



## Uso de péptidos neurales modificados como tratamiento de una lesión en la médula espinal: una vision general

### Use of neural-derived peptides as therapy for spinal cord injury: an overview

Recibido: 28 de mayo de 2015, aceptado: 8 de julio de 2015

*Paola Suárez-Meade*<sup>\*1</sup>, *Emanuel Malagón-Axotla*<sup>\*2</sup>, *Emma Herrera Martínez*<sup>\*3</sup>, *Antonio Ibarra Arias*<sup>\*,\*\*4</sup>

\*Universidad Anahuac México Norte. \*\*Centro de Investigación del Proyecto "Camina A.C."

#### Resumen

La lesión de la médula espinal (LME) es un fenómeno que daña al sistema nervioso central (SNC), y produce la pérdida de la actividad fisiológica por debajo del sitio de la lesión. Actualmente no existe algún tratamiento efectivo para la LME en el campo clínico. El papel del sistema inmune a través de la autorreactividad protectora (AP) —un fenómeno fisiológico desarrollado después de la LME— puede ser de gran importancia para inducir neuroprotección. La AP puede estimularse con el uso de péptidos neurales modificados (PNM) procedentes de componentes neurales como la proteína básica de la mielina.

El presente artículo pretende dar una visión general de esta estrategia terapéutica innovadora que ofrece efectos benéficos y un futuro muy alentador. Se revisará el fundamento, los mecanismos y los hallazgos preclínicos más importantes utilizando el PNM A91. Finalmente, se comentarán los obstáculos a vencer para su aplicación clínica.

*Palabras clave:* lesión de médula espinal, ligadura de peptídico modificado, neuroprotección, autorreactividad protectora, inmunomodulación.

#### Abstract

Spinal cord injury (SCI) is a phenomenon that damages the central nervous system (SNC) causing the loss of physiological activity beneath the injured area. Currently, no effective treatment exists against SCI in the clinical field. The role of the immune system through protective autoimmunity (PA) -a physiological phenomenon developed after SCI- could be of great relevance to induce neuroprotection. PA can be stimulated by using neural-derived peptides (NDP), obtained from neural constituents like myelin basic protein.

This article attempts to provide an overview of this innovative therapeutic strategy, which offers benefits and an encouraging future. The most relevant basic principles, mechanisms and preclinical outcomes using the NDP A91 will be revealed. Finally, clinical obstacles to surpass will be stated.

*Keywords:* spinal cord injury, neural-derived peptide, neuroprotection, protective autoimmunity, immunomodulation.

## INTRODUCCIÓN

La lesión de médula espinal (LME) implica una discapacidad neurológica. El daño o trauma en esta región anatómica genera la pérdida o alteración de la función motora, sensorial y autonómica. Dependiendo de la gra-

vedad del trauma, el daño en la médula espinal deviene parálisis por debajo del sitio de la lesión, lo que lleva a los pacientes a una vida de comorbilidad médica. De acuerdo con el Centro Nacional de Estadística de los

<sup>1</sup> Estudiante de la carrera de Médico Cirujano, investigador asociado al Centro de Investigación en Ciencias de la Salud (Cicsa), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Anahuac México Norte. Líneas de investigación: Estrategias de neuroprotección y neurorestauración en modelos de lesión de médula espinal. Correo electrónico: paosmeade@gmail.com.

<sup>2</sup> Médico de servicio social en investigación, investigador asociado al Cicsa. Líneas de investigación: Estrategias de neuroprotección y neurorestauración en modelos de lesión de médula espinal. Correo electrónico: maedcatavicam@gmail.com

<sup>3</sup> Doctora en Biotecnología, coordinadora de la licenciatura en Biotecnología e Investigadora titular del Cicsa. Líneas de Investigación: Desarrollo de péptidos modificados; interacción agentes patógenos-hospedero, y desarrollo de estrategias terapéuticas para enfermedades neurodegenerativas. Correo electrónico: emma.herrera@anahuac.mx

<sup>4</sup> Autor jefe del grupo. Doctor en Ciencias de parte del Cicsa. Líneas de investigación: Estrategias de neuroprotección y neurorestauración en modelos de lesión de médula espinal e isquemia cerebral focal, estrategias terapéuticas para el deterioro cognitivo, e inmunomodulación y nutrición clínica. Correo electrónico: iantonio65@yahoo.com; jose.ibarra@anahuac.mx

Estados Unidos (National Spinal Cord Injury Statistical Center [NSCSC], 2013), más de 273 mil personas sufrían LME en 2013, y la incidencia aproximada era de más de 12 mil casos nuevos cada año. En México, se estimó una prevalencia de 18.1 por cada millón de habitantes (Pérez e Ibarra, 1998). Las principales causas de LME son los accidentes automovilísticos, las caídas, y heridas por proyectil de arma de fuego. El tratamiento clínico se centra solamente en la prevención de un daño mayor, con el uso de metilprednisolona (MP), un glucocorticoide sintético con propiedades antiinflamatorias. Los estudios del National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS) —estudio que proporcionó las bases para el uso de la MP— sugieren que una dosis alta de MP es eficaz para el tratamiento de LME aguda. Sin embargo, los estudios que han intentado reproducir estas investigaciones, indican que los resultados son cuestionables (Hulbert, 2000, 2014).

Aunque algunos estudios han sugerido que el tratamiento con MP reduce el daño celular y los eventos secundarios a la lesión, la administración de altas dosis (tratamiento sugerido) conlleva al desarrollo de efectos secundarios que ponen en riesgo la vida del paciente (Rhen y Cidlowski, 2005). Por lo anterior, la administración de MP es cada día menos recomendada. Sin duda alguna, la escasa disponibilidad de tratamientos para la LME en el campo clínico hace clara la necesidad de diseñar terapias nuevas y seguras para los pacientes lesionados.

El propósito de este artículo es presentar la visión general de una nueva estrategia terapéutica basada en la inmunomodulación. Esta terapia utiliza péptidos neurales modificados (PNM) para estimular el efecto benéfico de una respuesta autorreactiva desarrollada después de una LME. Como tratamiento innovador, ha despertado el interés de diversos investigadores y ha mostrado ser una estrategia con gran versatilidad al promover neuroprotección y neurorestauración en modelos experimentales. Uno de los PNM utilizados con mayor éxito para esta terapia es el A91, un péptido derivado de la proteína básica de la mielina (PBM).

Después de más de una década de trabajo con A91, los estudios han demostrado que este péptido, además de promover neuroprotección, también incrementa la recuperación motora (Ibarra *et al.*, 2004; Martiñón *et al.*, 2007; García *et al.*, 2012; Rodríguez-Barrera *et al.*, 2013; Ibarra *et al.*, 2010; Ibarra *et al.*, 2013). El éxito de esta

terapia en modelos animales abre un panorama muy prometedor para su aplicación a nivel clínico.

## FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL

El daño a la médula espinal se caracteriza por tres fases que se producen después de la lesión (Hulsebosch, 2002). Durante la fase aguda, hay una lesión primaria inicial (provocada por el propio mecanismo de lesión: contusión, compresión, laceración, etc.) en la que se interrumpe la conducción axonal y se origina un daño irreversible al tejido medular (Rowland *et al.*, 2008). El daño vascular provoca isquemia, edema, desequilibrio iónico y la filtración de células inmunes en el sitio de la lesión (Sekhon y Fehlings, 2001; Silva *et al.*, 2014). Como consecuencia de la lesión primaria, se activa una compleja cascada de reacciones bioquímicas que inician minutos después de la lesión y duran varias semanas. Estos eventos provocan un mayor daño al tejido neural y son la causa de lo que se conoce como “la lesión secundaria” (Park, Velumian y Fehlings, 2004; Xu *et al.*, 2005; Xiong, Rabchevsky y Hall, 2007; Adibhatla y Hatcher 2008). La formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), la peroxidación lipídica, la excitotoxicidad y la alteración de la homeostasis iónica son parte de estos eventos secundarios de lesión. Finalmente, la fase crónica de la LME se caracteriza por el incremento de la lesión secundaria. Los mecanismos como la desmielinización, la formación de cicatriz glial y la respuesta inmune contra componentes del SNC son parte de los fenómenos que se llevan a cabo durante esta fase y que afectan una posible recuperación funcional (Rolla, Shechter y Schwartz, 2009; Amor *et al.*, 2010).

Después de un traumatismo, se produce una cascada de reacciones inmunológicas en el sitio de la lesión. La activación de la microglia, la síntesis de citocinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6), quimiocinas, y la infiltración de leucocitos periféricos al sitio de la lesión caracterizan la respuesta inflamatoria observada después de una LME (Hausmann, 2003; Schwab *et al.*, 2014). La intensa proliferación de astrocitos, la expresión de moléculas de adhesión y de citocinas proinflamatorias y la intensa extravasación de neutrófilos y monocitos en el tejido lesionado, promueven un microambiente deletéreo y un mayor daño a la médula espinal (Pineau *et al.*, 2010; Mawhinney *et al.*, 2012; Greenhalgh y David,

2014). Subsecuentemente, la muerte celular a través de apoptosis está controlada por diversos mecanismos en los que intervienen diversas moléculas como el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (complejo proteico que controla la transcripción del ADN). Esta molécula promueve la apoptosis mediante la activación de caspasas. De esta forma, la inflamación desempeña un papel importante en el daño al tejido neural (Crowe *et al.*, 1997; Bethea *et al.*, 1998).

Por todo lo anterior, diversos grupos de investigación en el mundo exploran diferentes estrategias que prevengan el daño al tejido neural y, con ello, evitar una mayor pérdida de la función neurológica. Las investigaciones han revelado estrategias terapéuticas dirigidas a las fases secundarias y crónicas (Meurer y Barsan, 2014). Una de estas estrategias se basa en la modulación del sistema inmune a través de la inmunización con péptidos neurales modificados. La autorreactividad protectora —como se la ha denominado a esta estrategia— ha mostrado resultados alentadores en modelos de LME.

### AUTORREACTIVIDAD PROTECTORA

Como se ha mencionado, después de una LME se desencadena la actividad del sistema inmune. Siempre se pensó que esta activación era un factor deletéreo y que la infiltración de células inmunes en el sitio de la lesión era un fenómeno patológico, sin embargo, los hallazgos recientes indican que la llegada de estas células al sitio de lesión no es necesariamente un evento dañino, sino que, incluso, es un fenómeno destinado a proteger el tejido neural. Diferentes estudios han demostrado que las células inmunes tienen un papel esencial en la protección y regeneración de la médula espinal (Schwartz y Cohen, 2000; Yoles *et al.*, 2001; Ibarra *et al.*, 2004; Mestre e Ibarra, 2011). Este fenómeno de protección tisular a través de la actividad del sistema inmune se ha denominado “autorreactividad protectora” (AP), y es un mecanismo por el cual las células encargadas de la respuesta inmune adaptativa (específicamente aquellas que reconocen constituyentes propios) ayudan a mantener la integridad del tejido y a promover la regeneración. El sistema inmune tiene un papel muy importante en el proceso de restauración, la angiogénesis y la regeneración de tejidos, y, cuando es modulada su función, tiene la capacidad de promover protección tisular y una mejor recuperación

funcional en el SNC lesionado (Schwartz *et al.*, 1999).

La AP está controlada genéticamente, es decir, puede ser más o menos eficiente dependiendo del fondo genético de cada individuo (Kipnis *et al.*, 2001). Adicionalmente, se ha demostrado que es un fenómeno fisiológico capaz de proporcionar neuroprotección en varias enfermedades neurodegenerativas (Yoles *et al.*, 2001; Kipnis *et al.*, 2001, 2003; Angelov *et al.*, 2003). Sin embargo, en condiciones normales, el efecto benéfico de la AP se ve ensombrecido por la acción destructora generada como consecuencia de la intensa respuesta inflamatoria desencadenada después de una LME. Actualmente, se sabe que se puede incrementar la eficacia de la AP mediante la inmunización con proteínas que forman parte del tejido lesionado y que, además, son parte de los antígenos que inducen la respuesta autorreactiva en el sitio de la lesión. En relación con esto, diferentes investigadores han demostrado el efecto benéfico de la AP mediante la transferencia pasiva de células T específicas para la PBM. Esta estrategia redujo el daño neuronal después de la lesión en ratas con LME (Hauben *et al.*, 2000; Kipnis *et al.*, 2002). Sus estudios revelaron que la presencia de células autorreactivas, en el momento y cantidad adecuados, son de gran beneficio para el tejido lesionado.

Considerando las observaciones anteriores, queda de manifiesto que el principal problema para que la AP ejerza su acción protectora es la forma disminuida y tardía en que se desarrolla después de la lesión. Por tal razón, la forma de hacerla más eficiente es estimulando la proliferación y migración de estas células inmunes específicas al sitio de lesión de una manera más rápida y amplificada. Una forma simple de lograr esto es activando la respuesta mediante la inmunización con los mismos constituyentes del sistema nervioso (Schwartz y Raposo, 2014). Esta estrategia es capaz de activar la proliferación y migración de las células inmunes —antígeno específicas— de forma rápida y en cantidades suficientes para desarrollar su efecto protector. De esta manera la AP puede ser capaz de modular la respuesta inflamatoria y promover protección al tejido neural lesionado (Schwartz *et al.*, 1999; Barouch y Schwartz, 2002; Aharoni, Arnon y Eilam, 2005).

La estrategia de inmunización con péptidos neurales modificados, usada con la finalidad de modular la respuesta inmune, ha sido estudiada en ratas con encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) —modelo animal de

la esclerosis múltiple— demostrando la disminución e incluso eliminación de la patología (Gaur *et al.*, 1997). Sin embargo, la inmunización con constituyentes neurales, específicamente con PBM, presenta el riesgo de inducir una enfermedad autoinmune como la EAE en la rata, o la esclerosis múltiple en el humano (Sakai *et al.*, 1988a, 1988b). Con la finalidad de estimular el efecto benéfico de la AP y, al mismo tiempo, eliminar el riesgo de inducir una enfermedad autoinmune, se propuso el uso de péptidos neurales modificados (PNM) (Nicholson *et al.*, 1995; Hauben *et al.*, 2001a).

Los PNM son péptidos sintéticos con sustituciones de aminoácidos en sitios críticos de interacción con el receptor de las células T (TRC, del inglés “*T cell receptor*”; Windhagen *et al.*, 1995). Estas sustituciones convierten a los PNM en péptidos parcialmente agonistas, o incluso antagonistas, afectando su unión al TRC y originando una desviación de la respuesta inmune (Nicholson *et al.*, 1995; Evavold y Allen, 1991).

Los PNM pueden causar la activación de linfocitos T hacia un estado antiinflamatorio, o bien, originar la anergia de los mismos. La PBM —proteína original del SNC— interactúa con el TRC como un péptido agonista a través de sus secuencias peptídicas más inmunogénicas, esto provoca una respuesta predominantemente inflamatoria, es decir, con un perfil de citocinas predominantemente Th1 (Jameson y Bevan, 1995; Nel, 2002; Mestre e Ibarra, 2011). Los PNM pueden modificar directamente la respuesta inmune al realizar un cambio de perfil de Th1 (proinflamatorio) a Th2 (antiinflamatorio), disminuyendo el efecto dañino de la respuesta inflamatoria. Esta modulación de la respuesta inmune ha podido promover la protección del tejido de la médula espinal y una recuperación motora de las extremidades en ratas con LME (Hauben *et al.*, 2001b; Mestre e Ibarra, 2011). Al cambiar el fenotipo predominante de Th1 a Th2, los PNM modulan la respuesta inmune y pueden ser una buena alternativa terapéutica para el tratamiento de la LME y de otras enfermedades neurodegenerativas.

## DESARROLLO DE UNA VACUNA PRECLÍNICA

Una forma segura (sin posibilidad de promover enfermedad autoinmune) de impulsar la actividad de la AP es mediante la inmunización con PNM (Hauben *et al.*, 2001a). Para obtener un PNM a partir de la PBM es neces-

rio identificar, en dicha proteína, los determinantes más inmunogénicos. La secuencia de aminoácido 87 a 99 de la PBM es la más inmunogénica y resulta esencial para el reconocimiento del TRC en respuestas autorreactivas contra constituyentes neurales (Yu, Johnson y Tuohy, 1996; Tuohy *et al.*, 1998). Esta secuencia fue utilizada para obtener diversos PNM y evaluar la respuesta inmune que estos generaban (Gaur *et al.*, 1997). Los péptidos fueron obtenidos mediante la sustitución de cada aminoácido con una alanina, alterando la secuencia del determinante antigénico inductor de la respuesta de células T (Karin *et al.*, 1994; Gaur *et al.*, 1997). Es importante comentar que la lisina en la posición 91 de la secuencia p87-99 contribuye a desencadenar una respuesta inmune con perfil de citocinas Th1 (proinflamatorio) (Karin *et al.*, 1994). La sustitución de esa lisina por una alanina en la posición 91 (PNM A91) contrarresta la producción de citocinas proinflamatorias y genera un perfil totalmente antiinflamatorio (Gaur *et al.*, 1997; Vergelli *et al.*, 1997; Yoles *et al.*, 2001). Por lo anterior y con el fin de encontrar una opción terapéutica para la LME y otras enfermedades neurodegenerativas, se ha propuesto este PNM como posible estimulador de la AP.

El A91 (secuencia de aminoácidos: VHFFANIVTPRTP) es un péptido sintético no encefalitogénico —es decir, sin posibilidad de inducir una enfermedad autoinmune—, que es capaz de inhibir, incluso, el desarrollo de la EAE (Karin *et al.*, 1994; Gaur *et al.*, 1997; Eisenbach y Hauben, 2004). El A91 ha demostrado ser muy efectivo como péptido agonista parcial del TRC, capaz de modular la respuesta inmune. Se sabe que las células T CD4<sup>+</sup> auto-reactivas secretan citocinas proinflamatorias Th1, tales como el interferón gamma (INF $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ) (Martíñon *et al.*, 2012). Sin embargo, la inmunización con A91 disminuye los niveles de estas citocinas e incrementa las correspondientes al perfil Th2 (IL-4 e IL-10) con propiedades antiinflamatorias (Karin *et al.*, 1994; Willenborg y Staykova, 2003; Martíñon *et al.*, 2012).

El tratamiento con el péptido A91 consiste en una inmunización subcutánea que es una ruta de administración mínimamente invasiva y altamente eficaz. Estudios previos en modelos experimentales han demostrado que la dosis única de A91 a una concentración de 150 a 200  $\mu$ g es suficiente para promover neuroprotección y recuperación motora de las extremidades posteriores de



ratas con LME (Hauben *et al.*, 2001b; Ibarra *et al.*, 2004; Martiñón *et al.*, 2012; Rodríguez-Barrera *et al.*, 2013). A pesar de lo anterior, aún se deben analizar diversos parámetros como el tipo de adyuvante y el esquema de dosificación para pensar en la aplicación de esta vacuna en seres humanos. En el curso de este objetivo, estudios en animales han revelado que una doble inmunización con A91 elimina el efecto benéfico de la vacuna. También se ha demostrado que la inmunización con A91 conserva su efecto benéfico aplicándose hasta 72 horas después de la LME (Ibarra *et al.*, 2004). Otro punto a considerar en el desarrollo de esta vacuna y especialmente en su aplicación en humanos, es el tratamiento de elección que actualmente existe para la LME. El uso de metilprednisolona (MP, glucocorticoide inmunosupresor) como estándar de oro en pacientes con LME podría interferir con el efecto benéfico de la inmunización con A91. Al respecto, estudios previos en ratas han demostrado que si se lleva a cabo la inmunización 48 horas después de la administración de MP, se puede mantener el efecto neuroprotector de la vacuna con A91 (Ibarra *et al.*, 2004).

Con el objetivo de llevar esta terapia a fases clínicas, otro factor importante a considerar es la seguridad de la vacuna. En relación con esto, es importante mencionar que la inmunización con el péptido A91 no ha mostrado signos de enfermedad autoinmune en los estudios realizados en animales, posiblemente debido a su baja afinidad por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés “*Major Histocompatibility Complex*”) (Martiñón *et al.*, 2007). Adicionalmente, no se ha encontrado signos de hipersensibilidad después de la inmunización en modelos experimentales (Karin *et al.*, 1994). Estos resultados sugieren que la inmunización con A91 puede ser una estrategia terapéutica clínicamente aplicable.

### **EFEECTO DE LA INMUNIZACIÓN CON A91 EN LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL: ESTUDIOS PRECLÍNICOS**

El modelo experimental más utilizado para LME es el de lesión por contusión en ratas hembra, Sprague-Dowley jóvenes (200-230 g de peso). La lesión se lleva a cabo de forma reproducible con el impactador de la Universidad de Nueva York (*MASCIS impactor*) y provoca a la rata una falta de movilidad de las extremidades posteriores

(Young, 2002). La inmunización con péptidos neurales modificados es una estrategia de tipo genérico en la que se inoculan de 150 a 200 microgramos del péptido haciendo emulsión con adyuvante completo de Freund. La inoculación se lleva a cabo mediante una punción intradérmica en la base de la cola (Martiñón *et al.*, 2007). En todos los estudios se evalúa el efecto de la terapia mediante estudios morfológicos (preservación del tejido, axones mielinizados o sobrevida de neuronas) y pruebas clínicas que analizan la recuperación motora, específicamente la capacidad de movimiento de las extremidades posteriores del animal (Hauben *et al.*, 2000; Ibarra *et al.*, 2013; Martiñón *et al.*, 2007). Esta evaluación se lleva a cabo mediante pruebas de locomoción a campo abierto o pruebas de cinemática (Collazos-Castro, López-Dolado y Nieto-Sampedro, 2006; Basso *et al.*, 2006).

La utilización de este modelo experimental ha permitido conocer los efectos de la estrategia propuesta en este artículo. El microambiente generado por la inmunización con A91 (predominio de linfocitos T con fenotipo Th2 y producción de citocinas IL-4 e IL-10) permite la neutralización de diferentes mecanismos deletéreos originados después de una LME. La lipoperoxidación (LP), por ejemplo, está presente después de la lesión; alcanza su pico máximo de 4 a 5 horas después de la lesión y tiene un segundo incremento desde las 24 horas hasta los 5 días (Christie *et al.*, 2008). La inmunización con A91 reduce la LP. Lleva a cabo dicho efecto al disminuir la concentración de ERO en el sitio de lesión, teniendo un fuerte impacto sobre el segundo pico de este fenómeno (Ibarra *et al.*, 2010). Además, el A91 contrarresta la producción de óxido nítrico (NO) y disminuye la expresión del gen que codifica para la sintasa del óxido nítrico (NOS, por sus siglas en inglés “*Nitric Oxide Synthase*”), efecto que también contribuye a la reducción de la LP (García *et al.*, 2012). La inmunización con A91 disminuye también la actividad de la caspasa-3 y TNF- $\alpha$ , reduciendo el número de células apoptóticas en el tejido neural, esto se correlaciona con una mejoría significativa en la capacidad de movimiento de las extremidades después de una LME en los animales afectados (Rodríguez-Barrera *et al.*, 2013). Otro hallazgo relevante demuestra que A91 previene el daño tisular, ya que animales inmunizados con este péptido presentan un mayor número de axones mielinizados y neuronas sobrevivientes en comparación con los animales no tratados (Ibarra *et al.*, 2004; Marti-

ñón *et al.*, 2007).

Por otra parte, la inmunización con A91 puede jugar también un papel importante en la neurogénesis, ya que se ha reportado que linfocitos T específicos contra A91 producen factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés “*Brain Derived Neurotrophic Factor*”), una molécula directamente relacionada con la neurogénesis pero también con la neuroprotección. La producción de este factor neurotrófico se ha correlacionado significativamente con una mejor recuperación motora de los animales tratados después de una LME (Martíñón *et al.*, 2012).

Es importante mencionar que todos los efectos benéficos observados a nivel morfológico y bioquímico en los animales inmunizados con A91 se correlacionan significativamente con una mejor recuperación motora (evaluada mediante pruebas de locomoción abierta), no obstante, se debe comentar que cuando el grado de lesión es severo, o incluso origina una sección completa de la médula espinal, la AP se ve eliminada completamente y, al momento, no se ha logrado estimularla para obtener los efectos benéficos de la misma (Martíñón *et al.*, 2012).

Los estudios reportados a la fecha sobre el efecto benéfico de la estimulación de la AP se han realizado en animales con LME en fase aguda. Actualmente se está explorando el efecto de la AP en animales con LME en fase crónica; los resultados en este caso son también muy alentadores: se ha logrado mejorar la capacidad motora de animales con LME (resultados aún no publicados).

En la línea de estudio para conocer las alternativas terapéuticas que puede ofrecer esta terapia innovadora, se ha demostrado incluso que la estimulación profiláctica de la AP (inmunización con A91 antes de la LME) puede provocar una mejor recuperación motora después de una LME (Ibarra *et al.*, 2013). Éste es un hallazgo muy importante, ya que también sustenta la propuesta de un tratamiento profiláctico para los casos en que se programa un procedimiento quirúrgico de riesgo en columna vertebral y que pudiera lesionar la médula espinal.

Finalmente, es importante considerar que la mejor opción neuroprotectora no es la eliminación la función inmunológica. Los estudios recientes indican que la función del sistema inmune es muy importante para proteger y restaurar el tejido neural. El uso de inmunosupresores como la metilprednisolona, la Ciclosporina A o el FK-506 pueden poner incluso en riesgo la vida

del paciente al dejarlo desprotegido contra diversos patógenos. Estudios en modelos experimentales han demostrado que después de una LME existe una inmunodepresión como resultado del trauma (Ibarra *et al.*, 2007). Por lo anterior, la administración de inmunosupresores complicaría de manera importante la morbimortalidad de los pacientes. Esto se ha demostrado ya en estudios clínicos realizados en pacientes que recibieron como tratamiento la MP (Chikuda *et al.*, 2014). La modulación, más que la inhibición de la respuesta inmune, es una gran alternativa a este problema; la inmunización con péptidos neurales modificados logra modular de manera eficiente la respuesta generada después de la LME sin provocar inmunosupresión (Ibarra *et al.*, 2007). Otra ventaja que puede tener esta estrategia moduladora es permitir al sistema inmune proteger el tejido lesionado y, en etapas posteriores, restaurarlo. Estas dos acciones ya fueron comprobadas en estudios previos en modelos experimentales de LME e incluso de isquemia cerebral (Martíñón *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2015).

## OBSTÁCULOS A VENCER ANTES DE LLEGAR A LA APLICACIÓN CLÍNICA

La inmunización con A91 promueve neuroprotección y la recuperación motora en animales con LME, pero antes de pensar en una aplicación clínica hay que solventar algunas dificultades. Como ya se mencionó anteriormente, se debe buscar el adyuvante adecuado para evitar efectos secundarios en nuestros pacientes. El sulfato de aluminio (ASO<sub>3</sub>) tiene un potente efecto, bien tolerado a nivel clínico que estimula en forma rápida la activación de los linfocitos T después de una inmunización (Mbow *et al.*, 2010; Reed, Orr y Fox, 2013), este adyuvante podría ser una opción a probar. Se deberá probar también la posibilidad de evaluar el efecto de la administración del A91 sin el uso de adyuvantes, ya que estudios previos en otros modelos experimentales han sugerido que el A91 puede ejercer su efecto modulador sin necesidad de un potenciador de la respuesta inmune (Gaur *et al.*, 1997; Karin *et al.*, 1994).

Por otra parte, como ya se mencionó, la severidad de la lesión repercute también de manera importante en los efectos de la vacuna. Se debe investigar la forma de restablecer la acción de la AP en este tipo de lesiones (Martíñón *et al.*, 2012). El uso de mayores concentraciones

nes o la combinación con otras estrategias inmunomoduladoras, entre otras cosas, deberán ser objeto de estudio para futuras investigaciones.

El estudio de reacciones adversas al tratamiento debe ser tema de investigación bien detallado antes de llevar esta estrategia a la clínica. En relación con esto, un estudio clínico previo utilizó un PNM muy similar al A91 (NBI-5788) en pacientes con esclerosis múltiple. Este estudio fue suspendido porque 9% de los pacientes presentó reacciones de hipersensibilidad (Kappos *et al.*, 2000). Aunque, al momento, los estudios preclínicos indican que el A91 no es inductor de este tipo de respuestas, es un tópico que se deberá abordar con mayor detalle antes de iniciar los estudios clínicos.

Para concluir, se estima que la respuesta neuroprotectora inducida por la inmunización con A91 ejercerá sus efectos benéficos en un lapso de 3 a 5 días, tiempo durante el cual el tejido neural se encuentra desprotegido y a expensas de los fenómenos degenerativos originados por la LME. Una solución a este problema es la administración de otra estrategia terapéutica en combinación con la inmunización. Una interesante alternativa podría ser el glutatión monoetil éster, un compuesto que, además de estimular la respuesta inmune, es capaz de promover neuroprotección y que en combinación con la inmunización con A91 ha demostrado promover una recuperación motora que fue significativamente mayor a la observada solamente por la inmunización en ratas (Del Rayo *et al.*, 2013).

## CONCLUSIONES

La supresión de la respuesta inmune después de una LME no es la mejor opción terapéutica. La respuesta inmune debe ser modulada para lograr aprovechar los beneficios que puede brindar después de una LME. La AP es un fenómeno fisiológico que al ser modulado, es capaz de promover neuroprotección y una mejor recuperación de la actividad motora. La inmunización con PNM, específicamente con A91, ha demostrado estimular de manera significativa la acción benéfica de la AP sin riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune. Aunque los datos preclínicos son muy alentadores, esta estrategia innovadora deberá ser estudiada en más detalle antes de ser considerada para su aplicación en estudios clínicos.

Es evidente que se requieren más estudios antes de

pensar en el uso de esta vacuna a nivel clínico, pero los datos preclínicos demuestran que puede ser una buena opción terapéutica para los pacientes con LME.

## REFERENCIAS

- Adibhatla, R. M., y Hatcher, J. F. (2008). Phospholipase A2, Reactive Oxygen Species, and Lipid Peroxidation in CNS pathologies. *BMB Rep.*, 41 (8), 560-567.
- Aharoni, R., Arnon, R., y Eilam, R. (2005). Neurogenesis and Neuroprotection Induced by Peripheral Immunomodulatory Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Neurosci.*, 25, 8217-8228.
- Amor, S., Puentes, F., Baker, D., y Van der Valk, P. (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*, 129 (2), 154-169.
- Angelov, D. N., Waibel, S., Guntinas-Lichius, O., Lenzen, M., Neiss, W. F., Tomov, T.L., Yoles, E., Kipnis, J., Schori, H., Reuter, A., Ludolph, A., y Schwartz, M. (2003). Therapeutic vaccine for acute and chronic motor neuron diseases: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *PNAS*, 100, 4790-4795.
- Barouch, R., y Schwartz, M. (2002). Autoreactive T cells induce neurotrophin production by immune and neural cells in injured rat optic nerve: implications for protective autoimmunity. *FASEB J.*, 16, 1304-1306.
- Basso, D. M., Beattie, M. S., Bresnahan, J. C., Anderson, D. K., Faden, A. I., Gruner, J. A., Holford, T. R., Hsu, C. Y., Noble, L. J., Nockels, R., Perot, P. L., Salzman, S. K., y Young, W. (1996). MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multi-center Animal Spinal Cord Injury Study. *J. Neurotrauma.*, 13, 343-359.
- Bethea, J., Castro, M., Keane, R., Lee, T., Dietrich, W. D., y Yeziarski, R. P. (1998). Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor- $\kappa$ B Activation. *J Neurosci.*, 18 (9), 3251-3260.
- Chikuda, H., Yasunaga, H., Takeshita, K., Horiguchi, H., Kawaguchi, H., Ohe, K., Fushimi, K., y Tanaka, S. (2014). Mortality and morbidity after high-dose methylprednisolone treatment in patients with acute cervical spinal cord injury: a propensity-matched analysis using a nationwide administra-

- tive database. *Emerg Med J.*, 31, 201-206.
- Christie, S. D., Corneau, B., Myers, T., Sadi, D., Purdy, M., y Mendez, I. (2008). Duration of lipid peroxidation after acute spinal cord injury in rats and the effect of methylprednisolone. *J. Neurosurg.*, 25 (5), E5.
- Collazos-Castro, J. E., López-Dolado, E., y Nieto-Sampedro, M. (2006). Locomotor deficits and adaptive mechanisms after thoracic spinal cord contusion in the adult rat. *J. Neurotrauma.*, 23, 1-17.
- Crowe, M. J., Bresnahan, J., Shuman, S., Masters, J., y Crowe, M. (1997). Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat med.*, 3, 73-76.
- Cruz, Y., Lorea, J., Mestre, H., Kim-Lee, J. H., Herrera, J., Mellado, R., Gálvez, V., Cuellar, L., Musri, C., e 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.
- Del Rayo, M., Silva-García, R., García, E., Martiñón, S., Morales, M., Mestre, H., Flores-Domínguez, C., Ibarra, A. (2013). Therapeutic window for combination therapy of A91 peptide and Glutathione Allows delayed treatment after spinal cord injury. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 112, 314-318.
- Eisenbach, M., y Hauben, E. (2004). Pharmaceutical compositions comprising modified CNS-derived peptides for promoting nerve regeneration and prevention of nerve degeneration. *United States patent*. Sep 30, 2004.
- Evavold, B. D, y Allen, P. M. (1991). Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science*, 252, 1308-1310.
- Gaur, A., Boehme, S., Chalmers, D., Crowe, P., y Pahuja, A. (1997). Amelioration of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with altered myelin basic protein peptides involves different cellular mechanisms. *J Neuroimmunol.*, 74, 149-158.
- García, E., Silva-García, R., Mestre, H., Flores, N., Martiñón, S., Calderón-Aranda, E.S., e Ibarra, A. (2012). Immunization with A91 peptide or Copolymer-1 reduces the production of Nitric Oxide and Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression after Spinal Cord Injury. *J Neurosci Res*. 90, 656-663.
- Greenhalgh, A., y David, S. (2014). Differences in the phagocytic response of microglia and peripheral macrophages after spinal cord injury and its effects on cell death. *J Neurosci.*, 34 (18), 6316-6322.
- Hauben, E., Butovsky, O., Nevo, U., Yoles, E., Moalem, G., Agranov, E., Mor, F., Leibowitz-Amit, R., Pevsner, E., Akselrod, S., Neeman, M., Cohen, I., y Schwartz, M. (2000). Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. *J Neurosci.*, 20, 6421-6430.
- Hauben, E, Agranov, E., Gothilf, A., Nevo, U., Cohen, A., Smirnov, I., Steinman, L., y Schwartz, M. (2001a). Posttraumatic therapeutic vaccination with modified myelin self-antigen prevents complete paralysis while avoiding autoimmune disease. *J Clin Invest.*, 108, 591-599.
- Hauben, E., Ibarra, A., Mizrahi, T., Barouch, R., Agranov, E., y Schwartz, M. (2001b). Vaccination with a Nogo-A-derived peptide after incomplete spinal cord injury promotes recovery via a T-cell mediated neuroprotective response: Comparison with other myelin antigens. *PNAS*, 98 (26), 15173-15178.
- Hausmann, O. N. (2003). Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord.*, 41, 369-378.
- Hulbert J. (2000). Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg. Spine*, 1 (93), 1-7.
- Hulbert J. (2014). Methylprednisolone for the treatment of acute spinal cord injury: point. *Clinical Neurosurgery*, 61 (1), 32-35.
- Hulsebosch, C. (2002). Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Advan in Physiol Edy.* 26, 238-255.
- Ibarra, A., Hauben, E., Butovsky, O., y Schwartz, M. (2004). The therapeutic window after spinal cord injury can accommodate T cell-based vaccination and methylprednisolone in rats. *European J. Neurosci.* 19, 2985-2990.
- Ibarra, A., Jiménez, A., Cortes, C., y Correa, D. (2007). Influence of the intensity, level and phase of spinal cord injury on the proliferation of T cells and T-cell-dependent antibody reactions in rats. *Spinal Cord.*, 45 (5), 380-386.
- Ibarra, A., García, E., Flores, N., Martiñón, S., y Reyes,



- R. (2010). Immunization with neural-derived antigens inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury. *Neurosci Lett.* 476, 62-65.
- Ibarra, A., Sosa, M., García, E., Flores, A., Cruz, Y., Mestre, H., Martiñón, S., Pineda-Rodríguez, B.A., y Gutiérrez-Ospina, G. (2013). Prophylactic neuroprotection with A91 improves the outcome of spinal cord injured rats. *Neurosci Lett.* 554, 59-63.
- Jameson, S., y Bevan, M. (1995). T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity*, 2 (1), 1-11.
- Kappos, L., Comi, G., Panitch, H., Oger, J., y Antel, J. (2000). Induction of a non-encephalitogenic type 2 helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. *Nat Med.*, 6 (10), 1176-1182.
- Karin, N., Mitchell, D., Brocke, S., Ling, N., y Steinman, L. (1994). Reversal of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by a soluble Peptide Variant of a Myelin Basic Protein Epitope: T Cell receptor antagonism and reduction of interferon  $\gamma$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  production. *J. Exp. Med.*, 1994, 180, 2227-2237.
- Kipnis, J., Yoles, E., Schori, H., Hauben, E., Shaked, I., y Schwartz, M. (2001). Neuronal survival after CNS insult is determined by a genetically encoded autoimmune response. *J Neurosci.*, 21, 4564-4571.
- Kipnis, J., Mizrahi, T., Hauben, E., Shaked, I., y Shevach, E. (2002). Neuroprotective autoimmunity: Naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *PNAS*, 99 (24), 15620-15625.
- Kipnis, J., Nevo, U., Panikashvili, D., Alexandrovich, A., Yoles, E., Akselrod, S., Shohami, E., y Schwartz, M. (2003). Therapeutic vaccination for closed head injury. *J Neurotrauma*, 20, 559-569.
- Martiñón, S., García, E., Flores, N., González, I., Ortega, T. (2007). Vaccination with a neural-derived peptide plus administration of glutathione improves the performance of paraplegic rats. *European J Neurosci.* 26: 403-412.
- Martiñón, S., García, E., Gutiérrez-Ospina, G., Mestre, H., e 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.
- Mawhinney, L. A., Thawer, S.G., Lu, W.Y., Rooijen, N., Weaver, L. C., Brown, A., y Dekaban, G. A. (2012). Differential detection and distribution of microglial and hematogenous macrophage populations in the injured spinal cord of lys-EGFP-ki transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 71, 180-197.
- Mbow, L., De Gregorio, E., Valiante, N., Rappuoli, R. (2010). New Adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol.*, 22, 411-416.
- Mestre, H., e Ibarra, A. (2011). Immunization with Neural-Derived Peptides as a Potential Therapy in Neurodegenerative Diseases, Neurodegenerative Diseases. doi: 10.5772/28029.
- Meurer, W. J, y Barsan, W. G. (2014). Spinal cord injury neuroprotection and the promise of flexible adaptive clinical trials. *World Neurosurg.*, 82 (3-4), e541-6.
- National Spinal Cord Injury Statistical Center, University of Alabama at Birmingham. (2013). Annual Statistical Report. Spinal Cord Injury facts and figures at glance. Recuperado de: <https://www.nscisc.uab.edu/>.
- Nel, A. (2002). T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *J Allergy Clin Immunol.*, 109 (5), 758-770.
- Nicholson, L., Greer, J., Sobel, R., Lees, M., y Kuchroo, V. (1995). An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*, 3, 397-405.
- Park, E., Velumian, A., y Fehlings, M. (2004). The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: A review with an emphasis on the implications for White matter degeneration. *J Neurotrauma*, 21 (6), 754-774.
- Pérez, P., e Ibarra, R. (1998). *Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal de 1993 a 1997*. Tesis de postgrado en Medicina de Rehabilitación. México: Secretaría de Salud.
- Pineau, I., Sun, L., Bastien, D., y Lacroix, S. (2010). Astrocytes initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory monocytes in an IL-1 receptor/MyD88-dependent fashion. *Brain Behav Immun.*, 24, 540-553.

- Reed, S., Orr, M., y Fox, C. (2013). Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med.*, 19 (12), 1597-1608.
- Rhen, T, y Cidlowski, J. A. (2005). Anti-inflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med.* 353, 1711-1723.
- Rodríguez-Barrera, R., Fernández-Presas, A., García, E., Flores-Romero, A., Martiñón, S., González-Puertos, Y., Mestre, H., Flores-Domínguez, C., Rodríguez-Mata, V., Königsberg, M., Solano, S., e Ibarra, A. (2013). Immunization with a Neural-Derived Peptide protects the spinal cord from apoptosis after traumatic injury. *BioMed Research International*, 2013, doi:10.1155/2013/827517.
- Rolla, A., Shechter, R., y Schwartz, M. (2009). The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci.*, 10, 235-241.
- Rowland, J., Hawryluk, G., Kwon, B., y Fehlings, M. (2008). Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus*, 25 (5), E2.
- Sakai, K., Sinha, A. A., Mitchell, D. J., Zamvil, S. S., Rothbard, J. B., McDevitt, H.O., y Steinman, L. (1988a). Involvement of distinct murine T-cell receptors in the autoimmune encephalitogenic response to nested epitopes of myelin basic protein. *Proc Natl Acad Sci.*, 85, 8608-8612.
- Sakai, K., Zamvil, S.S., Mitchell, D.J., Lim, M., Rothbard, J. B., y Steinman, L.(1988b). Characterization of a major encephalitogenic T cell epitope in SJL/J mice with synthetic oligopeptides of myelin basic protein. *J Neuroimmunol*, 19, 21.-32
- Schwab, J., Zhang, Y., Kopp, M., Brommer, B., y Popovich, P. (2014). The paradox of chronic neuroinflammation, systemic immune suppression, autoimmunity after traumatic chronic spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 258, 121-129.
- Schwartz, M., Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., y Cohen, I. (1999). Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci.*, 22, 295-299.
- Schwartz, M. y Cohen, I. R. (2000). Autoimmunity can benefit self-maintenance. *Immunology today*, 21 (6), 265- 268.
- Schwartz, M., y Raposo, C. (2014). Protective Autoimmunity: A Unifying Model for the Immune Network Involved in CNS Repair. *Neuroscientist*, 20 (4), 343-358.
- Sekhon, L. H., y Fehlings, M. G. (2001). Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine.* 26, S2-S12.
- Silva, N., Sousa, N., Reis, R., y Salgado, A. (2014). From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. *Prog Neurobiol.* 114, 25-57.
- Tuohy, V., Yu, M., Yin, L., Kawczak, J., Johnson, J., Mathisen, P. M., Weinstock-Guttman, y Kinkel, R. P. (1998). The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev.*, 164 (1), 93-100.
- Vergelli, M., Hemmer, B., Kalbus, M., Vogt, A., Ling, N., Conlon, P., Coligan, J. E., McFarland, H., y Martin, R. (1997) Modifications of peptide ligands enhancing T cell responsiveness imply large numbers of stimulatory ligands for autoreactive T cells. *J Immunol.*, 3746-3752.
- Willenborg, D. y Staykova, M. (2003). Cytokines in the pathogenesis and therapy of autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol.*, 520, 96-119.
- Windhagen, A., Scholz, C., Hollsberg, P., Fukaura, H., Sette, A., y Hafler, D. A. (1995). Modulation of cytokine patterns of human autoreactive T cell clones by a single amino acid substitution of their peptide ligand. *Immunity*, 2, 373-380.
- Xiong, Y., Rabchevsky, A., y Hall, E. (2007). Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *J Neurochem.*, 100, 639-649.
- Xu, W., Chi, L., Xu, R., Ke, Y., Luo, C., Cai, J., Qiu, M., Gozal, D., y Liu, R. (2005). Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord.*, 43, 204-213.
- Yoles, E., Hauben, E., Palgi, O., Agranov, E., Gothilf, A., Cohen, A., Kuchroo, V., Cohen, I. R., Winer, H., y Schwartz, M. (2001). Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *J Neurosci.*, 21 (11), 3740-3748.
- Yu, M., Johnson, J., y Tuohy, V. (1996). A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: A basis for peptide-specific therapy after onset of clinical

disease. *J. Exp. Med.*, 183, 1777-1788.

Young, W. (2002). Spinal cord contusion models. *Prog. Brain Res.*, 137, 231-255.