



Roxana Haydee Rodríguez Barrera
Centro de Investigación en Ciencias de la Salud
haydeeroba@hotmail.com



Karla Soria Zavala
Centro de Investigación en Ciencias de la Salud
kasz11@hotmail.com



Adrián Flores Romero
Centro de Investigación en Ciencias de la Salud
adrianmvz@yahoo.com.mx



Edna Elisa García Vences
Centro de Investigación en Ciencias de la Salud
edetisa81@gmail.com



Antonio Ibarra
Centro de Investigación en Ciencias de la Salud
iantonio65@yahoo.com

Introducción

La lesión de médula espinal induce un conjunto de eventos autodestructivos y cambios en la expresión génica de citocinas que generan un microambiente no permisivo por el incremento de la inflamación e interrupción de los procesos de regeneración. Durante la lesión crónica de médula espinal (LCME), la continua desregulación de la expresión génica de citocinas pro-inflamatorias exacerba la respuesta autorreactiva, potenciando la degeneración del tejido neural. Se han diseñado estrategias para contrarrestar estos efectos. Una es la Inmunización con Péptidos Neurales Modificados (IPNM), como el A91, que promueve la modulación del microambiente incrementando la expresión de citocinas anti-inflamatorias en fases crónicas. Asimismo, se ha demostrado que la remoción de cicatriz (RC) y trasplante de células troncales mesenquimales (CTM) modulan este microambiente de daño; sin embargo, se desconoce si la IPNM en combinación con éstas (RC y el trasplante de CTM) pueden potenciar su efecto restaurador en la fase crónica. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión génica de citocinas en ratas con LCME, tratadas con la estrategia de combinación.

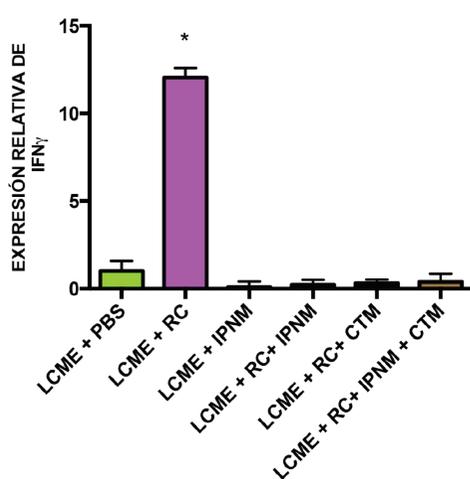


Figura 1. Análisis de la expresión de INF- γ en ratas con LCME, después de la terapia de combinación. Los animales con LCME + PBS fueron usados como controles y la normalización fue llevada a cabo usando el método 2- $\Delta\Delta$ ct. Se observó un incremento significativo en la expresión de INF- γ en el grupo de remoción de cicatriz en comparación con el grupo control sin ningún tratamiento. (* $p < 0.05$ vs grupo sin ningún tratamiento).

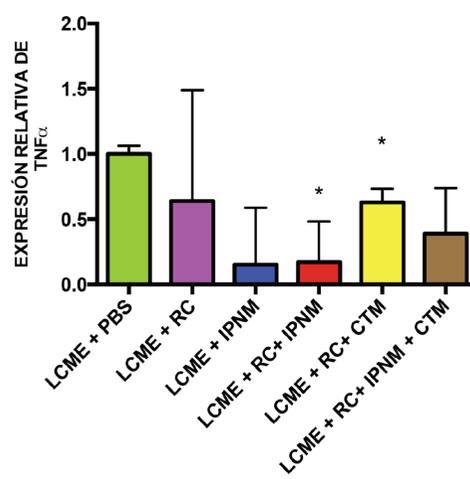


Figura 2. Análisis de la expresión de TNF- α en ratas con LCME, después de la terapia de combinación. Los animales con LCME + PBS fueron usados como controles y la normalización fue llevada a cabo usando el método 2- $\Delta\Delta$ ct. Se observó una disminución significativa en la expresión de TNF- α en los grupos de LCME+RC+IPNM y LCME+RC+CTM en comparación con el grupo control sin ningún tratamiento. (* $p < 0.05$ vs grupo sin ningún tratamiento).

Material y Método

El experimento consistió en la evaluación de la expresión génica de las citocinas: INF- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 y TGF β -3 mediante PCR-TR, dos meses después de la aplicación de la terapia de combinación en 24 ratas de la cepa *Sprague Dawley* sometidas a LCME por contusión moderada. Los grupos se distribuyeron aleatoriamente de la siguiente manera: grupo 1: LCME + PBS; grupo 2: LCME + RC; grupo 3: LCME + IPNM; grupo 4: LCME + RC + IPNM; grupo 5: LCME + RC + CTM; grupo 6: LCME + RC + IPNM + CTM.

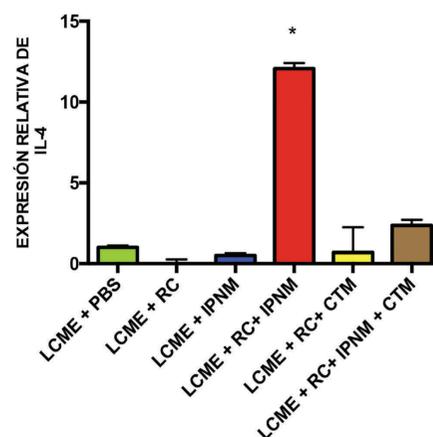


Figura 3. Análisis de la expresión de IL-4 en ratas con LCME, después de la terapia de combinación. Los animales con LCME+PBS fueron usados como controles y la normalización fue llevada a cabo usando el método 2- $\Delta\Delta$ ct. Se observó un incremento significativo en el grupo de LCME+RC+CTM en comparación con el control sin ningún tratamiento. (* $p < 0.05$ vs grupo sin ningún tratamiento).

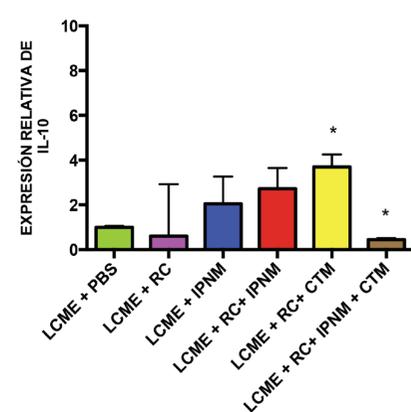


Figura 4. Análisis de la expresión de IL-10 en ratas con LCME, después de la terapia de combinación. Los animales con LCME+PBS fueron usados como controles y la normalización fue llevada a cabo usando el método 2- $\Delta\Delta$ ct. Se observó un incremento significativo en el grupo de LCME+RC+CTM en comparación con el control sin ningún tratamiento. (* $p < 0.05$ vs grupo sin ningún tratamiento).

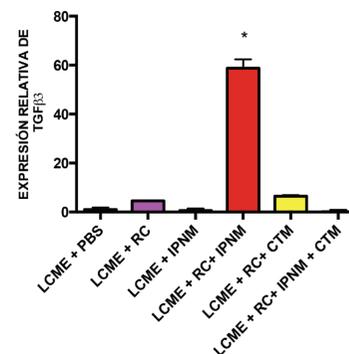


Figura 5. Análisis de la expresión de TGF β 3 en ratas con LCME, después de la terapia de combinación. Los animales con LCME+PBS fueron usados como controles y la normalización fue llevada a cabo usando el método 2- $\Delta\Delta$ ct. Se observó un incremento significativo en el grupo de LCME+RC+IPNM en comparación con el grupo control sin ningún tratamiento. (* $p < 0.05$ vs grupo sin ningún tratamiento).

Resultados

Los resultados demostraron que la expresión génica de INF- γ presentó un incremento significativo en el grupo de RC, comparada con el grupo control. En el tercer grupo (RC+ IPNM) se observó que TNF α disminuyó significativamente, mientras que la expresión de IL4 y TGF β 3 incrementó de manera significativa con respecto al grupo control. Por último, la expresión relativa de IL10 se encontró disminuida de manera significativa en el grupo de RC + IPNM + CTM, y aumentada en el grupo de RC + CTM al compararla con el grupo control.

Conclusión

Estos hallazgos sugieren que la IPNM en conjunto con la RC incrementa la expresión de genes anti-inflamatorios como IL4 y TGF β 3 y disminuye los de tipo pro-inflamatorios como TNF α , promoviendo la modulación del microambiente no permisivo que propicia los procesos de regeneración. Sin embargo, esto no se presenta en la terapia de combinación, debido probablemente a la ausencia de sinergia entre la IPNM y CTM. Más estudios serán requeridos para profundizar los mecanismos inmunológicos de la terapia.

Referencias

1. Beck KD, Nguyen HX, Galvan MD, Salazar DL, Woodruff TM, Anderson AJ. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain*, 2010;133:433-47.
2. Rodríguez-Barrera R, Flores-Romero A, Fernández-Presas AM, García-Vences E, Silva-García R, et al. Immunization with neural derived peptides plus scar removal induces a permissive microenvironment, and improves locomotor recovery after chronic spinal cord injury. *BMC Neuroscience*, 2017;18(1):7.

3. Ishi H, Tanabe S, Ueno M, Kubo T, Serada S, Fujimoto M, et al. IFN- γ dependent secretion of IL-10 from Th1 cells and microglia/macrophages contributes to functional recovery after spinal cord injury. *Cell death and disease* 2003;1:1-9.
4. Nauta A, Fibbe W. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, 2007;110:3499-3506.
5. Quertainmont R, Cantinieux D, Botman O, Sid S, Schoenen J, Franzen R. Mesenchymal Stem Cell Graft Improves Recovery after Spinal Cord Injury in Adult Rats through Neurotrophic and Pro-Angiogenic Actions. *PlosOne* 2012;7(6):1-15.
6. Walsh JT, Hendrix S, Boato F, Smirnov I, Zheng J, Lukens JR, et al. MHCII-independent CD4+ T cells protect injured CNS neurons via IL-4. *The Journal of Clinical Investigation* 2015;125(2):699-714.