalización en la activación de los receptores Trk y p75NRT.** Los receptores Trk median la diferenciación y supervivencia celular; mientras que el receptor p75NRT puede seguir diferentes cascadas de señalización provocando arresto en el ciclo celular, cambios en el citoesqueleto, inflamación y muerte celular.

### Proteína Asociada al Crecimiento – 43 (GAP -43)

GAP-43 juega un papel importante promoviendo el crecimiento de los axones y la formación y mantenimiento de conexiones neuronales. De hecho, se ha documentado que aún en ausencia de factores de crecimiento adicionales, GAP-43 posibilita el brote de nuevas terminales nerviosas, e incluso es considerado un

determinante intrínseco del estado de crecimiento neuronal durante el desarrollo y en la presencia de lesiones (21, 22,23).

La expresión de esta proteína disminuye después de la mielinización de los axones, y de la formación de sinapsis estables (24). Se ha observado que GAP-43 se encuentra presente en elevadas concentraciones en los conos en crecimiento y en sus filopodios, sugiriendo así que juega un papel importante durante el crecimiento de conos móviles y en la interacción de los mismos con su ambiente. Esta expresión disminuye durante la diferenciación de los conos hacia terminales presinápticas (25).

Esta fosfoproteína se expresa no solo durante el desarrollo, sino que también desempeña un papel importante en la regeneración de axones después de un daño. Estudios previos han mostrado que durante la regeneración, GAP-43 es rápidamente transportado en dirección anterógrada hacia el sitio de rebrote axónico. A nivel celular, GAP-43 se encuentra fuertemente unida a la cara citoplasmática de la membrana del velo terminal de los axones, a través de una secuencia hidrofóbica que contiene residuos de cisteína en las posiciones 3 y 4. Dichas cisteínas pueden cambiar su estado de hidrofobicidad mediante la adición de ácido palmítico, lo que al parecer facilita la movilidad membranal en los conos de crecimiento (26). Para alcanzar las membranas del velo terminal, GAP-43 se asocia con el compartimiento membranal trans-Golgi, desde donde es transportado rápidamente a lo largo del axón en vesículas membranosas (27). Se ha mostrado que esta proteína se encuentra de manera exclusiva en neuronas, terminales presinápticas, y a niveles muy bajos ocasionalmente en dendritas. Sin embargo existen reportes que sugieren su presencia en astrocitos jóvenes y en células de Schwann que no están en contacto con axones (27). Para poder ejercer sus acciones biológicas, GAP-43 requiere de ser fosforilada en la serina-41 por la proteína cinasa C. El estado fosforilado de GAP-43 parece ser regulado de manera

dinámica por factores que facilitan el crecimiento axonal, incluyendo a los elementos del cito-esqueleto (28).

### **3.4 Sistema Inmune y Daño Medular**

Los daños en el sistema nervioso central tanto en el cerebro como en la médula espinal, provocan patologías que se asocian a estados que limitan su recuperación. De esta manera, un trauma mecánico se asocia a la muerte rápida de neuronas y glía trayendo consigo daños colaterales e inflamación (29). En particular, la lesión mecánica de la médula espinal generalmente conduce a una hemorragia central acompañada de necrosis. Esta situación produce una activación glial e infiltración leucocitaria. Los neutrofilos se aglomeran en el lugar de la lesión horas después del daño y hasta por días. Los linfocitos y monocitos arriban al lugar lesionado durante los primeros 3 a 7 días después de infringido el daño (30). Aunado a ello, se ha mostrado también que las lesiones en la médula espinal inducen cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de forma que mientras más severa sea la lesión mayor será el incremento de las permeabilidad de la barrea y el daño a la materia gris y blanca de la médula espinal (31). Se ha observado que existe una correlación entre la activación de la microglía y los cambios en la permeabilidad microvascular de la materia blanca después de una contusión medular. Mientras que las fuerzas mecánicas contribuyen a la desorganización en la barrera hematoencefálica, mediadores de la inflamación influyen en las funciones endoteliales incluyendo el mantenimiento del flujo sanguíneo a los tejidos de transferencia (32). Las citocinas pro inflamatorias IL-1B y TNF son sobre expresadas inmediatamente después de un daño medular ayudando a incrementar la permeabilidad vascular (32).

En términos generales, el estado fisiopatológico que se presenta después de un daño medular se puede dividir en dos etapas: el daño primario y el secundario. El daño primario consiste en la destrucción local de tejido neural

causado por un trauma mecánico directo. Esta lesión primaria trae consigo una ola creciente de daños secundarios que incrementan el daño medular. Al haber un daño mecánico, se destruyen tractos axonales, y membranas de células endoteliales y neuronales, circunstancia que provoca que haya un mayor impedimento para la recuperación (33). Como consecuencia de la ruptura de tejido y membranas celulares se produce una zona de necrosis hemorrágica que se extiende en su mayoría en la materia gris, siendo los axones que se afectan menos aquellos que se encuentran más cerca de la pía madre. De hecho no es infrecuente que éstos se preserven y formen un borde denominado axonal subpial (34). La contusión trae consigo la deformación de células y axones mielinizados volviéndolos más vulnerables al daño citotóxico.

Con la llegada del daño secundario se observan cambios bruscos en el lugar de la lesión y sus alrededores. En las dos primeras horas post-lesión, la hemorragia se extiende. Transcurridas 6 horas, se constituye una la zona de penumbra (muerte celular y hemorragia) que rodea al sitio de lesión primaria y el edema se observa principalmente en la materia blanca. Durante las siguientes 12-24 horas, la hemorragia continua extendiéndose y las materias blanca y gris comienzan a perder su definición, volviéndose suaves y abultadas conforme aumenta el edema. A los 3 días desde ocurrida la lesión, la hemorragia es aún evidente, aunque tiende a desaparecer hacia el octavo día. Histopatológicamente, sin embargo, se nota una gran cantidad de restos celulares en la zona de daño primario (33). Para este momento. La región también se rodea e infiltra de tejido cicatricial que contiene moléculas inhibitorias del crecimiento axonal.

En el daño secundario se presentan algunos procesos biológicos como son: la necrosis, apoptosis, excitotoxicidad e inhibición del crecimiento axonal. La necrosis se da de manera centrípeta desde la zona de daño primario y se extiende de manera rostro-caudal al mismo. La necrosis en el tejido vascular se observa

como daño a arteriolas, capilares y vénulas, situación que limita el flujo sanguíneo al tejido medular. A nivel bioquímico, en el sitio de lesión se pierden los marcadores que permiten identificar la actividad de las vías de fosforilación oxidativa y glicolítica, con lo cual se induce una baja en el metabolismo de energía celular por medio de la reducción de ATP (35). La pérdida de ATP provoca que existan cambios en la permeabilidad membranal, liberación del contenido lisosomal, activación de enzimas como proteasas, fosfolipasas, ATPasas y endonucleasas que se encargan de degradar componentes del citoesqueleto, núcleo y membranas plasmáticas.

La exitotoxicidad durante un daño medular se da principalmente por la presencia de glutamato liberado como resultado de lisis celular. Este glutamato en exceso causa la despolarización anormal de las neuronas aledañas y la activación excesiva de canales iónicos (36). La apoptosis juega un papel muy importante en el daño medular conduciendo a la eliminación de diversos tipos celulares en un inicio, y más tardíamente a afectación de las microglía y los oligodendrocitos (37). La inhibición del rebrote axonal se inicia con la gliosis generada como respuesta al daño medular y al infiltrado de células gliales e inmunes que invaden la zona de daño primario limpiando los residuos celulares; Se cree que este fenómeno de limpieza evita la propagación del daño a través de ayudar a la formación de tejido cicatricial. Las moléculas que componen al tejido cicatricial son proteoglicanos, glicoproteínas y moléculas asociadas a mielina (38).

La fase aguda de la lesión medular se encuentra dominada por la presencia de citocinas pro-inflamatorias como el TNF, IL-1 e IL-6. La interleucina IL-1 es liberada por microglía inmediatamente después de ocasionado el daño medular. Su presencia ayuda a elevar los niveles de IL-6 y TNF, por lo que los niveles de estas tres citocinas incrementan con rapidez. Durante la primera semana post-lesión, los niveles de TNF continúan aumentando, esto se atribuye a la infiltración

leucocitaria y a la secreción de citocinas pro-inflamatorias en la zona del daño primario (39). La unión de IL-1 y TNF a sus receptores induce una respuesta inflamatoria por medio de la vía de señalización de NF $\kappa$ B en microglía y células endoteliales durante los primeros 30 min post-lesión, persistiendo hasta 72 horas. NF $\kappa$ B es un producto elemental para la estimulación en la producción de mediadores inflamatorios como ROS, citocinas, iNOS (óxido nítrico sintetasa inducible) y prostaglandinas (40).

TGF $\beta$  es una citocina anti-inflamatoria, se encuentra presente después de una lesión medular, y durante las primeras 24 horas post-lesión. Su nivel más alto se observa hasta los 7 días, y tiende a contrarrestar el efecto de las citocinas pro inflamatorias suprimiendo la expresión de iNOS y disminuyendo la adhesión de las células inmunes al endotelio (41). Mediadores pro-inflamatorios como metaloproteinasas y citocinas como TNF, IL-1, IL-8 y TGF $\beta$ , inducen a neutrófilos a generar sus propias citocinas; así como a la producción de proteasas por medio de la vía NF $\kappa$ B. Tales mediadores estimulan a la quimiotaxis de leucocitos, activan la glía y fomentan el daño medular (42). En el área lesionada del parénquima, se observa un incremento en monocitos los que se diferenciarán hacia macrófagos una vez transcurridas alrededor de 72 horas. La microglía es activada una hora después de la lesión en la zona del daño primario (42).

La activación de macrófagos conduce a la secreción de glutamato, citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1 e IL-6), y a la activación de la enzima de estallido respiratorio iNOS (43). Después de la activación de macrófagos y microglía existe fagocitosis de desechos necróticos y apoptóticos. La presencia de macrófagos se puede observar hasta los primeros 7 días post- lesión; mientras que la microglía está en el lugar de la lesión entre 2 y cuatro semanas.

## Sistema inmune y regeneración

Estudios realizados sugieren que las neurotrofinas y sus receptores se expresan en células y tejidos no neurales, como pueden ser células pertenecientes al sistema inmune como linfocitos T y B, células dendríticas, monocitos y macrófagos (44,45). En concordancia, se ha documentado la expresión de neurotrofinas (BDNF, NT3 y NT4) en macrófagos derivados de monocitos (MDM); los MDM expresan de manera constitutiva todas las neurotrofinas y sus receptores, teniendo un mayor nivel de secreción NT4. Todas estas neurotrofinas se expresan a diferentes niveles según sea el estímulo molecular inflamatorio o antiinflamatorio. Si bien la expresión de neurotrofinas por MDM no modula su capacidad de respuesta pro-inflamatoria, estas pueden desempeñar un papel regulatorio de la inflamación teniendo una influencia en células vecinas al daño, y ayudando en mecanismos de reparación (46).

La microglía, por otro lado, es activada en respuesta a daños, infecciones e inflamación en el sistema nervioso. Si bien estas células secretan agentes citotóxicos que inducen muerte neuronal y desmielinización de oligodendrocitos, también proveen de factores de crecimiento a glía y neuronas. En este sentido, la microglía es responsable de la secreción de NT3 y BDNF, las cuales inducen proliferación y activación fagocítica en microglia *in vitro* (47). La microglía participa en los procesos de remodelación del tejido neural durante el desarrollo en condiciones de lesión/regeneración a través de "limpiar" restos celulares y eliminar sinápsis. La expresión de neurotrofinas por parte de estas células ocurre de manera homeostática, incrementándose su expresión cuando hay daños o enfermedades. Es posible que la microglía adulta solo exprese neurotrofinas cuando un estímulo patológico está presente, lo cual indica que funcionan como mediadores entre el sistema inmune y el cerebro (47).



Después de un daño en el sistema nervioso existen mecanismos que ayudan a la reparación y regeneración de nervios y tractos, una de las moléculas que se ha sugerido como parte de estos elementos de regeneración es GAP-43. Se ha observado que posteriormente a un daño en nervios periféricos se incrementa el transporte axonal de GAP-43, debido a que se expresa en axones durante el desarrollo y regeneración.

Una lesión primaria causada al Sistema nervioso Central es seguida por una pérdida neuronal; *Yoles et al* han demostrado que la inmunización pasiva o activa con mielina asociada al sistema nervioso central pueden reducir las pérdidas neuronales en una segunda lesión al mismo.

En individuos ciegos la reorganización cerebral es un componente de plasticidad que ha llamado la atención en los últimos años. Sin embargo no existen estudios que evalúen los posibles cambios en el sistema inmune de individuos ciegos ante una posterior lesión en el sistema nervioso central (48).

La enucleación es uno de los modelos más comúnmente usados dentro de la investigación en el daño al SNC. Debido a que durante este tipo de lesión existe una degeneración del nervio óptico que interactúa con el sistema inmune. La interacción del sistema inmune ante la degeneración del nervio óptico suele ser muy dañina para el organismo (49).

Por lo que se ha propuesto que la enucleación de animales experimentales a su nacimiento servirá para que el sistema inmune reconozca a los elementos del SNC durante su degeneración evitando así que durante una segunda exposición a los mismos el sistema inmune actúe de manera atenuada y reaccionando en pro de la regeneración (datos no publicados del laboratorio).

## **Justificación**

Las lesiones en el sistema nervioso central se caracterizan por tener una tasa baja ó nula de recuperación funcional asociada, probablemente a la falta de regeneración neuronal. Este hecho resulta de la existencia de un ambiente poco propicio para el rebrote axonal durante la fase aguda de la inflamación, en parte causado por el tipo de respuesta inmune que da lugar inmediatamente después de infringido el daño. La respuesta inmune tardía, sin embargo, promueve la expresión de factores que potencialmente son pro-regenerativos lo que debería ayudar al re-establecimiento de la circuitería neuronal útil. Este, sin embargo no es el caso. Estudios previos han mostrado que la exposición anticipada a antígenos neurales mejora las posibilidades de regeneración neuronal ante un daño subsecuente. Esto sugiere que se puede instruir al sistema inmune tal que el proceso de inflamación inicial sea atenuado, favoreciendo la presencia de un ambiente pro-regenerativo de manera más temprana durante la segunda fase de la inflamación, situación que podría ayudar a mejorar la recuperación morfo-fisiológica neuronal. En este trabajo evaluamos esta posibilidad utilizando a la enucleación neonatal como medio para exponer al sistema inmune a antígenos neurales de manera temprana durante el desarrollo, bajo la premisa de que dicha instrucción permitiera mejorar las habilidades regenerativas neuronales en la vida adulta.

**¿LA ENUCLEACIÓN EN ANIMALES RECIÉN NACIDOS PUEDE INDUCIR A UN CAMBIO EN LA RESPUESTA INMUNOLOGICA, TENIENDO COMO CONSECUENCIA FINAL UN AUMENTO EN LA REGENERACIÓN Y RECUPERACIÓN MOTORA DESPUÉS DE UNA LESIÓN EN LA MÉDULA ESPINAL?**

## **Hipótesis**

La enucleación al nacimiento conduce a una mejora de la recuperación motora asociada al aumento de proteínas pro regenerativas y a un incremento en células troncales después de una lesión medular en la vida adulta de la rata.

## **Objetivos**

### Objetivo general

Evaluar *in situ* los cambios en la producción de proteínas pro-regenerativas neurales y en la proliferación de células troncales neurales medulares, así como la recuperación motora consecutiva a una lesión medular en ratas adultas enucleadas al nacimiento.

### Objetivos particulares

Evaluar los cambios en la síntesis de neurotrofinas y GAP-43 en ratas control y enucleadas neonatalmente, ambas sometidas a lesiones medulares en la vida adulta, a los 7 y 60 días post-lesión, mediante el uso de técnicas de inmunocitoquímica y densitometría.

Evaluar los cambios en la proliferación de las células troncales neurales medulares en ratas control y enucleadas neonatalmente, ambas sometidas a lesiones medulares en la vida adulta, a los 7 y 60 días post-lesión, mediante el uso de técnicas de inmunocitoquímica y morfometría

Evaluar la recuperación motora en ratas control y enucleadas neonatalmente, ambas sometidas a lesiones medulares en la vida adulta, a los 7, 30 y 60 días post-lesión, utilizando la escala BBB.

## **Materiales y Métodos**

### **Animales**

Los experimentos se realizaron con ratas hembras Wistar recién nacidas, las cuales fueron sacrificadas a los 60 y 90 días de edad. Todos los animales tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum*, y se les mantuvo en cajas de acrílico con aserrín en una habitación con temperatura e iluminación controladas (12 horas luz / 12 horas oscuridad). Los protocolos de experimentación con animales fueron aprobados por la comisión de ética para el trabajo con animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### **Enucleación**

Consta de la remoción quirúrgica de los globos oculares. Animales nacidos entre las 6 y 12 horas de vida (n=12) se anestesiaron por hipotermia. Se les realizó una incisión en la fisura palpebral para así remover de manera completa el tejido ocular con la ayuda de una pinza fina. Después de la remoción ocular, se controló el sangrado debido a la cirugía. Una vez que recuperaron la temperatura, movilidad y color, los animales fueron devueltos a sus madres. Los animales controles fueron tratados de la misma manera con excepción de la cirugía.

### **Lesión medular**

Los animales fueron sometidos a una cirugía de lesión medular, la cual se realizó después de haber alcanzado un peso de 250 gramos. Se anestesió a los animales con una mezcla de Ketamina/Xilacina en una proporción 5:1. Dicha mezcla se administró vía intramuscular. Los animales anestesiados fueron sometidos a una laminectomía a la altura de la novena vertebra torácica. La laminectomía consta de la separación de piel y músculo, la remoción del hueso para dejar expuesta la médula espinal. La contusión medular se realizó por medio del Impactador de la Universidad de Nueva York, en el cual se sujeta a la rata por medio de las apófisis cercanas a la laminectomía dejando caer sobre la médula

desnuda un balón de 10 gramos a una altura de 25 mm. Los animales se suturaron a nivel muscular y dérmico. Una vez finalizada la cirugía, y durante 8 días sucesivos, se les administró vía oral Enrofloxacin para evitar infecciones en la herida, y paracetamol para controlar el dolor debido a la cirugía. Durante el primer mes posterior a la cirugía, se les ayudo a los animales a orinar y defecar por medio de un masaje de presión sobre el vientre tres veces al día.

### **Procesamiento del tejido**

Los animales se sacrificaron en tres diferentes tiempos: 7, 60 y 90 días post lesión medular. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (45mg/Kg de peso corporal) para después ser perfundidas con paraformaldehído (4%) amortiguado. El tejido medular se extrajo completamente removiendo cada una de las vertebrae que lo cubría. La médula se dividió en tres secciones: superior a la zona de lesión, zona de lesión e inferior a la zona de lesión. El tejido se incluyó en tissue tek y se cortó transversalmente a un grosor de 30 micras en el criostato. Los cortes se colectaron en portaobjetos (4 cortes de tejido en cada portaobjeto) cubiertos con gelatina y se almacenaron a una temperatura de -4°C hasta su uso.

### **Prueba de recuperación motora**

La recuperación motora se realizó por medio de la escala BBB (Beattie, Basso, Bresnahan) la cual se aplica a animales que han sido sometidos a lesiones medulares. Esta escala está compuesta por 21 puntos, cada uno de los cuales evalúa la capacidad de coordinación de los miembros inferiores, caderas, tobillos y rodillas, así como el apoyo de la pata sobre el piso, balance y soporte corporal con los miembros inferiores. Los animales se colocan en un campo abierto por aproximadamente 5 minutos, para que deambularan libremente. En ese periodo se observa y evalúa su ejecución motriz.

## Immunohistoquímica

El protocolo de inmunocitoquímica empleado para identificar NT3 (anticuerpo rabbit; 1:200; Chemicon), NT4 (anticuerpo sheep; 1:100; Chemicon), BDNF (anticuerpo rabbit; 1:2000; Chemicon) y GAP-43 (anticuerpo rabbit; 1:200; Chemicon) en los cortes medulares se enlista a continuación:

1. Colocar a las láminas en una cámara húmeda.
2. Incubar con PBS (0.1M, pH 7.4) por cinco minutos a temperatura ambiente por dos ocasiones.
3. Bloquear peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en agua por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, lavar en dos ocasiones con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Bloquear por 10 minutos a temperatura ambiente con PBS adicionado con albúmina bovina (0.1%) y Tween20 (0.05%).
5. Substituir la solución de bloqueo por la de incubación con el anticuerpo primario correspondiente diluido en suero de bloqueo. La incubación se realizó durante 12 horas a 4°C.
6. Lavar 2 veces en dos ocasiones con PBS por 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Bloquear como en el paso 6.
8. Incubar con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a biotina diluido durante una hora a temperatura ambiente
9. Lavar como en el paso 10.
10. Incubar con el complejo avidina –peroxidasa de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (Vector; 1 hora a temperatura ambiente).
11. Lavar como en el paso 10.
12. Revelar la actividad de peroxidasa utilizando 3,3-diaminoencidina (0.05%) y peróxido de hidrógeno de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (Vector; 1-5 minutos a temperatura ambiente).
13. Detener la reacción de revelado lavando en al menos tres ocasiones por 10 minutos a temperatura ambiente.

El protocolo utilizado para identificar células troncales neurales medulares utilizando el anticuerpo dirigido contra SOX-2 (anticuerpo Donkey; 1:2000; Chemicon) fue:

- 1.- Colocar las laminillas en una cámara húmeda hacer 3 lavados PBS 1x 5 min c/u.
- 2.- Después de cada lavado con PBS colocar sobre el tejido INMUNO RETRIEVER 1X 70°C por 30 min.
- 3.- Retirar la solución anterior y aplicar INMUNO RETRIEVER 1X a Temperatura Ambiente 15 por min.
- 4.- Hacer 3 lavados con PBS 1x por 5min c/u a temperatura ambiente.
- 5.- Aplicar una solución de HCl 1N a 25°C por 30 min.
- 6.- Aplicar una solución de BORATO DE SODIO 0.1M por 12 min.
- 7.- Realizar 3 lavados con PBS 1x durante 5 min c/u a temperatura ambiente.
- 8.- Bloquear con BSA 3% y triton 0.3% por 1h RT°.
- 9.- Substituir la solución de bloqueo por la de incubación con el anticuerpo primario Anti sox (Hecho en goat ) 1:200 en PBT 4 °C o 12h (O/N) RT°.
- 10.- Hacer 3 lavados con PBS 1x durante 5 min a temperatura ambiente.
- 11.- Aplicar el anticuerpo secundario mouse (1:500, Donky x ms; chemicon ) + (Donky x goat 1:500) durante 2hr a temperatura ambiente.
- 12.- Realizar 3 lavados con PBS 1x durante 5min a temperatura ambiente.
- 14.- Agregar DAPI por 10 min aproximadamente a temperatura ambiente.
- 15.- Lavar con PBS 1x hasta remover DAPI.
- 16.- Observar al microscopio

### **Densitometría**

Una vez inmunoteñidas, fueron fotografiadas digitalmente únicamente las laminillas que contenían el tejido correspondiente al área en la que se realizó la lesión medular, con la ayuda de un microscopio Optiphot equipado con una cámara Digital CoolPix (NIKON). Durante la sesión de fotografía se mantuvieron el contraste, la ganancia y el tiempo de exposición en los mismos valores. En todas las laminillas que fueron fotografiadas se eligieron tres diferentes campos, los cuales fueron tomados al azar, esto para evitar la incidencia de artefactos.

Las imágenes capturadas y digitalizadas a una magnificación de 20X fueron analizadas por métodos densitométricos utilizando el programa Image J (NIH). Para ello, se determinó el porcentaje de área marcada positivamente con los anticuerpos dirigidos específicamente contra las proteínas de interés. Por otra parte, el análisis de SOX-2 se realizó estimando la intensidad de fluorescencia en cada uno de los grupos en la zona ventricular aledaña a la lesión medular utilizando el programa Stereo Investigator 8 (MicroBright Field). El análisis estadístico empleado para evaluar este parámetro fue la t de Student, considerando las diferencias entre grupos como significativas con un valor de  $p < 0.05$ .

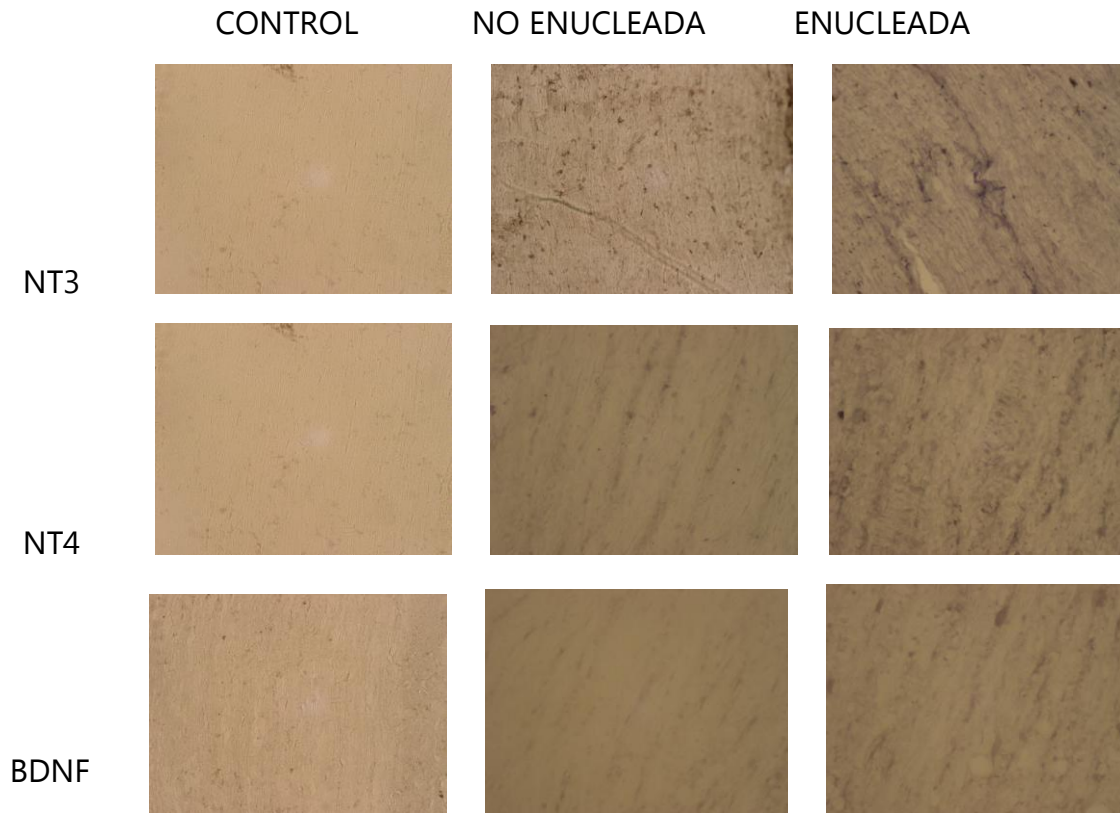


## Resultados

***El área ocupada por inmunotinción para NT3, NT4 y BDNF fue mayor en las ratas adultas enucleadas al nacimiento a los 7 días, no así a los 60 días, después de la lesión.***

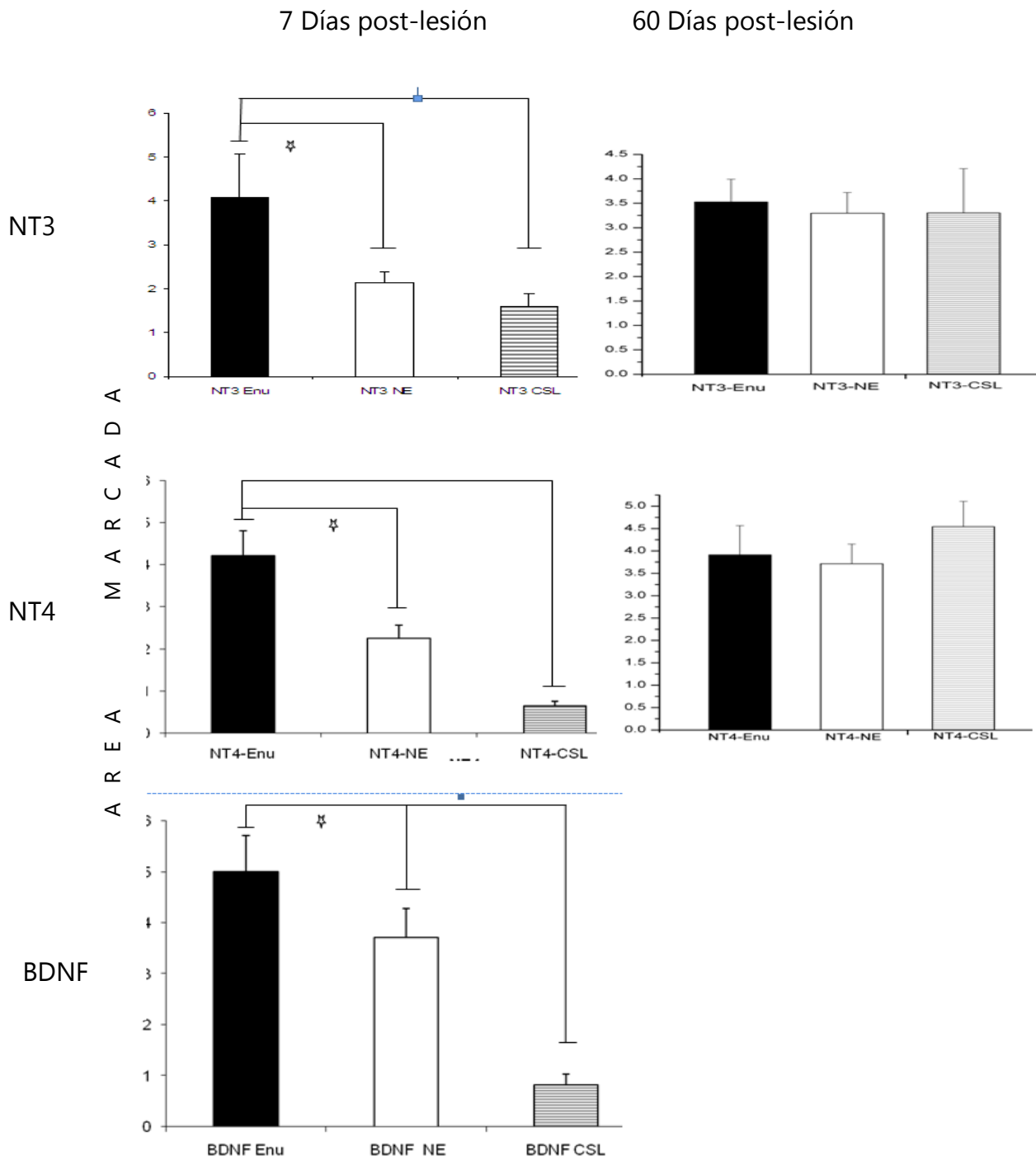
El presente trabajo evaluó el cambio en el área ocupada por la inmunotinción para NT3, NT4 y BDNF en cortes de la médula espinal de ratas adultas control o enucleadas al nacimiento, a los 7 y 60 días después de ser sujetas a un procedimiento de contusión. Si bien a los 7 días postlesión, ambos grupos de ratas mostraron un incremento en el área ocupada por la marca para las neurotrofinas evaluadas, con respecto al control intacto, dicho incremento fue mayor en las ratas enucleadas (Fig. 1). No obstante esta diferencia, la intensidad de la marca para NT3, NT4 y BDNF cae con el paso del tiempo en ambos grupos de animales alcanzando valores equivalentes a los normales hacia los 60 días (Fig.2).

**FIGURA 1**



**Figura 1:** Cuantificación de NT3, NT4 y BDNF 7 días después de una lesión medular. La expresión de estas proteínas fue analizada por medio de una inmunohistoquímica con HRP en médula espinal de ratas control, no enucleada con lesión y ratas enucleadas con lesión.

**FIGURA 2**

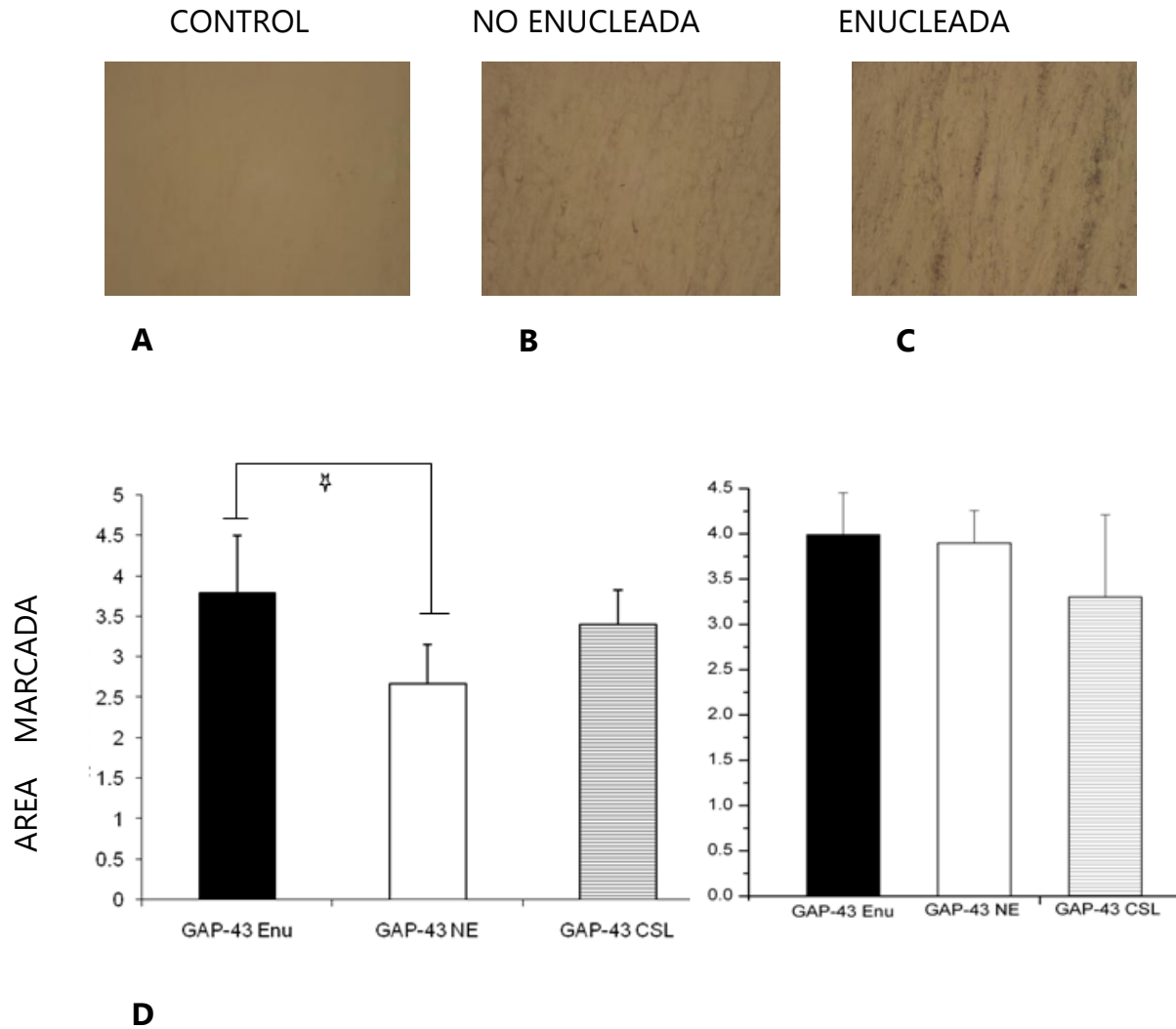


**FIGURA 2:** Análisis de la presencia de NT3, NT4 y BDNF 7 y 60 días después de una lesión medular. Cuantificación por medio de inmunotinción  $p < 0.05$ . Método estadístico: T de student.  $n = 13$ .

***El área ocupada por inmunotinción para GAP-43 fue mayor en las ratas adultas enucleadas al nacimiento a los 7 días, no así a los 60 días, después de la lesión.***

También evaluamos el cambio en el área ocupada por la inmunotinción para GAP-43 en cortes de la médula espinal de ratas adultas control o enucleadas al nacimiento, a los 7 y 60 días después de ser sujetas a un procedimiento de contusión. Si bien a los 7 días postlesión, ambos grupos de ratas mostraron un incremento en el área ocupada por la marca para GAP-43, con respecto al control intacto, dicho incremento fue mayor en las ratas enucleadas (Fig. 3). No obstante esta diferencia, la intensidad de la marca para GAP-43 decae con el paso del tiempo en ambos grupos de animales alcanzando valores equivalentes los normales hacia los 60 días.

**FIGURA 3**

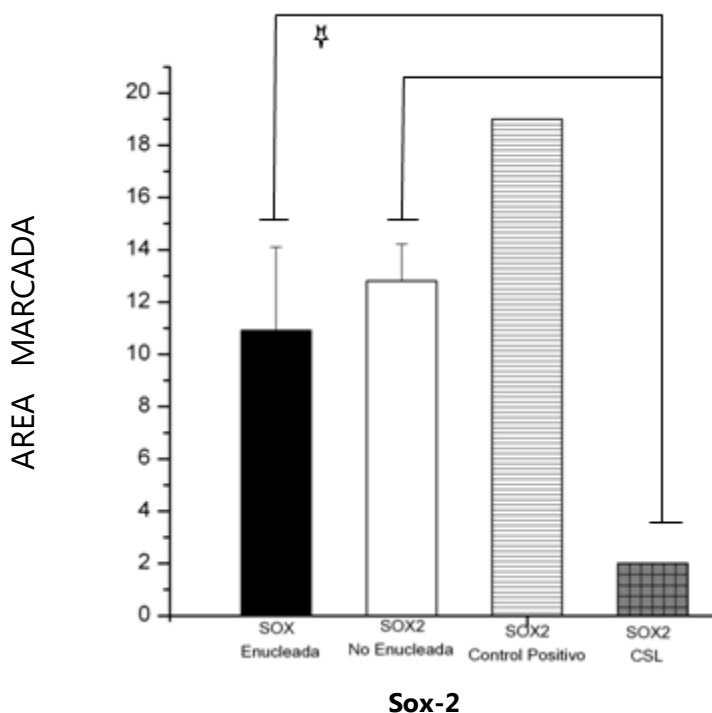


**FIGURA 3:** Cuantificación y análisis de BDNF 7 Días después de una lesión medular. A) Tejido de médula espinal inmunoteñido en rata control; B) tejido de rata no enucleada; C) Fotografía digitalizada de tejido medular de rata enucleada con lesión medular; D) Análisis de la presencia de GAP-43 7 y 60 días después de una lesión medular n= 13, método estadístico utilizado: T de student,  $p \leq 0.05$ .

**La intensidad de la inmunotinción para SOX-2 fue equivalente en ratas adultas control y enucleadas al nacimiento a los 7 y 60 días después de la lesión.**

En nuestro estudio se evaluó la intensidad de la inmunotinción para SOX-2 en cortes de la médula espinal de ratas adultas control o enucleadas al nacimiento, a los 7 y 60 días después de ser sujetas a un procedimiento de contusión. No se encontraron diferencias en éste parámetro al comparar entre los grupos experimentales. No obstante ello, ambos grupos mostraron un incremento significativo de la intensidad de la marca para SOX-2 al ser comparados el grupo control intacto en las edades analizadas (Fig. 4).

**FIGURA 4**

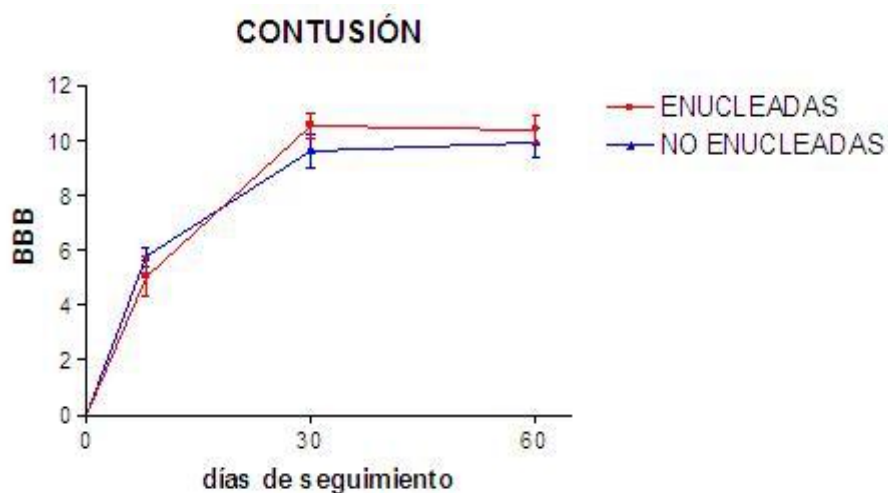


**Figura 4: Análisis de la presencia del factor transcripcional SOX-2 en ratas enucleadas y no enucleadas dos meses después de una lesión medular.** Cuantificación por medio de inmunofluorescencia. \*\*  $p < 0.05$ . Método estadístico: T student.

**Las ratas enucleadas no muestran una mejoría de los niveles de recuperación motriz post-lesión medular**

Después de evaluar la conducta motriz de los grupos de ratas adultas control o enucleadas al nacimiento, a los 7, 30 y 60 días después de ser sujetas a un procedimiento de contusión, los puntajes obtenidos por los animales pertenecientes a ambos grupos fueron equivalentes en todos los puntos temporales analizados. Tampoco se observó una mejoría cualquiera de los grupos con el paso del tiempo (Fig. 5).

**FIGURA 5**



**Figura 5: Evaluación de la recuperación motora en animales enucleados y no Enucleados con contusión medular por medio de la escala BBB.**

## Discusión

Las lesiones de la médula espinal conducen a un estado de disfuncionalidad motriz asociado a la falta de regeneración neuronal. Este hecho resulta de la existencia de un ambiente poco propicio para el rebrote axonal en parte causado por la inflamación orquestada por células del sistema inmune. En las fases tardías, sin embargo, las células inmunes promueven la expresión de factores pro-regenerativos neurales (45, 46, 47, 53). Debido a que estudios previos han mostrado que la exposición anticipada a antígenos neurales mejora las posibilidades de regeneración neuronal ante un daño subsecuente, es posible que uno de los mecanismos que subyace a esta circunstancia sea que la exposición anticipada a antígenos neurales mejore la producción de factores pro-regenerativos durante la segunda lesión. En este trabajo evaluamos esta posibilidad utilizando a la enucleación neonatal como medio para exponer al sistema inmune a antígenos neurales de manera temprana durante el desarrollo, bajo la premisa de que dicha instrucción permitiría mejorar las habilidades regenerativas neuronales en la vida adulta. Dicha mejoría sería el resultado de un incremento en la producción de factores neurales pro-regenerativos en las ratas enucleadas.

En concordancia con la hipótesis, nuestros resultados muestran que la enucleación conduce a un incremento en el área ocupada por elementos celulares inmunoteñidos para NT3, NT4, BDNF y GAP-43 en cortes de la médula espinal de ratas enucleadas al nacimiento, y lesionadas cuando adultas, al ser comparadas con ratas lesionadas pero no sujetas a enucleación o con ratas control intactas. Sorprendentemente, no obstante este hallazgo, la recuperación motriz de las ratas enucleadas no difiere de la observada en los animales lesionados con visión intacta ni en el corto ni en el largo plazo.



Estos resultados apoyan que si bien la enucleación neonatal pudiese “cebar” a los sistemas nervioso e inmune para incrementar la disponibilidad de factores pro-regenerativos durante la fase aguda de inflamación asociada a una lesión nerviosa subsecuente infringida en la vida adulta, la reprogramación no parece ser suficiente para asegurar una mejora de los procesos regenerativos. En apoyo a esta idea está el hecho de que los cambios observados a los 7 días post-lesión, no perduran por un tiempo prolongado ya que a los 60 días dichas diferencias desaparecen. No obstante esta dificultad, los datos obtenidos podrían indicar que la producción exacerbada de neurotrofinas y GAP-43 observada en las ratas enucleadas después de la lesión medular, tiene un efecto de neuroprotección incrementada. Estudios dirigidos a la cuantificación de neuronas viables en la zona de lesión podrían ayudar a evaluar esta posibilidad.

En la rata, el nervio óptico termina su proceso de mielinización después de los 10 días de vida postnatal. Se sabe que proteolípidos derivados de la mielina son los principales agentes inmunogénicos durante los procesos degenerativos neurales post-lesión. De esta manera, quizás el hecho de que la enucleación se haya realizado neonatalmente, es la explicación del porque no se observa una respuesta de reprogramación neuroinmunológica pro-regenerativa más efectiva y sostenida en las ratas enucleadas; a esta edad el nervio óptico es esencialmente amielínico. En este contexto, sería importante realizar experimentos en los que la enucleación se realice en edades más tardías una vez mielinizado el nervio óptico, o bien, que utilicen extractos de nervio óptico mielinizados y en proceso de degeneración para inmunizar ratas jóvenes que luego pudiesen ser sujetas contusiones medulares en la vida adulta. Adicionalmente, En roedores, el sistema inmune madura sus respuestas adaptativas en los primeros días de vida.

Quizás la inmunización anticipada con antígenos neurales debería hacerse en edades en las que el sistema inmune desarrolla una respuesta adaptativa madura. Experimentos futuros deberán evaluar esta posibilidad.

La médula espinal adulta posee pocas células troncales neurales. De hecho, aunque *in vitro* el epitelio endimario/subendimario medular muestra potencialidad neurogénica, dicha característica no se presenta *in vivo*, condición en la que las escasas células troncales existentes dan origen predominantemente a células gliales. Aunque nuestros experimentos no evaluaron directamente la formación de neuronas o células gliales nuevas en las ratas control o enucleadas al nacimiento, y contundidas en la médula espinal cuando adultas, el hecho de que se haya observado un incremento en la inmunotinción para SOX-2 en el epitelio endimario/subendimario perilesional acompañado de una falta de recuperación funcional en ambos grupos de ratas lesionadas, sugiere que la lesión incrementa la proliferación de precursores neurales que se diferencia hacia células del linaje glial; la cicatriz glial inhibe la regeneración axonal y por tanto la recuperación funcional. En este sentido, la enucleación parece no afectar esta respuesta celular pues no se observaron diferencias entre los grupos de ratas contundidas sujetas o no a enucleación neonatal.



## **Conclusiones**

- La enucleación al nacimiento induce una mayor expresión de NT3, NT4, BDNF y GAP43, 7 días después de infringida una lesión en medula espinal en la vida adulta.
- No existe una diferencia significativa en la proliferación de células madre entre ratas enucleadas y ratas no enucleadas después de una lesión medular, aunque si entre éstas con el grupo control intacto.
- No se observó una diferencia en la recuperación motora entre las ratas enucleadas y no enucleadas.
- Las neurotrofinas y el GAP-43 no son los únicos elementos requeridos para lograr una recuperación exitosa después de una lesión en la médula espinal.

## BIBLIOGRAFIA

1. - William E. Paul; Fundamental Immunology; Ovid Technologies; Quinta Edición 2003.
2. - Abul K. Abbas, Andrew H. Litchman; "Basic immunology, functions and Disorders of the immune system".
3. - Arthur C. Guyton; "Anatomía y Fisiología del sistema nervioso: Neurociencia Básica".
- 4.- Valadez J., "Neuroanatomia Funcional: Manual Básico"; 2008.
5. - Koeberle D. Paulo, Bähr Mathias; "Growth and guidance cues for Regenerating Axons: Where have they gone?" , 2003.
6. - Graham V., Khudyakov J., Ellis P., Pevny L., "SOX2 Function to maintain neural progenitor identity", 2003.
7. - Pevny L., Placzek M., " SOX genes and neural progenitor identity"; 2005.
8. - Viktor Hamburger; "Neurotrophic Factors", 1934.
9. - Huang J. Erick and Reichardt F. Louis; "Neurotrophins: roles in neuronal Development and function".
10. - Hefti, Denten Krusel y Lapchak; "Neurotrophic Factors", Purves 1998
11. - Albers K.M., Perrone T.N., Goodness T.P., " Cutaneous Overexpression of NT3 increases sensory and sympathetic neurons number and enhances touch dome and hair follicle innervations", 1996.
12. - Elshamy W.M., Ernfors P., " A local action of neurotrophin-3 prevents the death of proliferating sensory neuron precursor cells", 1996.
13. - Ohtsuka, Furukawa 2008.
14. - Stucky C.L., Dechiara T., Lindsay R.M., " Neurotrophin 4 is required for the survival of a subclass of hair follicle receptors", 1998.
15. - Stucky C.L., Jung-bum S., Lewin G.R., "Neurotrophin- 4: A survival factor for adult sensory neurons", 2002.
16. - Carroll P., Lewin G. R., Koltzenburg M., Toyka K. V., Thoenen H., "A role for BDNF in mechanosensation", 1998.
17. - Heymach John, Barres A Barbara; Neurotrophins moving forward"
18. - Lu bai, Pang and Newton; "The Ying and Yang of neurotrophins action"
19. - Chao V. Moses; "Neurotrophins and their receptors: a convergent point for Many signaling pathways".
20. - Huang J. Erick and Reichardt F. Louis;"Trk Receptors: roles in neuronal Signal transduction".
21. - Ramon y Cajal, S (1972) Histologie du Systeme Nerveux de l'homme et des vertebres (Vol.II), pp. 888-889, Consejo superior de investigaciones científicas.
22. - Skene, J.H.P (1998) Ann. Rev. Nuerosci.12, 127-156.
23. - Benowitz, L.I., Perrone Bizzozero, N.I. (1991) Prog. Brain Res. 89, 69-87.
24. - Soto Ileana *et al*; "FGF-2 Modulates Expresion and Distribution of GAP-43 In Frog Retinal Ganglion Cells After Optic Nerve Injury"; 2003.
25. - Burry R.W; Lah JJ, Hyes DM, "GAP-43 distribution is correlated with Development of growth cones and presynaptic terminals"; 1992.
26. - Chapman E.R. *et a*.; J. Biol. Chem. 266, 207-213, (1991).

27. - Benowitz L.I, Routtenberg A.; GAP-43: "An intrinsic determinant of Neuronal development and plasticity", 1997.
28. - Widmer F. and Caroni P.; J. Cell: Biol. 1993.
29. - Schnell L; Klassen H; "Acute inflammatory responses to mechanical lesions In the CNS: differences between brain and spinal cord", 1999.
30. - Kigerl K.A., Mcgaughy V.M., Popovich P.G.; "Comparative analysis of lesion development and intraspinal inflammation in four strains of mice following spinal contusion injury"; 2006.
31. - Noble L.J., Wrathall J.R.; "Distribution and time course of protein extravasation in the rat spinal cord after contusive injury"; 1989.
32. - Popovich P.G., Horner P.J., Mullin B.B., Stokes B.T.; "A quantitative spatial analysis of the blood-spinal cord barrier, permeability changes after experimental spinal contusion injury"; 1996.
33. - Beattie M.S.; Hermann G.E., Rogers R.C., Bresnahan J.C., "Cell death in models of spinal cord injury", 2002.
34. - Young W., "Spinal cord contusions models", 2002.
35. - Cotran R.S., Kumar V., Collins T., "Cellular pathology I: cell injury and cell death"; 1999.
36. - Doble A., "The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy"; 1999.
37. - Beattie M.S., Farooqui A.A., Bresnahan J.C., "Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury"; 2000.
38. - Bannister L.H.; "Connective tissues, Gray's Anatomy" pp. 75-90.
39. - Popovich P.G., Jones T.B.; "Manipulating neuroinflammatory reactions in the injury spinal cord: back to basics", 2003.
40. - Allan S.M, Rothwell N.J.; "Cytokines and acute neurodegeneration", 2001.
41. - Kitamura M., "Identification of an inhibitor targeting macrophage production of monocyte chemoattractant protein-1 as TGF-beta 1", 1997.
42. - Carlson S.L., Parrish M.E., Springer J.E.; "Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury", 1998.
43. - Leskova A., Moriarty L. J., "The macrophage in acute neural injury: changes in cell numbers over time and levels of cytokine production in mammalian central and peripheral nervous systems", 2000.
44. - Unanue E.R., Allen P.M.; "The immunoregulatory role of the macrophage", 1987.
45. - Vega J.A., García- Suarez O., Germana A.; "Neurotrophins and the immune system", 2003.
46. - Samah B., Porcheray F., Gras G.; "Neurotrophins modulate monocyte Monocyte chemotaxis without affecting macrophage function", 2007.
47. - Elkabes E. Emanuel M.; "Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function", 1996.
48. - Martinez E., "Evaluación de la plasticidad periférica en ratas ciegas", 2004, Departamento de biología celular y fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

49. - Fitzgerald M; Bartlett C; Evill L; Rodger J; "Secondary degeneration of the Optic nerve following partial transection: The benefits of lomerizine", 2008.
50. - Fleming J.C., Norenberg M.D., Ramsay D.A., Dekaban G.A., Marcillo A. E., "The Cellular inflammatory response in human spinal cords after injury", 2006.
51. - Donnelly D.J., Popovich P. G., "Inflammation and its role in neuroprotection, Axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury", 2007.
52. - Lemons M.L., Howland D.R., Anderson D.K., "Chondroitin sulfate Proteoglycan immunoreactivity increases following spinal cord injury and Transplantation", 1999.
53. - Kerschensteiner M., Gallmeier E., Behrens L., " Activated human T cells, B cells, And monocytes produce Crain-derived neurotrophic factor in vitro and in Inflammatory brain lesions: A neuroprotective role of inflammation? ", 1999.
54. - Bisby M. A., "Dependence of GAP-43(B50, F1) transport on axonal Regeneration in rat dorsal root ganglion neurons", 1988.