



Efecto de antagonistas de receptores purinérgicos para el tratamiento de las alteraciones locomotoras y el dolor neuropático asociados a lesiones de la médula espinal.

Benjamín Alejandro Zylberberg

Trabajo Final de Carrera

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Belgrano.

Tutora: Dra. Graciela Lujan Mazzone

Co-Tutora: Dra. María Florencia Coronel

Marzo 2022

Agradecimientos

A mi directora y codirectora Graciela y Flor que me ayudaron y guiaron en el desarrollo de la tesis y el trabajo realizado a lo largo del proyecto.

A todo el equipo del laboratorio por su buena predisposición, especialmente a Martina y Julieta por su participación en el proyecto y haberme ayudado en su elaboración.

Al IIMT por aceptarme y facilitarme los recursos para poder realizar este proyecto en sus instalaciones.

A los profesores de la Universidad de Belgrano y a mi familia que me acompañó a lo largo del alcance de este objetivo.

A todos aquellos que me han ayudado de alguna manera.

Índice

Agradecimientos	2
Índice	3
Resumen	5
Presentaciones a Congresos	7
Abreviaturas.....	8
Introducción.....	9
Características y generalidades del sistema nervioso central.....	9
Incidencia y principales causas de una lesión aguda de la médula espinal	11
Mecanismos bioquímicos desencadenados después de la lesión de médula espinal	13
Efecto de la excitotoxicidad en el daño secundario de lesiones espinales.....	14
Tratamientos e intervenciones farmacológicas para mitigar la propagación del daño secundario espinal	15
Intervenciones quirúrgicas de descompresión luego de daño espinal	17
Dolor neuropático luego de una lesión medular	18
Implicancia de los receptores purinérgicos en las alteraciones funcionales luego de una lesión espinal.....	18
Antecedentes	21
Modelos <i>in vitro</i> de LME	21
Preparación de médula espinal de ratones neonatales <i>in vitro</i> como modelo de LME.....	22
Cultivos organotípicos para el estudio de LME	23
Objetivo general	26
Objetivos específicos	26
Hipótesis	26
Materiales y métodos	27
Consideraciones de bioseguridad.....	27
Modelo experimental <i>in vivo</i> de lesión espinal en ratón.....	27
Protocolo de lesión <i>in vivo</i> de LME.....	27
Análisis de la actividad y coordinación locomotora utilizando distintas pruebas funcionales.....	28
Preparación y mantenimiento <i>in vitro</i> de los preparados de médula espinal de ratón	30
Procedimiento de inmunofluorescencia	31
Análisis estadístico	35
Resultados	36

Validación del modelo murino de LME: daño químico y traumático. Pruebas funcionales para evaluar la actividad locomotora y caracterización histológica del tejido lesionado...	36
Mecanismos farmacológicos de neuroprotección luego de inducir un daño químico <i>in vivo</i> con KA	40
Efecto de neuroprotección con la aplicación de CBO luego de inducir LME <i>in vitro</i> con KA	45
Discusión	53
 Mecanismos de neuroprotección farmacológica luego de una LME.....	55
Consideraciones Finales	59
Referencias	61

Resumen

La lesión de la médula espinal (LME) es una patología de incidencia creciente que causa con frecuencia alteraciones funcionales locomotoras, neurológicas, e, incluso, un deterioro cognitivo generalmente permanente e irreparable. El dolor neuropático, dolor crónico desencadenado luego de la injuria del sistema nervioso, reduce aún más la calidad de vida del paciente y a menudo acompaña a los déficits funcionales motores asociados con la LME. Los estudios previos del laboratorio estuvieron enfocados en entender distintas etapas del proceso de daño secundario desencadenado luego de una LME para identificar los procesos centrales en la propagación de la lesión primaria y caracterizar mediadores claves que permitan hacer efectiva la neuroprotección temprana. El objetivo general de esta tesis fue evaluar la eficacia de diferentes alternativas terapéuticas farmacológicas para limitar o reducir el proceso neuroinflamatorio desencadenado luego de la LME en su fase más temprana posible. Específicamente, estudiar el rol de la señalización purinérgica mediada por los receptores P2X4 y P2X7 en el daño secundario desencadenado luego de una lesión de la médula espinal, analizando su participación en la generación de alteraciones motoras (cambios en sincronidad y alternancia en la marcha) y evaluar la actividad neuroprotectora del antagonista de receptores purinérgicos Coomassie Brilliant Blue (CBO) y del antioxidante natural resveratrol. Para ello se emplearon dos modelos de daño químico y mecánico en la médula espinal de ratones Balb/c siguiendo protocolos establecidos en el laboratorio. El daño químico consistió en la aplicación de kainato (KA), compuesto análogo del glutamato, y el daño mecánico fue inducido por compresión directa de la médula espinal mediante un clip de aneurisma modificado. Se utilizaron distintas pruebas funcionales de locomoción como ser los tests de Basso-Beattie-Bresnahan para ratón (BMS), la plantilografía y el test de escalera horizontal para analizar las alteraciones motoras de los distintos modelos de LME y su evolución temporal. Posteriormente, se realizaron técnicas de inmunohistoquímica para la evaluación histológica del desarrollo del daño mediante el análisis cuantitativo de las poblaciones celulares y de marcadores de daño / muerte celular en los distintos grupos experimentales. Los resultados obtenidos en la presente tesis demuestran amplias variaciones con respecto a la destreza locomotora en los grupos sometidos a LME química y mecánica en comparación con los grupos controles, así como a nivel locomotor y también a nivel histológico. Al comparar los modelos de lesión química y mecánica se observó un daño locomotor más drástico e irreversible en la lesión mecánica, con una reducción del número de neuronas sin afectar la población glial, al menos en los tiempos estudiados. Por otro lado, al evaluar los grupos experimentales de lesiones químicas conjuntamente con la aplicación de CBO se observó una preservación del número de neuronas, especialmente en la región dorsal espinal, con respecto a los grupos lesionados por KA que no recibieron el tratamiento. Sin embargo, no se detectaron mejoras significativas en los patrones locomotores estudiados. Al evaluar los efectos neuroprotectores del

resveratrol se observó una capacidad neuroprotectora más generalizada a nivel de las regiones medulares ventrales, centrales y dorsales, así como una mejora significativa con respecto a los resultados de las evaluaciones locomotoras funcionales. Estos resultados demuestran que, si bien quedan varios puntos por estudiar en relación al mecanismo de acción de los receptores purinérgicos, los resultados aquí obtenidos son de vital importancia para generar estrategias terapéuticas que permitan limitar las consecuencias de las LME en su fase más temprana posible.

Palabras clave: Lesión de Médula Espinal, Neurodegeneración, Neuroprotección, Excitotoxicidad, señalización purinérgica.

Presentaciones a Congresos

Parte de los resultados que forman parte de esta Tesina de Licenciatura fueron presentados en el XXXVI Congreso anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN) en formato virtual (del 18 al 22 de Octubre 2021):

- “Role of purinergic signalling in counteracting excitotoxic damage induced by kainic acid in a model of spinal injury”. Benjamín Zylberberg, Martina Poodts, Julieta Roncoroni, M. Florencia Coronel y Graciela L Mazzone.

Abreviaturas

ASIA: Asociación Americana de Lesión Medular

BMS: Basso-Beattie-Bresnahan

CBO: Coomassie Brilliant Blue

DRG: Ganglios de la raíz dorsal

LME: Lesión de médula espinal

LNP: Lesión de nervio periférico

MP: Metilprednisolona

P2XR: Receptores P2X

REV: Resveratrol

SEM: Error estándar de la media

SNC: Sistema nervioso central

SN: Sistema nervioso

SNP: Sistema nervioso periférico

KA: Kainato

Introducción

Características y generalidades del sistema nervioso central

El **sistema nervioso (SN)** se puede distinguir fisiológicamente en dos grandes subsistemas: el **sistema nervioso central (SNC)**, donde tenemos el encéfalo y la médula espinal, y el **sistema nervioso periférico (SNP)**, formado por los nervios y ganglios nerviosos que se extienden fuera del SNC. La médula espinal está situada en el interior del canal vertebral y se conecta con el encéfalo a través del agujero occipital del cráneo (Ludwing, 2015). Esta, se conecta con el SNP mediante las raíces nerviosas que nacen y se ramifican de las distintas regiones del cuerpo, como se puede observar representado en la Figura 1. Específicamente, la médula espinal posee dos funciones básicas: de aferencia de las señales provenientes de los nervios periféricos del tronco, cuello y las cuatro extremidades, que son transmitidas hacia el cerebro, y la eferente, de las señales originadas del cerebro que son transmitidas a los órganos efectores con el fin de realizar determinada acción o producir un determinado estímulo, llevando estos impulsos hacia el tronco, cuello y miembros. Es decir, el SNC (encéfalo y médula espinal) recibe, integra y correlaciona distintos tipos de información sensorial.

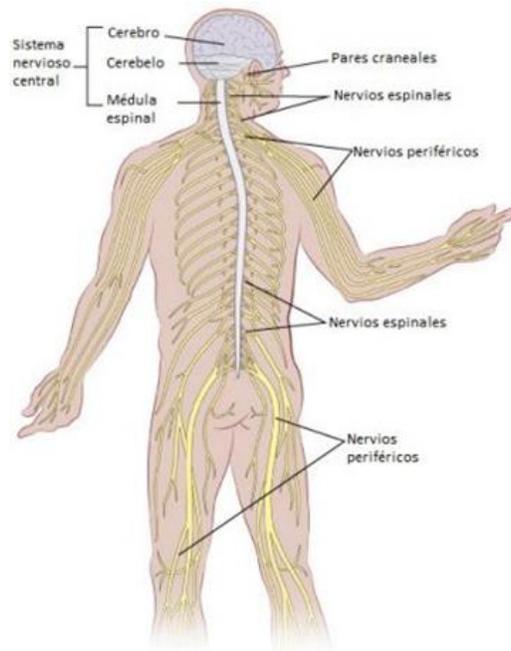


Figura 1. Estructuras que componen el sistema nervioso central (médula espinal y cerebro) y sistema nervioso periférico (nervios periféricos y ganglios) imagen tomada de (cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/efectos-secundarios-fisicos/neuropatia-periferica/que-es-neuropatia-periferica.html).

Con respecto a la anatomía externa la médula espinal posee un sistema de protección, dado por las vértebras, las meninges y el líquido cefalorraquídeo. La columna vertebral está formada por veinticuatro vértebras individuales que se corresponden con las regiones cervical (cuello), torácica (pecho) y lumbar (parte inferior de la espalda) y por las vértebras de la porción sacra y coxígea (en la zona pélvica). Al igual que el cerebro, también está protegida por tres membranas de tejido conectivo llamadas meninges, de fuera hacia adentro, son la duramadre, la aracnoides y la piamadre.

Teniendo en cuenta la anatomía interna, como puede observarse en la Figura 2, en un corte transversal de la médula espinal pueden diferenciarse morfológicamente dos regiones principales. La sustancia gris, en forma de H, ubicada en la región central de la médula espinal, la cual está constituida principalmente por neuronas, los cuerpos celulares y las dendritas de las neuronas eferentes, las fibras de entrada de las neuronas aferentes y las células gliales. La sustancia blanca que rodea la sustancia gris está compuesta principalmente por grupos de fibras nerviosas o axones mielinizados. Estos grupos de axones transcurren longitudinalmente a través de la médula, algunos descienden para transmitir información del cerebro a la periferia, otros son ascendentes transmitiendo información hacia el cerebro (Silva et al., 2013). Ambas regiones contienen también células gliales, astrocitos, y microglía, cuyas funciones principales son de protección inmunológica, sostén mecánico y nutrición de las neuronas, así como participación y mantenimiento de la sinapsis en el caso de los astrocitos, y desarrollo y mantenimiento de la mielina en el caso de las células de Schwann y los oligodendrocitos, aunque en distinta proporción (Cifra et al., 2012a).

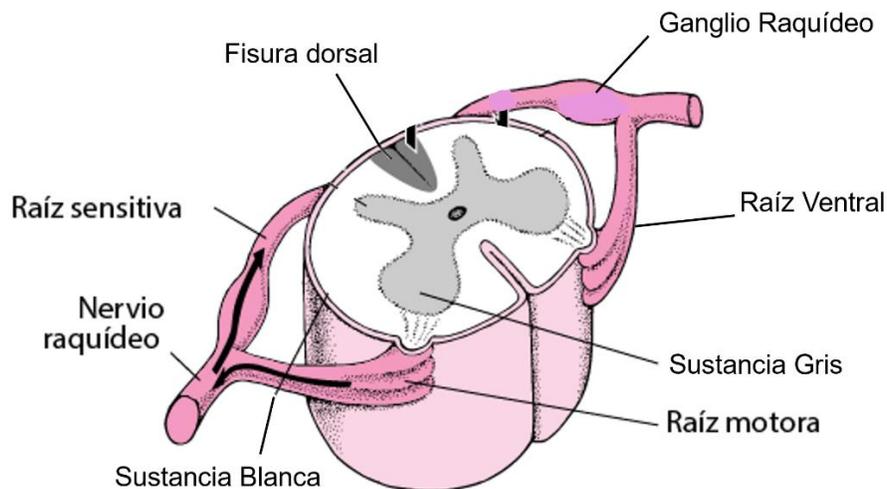


Figura 2. Representación gráfica de médula espinal en un corte transversal donde se visualizan bilateralmente las distintas regiones y estructuras morfológicas, incluyendo las raíces dorsales y ventrales de los nervios raquídeos bilaterales y los ganglios anexos a la raíz dorsal, así como

sustancia gris, en forma de H ubicada en la región central y la sustancia blanca que la rodea. Imagen modificada de (msdmanuals.com/es/hogar/multimedia/figure/neu_to_from_spinal_cord_b_es).

Incidencia y principales causas de una lesión aguda de la médula espinal

La **lesión de la médula espinal** (LME) es una patología de incidencia creciente en todo el mundo que posee una repercusión global entre 10,4 y 83 casos por millón y causa con frecuencia alteraciones funcionales, neurológicas, e incluso, un posible deterioro cognitivo permanente e irreparable (Witiw and Fehlings, 2015). Los accidentes de tránsito son la causa más común de LME en la mayoría de las regiones del mundo, siendo las caídas y accidentes domésticos la segunda causa más frecuente, principalmente en pacientes mayores de 60 años (Witiw and Fehlings, 2015). La población más afectada por las LME son los adultos jóvenes, de entre los 16 a 30 años de edad. En la Argentina las estadísticas concuerdan con los datos a nivel mundial. Un estudio retrospectivo demostró que una de las principales causas de LME fueron los accidentes de moto y en sujetos de sexo masculino cuya edad promedio fue de 30 años (Bazan PL, 2004; Barrera RM, 2013). A pesar de los avances médicos en las terapias para rehabilitación, muchos pacientes desarrollan una discapacidad neurológica irreversible y permanente que es asociada a una pérdida severa de la función locomotora. La estimación de las lesiones espinales se puede clasificar según su gravedad de acuerdo con las siguientes formas:

- Lesión de médula espinal completa, donde se pierde por debajo de la lesión la función sensorial y motora, impidiendo así toda la capacidad para controlar los movimientos;
- Lesión de médula espinal incompleta, donde la capacidad sensorial y motora se pierde parcialmente debajo del sitio de la lesión. Se pueden observar distintos grados de lesión incompleta.

La parálisis por LME puede denominarse tetraplejía, o cuadriplejía, cuando se ven afectados por los brazos, las manos, el tronco, las piernas y los órganos pélvicos. En cambio, si la lesión afecta la totalidad o parte del tronco, las piernas o los órganos pélvicos se denomina paraplejía. El grado y severidad de la lesión espinal se determina realizando una serie de exámenes neurológicos. Actualmente existen distintos métodos para la evaluación clínica del grado y severidad de las LME en los pacientes. Uno de los criterios clínicos más utilizados es de la Asociación Americana de Lesión Medular (ASIA), donde se definen las reglas para la correcta clasificación de las LME con una escala de grados (B, C y D) relacionando la presencia o ausencia de función motora o sensitiva en los distintos segmentos espinales ([ttps://asia-spinalinjury.org/](https://asia-spinalinjury.org/)).

La etiología de las LME va de la mano con la epidemiología ya que ayuda a orientar específicamente las medidas preventivas de este tipo de patologías. La etiología u origen de la LME, denominado daño primario, puede ser debido a distintas causas, ya sea traumática o como producto de isquemia, hipoxia o por enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, las estadísticas mundiales concuerdan en que el 80% de las LME son de origen traumático. Independientemente de su etiología, la fisiopatología de la LME se puede clasificar en la lesión primaria y lesión secundaria. Habitualmente la lesión primaria se produce por un desplazamiento de los elementos de la columna vertebral, fragmentos óseos, discos y ligamentos de tipo compresivo-contusivo dentro del tejido medular. Otros mecanismos de lesión primaria descritos son: cizallamiento, laceración, estiramiento agudo y aceleración-des-aceleración súbitas. Es importante aclarar los mecanismos físicos raramente producen cortes transversales de la médula, lo que resultaría en una pérdida completa de la continuidad anatómica del cordón espinal (Ballesteros Plaza et al., 2012). Dichos mecanismos mencionados conllevan al aumento de la compresión sobre la médula espinal, resultantes de la disrupción de los axones neuronales, los vasos sanguíneos y las membranas celulares. En sí, la LME daña principalmente las neuronas motoras superiores e inferiores e impacta a las neuronas sensoriales, afectando diversas funciones autonómicas (como la respiración, los latidos del corazón, la temperatura, la digestión y el tono vascular). Asimismo, el efecto sistémico de la lesión primaria en sí viene aparejado con un riesgo de complicaciones cardiovasculares, trombosis, osteoporosis, disreflexia autonómica y dolor neuropático, el cual será mencionado en detalle más adelante.

Por otra parte, es posible describir la LME en términos de su evolución temporal en temprana o aguda. En las primeras horas luego de producida la lesión se observa que un cambio detectable es la inflamación generalizada en la región adyacente al cordón espinal, frecuentemente acompañada de hemorragias en la sustancia gris central, en cuyas células se presenta necrosis debido a la ruptura mecánica de las membranas y/o a la isquemia resultante de la disrupción vascular. La disrupción microvascular también induce hemorragia en la sustancia blanca circundante lo que puede empeorar el compromiso local y extenderlo a segmentos adyacentes proximales y distales (Ballesteros Plaza et al., 2012). Luego de algunos minutos de producirse la lesión primaria en sí, se da lugar al comienzo de la denominada **lesión secundaria, que amplifica aún más la gravedad de la lesión primaria**. Los procesos fisiopatológicos que ocurren en la fase secundaria de la lesión se concentran en los procesos de excitotoxicidad, edema, e inflamación persistente (Park et al., 2004), creando un entorno desfavorable para los esfuerzos endógenos de reparación, regeneración y re-mielinización. El daño secundario es desencadenado y amplificado por la lesión primaria en el tejido circundante debido a la liberación masiva de glutamato, la producción de radicales libres y disfunción metabólica (McDonald and Sadowsky, 2002; Schwab, 2002). La extensa liberación de glutamato provoca excitotoxicidad (Choi, 1992; Doble, 1999), que se cree que contribuye de forma importante a agravar

al cuadro clínico general debido a la pérdida de tejido neuronal en zonas adyacentes y/o distantes a la lesión primaria en si (Hall and Springer, 2004; Park et al., 2004; Rossignol et al., 2007).

Mecanismos bioquímicos desencadenados después de la lesión de médula espinal

En términos fisiopatológicos el daño secundario amplifica considerablemente la destrucción de las células neuronales y gliales en áreas adyacentes al daño primario mediante el mecanismo de propagación postraumático (Park et al., 2004). El mecanismo principal del daño secundario es el proceso de excitotoxicidad. Este, consiste en la liberación masiva del neurotransmisor glutamato, el cual produce la activación de los receptores ionotrópicos para el ácido N-metil-D-aspártico (NMDAR), ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y de KA (Doble, 1999), los que mencionaremos en mayor detalle a continuación. De esta forma, se inicia parte del proceso excitotóxico de lesión secundaria a partir del momento en el que ocurre el daño primario, como se ve representado en la Figura 3, el cual continúa provocando daños adicionales y un progresivo aumento en la disfunción neurológica. Este proceso se agrava al comprometerse la microvasculatura lo cual puede crear una región susceptible a isquemia. A medida que la lesión avanza a lo largo de las horas, el aumento del edema y la compresión de la médula se suman cíclicamente a la muerte neuronal.

Finalmente, si bien la excitotoxicidad del glutamato se asocia generalmente a la lesión isquémica, existen otras patologías agudas del SNC que se cree tienen mecanismos similares, mediante el proceso de lesión secundaria después de una lesión traumática. Sin embargo, el concepto de sobreexcitación crónica de las neuronas se ha relacionado también con la excitotoxicidad inducida por glutamato con procesos neurodegenerativos como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Huntington, Enfermedad de Parkinson y demencia de Alzheimer (Lau and Tymianski, 2010).

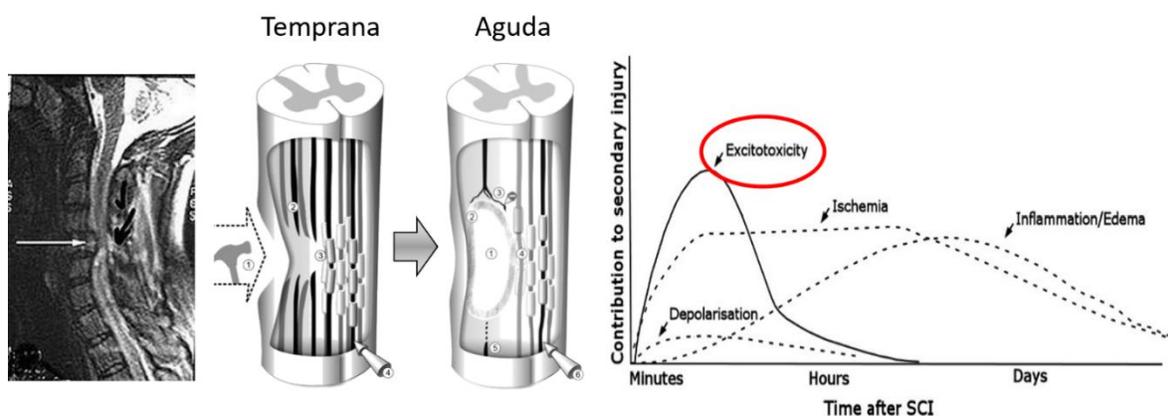


Figura 3. Esquema representativo del desarrollo de la LME a partir de lesión inicial en la fase temprana, seguida por la fase aguda donde se observa el comienzo de la respuesta excitotóxica, así

como un gráfico representativo de los procesos celulares y tisulares que se desarrollan en el tiempo con respecto a su contribución a la evolución de la lesión secundaria. Imágenes modificadas de (Ronsyn et al., 2008) y (Schwab et al., 2006).

Efecto de la excitotoxicidad en el daño secundario de lesiones espinales

Como se mencionó previamente, la excitotoxicidad es el principal mecanismo de propagación del daño secundario. Esta es provocada por la liberación masiva del neurotransmisor glutamato, produciendo la activación de los receptores ionotrópicos: los receptores para el ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), el ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y el KA (Doble, 1999). Además, en el daño secundario inducido por la excitotoxicidad se produce la activación de una cascada patológica mediada por efectores y vías moleculares comunes de muerte celular con mediadores aún no del todo esclarecidos (Klussmann and Martin-Villalba, 2005; Mazzone et al., 2010; Van Den Berg et al., 2011).

La interacción y subsecuente activación persistente de los tres tipos de receptores ionotrópicos mencionados anteriormente (NMDAR, AMPA y de KA) elevan los niveles de Ca^{2+} intracelular (Lau and Tymianski, 2010), lo que desencadena una cascada de vías de señalización intracelulares finalmente conduciendo a la muerte celular por excitotoxicidad, observable en la Figura 4, debido a daño a nivel mitocondrial, nuclear y la desestabilización de la membrana plasmática. El efecto de los niveles de Ca^{2+} intracelular fue demostrada por Choi, 1985 como un proceso esencial en la excitotoxicidad provocada por glutamato para potenciar la neurodegeneración y estaría mediada, al menos en parte, por los receptores NMDA (Lau and Tymianski, 2010). Por otra parte, distintas líneas de investigación sugieren que la mayor parte del Ca^{2+} intracelular es secuestrado en las mitocondrias, esto es de vital relevancia para el desarrollo de excitotoxicidad inducida por glutamato (Thayer and Wang, 1995 & Wang and Thayer, 1996) ya que conduce a la acidosis metabólica y a la generación de radicales libres que potenciaran el efecto de toxicidad mitocondrial.

Si bien se han descrito varias formas de proteger las neuronas contra la excitotoxicidad: inhibición de los receptores NMDA, estimulación del transporte activo de calcio (Ca^{2+}) hacia el medio extracelular o limitación de la activación de los receptores NMDA por neuromoduladores, desafortunadamente, estas estrategias están limitadas por la consecuente inhibición de importantes funciones fisiológicas mediadas por este neurotransmisor y sus receptores en las neuronas en condiciones normales (Angelova et al., 2019). Un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares y procesos implicados en el proceso de amplificación del daño secundario resultan de vital importancia para generar estrategias clínicas efectivas.

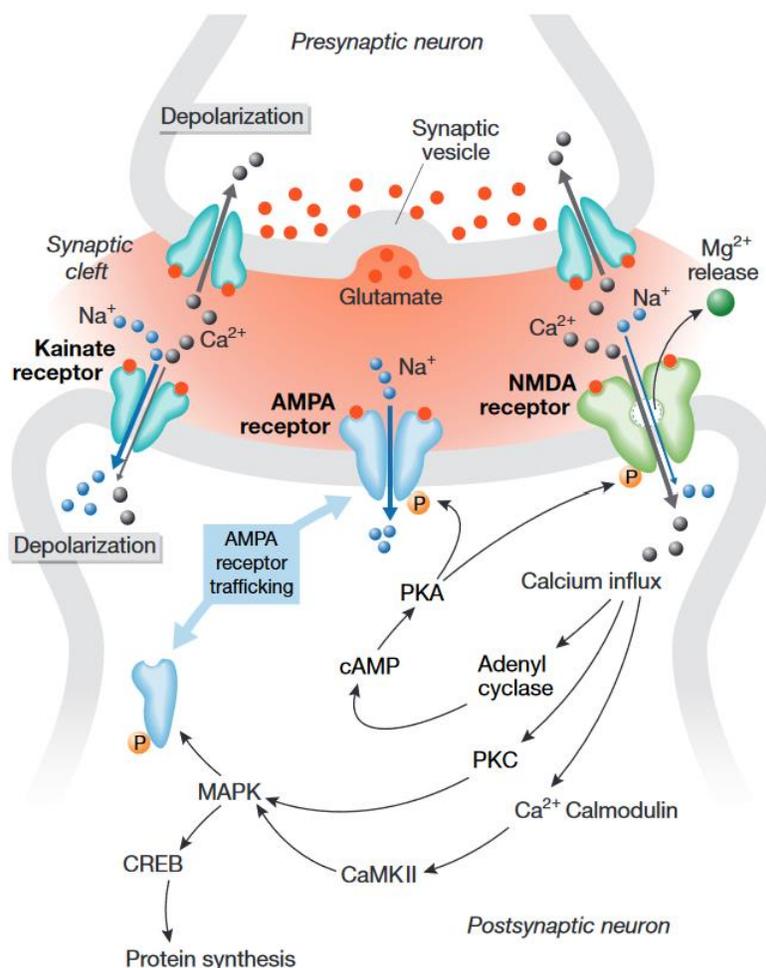


Figura 4. Diagrama esquemático que resume el proceso de lesión secundaria desencadenado en la médula espinal mediante la activación de los receptores glutamatergicos. La llegada de una serie de impulsos a la terminal presináptica desencadena la liberación de glutamato, el cual se une a los receptores de glutamato de la membrana postsináptica. Al activarse, los receptores AMPA, NMDA y KA conducen iones de Na⁺ y Ca²⁺, que inician el proceso de despolarización postsináptica. La entrada de Ca²⁺ a través de los canales NMDA desencadenan la activación de la potencialización a largo plazo. Los receptores de KA presinápticos facilitan la transmisión sináptica mediante la amplificación de la liberación de neurotransmisores. Imagen tomada de (Voglis and Tavernarakis, 2006).

Tratamientos e intervenciones farmacológicas para mitigar la propagación del daño secundario espinal

En la mayoría de los casos de LME existe una relación entre la muerte neuronal moderada y la severidad de las disfunción locomotora crónica (Kuzhandaivel et al., 2011). Es por ello que es importante evitar la pérdida neuronal, tanto en calidad como en número, ideando estrategias para la

reparación de los tejidos dañados y tratamientos de neuroprotección farmacológica que permitan incluso prevenir el daño neuronal (Silva et al., 2013). Un objetivo importante para entender cómo reparar el tejido de la médula espinal es dilucidar la duración del proceso de lesión secundaria y si ciertas células intrínsecas pueden compensar los daños para obtener una mejora funcional. Como se discutió previamente, uno de los procesos claves en la LME es la excitotoxicidad (Dirnagl et al., 1999). La liberación excesiva del glutamato, desencadenada en el proceso de daño secundario, activa una serie de procesos bioquímicos complejos que amplifican aún más el daño primario (Dirnagl et al., 1999). Distintas observaciones elaboradas por nuestro grupo de trabajo demuestran que en la médula espinal se encuentran latentes los mecanismos endógenos de reparación y delinea una ventana de tiempo para explorar los mecanismos farmacológicos tendiente a la reparación de la función locomotora luego de una LME (Kuzhandaivel et al., 2011; Mazzone et al., 2013).

Existen diversos agentes neuroprotectores en investigaciones preclínicas que demuestran ser promisorios para el tratamiento de LME. A pesar de ello ninguno demostró ser eficaz en ensayos clínicos de fase III aún. La metilprednisolona (MP) es el agente más prescrito en la práctica clínica. Dicho fármaco es un corticosteroide capaz de inhibir la peroxidación lipídica (al actuar como secuestrador de radicales libres), manteniendo la integridad de la barrera hematoencefálica de la médula espinal, mejorando la circulación sanguínea y limitando la respuesta inflamatoria (Hall and Braughler, 1981; Hall and Braughler, 1982; Tator, 1998). Una investigación llevada a cabo en 1990 propuso que la administración de una dosis alta de MP en las 8 horas siguientes a una LME se asocia a una mejora significativa de la función motora y sensorial a los 6 meses de seguimiento en comparación con pacientes en grupos placebo o con administración de MP en periodos temporales posteriores (Bracken et al., 1990). Estudios del mismo grupo demostraron que los pacientes que reciben MP entre 3 y 8 h después de la lesión demuestran mejoras en habilidades motoras si la administración del fármaco se continua durante 48 h, al contrario de grupos de 24 h de administración (Bracken et al., 1997). Estas diferencias se observaron sólo a las 6 semanas y a los 6 meses de evaluación, no observándose diferencias estadísticamente significativas luego de un año (Bracken et al., 1998). Sin embargo, surgieron intensas críticas a ambos ensayos clínicos debido al hecho de que los estudios informaron un aumento estadísticamente significativo con respecto a la presencia de diversos efectos secundarios: aumento de infecciones, hemorragias gastrointestinales, embolias pulmonares e incluso muerte. Esto culminó con un dictamen emitido por la Asociación Americana de Cirujanos Neurológicos, en el cual se permite el tratamiento con MP de los pacientes con lesiones medulares agudas, sólo si estos dan el consentimiento al ser advertidos que las pruebas sugieren efectos secundarios nocivos, siendo estos tan consistentes como la posibilidad de beneficios clínicos con respecto a LME (Silva et al., 2013).

Otros agentes con expectativas más prometedoras en etapas de evaluación clínica avanzada son: minociclina, derivado químico de la tetraciclina que ha demostrado inhibir la activación microglial, reducir la apoptosis y modular la activación de las caspasas, con evidencia de efectos neuroprotectores en modelos animales de LME; SUN13837, una pequeña molécula altamente liposoluble que puede administrarse de manera intravenosa (Wilson et al., 2017); el riluzol, actualmente el único fármaco aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Se ha demostrado que la administración de riluzol a pacientes con ELA reduce la neurodegeneración de neuronas motoras y prolonga la supervivencia. Asimismo, se cree que el potencial terapéutico del riluzol está principalmente relacionado con su conocida acción antiglutamatérgica (Wokke, 1996). Por lo tanto, para explorar y utilizar la acción del riluzol como agente neuroprotector, se han implementado varios modelos experimentales con el fin de imitar los procesos básicos que subyacen a las LME (Guzman-Lenis et al., 2009; Mazzone and Nistri, 2011a; Cifra et al., 2012b). Una de las propiedades clave involucradas en la neuroprotección mediada por riluzol es su capacidad para reducir la concentración extracelular de glutamato a través de un mecanismo de inhibición de su liberación (Mazzone and Nistri, 2011a; Cifra et al., 2012b). Este efecto, atribuido a la disminución en la afluencia de Ca^{2+} presináptica y al bloqueo de los autorreceptores que controlan la liberación de neurotransmisores (Lamanauskas and Nistri, 2008; Wang et al., 2004) debería reducir la excitabilidad neuronal y evitar el desarrollo de la excitotoxicidad. La explotación de estas características puede contribuir al potencial terapéutico del riluzol así como representar una herramienta útil para desvelar importantes mecanismos que regulan la excitabilidad neuronal y comportamientos de las redes neuronales en la médula espinal (Cifra et al., 2012b).

Intervenciones quirúrgicas de descompresión luego de daño espinal

En la actualidad se emplean distintas intervenciones quirúrgicas de descompresión tendientes a interrumpir el proceso de desarrollo de la lesión primaria de manera temprana (8 a 24 horas luego de la lesión) aliviando la presión dentro del parénquima de la médula, para así restaurar parcialmente el flujo sanguíneo microvascular, reducir la isquemia y eliminar la compresión mecánica de las membranas celulares. Hasta el momento, existen datos científicos provenientes de estudios que utilizan modelos de LME en roedores, en los cuales se evaluó el efecto del estrechamiento del canal espinal y el efecto temporal de descompresión tras una lesión de la médula espinal (Dimar et al., 1999). Los resultados demuestran que el pronóstico de recuperación neurológica se ve afectado negativamente tras una LME incompleta y puede verse beneficiado si se emplea una intervención quirúrgica de descompresión temprana. En otras palabras, el grado de degeneración histológica del tejido es parcialmente mitigable mediante la intervención quirúrgica temprana, observándose mejoras en los resultados de análisis neuroconductuales, al minimizar la duración de la compresión

del tejido medular comprometido (Ahuja et al., 2020). Por otro lado, en una revisión sistemática llevada a cabo por Wilson et al., 2017, se comparan la eficacia y seguridad de la descompresión quirúrgica temprana (≤ 24 horas) frente a la tardía (> 24 horas) en personas adultas con LME, dando lugar a resultados variados según el nivel de lesión. Estas pruebas apoyan la hipótesis de una mejor recuperación neurológica entre los pacientes con LME cervical sometidos a cirugía temprana; sin embargo, las pruebas relativas a las poblaciones con otro tipo de lesiones y los resultados terapéuticos fueron inconsistentes (Wilson et al., 2017).

Dolor neuropático luego de una lesión medular

Una de las consecuencias de la LME es el desarrollo de dolor neuropático, dolor crónico desencadenado como consecuencia de una lesión o patología que afecta al sistema nervioso somatosensorial (Taccola et al., 2008; Jensen et al., 2011). La presencia del mismo reduce aún más la calidad de vida del paciente y a menudo acompaña a los déficits motores asociados a la lesión. Particularmente, el dolor crónico es un problema clínico de importancia a tener en cuenta en casos de LME. Se sabe que el dolor neuropático es refractario a los fármacos de uso habitual en el entorno clínico, incluyendo los antiinflamatorios no esteroideos.

Implicancia de los receptores purinérgicos en las alteraciones funcionales luego de una lesión espinal

La señalización purinérgica juega un papel importante en la transmisión somatosensorial de la médula espinal en condiciones fisiopatológicas, mediada fundamentalmente por los receptores del tipo P2X y P2Y (Inoue and Tsuda, 2020). Estos son **canales iónicos activados por ATP**, que median las respuestas postsinápticas excitatorias (Burnstock and Wood, 1996; Ralevic, 2021). Las funciones de los receptores purinérgicos P2X (Kennedy, 2021) en la señalización del dolor se han estudiado ampliamente para dilucidar los mecanismos subyacentes al dolor persistente y como un importante objetivo terapéutico ante el dolor neuropático luego de las LME (Inoue and Tsuda, 2021). Recientemente se ha demostrado que los receptores P2X4 y P2X7 están implicados en el desarrollo del dolor después de una lesión de nervio periférico (Masoodifar et al., 2021; Tam & Salter, 2021) al igual que luego de la LME (Du et al., 2019). Los receptores P2X (P2XR) presentes en las terminales espinales regulan la liberación de neurotransmisores. Estudios realizados utilizando cortes de médula espinal y neuronas periféricas de ganglios de la raíz dorsal (DRG) y neuronas superficiales del asta dorsal espinal (SDH) mostraron que la activación de los P2XR aumenta las corrientes postsinápticas excitatorias glutamatérgicas en neuronas (Gu & MacDermott, 1997). Desde el punto de vista comportamental, la activación de los P2XR en la médula espinal mediante la administración intratecal de $\alpha\beta\text{meATP}$ produce hiperalgesia transitoria (Tsuda et al., 1999; Okada et al., 2002) y alodinia mecánica, ambas reducidas mediante la inhibición farmacológica de los P2X3Rs o P2X2/3R

(Fukuhara et al., 2000). Esta hipersensibilidad parece estar asociada a un aumento en la liberación de glutamato presináptico, que subsecuentemente, podría activar los receptores de NMDARs en las neuronas del SDH (Tsuda et al., 1999), contribuyendo así con la cascada excitotóxica.

De los P2XR, el **receptor P2X4** es uno de los más sensibles al ATP, y se encuentra abundantemente presente en las neuronas y células gliales de la médula espinal. Adicionalmente, las lesiones de médula espinal, la isquemia cerebral y los traumatismos aumentan la expresión del receptor P2X4 en las células microgliales. En 2003 se propuso una nueva estrategia de evocación de dolor neuropático (Tsuda et al., 2003), en la que luego de utilizar un modelo de inducción de lesión de nervio periférico (LNP) sobre el quinto nervio lumbar (L5) se evaluó la activación de la microglía espinal, y la sobreexpresión de P2X4Rs en estas células, lo cual demostró que este canal iónico juega un papel importante en el desarrollo del dolor neuropático. Además, utilizando esta estrategia, se logró revertir la alodinia mecánica desencadenada luego de la inducción de LNP a través de la administración intratecal de un inhibidor de P2X4Rs. Por otro lado, animales P2X4R knockdown o knockout resultan ser resistentes al desarrollo de alodinia (Tsuda et al., 2003; Ulmann et al., 2008). Estos resultados indican que la alodinia inducida por la LNP depende en parte de la señalización mediada por los P2X4R microgliales.

Por otro lado, el **receptor P2X7** tiene la menor afinidad por el ATP entre los receptores de esta familia. Se activa con altas concentraciones de ATP en el rango milimolar, superando claramente las concentraciones necesarias para activar otros P2XR. Sin embargo, ahora está claro que, en sitios de inflamación, la concentración local de ATP extracelular puede elevarse a niveles cercanos a los necesarios para estimular los receptores P2X7 (Di Virgilio et al., 2018); Además, algunos factores inflamatorios pueden actuar como moduladores alostéricos positivos (PAM), reduciendo así el umbral de ATP para la activación de los receptores P2X7.

Una de las características más relevantes de este receptor es su capacidad de actuar como canal catiónico no selectivo activado por ATP, permitiendo el paso de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} a través de la membrana celular, lo que conduce a una corriente despolarizante en el potencial de membrana en reposo. Con la estimulación agonista sostenida, la apertura de los poros permite una afluencia excesiva de Ca^{2+} , el agotamiento de los iones intracelulares, así como de los metabolitos, y finalmente la muerte celular. Además, el receptor P2X7 ocupa un lugar importante en el mecanismo global de la secreción de interleucina-1 ($\text{IL-1}\beta$), ya que su activación por ATP extracelular permite el flujo de K^+ citosólico que a su vez impulsa la activación de la caspasa-1 y el ensamblaje de NLRP3, proteína que actúa como componente del inflamasoma, que detecta productos de células dañadas, como el ATP extracelular, y desencadena la respuesta inmune (Illes et al., 2020). De hecho, el receptor P2X7 es el receptor de membrana plasmática más potente que desencadena el procesamiento y la liberación de pro- $\text{IL-1}\beta$ (Di Virgilio et al., 2017) y, por tanto, es un iniciador crucial

de la inflamación. En estudios previos, utilizando ratones P2X7 knockout se observó que estos son menos propensos a iniciar la inflamación en respuesta a una variedad de estímulos, ya que la secreción de IL-1 β madura está muy reducida, y, como consecuencia, el inicio de la cascada de citoquinas inflamatorias se encuentra disminuida (Solle et al., 2001).

La microglía posee la mayor densidad de receptores P2X7, superando la presente en los astrocitos/oligodendrocitos, mientras que las neuronas parecen carecer de este receptor (Illes et al., 2017). Se cree que los efectos atribuidos con anterioridad a la activación de los receptores P2X7 neuronales actúan de manera indirecta, mediada por la liberación de gliotransmisores, u otros tipos de moléculas de señalización glial como ATP y glutamato (Illes et al., 2019).

Por su parte, investigaciones llevadas a cabo en modelos de inducción de LME mecánica de los segmentos T12 de la médula espinal en ratas *in vivo* visualizadas mediante métodos de bioluminiscencia demostraron producir una liberación masiva de ATP en las células dañadas (Wang et al., 2004b). Esta liberación excesiva de ATP condujo a las neuronas de la médula espinal a aumentos irreversibles del Ca²⁺ intracelular y a la subsecuente muerte apoptótica de las células, demostrada mediante la presencia de condensación y fragmentación de la cromatina nuclear utilizando métodos de inmunofluorescencia. Adicionalmente, se demostró que la inyección de un antagonista parcialmente selectivo de P2X7R, Brilliant Blue G (BBG), a nivel rostral y caudal del epicentro de la lesión provocó una recuperación funcional locomotora más rápida que en grupos de tratamientos controles (Peng et al., 2009).

El receptor P2X7 ha sido el subtipo más investigado para el desarrollo de fármacos, y se han descrito numerosos antagonistas selectivos del mismo, principalmente de acción alostérica negativa (Gelin et al., 2020). El colorante de Coomassie Brilliant Blue, antagonista purinérgico no nucleotídico bloquea los receptores P2X7 y P2X4, dicho compuesto se ha utilizado en varios estudios debido a su bajo costo. Este colorante será uno de los principales compuestos a evaluar en la presente investigación, en relación a su capacidad de inhibición farmacológica de la lesión secundaria en la LME.

El rol de la señalización purinérgica en el proceso de neuroinflamación en las LME es compleja y sigue siendo un campo de investigación en constante expansión. Si bien en los últimos años se ha realizado varios avances en las intervenciones terapéuticas en LME la ventana temporal efectiva para realizarlos sigue siendo aún limitada e incierta.

Antecedentes

En las últimas dos décadas, numerosas investigaciones se han realizado con el objetivo de dilucidar los mecanismos moleculares implicados en el daño generado por las LME. Así mismo, tal como se ha descrito en la introducción de esta tesis, distintos estudios se han realizado tendientes a limitar o reducir el proceso neuroinflamatorio desencadenado luego de la LME en su fase más temprana posible.

Modelos *in vitro* de LME

Los modelos de análisis *in vitro* de médula espinal son de gran importancia en el estudio de las LME, ya que brindan datos útiles que simplifican la complejidad de la fisiopatología de las lesiones medulares en relación con modelos *in vivo*, facilitando la identificación de los procesos específicos que ocurren en la lesión sin la potencial interferencia del uso de anestesia general o posibles alteraciones fisiológicas como la presión sanguínea. Las preparaciones de médula espinal *in vitro* se han utilizado en una amplia gama de condiciones experimentales. En 1911, Graham Brown demostró que los mecanismos básicos del movimiento pueden reproducirse sin la necesidad de un comando descendente de la corteza (Whelan, 1996). En comparación con los experimentos *in vivo*, utilizando una cinta caminadora (treadmill) y electromiografías (Pearson et al., 2003), los experimentos en modelos *in vitro* médula espinal representan un modelo útil para profundizar diferentes aspectos sobre los circuitos que controlan la locomoción (Cazalets et al., 1992; Whelan, 1996; Pearson et al., 2003, 2005; Gordon et al., 2008). La característica común, y la principal propiedad de los sistemas *in vitro* es que mantiene las características básicas del tejido *in vivo* (Pearson et al., 2005), específicamente en la médula espinal se mantiene la cito arquitectura de base de los segmentos espinales, las conexiones sinápticas, y permite a su vez un acceso experimental estructural y funcional controlado (Spenger et al., 1991; Streit et al., 1991). Es posible además realizar experimentos de imágenes de calcio, registros extracelulares y manipular reversiblemente la actividad locomotora según se activen diferentes segmentos en forma individual (Deumens et al., 2013). Efectivamente, los inputs descendentes se cortan al realizar los cultivos de médula espinal (Whelan, 1996). La aplicación en el medio de cultivo de drogas como dopamina, NMDA, serotonina (5-HT), noradrenalina, permiten la activación del circuito del CPG, necesario para comenzar el patrón locomotor (Cazalets et al., 1992). Como se ha demostrado mediante el registro del patrón locomotor ficticio, una propiedad de los sistemas *in vitro* es que se mantienen viables por hasta 24 horas luego de su aislamiento, dando como resultado distintos estudios en este campo (Cazalets et al., 1992; Pearson et al., 2003; Gordon et al., 2008; Taccola et al., 2008). Es posible comparar los patrones locomotores obtenidos de los modelos *in vitro* de médula espinal a los registros obtenidos de los estudios *in vivo* mediante el registro de los patrones de disparo (bursting) de las raíces ventrales,

que reflejan las fases de alternancia ipsilateral y las fases musculares flexores – extensoras (Whelan, 1996; Pearson et al., 2003), cuya demostración esquemática se ve representada en la Figura 5.

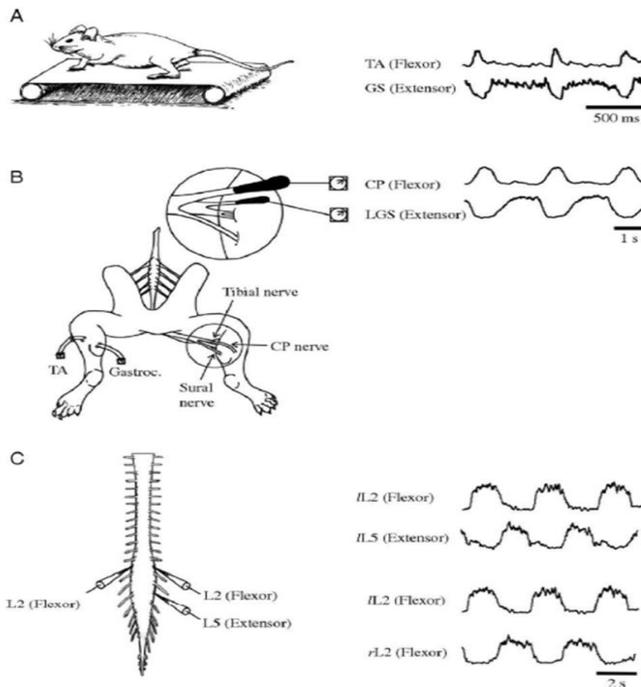


Figura 5: Comparación de la actividad locomotora registrada en los modelos *in vivo* e *in vitro*. (A) Registro de flexor y extensor en los músculos de ratones adultos en el treadmill (B) Registros de actividad muscular de los miembros inferiores mediante electromiografías y electroneogramas. (C) Preparados *in vitro* de médula espinal. Registros extracelulares, de las raíces ventrales izquierda y derecha en los segmentos 2-5, con las alternancias de fase flexor y extensoras (Figura adaptada (Whelan, 1996; Gordon et al., 2008) y (Pearson et al., 2005)).

Preparación de médula espinal de ratones neonatales *in vitro* como modelo de LME

El grupo de trabajo en el cual he desarrollado esta tesis ha realizado múltiples investigaciones en el área de LME. Específicamente, los primeros estudios realizados por Mazzone *et al.* 2010 se concentraron en evaluar la actividad electrofisiológica de la red neuronal espinal mediante la aplicación transitoria de KA, un análogo no metabolizable del glutamato, capaz de inducir un proceso excitotóxico imitando el periodo clínico de la mayoría de las LME. Explorando particularmente la relación dosis dependiente de KA con la supervivencia celular en áreas espinales y su relación con los patrones locomotores evaluados utilizando novedosas técnicas de análisis de la actividad locomotora ficticia *in vitro* (Taccola et al., 2008). Los resultados electrofisiológicos de dicha investigación indicaron que concentraciones de KA iguales (o superiores) a 50 μ M producen la desaparición de la locomoción ficticia sin recuperación, sugiriendo que hay un umbral crítico para la excitotoxicidad mediada por KA. En esta línea, el modelo murino neonatal es utilizado para investigar la rápida evolución del daño secundario temprano de LME (Taccola et al., 2008; Mazzone et al.,

2010; Mazzone, et al., 2017). Este modelo tiene la ventaja de correlacionar el resultado funcional de la lesión (con un seguimiento de >24 h de la actividad locomotora, denominada locomoción ficticia) con el número, el tipo y la topografía del daño y muerte celular, debido a que la médula retiene las conexiones celulares y actividades propias del tejido. Este modelo puede emplearse para producir y comparar distintas formas de daño espinal mediante métodos farmacológicos, particularmente la estimulación excitotóxica que surge luego de un trauma físico o perturbaciones metabólicas severas (Taccola et al., 2008; Mazzone et al., 2010). Los eventos patológicos ocurren durante la fase secundaria de la LME y su relación con las vías nociceptivas del dolor en este modelo serán discutidos más adelante en esta tesis.

Cultivos organotípicos para el estudio de LME

Los cultivos organotípicos son también una herramienta importante a la hora de estudiar el desarrollo y los cambios crónicos estructurales y funcionales de la red neuronal. Una característica común y la principal ventaja de este sistema es el mantenimiento de la morfología celular básica del tejido *in vivo* conservando, por ejemplo, las conectividades sinápticas por más tiempo, lo cual proporciona mayor acceso experimental a la estructura y función del tejido (Spenger *et al.*, 1991; Streit *et al.*, 1991; Streit, 1996). Esto permite realizar estudios a largo plazo en los que se pueden explorar las alteraciones en las propiedades de la red en relación con los cambios en el entorno celular local (Sibilla and Ballerini, 2009), más allá del tiempo de supervivencia estándar de la médula espinal aislada de los roedores, resultando ser útiles para llevar a cabo experimentos con respecto a lesiones del tejido neuronal espinal (Guzman-Lenis et al., 2009; Mazzone et al., 2010). Utilizando este modelo nuestro grupo de trabajo pudo demostrar que existe liberación excesiva de glutamato, inducido por el tratamiento con KA, y describir su rol en el proceso de muerte neuronal. Por otro lado, nuestro grupo ha desarrollado un método para estudiar la liberación de glutamato en tiempo real con una técnica basada en un biosensor electroquímico específico (Mazzone and Nistri, 2011c). Con este método se ha podido demostrar el efecto de fármacos neuroprotectores como el riluzol (2-amino-6-trifluoromethoxybenzothiazole; Rilutek), uno de los pocos fármacos con licencia para el tratamiento de la ELA, que inhibe la liberación de glutamato (Mazzone and Nistri, 2011a; Cifra et al., 2012b). Asimismo, nuestro grupo ha demostrado que la neuroprotección inducida por el riluzol está restringida mayoritariamente a las regiones dorsales y centrales de la médula espinal, y que estaría mediada por mecanismos no identificados inducidos luego de la liberación de glutamato (Mazzone and Nistri, 2011a). Se ha demostrado también que la muerte celular inducida por el estrés excitotóxico transitorio podría desencadenar la activación y proliferación de células neuroprogenitoras endógenas, que expresan doblecortina como marcador de linaje neuronal (Juhsova J, 2015), siendo estas una fuente potencial ante el proceso de reparación de la lesión espinal (Mazzone et al., 2013).

Finalmente, los estudios realizados por nuestro grupo de trabajo buscaron describir si ante un daño químico inducido por KA era posible estimar la liberación de ATP conjuntamente con el glutamato. Tal como fue postulado por Geoff Burnstock el ATP actuaría como un neurotransmisor y, por lo tanto, molécula de señalización extracelular al igual que glutamato, y GABA, entre otros, tanto en neuronas como en células gliales, con un papel importante en la neuromodulación presináptica (Burnstock, 2020). Nuestros estudios preliminares sugieren que concomitantemente a la liberación de glutamato se produciría una rápida liberación de ATP, tal como hemos podido registrar por un biosensor electroquímico específico al realizar tratamientos con KA por 1 h y compararlo luego con una curva de calibración para ATP como se ve representado en la Figura 6 (datos no publicados).

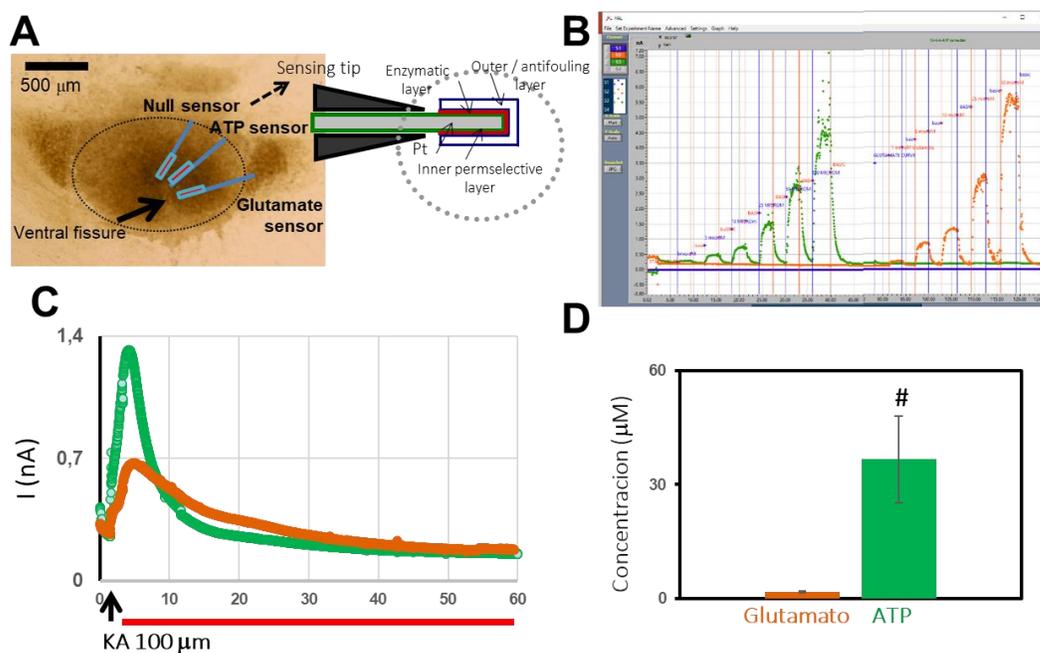


Figura 6: Liberación de ATP y glutamato en tiempo real a partir de cultivos organotípicos de médula espinal luego de la aplicación de KA. A, Los sensores nulos, ATP y glutamato se colocaron en el área ventral con referencia a la fisura ventral. B, los sensores lineales a ATP (verde) y glutamato (naranja) se validaron mediante una curva de calibración para ATP (0,5-100 μM) y glutamato (0,5-50 μM). C, los cultivos se trataron con KA, mientras que la liberación de glutamato (verde) de ATP (naranja) se registraba continuamente durante 1 h. D, Curvas promedio de las corrientes redox amperométricas obtenidas para ATP y glutamato (μM) durante el curso de tiempo y monitoreada continuamente durante todo el experimento, $n = 4-5$ rodajas tratadas con KA. D, los histogramas muestran el promedio de concentración de ATP y glutamato para cortes tratados con KA durante 1 h, $n = 4-5$ cortes, $p=0,0304$, prueba t .

Estos estudios serán complementados en la presente tesis y permitirán dilucidar el rol del ATP y la activación de los receptores purinérgicos implicados en una lesión excitotóxica aguda. Los resultados obtenidos hasta el momento delinean una ventana temporal estrecha para futuros intentos experimentales tendientes a reducir la pérdida neuronal, mitigar los daños asociados a los efectos secundarios e identificación de los factores que regulan este proceso (Mazzone et al., 2013).

Objetivo general

El objetivo general del presente proyecto es evaluar la eficacia de diferentes alternativas terapéuticas farmacológicas para limitar o reducir el proceso neuroinflamatorio desencadenado luego de la LME en su fase más temprana posible. Nos proponemos estudiar el rol de la señalización purinérgica mediada por los receptores P2X4 y P2X7 en el daño secundario desencadenado luego de una lesión química de la médula espinal, analizando su participación en la generación de alteraciones motoras (cambios en sincronidad y alternancia en la marcha).

Objetivos específicos

- Estudiar cambios en los niveles y patrones de expresión de los canales P2X4 y P2X7 en la médula espinal lesionada, y correlacionarlos con la presencia de marcadores de daño neuronal, activación glial y con el desarrollo de alteraciones motoras. Evaluar si la administración de antagonistas farmacológicos de los receptores P2X4 y P2X7 induce neuroprotección.
- Analizar si la administración del antagonista purinérgico no nucleotídico Coomassie Brilliant Blue (CBO) que bloquea los receptores P2X7 y P2X4, o el antioxidante natural resveratrol, logran atenuar el daño secundario y los déficits motores desencadenados por la lesión espinal, e investigar su participación en la modulación de la señalización purinérgica.

Hipótesis

La hipótesis general de este trabajo es que luego de la estimulación excitatoria presináptica inducida por un daño espinal donde se induciría la liberación de glutamato y co-liberación ATP, estos eventos desencadenarían la activación de los receptores purinérgicos P2X4 y P2X7, que a su vez modularían la respuesta inflamatoria (Figura 5). Estas alteraciones excitatorias estarían asociadas a cambios postsinápticos en los niveles de expresión o activación de los receptores extracelulares P2X4 y P2X7, eventos que podrían amplificar el proceso de daño secundario inducido por el proceso de excitotoxicidad y mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias que favorecerían la neurodegeneración. La administración de antagonistas y moduladores alostéricos para los receptores P2X podría reducir o amplificar las consecuencias de la neurodegeneración y a su vez manifestaciones asociadas a la excitabilidad como ser la generación de alteraciones motoras (cambios en la sincronidad y la alternancia en la marcha).

Materiales y métodos

Consideraciones de bioseguridad

Los protocolos experimentales fueron evaluados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del IIMT – CONICET: Protocolo 08-2021 “Uso de moléculas inmunomoduladoras para el tratamiento de las alteraciones locomotoras y el dolor neuropático asociados a lesiones de la médula espinal”, Investigadora Responsable: Dra. GL Mazzone, fecha de resolución 26/11/2021. El bioterio del IIMT es el que se criaron y alojaron los animales durante todo el proceso experimental y cuenta con personal técnico y veterinario altamente capacitado. Las técnicas empleadas en la manipulación de los animales, los protocolos experimentales, las pruebas funcionales fueron diseñadas para minimizar su sufrimiento reduciendo el número de animales al mínimo necesario para obtener resultados significativos. Los desechos provenientes del bioterio (restos de animales, viruta) y los materiales descartables utilizados (tubos, jeringas, agujas) fueron descartados siguiendo las indicaciones de la Comisión de Higiene y Bioseguridad del Hospital Austral.

Modelo experimental *in vivo* de lesión espinal en ratón

Diseño experimental

En la presente tesis se propuso estudiar el rol de los receptores de membrana de ATP, P2X4 y P2X7, como moduladores del daño secundario en el mecanismo neurodegenerativo desencadenado luego de inducir una lesión espinal, tanto *in vivo* como *in vitro*. Para evaluar el efecto funcional de las LME y su evolución temporal se utilizaron modelos de LME mecánica y química en animales Balb/c adultos. Para inducir un daño traumático se empleó un clip de aneurisma modificado y para la lesión química la micro inyecciones de KA (1 y 5 mM), de acuerdo con los procedimientos ya establecidos en el laboratorio (Taccola et al., 2008; Mazzone et al., 2010; Mazzone, et al., 2017; Mazzone et al., 2020). Se analizaron las posibles mejoras funcionales mediante los tests de locomoción de Basso-Beattie-Bresnahan para ratón (BMS), de grid-walk. Se analizaron también cambios histológicos de la médula espinal con aplicación de inmunomarcaciones. Para evaluar el efecto de distintos tratamientos neuroprotectores y según los objetivos propuestos en la presente tesis se utilizó comassie brilliant blue (CBO, 10 μ M) o resveratrol (REV, 50 mg/Kg) tal como se describe en las Figuras 7 y 8.

Protocolo de lesión *in vivo* de LME

Los animales fueron anestesiados, utilizando isoflurano 2% (mg/Kg) mediante su inhalación con máscara de respiración, y se procedió a realizar una laminectomía dorsal a nivel torácico T10-T12.

Una vez realizada la incisión, quedó expuesta la médula espinal, y se realizaron inyecciones con KA (1 y 5 mM), un análogo de glutamato metabólicamente estable y con actividad agonista de los receptores ionotrópicos de glutamato AMPA/KA, con efecto excitotóxico tal como se ha descrito previamente (Akaike et al., 2001; Farag et al., 2019; Mazzone et al., 2020). Posteriormente, se procedió a suturar las capas musculares y la piel. Se colocó lidocaína en las zonas de incisiones. Se suministró tramadol cada 12 horas por la vía subcutánea (5 mg/kg), durante las primeras 72 horas y según necesidad, también se dejó una dosis de tramadol en el agua de bebida (25 mg/mL).

El modelo de daño de médula espinal traumática por compresión se realizó empleando un clip de aneurisma modificado, para lo cual se siguieron protocolos previamente establecidos (Joshi and Fehlings, 2002a, 2002b; Mazzone et al., 2020). Este tipo de lesión afecta a toda la médula espinal, como ha sido descrito, ya que con el clip se comprime todo el espesor de la médula espinal del ratón. Luego de realizar este tipo de lesiones, los animales sobreviven a la cirugía por varios días, permitiendo obtener animales con distintos grados de gravedad de la lesión al compararla con el daño químico inducido por el agregado de KA (Mazzone et al., 2020)

Para evaluar el progreso comportamental de dichos tratamientos, se realizaron distintas pruebas comportamentales, empleando tres métodos de análisis de actividad locomotora; luego del cual los ratones fueron sometidos a eutanasia y sus médulas removidas quirúrgicamente para su posterior fijación en paraformaldehído (PFA, 4 %) y utilización en las técnicas de inmunohistoquímica descritas más adelante (Figura 7).

Análisis de la actividad y coordinación locomotora utilizando distintas pruebas funcionales

Caracterización funcional locomotora

Para evaluar el efecto funcional de las lesiones medulares y su evolución temporal, se analizó la actividad locomotora de los miembros posteriores en un modelo de LME *in vivo* (Mazzone et al., 2019, 2020) mediante la escala de BMS, siguiendo los protocolos ya establecidos (Basso et al., 2006). Los valores estuvieron en un rango de 0 (parálisis flácida) y 11 (marcha normal), y guardan relación con la movilidad, el apoyo del peso y la coordinación, puntos que reflejan el posicionamiento de la planta de las extremidades, su movimiento al caminar (toe clearance) y la posición de la cola. Para evitar sesgos en la cuantificación y asegurar su transparencia, la evaluación locomotora se realizó utilizando un programa computacional recientemente desarrollado para obtener los parámetros de BMS (Gómez et al., 2018). Con el objetivo de obtener resultados cuantitativo más estandarizado con los distintos grupos experimentales y empleando el plugin Animal tracker del software ImageJ se analizó la distancia recorrida (cm) y el porcentaje de tiempo de inmovilidad respecto al tiempo total analizado, siguiendo protocolos previamente establecidos (<http://animaltracker.elte.hu/>).

Se aplicó también la prueba de huella o plantilografía, siguiendo protocolos ya establecidos en la literatura (Marques et al., 2009). Para ello, las plantas de las extremidades anteriores y posteriores fueron teñidas con tinturas rojas y azules no tóxicas, respectivamente, y se dejó caminar a los ratones sobre papel blanco dentro de una pasarela. De esta forma fue posible evaluar el área de las huellas, su distancia, la coordinación ipsilateral, la duración de los ciclos de alternancia y la regularidad de los pasos, entre otros parámetros. Como último test comportamental se empleó la prueba de gridwalk, o escalera, en la cual los ratones debieron cruzar voluntariamente por una grilla horizontal de 70 cm con 36 peldaños, y donde se estimó el número de errores de apoyo de los miembros posteriores respecto a los peldaños totales. Esta prueba permitió discriminar la coordinación de distintas posturas relacionadas con la movilidad de las extremidades posteriores como fue establecido en la literatura (Cummings et al., 2007).

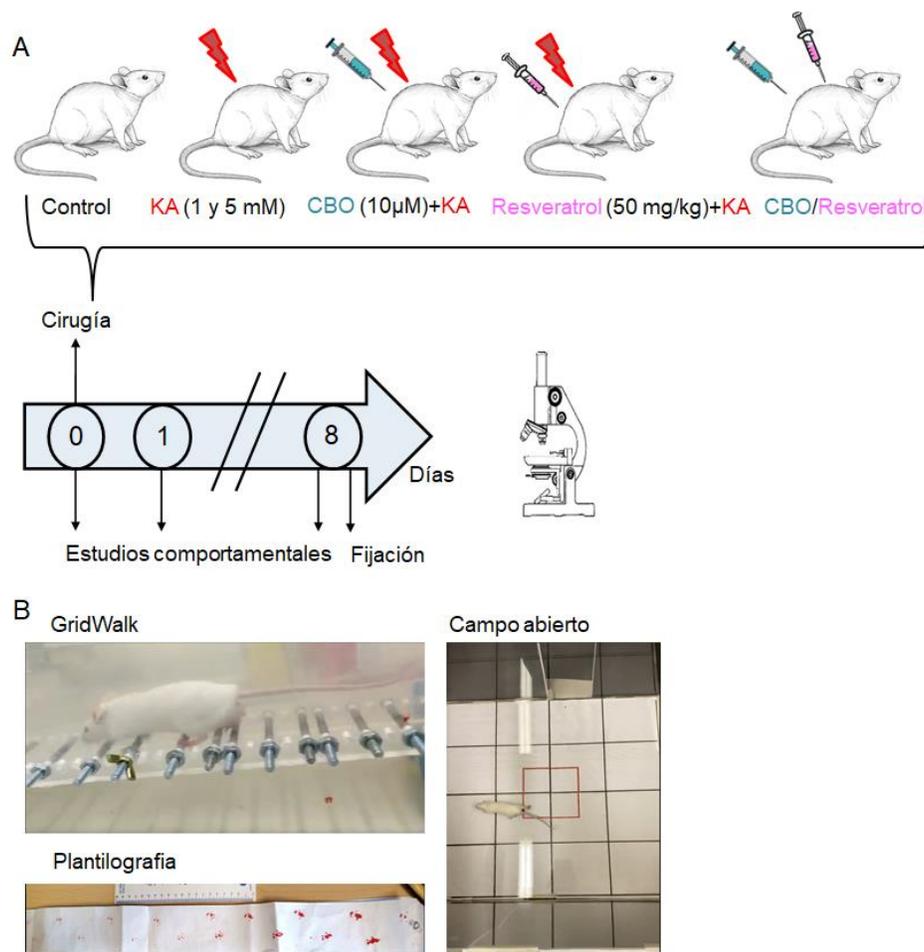


Figura 7. Protocolos y grupos experimentales realizados en el estudio. En (A) se representan los 5 grupos experimentales y la línea de tiempo con las intervenciones realizadas en los animales

utilizados para los estudios comportamentales (8 días). En (B) se representan las 3 evaluaciones comportamentales realizadas (gridwalk, plantilografía y campo abierto) en los días 0, 1 y 8 al final del cual los animales fueron sacrificados y sus médulas extraídas y fijadas en PFA.

Preparación y mantenimiento *in vitro* de los preparados de médula espinal de ratón

Los experimentos *in vitro* fueron realizados utilizando preparados de médula espinal toracolumbar aisladas a partir de ratones Balb/c de 0-3 días de edad postnatal, alojados en el bioterio del IIMT de la Universidad Austral. Para ello se procedió a realizar una laminectomía, procedimiento que permite abrir el conducto raquídeo cortando los huesos laminares ventrales de la columna, dejando expuesta la médula espinal para luego extirparla, manteniendo intactas las raíces ventrales y dorsales. La disección se realizó en solución de Krebs carbogenada durante al menos 24 h, como ha sido previamente descrito (Taccola et al., 2008; Mazzone et al., 2010; Mazzone, et al., 2017). La solución de Krebs está compuesta por (en mM): NaCl, 113; KCl, 4.5; MgCl₂·7H₂O, 1; CaCl₂, 2; NaH₂PO₄, 1; NaHCO₃, 25; glucosa, 11; fue gaseada con 95% O₂ 5% CO₂ y mantuvo a un pH de 7.4. Posteriormente, la médula se mantuvo en cultivo en una solución de Krebs carbogenada durante 4 horas (Figura 8).

Grupos experimentales y tratamientos

Como hemos descrito previamente, los modelos *in vitro* utilizados para el estudio de las lesiones espinales mantienen varias características de las lesiones y modelos *in vivo*. Para evaluar los efectos neuroprotectores se repitieron los mismos grupos experimentales para los preparados aislados de médula espinal utilizando el modelo de lesión química inducida por KA y CBO, analizando los siguientes grupos experimentales: (1) Control; (2) KA (100 µM); (3) KA + CBO (10 µM); (4) CBO, (10 µM). Luego de las cuatro horas de tratamiento las médulas espinales fueron fijadas en PFA (4%) por 24 horas, tal como se esquematiza en la Figura 8. Posteriormente las médulas fueron mantenidas a en sacarosa (30%) hasta el procesamiento por la técnica de inmunofluorescencia que se describe a continuación.

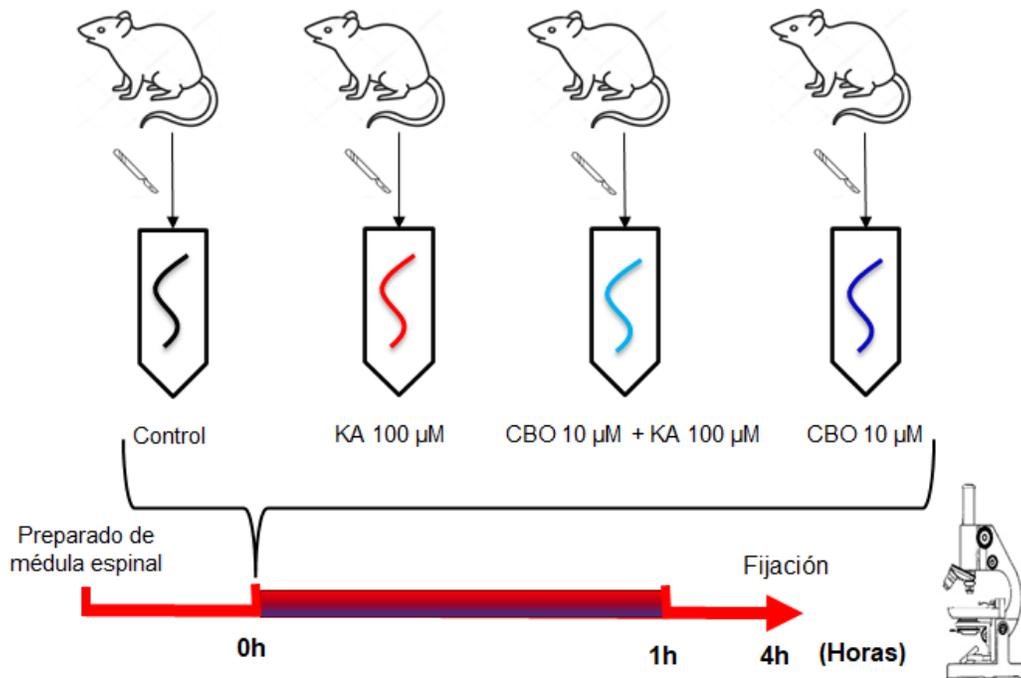


Figura 8. Protocolos y grupos experimentales incluidos en el estudio *in vitro*. Se representan los 4 grupos experimentales utilizados y la línea de tiempo con la duración de las incubaciones medulares para los grupos Control, KA, KA+CBO y CBO (1 hora), siendo luego transferidos a soluciones de paraformaldehído para su fijación y posterior procesamiento para inmunohistoquímica.

Procedimiento de inmunofluorescencia

Luego de realizar la evaluación funcional, se procedió a sacrificar a los animales, y diseccionar la médula espinal, las cuales fueron fijadas en PFA (4%) a 4°C durante toda la noche, y posteriormente conservadas en sacarosa 30% hasta su procesamiento. El tejido se incluyó en OCT y se realizaron cortes (20 µm) en un criostato que fueron montados en portaobjetos. Se realizaron inmunomarcaciones con el objeto de analizar la contribución de los distintos tipos celulares en las diferentes zonas de interés de la médula espinal, tal como se describió en estudios previos del laboratorio (Cifra et al., 2012a), representados en la Figura 9. Para ese fin, se utilizaron anticuerpos específicos para neuronas (NeuN y RbFOX), astroglia (S100β y GFAP), microglía (Iba1) (ver Tabla 1). Los núcleos fueron teñidos mediante el agregado del colorante 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). A su vez, se procedió a cuantificar el grado de avance de la lesión y su evolución temporal evaluando la desaparición de los marcadores neuronales y el aumento de la reactividad glial. Las cuantificaciones fueron realizadas utilizando el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Name	Supplier	Cat Number	Host	Dilution
S100β	DAKO	Z031101	Rabbit polyclonal	1:750
NeuN	Millipore	MAB377	Mouse monoclonal	1:200
Iba1	Wako	019-19741	Rabbit polyclonal	1:500
GFAP	SIGMA	G3893	Mouse monoclonal	1:500
RbFOX	NovusBio	NBP1-77686SS	Rabbit polyclonal	1:200

Tabla 1. Anticuerpos que fueron utilizados para el análisis de inmunofluorescencia

A Médula Espinal

Regiones
Dorsal: 350 x 350 μm
Central: 350 x 350 μm
Ventral: 235 x 235 μm

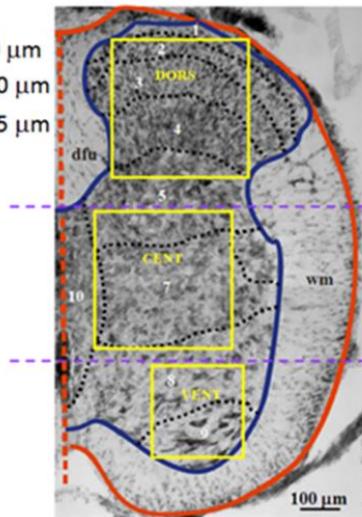


Figura 9: (A) Ejemplo de una sección lumbar de médula espinal de 30 μm teñida con azul de toluidina. La sustancia gris se indica mediante el contorno azul, mientras que el contorno de la médula espinal se evidencia en rojo. La laminación de Rexed se evidencia con línea puntada negra. La médula se divide en las regiones dorsales, centrales y ventrales, como indican los cuadrados amarillos. La línea violeta superior indica el final del funículo dorsal, comprendido hasta la mitad de la lámina de Rexed 5. La región central comprende las láminas 5, 7 y 10. La región ventral, por debajo de la segunda línea punteada violeta, comprende las láminas 8 y 9. La superficie de cada región se indica en la figura en μm. Figura modificada de (Cifra et al., 2012a)

Protocolo de inmunohistoquímica

Todos los procedimientos fueron realizados en una caja húmeda a temperatura ambiente. Las secciones de tejido previamente montadas y preservadas fueron lavadas en buffer fosfato 1x (PBS) y posteriormente bloqueadas en solución de bloqueo (FCS 5%, BSA 5%, Tritón 0,3%, PBS 1X, a

volumen con agua MiliQ). A continuación, se retiró la solución de bloqueo para agregar los anticuerpos primarios diluidos en la solución de anticuerpos (FCS 1%, BSA 1%, 0,1%, PBS 1X, a volumen con agua MiliQ). Las diluciones utilizadas para cada anticuerpo se encuentran detalladas en la Tabla 1. Como se describe en la misma, el anticuerpo NeuN fue utilizado para la identificación de las neuronas, dado que reconoce el factor de transcripción Fox3 (Kim et al., 2009); S100 β (una proteína de unión a Ca²⁺, que es producida principalmente por astrocitos en el sistema nervioso central al igual que GFAP), Iba1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1) reconoce la secuencia carboxi-terminal de Iba1, una proteína que une calcio específica de macrófagos y microglía (Ito et al., 1998)

Para visualizar los anticuerpos primarios, se agregaron los anticuerpos secundarios específicos en una dilución 1:200 en solución de anticuerpos, por 2 horas. Dichos anticuerpos secundarios se encuentran conjugados con un colorante fluorescente (FITC o TRITC, Jackson ImmunoResearch, <https://www.jacksonimmuno.com/>) y proporcionan de esta forma la capacidad de distinguir entre las múltiples proteínas en una sola muestra. Finalmente, los preparados se montaron con el medio de montaje DABCO. Las imágenes para el análisis fueron tomadas con un microscopio Nis-Eclipse microscope (NIKON, Amsterdam, Netherlands), usando aumentos de 20X y 40X, y discriminando entre las regiones dorsales y ventrales de la médula como se puede observar en la Figura 10. Esta distinción se realizó porque la composición celular de las regiones dorsales y ventrales de la médula es diferencial, en la zona dorsal se verá una amplia población de interneuronas y en la zona ventral tanto interneuronas como motoneuronas (Cifra et al., 2012a).

Cuantificación de las distintas poblaciones celulares presentes en los preparados *in vitro* de médula espinal

Se cuantificó el grado de avance de la lesión y su evolución temporal evaluando la desaparición de los marcadores neuronales, mediante el conteo de NeuN e Iba1 en las distintas regiones, y/o el aumento de la reactividad glial. Dado que S100 β y GFAP son marcadores fibrilares y su inmunomarcación es difusa se procedió a cuantificar estos anticuerpos analizando su expresión en unidades arbitrarias de fluorescencia media estimadas mediante un análisis densitométrico. Las cuantificaciones y/o conteos para cada tratamiento en las distintas regiones de la médula espinal fueron realizadas utilizando el programa ImageJ (NIH, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>).

Evaluación de la muerte celular

Como medida de muerte celular se estimó el porcentaje de células que presentaron condensación de cromatina nuclear (Picnosis), la cual es representativa del proceso de muerte celular (Burgoyne, 1999), como se ejemplifica en la Figura 11 y tal como el grupo de trabajo ha descrito previamente

en los estudios previos (Mazzone et al., 2010). Para cuantificar los porcentajes de núcleos con cromatina condensada, al igual que el número de células positivas para NeuN, en las distintas regiones de la médula espinal se utilizó el programa el plugin Cell Counter, que es un complemento para el software ImageJ que permite el conteo de objetos a partir de imágenes color. Dichos datos fueron recopilados, utilizados en la confección de gráficos y analizados estadísticamente, tal como se describe a continuación.

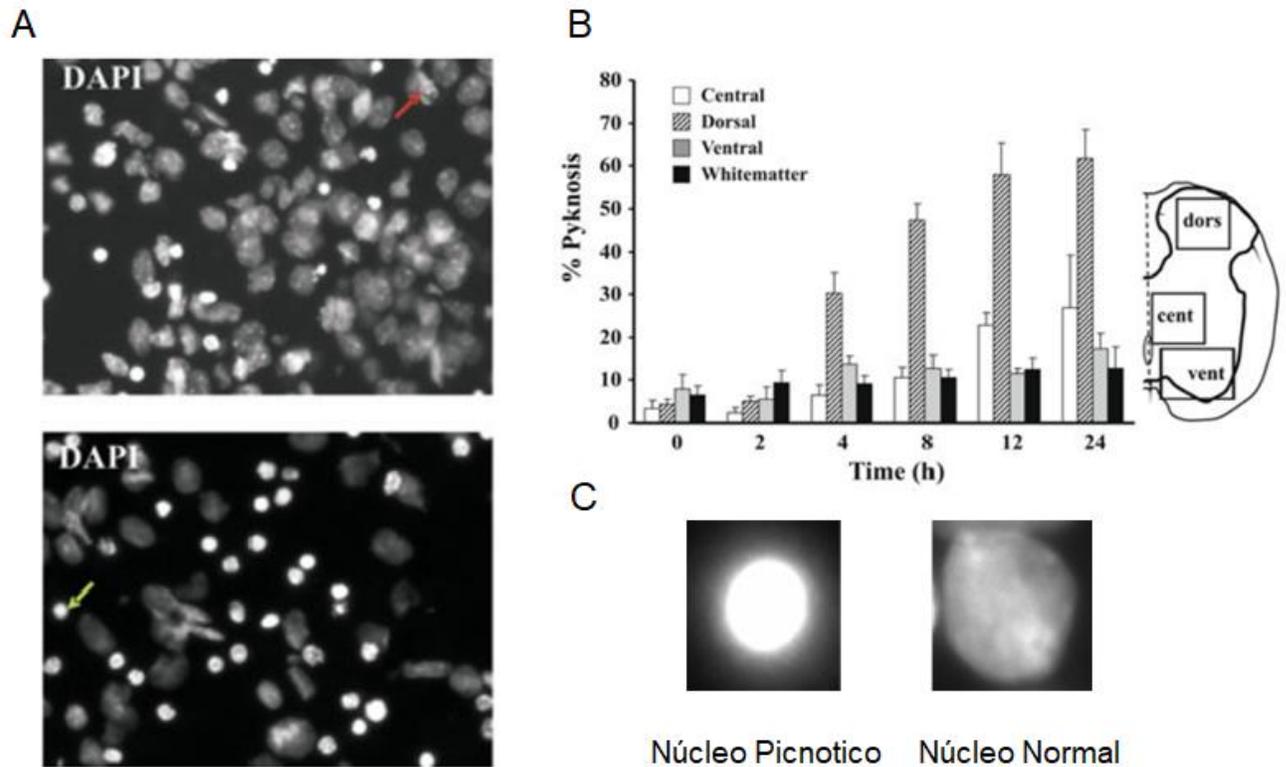


Figura 11. Representación del daño celular evocado por la aplicación de KA en preparados de médula espinal de ratones postnatales mediante la visualización de picnosis nuclear. (A) Imágenes representativas de los núcleos de la región central de la médula espinal 24 h después del tratamiento con KA. En la imagen superior se evidencia la presencia de núcleos normales (flecha roja) en comparación con la imagen inferior donde se evidencia un núcleo picnótico (flecha verde). (B) Histograma representativo del porcentaje de picnosis en varios puntos temporales tras lavado (0 h) del KA (1mM) durante 1h. El recuadro derecho muestra la representación esquemática de las áreas analizadas para el recuento de celular. Imagen modificada de Kuzhandaivel et al., 2010. (C) Imágenes representativas a mayor escala de un núcleo normal en comparación con uno núcleo picnótico observado luego de la tinción con DAPI.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media + el error estándar de la media (SEM); n se refiere al número de animales o secciones (médula espinal). Los datos se analizaron mediante test de ANOVA para los datos paramétricos, seguido de prueba a posteriori apropiados, Tukey-Test post-hoc de Kramer o pruebas de t para las comparaciones entre dos grupos diferentes. Los valores no paramétricos se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis o la prueba de Mann-Whitney. Se aceptaron diferencias estadísticamente significativas a $p \leq 0.05$. El análisis estadístico se realizó mediante SigmaStat (SigmaStat 3.1, Systat Software, Chicago, IL, USA).

Resultados

Validación del modelo murino de LME: daño químico y traumático. Pruebas funcionales para evaluar la actividad locomotora y caracterización histológica del tejido lesionado

En los primeros experimentos realizados en esta tesis se pudieron estimar los efectos del daño traumático y químico en ratones BALB/c adultos. Tal como se describe en la metodología, el procedimiento consistió en una compresión de la médula espinal a nivel toraco-lumbar, aplicando durante 1 minuto un clip de aneurisma modificado, siguiendo protocolos previamente establecidos (Joshi and Fehlings, 2002a). Como el efecto conseguido fue muy drástico, permitiendo muy poca capacidad de recuperación, nos propusimos aplicar un modelo de lesión química. Previamente se pudo demostrar que el KA, un potente análogo del glutamato, induce la muerte neuronal, a través de excitotoxicidad, con un daño moderado a la sustancia blanca (Taccola et al., 2008; Mazzone et al., 2010). Es por ello que se decidió evaluar un modelo de lesión espinal inducido por la aplicación de KA (1 y 5 mM) con la aplicación de una sola dosis a nivel del funículo dorsal en el límite toraco-lumbar. Para evaluar temporal y funcionalmente las lesiones medulares químicas y traumáticas se procedió a realizar distintos estudios comportamentales, previa aclimatación, con el registro y análisis de al menos dos observadores en cada experimento.

El primer test consistió en la medición de la actividad locomotora *in vivo* mediante la estimación de parámetros como la distancia recorrida según el test de campo abierto, siguiendo los protocolos ya establecidos en la literatura (Basso et al., 2006). Un resumen de los resultados obtenidos hasta el momento se detalla en la Figura 12. Mediante esta escala BMS, fue posible otorgar una calificación locomotora a los distintos grupos de animales. En los estudios realizados con los dos modelos de lesión se observaron reducciones significativas y tiempo-dependientes en la escala de BMS, en relación a los animales controles. Esto implica que tanto las lesiones traumáticas como químicas reducen la capacidad locomotora (Figura 12).

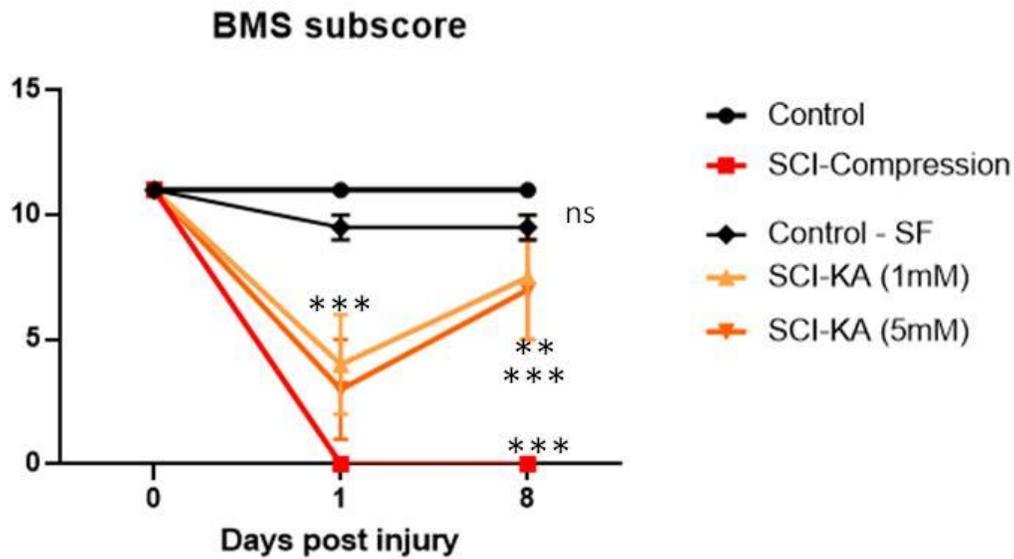


Figura 12: Resumen de resultados obtenidos para la evaluación de la actividad locomotora. Gráficos que muestran comparaciones estadísticas de valores de la escala BMS antes y después de la aplicación de las diferentes injurias. ANOVA, $p < 0,05$. $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; comparaciones múltiples por el test Dunnett, $n=2-5$.

Concomitantemente se realizó también un estudio de la plantilografía que permitió un análisis cualitativo de las extremidades posteriores utilizando la prueba de huella, antes y después de las LME, tal como descrito previamente en la literatura (Marques et al., 2009). Para ello, las plantas de las extremidades posteriores fueron teñidas con tinturas rojas no tóxicas y se dejó caminar a los ratones sobre papel blanco dentro de una pasarela. De esta forma, como se representa en la Figura 13, fue posible evaluar el número de las huellas (no mostrado), su distancia, la coordinación ipsilateral, la duración de los ciclos de alternancia y la regularidad de los pasos, entre otros parámetros. Se observó una ausencia total de huellas en animales lesionados por compresión completa y no se observaron cambios significativos en el contexto de lesiones químicas.

Footprint detection

Control (Laminectomy)

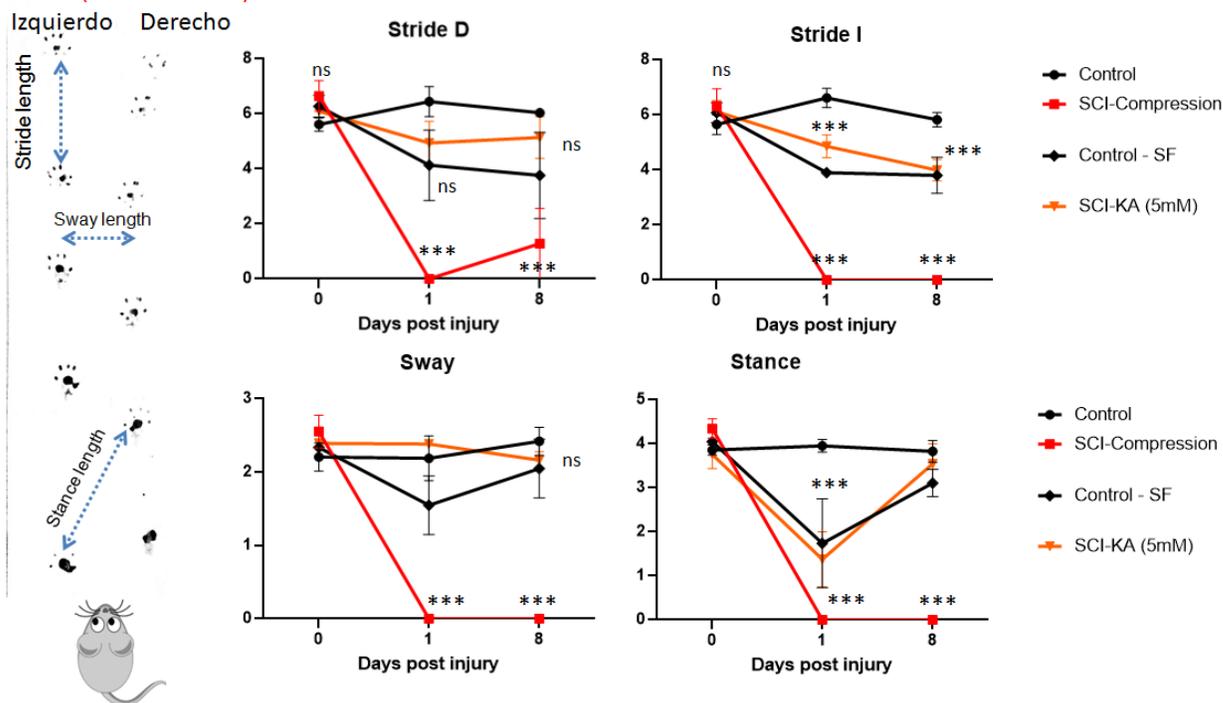


Figura 13: Resumen de resultados obtenidos para la evaluación de la actividad locomotora mediante el análisis de la plantilografía para los procedimientos de compresión y KA (5 mM) en la médula espinal. Estudio de la plantilografía que permitió un análisis cualitativo de la extremidad posterior en los grupos control y para los procedimientos de compresión y KA, $n=2-5$, ANOVA, $p<0,05$. *** $p<0,001$; prueba de comparaciones múltiples comparaciones por el test Dunnett.

El desplazamiento y la locomoción requieren distintas habilidades motoras, incluyendo el movimiento coordinado de los miembros. Es por ello que se realizó una prueba de la escalera horizontal que permite discriminar la coordinación de distintas posturas relacionadas con la movilidad de las extremidades anteriores y posteriores (Cummings et al., 2007). Se procedió así a realizar una estimación de la cantidad de peldaños errados a lo largo del eje horizontal, sobre la cantidad de peldaños totales analizados, analizando la colocación de la pata mientras el animal camina por una escalera. Se consideró error a los casos en que: 1) la superficie plantar de la pata trasera establece contacto inicial con un peldaño, pero, tras perder su equilibrio, el pie cae por debajo del nivel de los peldaños; 2) la pata trasera pasa entre dos peldaños sin apoyarse en los mismos, o 3) es la superficie dorsal de la pata trasera la que hace contacto con el peldaño. Se realizó una filmación: los registros fueron analizados al menos por dos observadores distintos. Tal como se describe en la literatura, la prueba refleja una mayor tasa de peldaños errados coincidentemente con una mayor gravedad de la LME. El mayor porcentaje de error para las patas derecha e izquierda, respecto a los peldaños

totales, se observó luego de 24 hs de inducida la lesión por compresión como se ve representado en la Figura 14. Interesantemente, se observó un incremento significativo de errores tras la inyección del KA (5mM) en la pata izquierda. Como conclusión de estos experimentos se observó un efecto diferencial de los modelos de LME empleados. Lo que nos permitirá analizar la naturaleza heterogénea de la lesión espinal en los estudios de recuperación, tal como se refleja en la clínica (Khorasanizadeh et al., 2019).

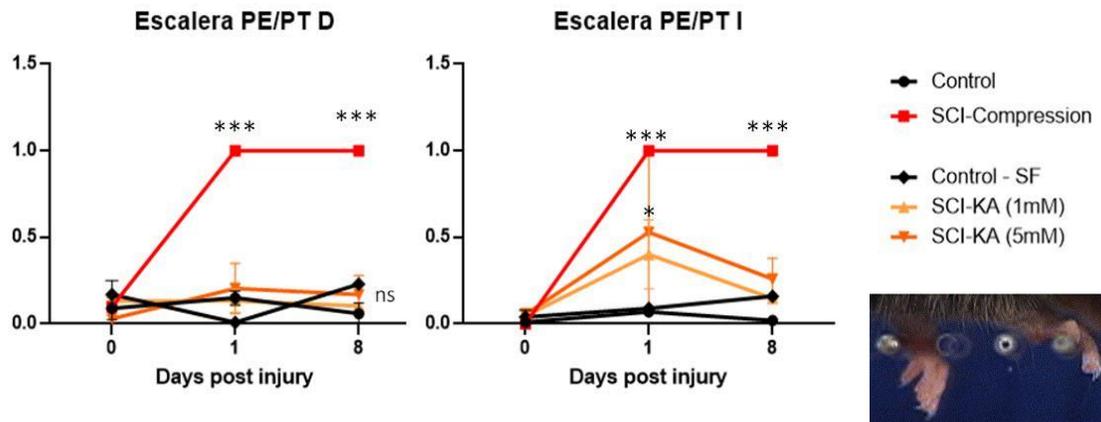


Figura 14: Evaluación del efecto de las lesiones espinales sobre la actividad locomotora mediante la prueba de la escalera para las extremidades posteriores. Gráficos con comparaciones del número absoluto de errores por animal para la extremidad derecha (D) e izquierda (I), sobre el total de peldaños analizados. $n=2-4$. ANOVA, $p<0,05$; * $p<0,05$; *** $p<0,001$ múltiples comparaciones por el test Dunnett.

Luego de realizar las pruebas comportamentales (Figuras 12-14) y con el objetivo de analizar el grado de lesión, se realizó una caracterización histológica en las lesiones por compresión, cuyo análisis de puede apreciar en la Figura 15. En el modelo de compresión completa se redujo el número de neuronas en las zonas lesionadas (Figura 15B), sin afectar las zonas rostrales y caudales de la lesión. Con el paso del tiempo, se observó una expansión considerable de la zona lesionada hacia los costados de la zona directamente lesionada (no mostrado). Tampoco se observaron cambios a nivel de la expresión glial las distintas regiones analizadas (lesión, y rostral y caudal a la lesión), lo que es consistente con que la reactividad glial es descripta a plazos más largos para las lesiones químicas (Mazzone and Nistri, 2014).

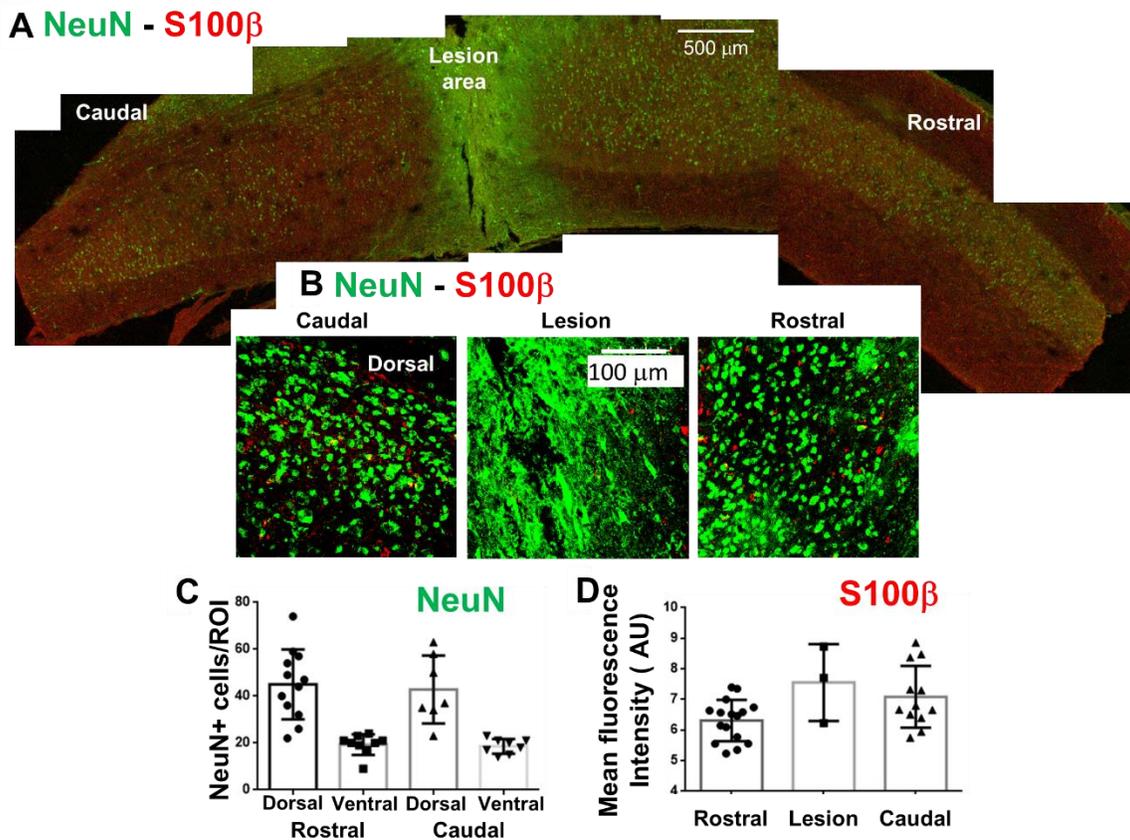


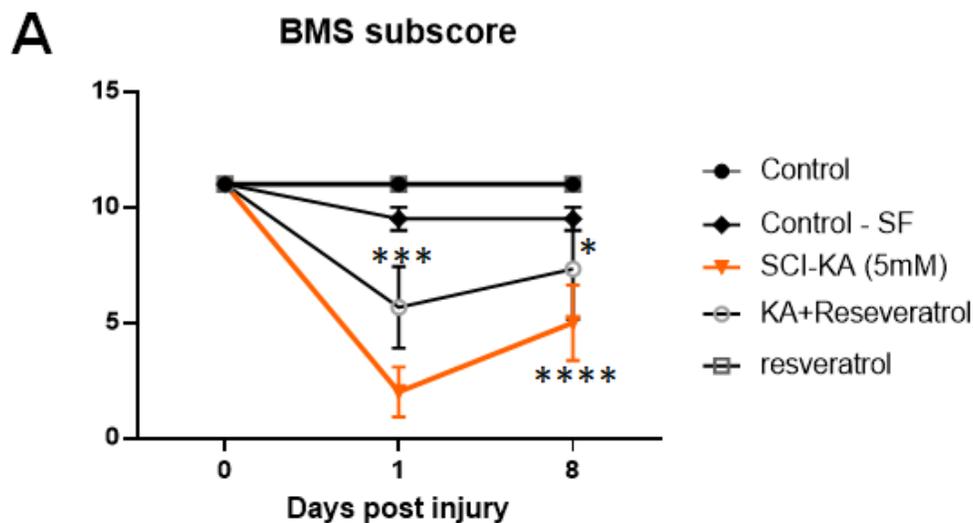
Figura 15. Resumen de resultados obtenidos para el modelo de compresión en ratones. (A) Imágenes representativas de una médula espinal lesionada con el clip de aneurisma. Posteriormente las médulas fueron fijadas y se realizó un análisis histológico para neuronas (NeuN en verde) y glía (S100β en rojo), en las zonas central, rostral y caudal de la lesión. (B) Imágenes representativas para los mismos marcadores, con una mayor magnificación de las áreas analizada en (A). (C-D) histogramas que representan la cuantificación del número de neuronas (izquierda) y glía (en unidades arbitrarias de fluorescencia, derecha) para las imágenes obtenidas en (B).

Mecanismos farmacológicos de neuroprotección luego de inducir un daño químico *in vivo* con KA

Considerando que los factores que determinan la plasticidad neuronal en condiciones fisiológicas y luego de una LME son en gran parte desconocidos, la inducción de mecanismos que permitan potenciar los procesos de neuroprotección son de vital importancia para el diseño de terapias regenerativas efectivas. Por este motivo en la presente tesis se analizó si la administración del antioxidante natural resveratrol (50 mg/Kg, IP) o del antagonista purinérgico no nucleotídico CBO (10

μM) lograban atenuar el daño secundario, o los déficits motores inmediatamente luego de inducida una lesión espinal por el agregado de KA.

Los primeros resultados obtenidos con la aplicación de resveratrol luego de inducir un daño químico se resumen en la Figura 16. Estos resultados de los estudios comportamentales, si bien son preliminares y se debería aumentar el número de animales en todos los grupos demostrarían un efecto beneficioso tanto en la evaluación de los parámetros de BMS (Figura 16 A) como en el estudio de tasa de peldaños errados. Coincidentemente con los experimentos previos realizado luego de inducir un daño por KA, la tasa de error aumentó considerablemente en comparación con su grupo control. Contrariamente a lo esperado en estos estudios no se observaron modificaciones en el número de huellas (Figura 16 B) ni en la coordinación ipsilateral, la duración de los ciclos de alternancia o la regularidad de los pasos, entre otros parámetros (no mostrado). Sin embargo, al igual que para lo observado en el estudio de BMS la tasa de error en los peldaños disminuyó luego del agregado de resveratrol (Figura 16 C). Este efecto podría ser de relevancia sobre todo en la pata izquierda que es donde se observan, según los resultados obtenidos en los primeros experimentos realizados para esta tesis, la mayor tasa de error dado que es en el sector izquierdo de la médula espinal donde se produce la inyección del KA.



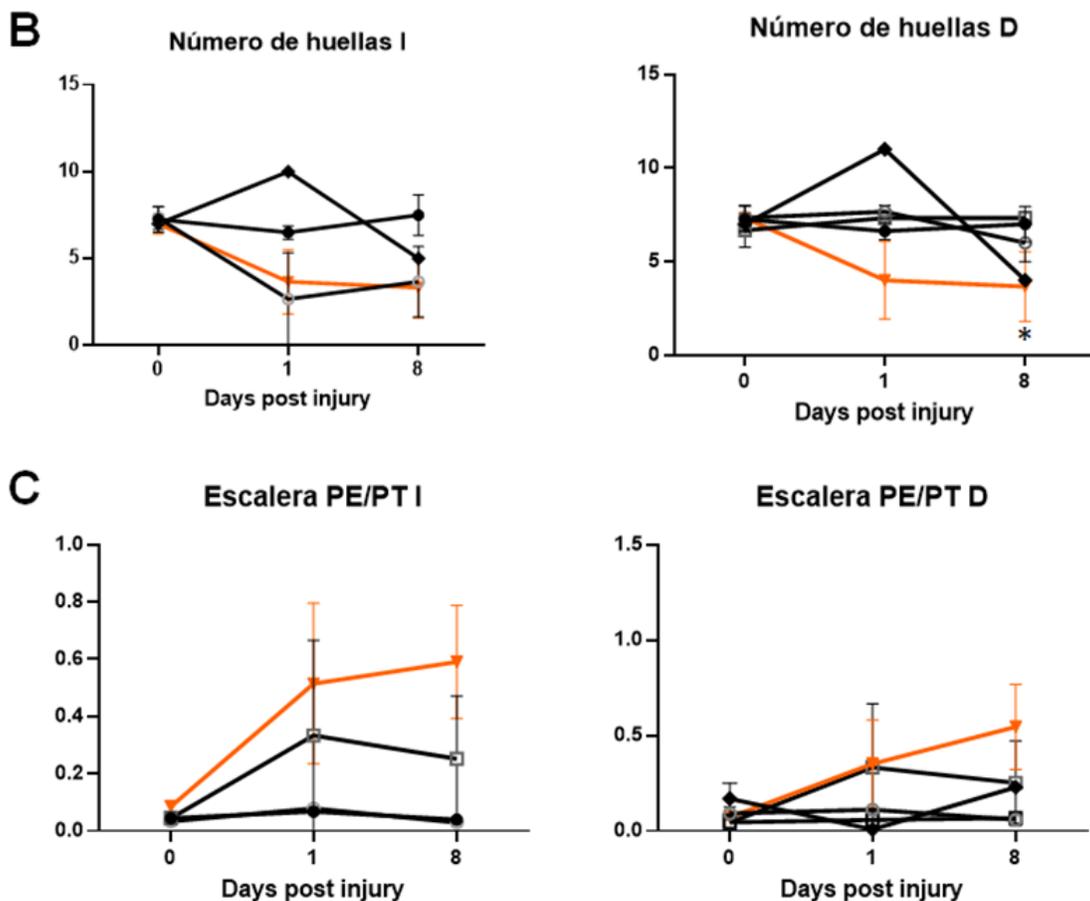
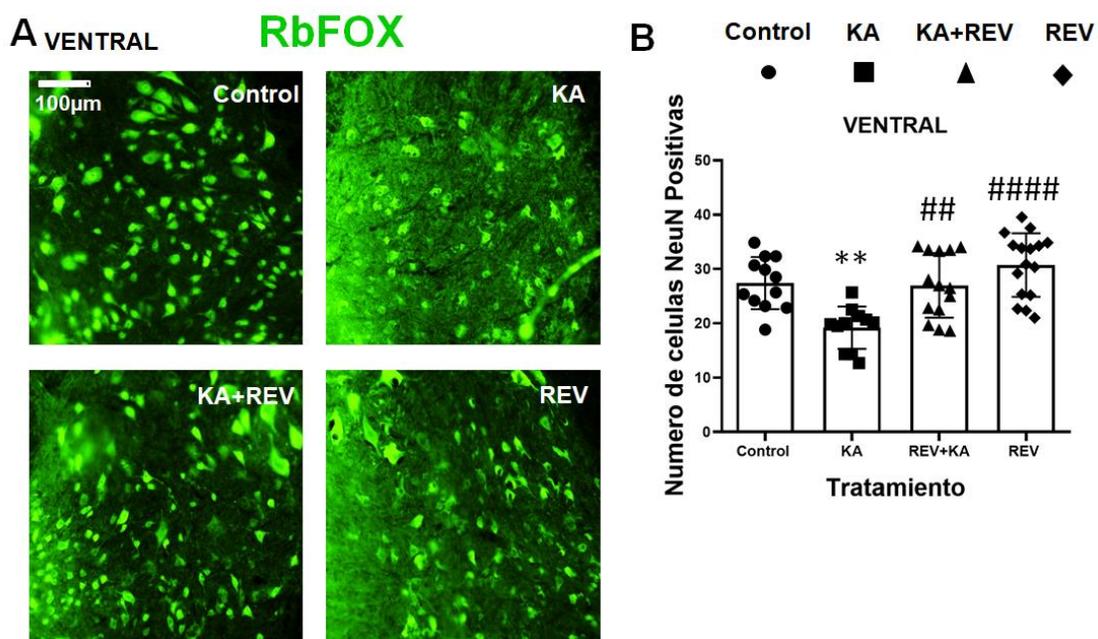


Figura 16. Resumen de resultados obtenidos para la evaluación de la actividad locomotora luego de LME química inducida por KA. Efecto del agregado de Resveratrol. (A) Gráficos que muestran los valores de la escala BMS antes y después de la aplicación del KA (5mM), con o sin el agregado de resveratrol en los distintos tiempos analizados (0, 1 y 8 días post lesión). (B) Evaluación del análisis de plantilografía para los distintos grupos experimentales. En los histogramas se representa el número promedio de huellas obtenidos para las extremidades izquierda (I) y derecha (D) luego de los distintos tratamientos. (C) Histogramas que resumen los valores promedio de peldaños errados en función de los peldaños totales por el test de escalera horizontal para las extremidades derecha (D) e izquierda (I). $n=2-5$ animales por condición experimental, ANOVA, $p<0,05$; * $p<0,05$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$. prueba de comparaciones múltiples comparaciones por el test Dunnett.

Luego de realizar las pruebas comportamentales, se evaluó a nivel histológico el número de neuronas para estimar los posibles efectos neuroprotectores del resveratrol. Los experimentos se realizaron tal como se describe en la sección metodológica de esta tesis y se resumen en la Figura 7 con los tiempos y concentraciones empleadas para cada tratamiento. Se realizó la caracterización histológica de los grupos experimentales para determinar el número de neuronas evaluadas por el

marcador neuronal RbFOX representado en la Figura 17. Se analizaron las regiones de la médula espinal ventral (Figura 17 A), central (Figura 17 D) y dorsal (Figura 17 E).

En concordancia con los estudios previos a esta tesis (Mazzone and Nistri, 2014 et al., 2010), se observó una disminución significativa en el número de neuronas en todas las regiones inducida por el tratamiento con KA. Por otra parte, al realizar co-tratamientos con resveratrol (KA+REV) se observó una reducción significativa en la pérdida neuronal. En otras palabras, el tratamiento con resveratrol demostraría ser neuroprotector en todas las regiones analizadas. Finalmente, al evaluar el grupo experimental al cual se le agrego resveratrol solo, sin inducir la lesión química por KA, no se observaron diferencias significativas en cuanto al número de neuronas en ninguna de las áreas espinales analizadas con respecto a los grupos controles. Estos resultados demostrarían un posible efecto neuroprotector del tratamiento con resveratrol luego del daño químico de la médula espinal, y estarían en concordancia con los datos comportamentales mostrados en la Figura 16, donde se observa una mejora en la actividad locomotora con este tratamiento.



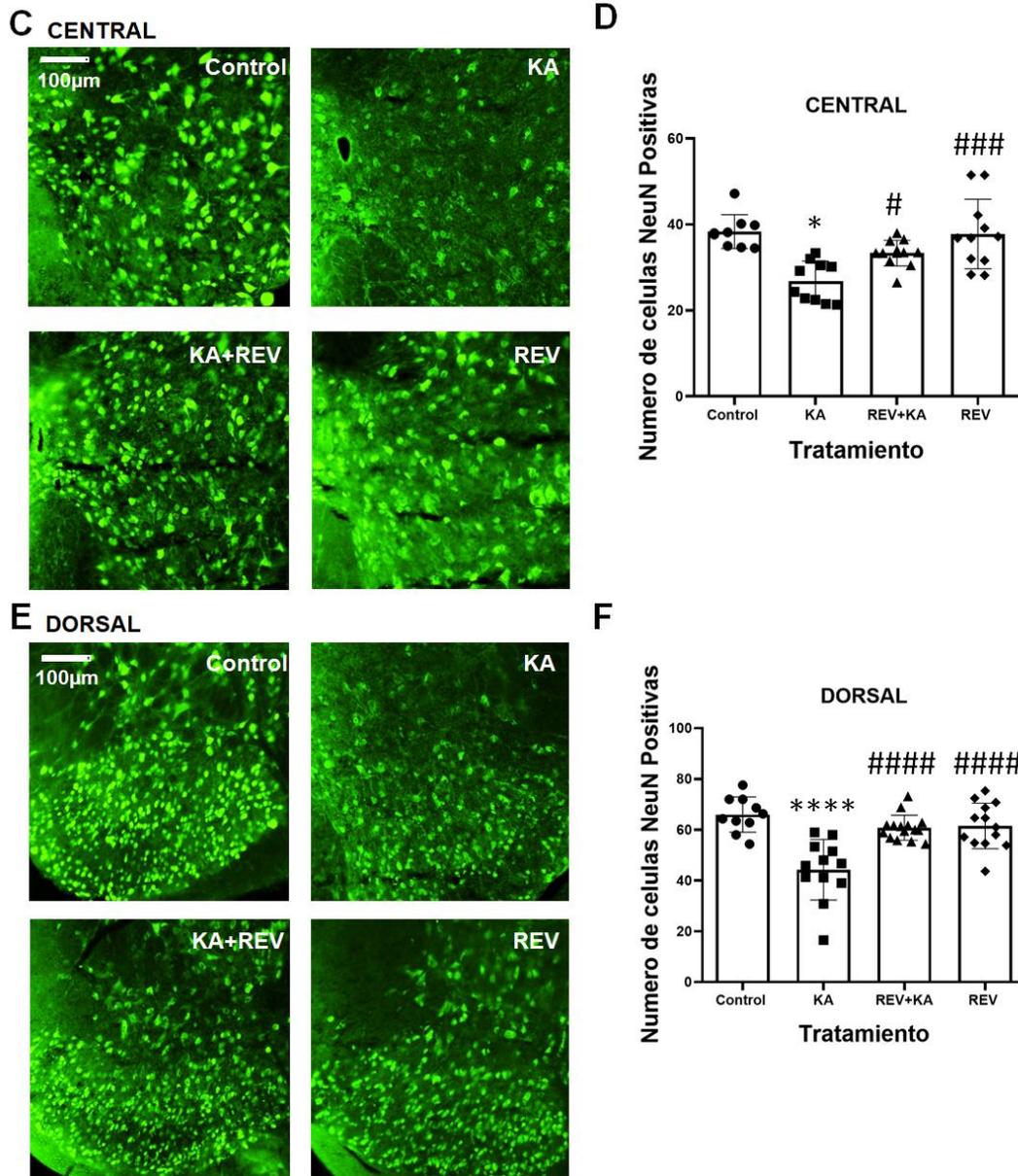


Figura 17. Numero de neuronas en el modelo de lesión química inducida por KA en ratones adultos luego del agregado de Resveratrol. Imágenes representativas para el marcador neuronal (utilizando el marcador RbFOX) en los tratamientos analizados (Control, KA, con o sin el agregado de REV) para las región ventral, central y dorsal espinal (A, C, E respectivamente). (B, D, F) Histogramas con la cuantificación del número de neuronas promedio bajo las distintas condiciones experimentales en las distintas regiones espinales mostradas en previamente en los paneles A, C y E. ($n=11-14$, ANOVA: $p=0.002$, $*p<0.05$ vs control, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$, # $p<0.05$ vs KA, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, #### $p<0.0001$, ##### $p<0.0001$, prueba de comparaciones múltiples comparaciones por el test Tukey).

En segundo lugar, se obtuvieron resultados con respecto a los efectos de la aplicación de CBO luego de inducir un daño químico, estos se resumen en la Figura 18. Para ello, se utilizó el plugin Animal tracker del programa previamente mencionado ImageJ el cual es una aplicación de seguimiento universal diseñada específicamente para apoyar los análisis comportamentales de los modelos animales utilizados, esto permite estimar la distancia recorrida y el tiempo de inmovilidad automáticamente para así obtener un resultado cuantitativo más estandarizado con los distintos grupos experimentales. De esta manera, como se puede observar el panel C, se presentan diferencias significativas en relación a los tiempos de inmovilidad de los grupos con lesión inducida por KA tratados con resveratrol y los grupos controles respecto a los grupos con sola aplicación de KA.

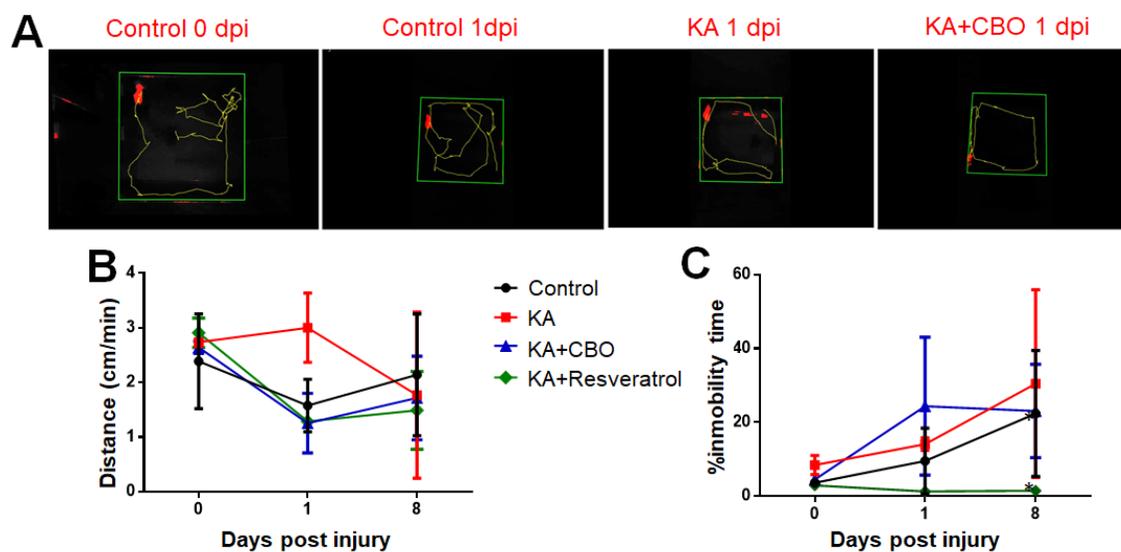


Figura 18. Evaluación de locomoción utilizando Animal Tracker plugin FIJI en experimentos in vivo de LME química inducida por KA. (A) trayectoria representativa de la recorrida en animales control, KA y KA+CBO. (B) gráficos con los valores promedios de la trayectoria recorrida (cm/min) en animales control, KA y con el agregado de CBO, o resveratrol durante el tiempo total estudiado (0, 1 y 8 días post lesión). (C) grafica del porcentaje promedio del tiempo de inmovilidad respecto del tiempo total en los mismos grupos experimentales estudiados in vivo. (n=2-3, ANOVA, *p<0,05 vs KA, comparaciones múltiples por el test Dunnett).

Efecto de neuroprotección con la aplicación de CBO luego de inducir LME in vitro con KA

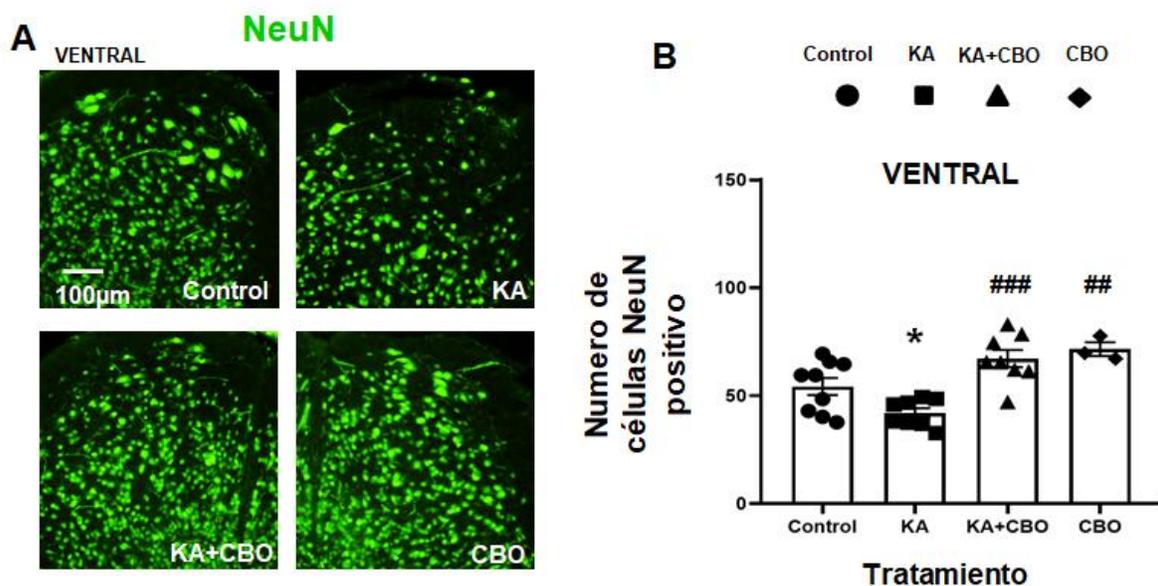
Los siguientes experimentos fueron realizados con el objetivo de estimar la evaluación del daño inducido por KA y los efectos de neuroprotección del CBO. Tal como se describe en la metodología de esta tesis se utilizaron las preparaciones de médula postnatal de 3 días obtenida a partir de

ratones BALB/c para inducir un daño químico de LME *in vitro* por el agregado de KA (100 μ M) por 1 hora y 3 horas posteriores de lavado (Figura 8). Asimismo, se realizaron contratamientos en distintas condiciones experimentales (KA + CBO (10 μ M) o CBO (10 μ M), mantenidos por 4 horas en la solución de Krebs carbogenada. Todas las condiciones experimentales fueron comparadas con el grupo control, médulas espinales diseccionadas de en las mismas condiciones, pero sin tratamiento. Al finalizar el tiempo de incubación las médulas fueron fijadas y se utilizó la técnica de inmunofluorescencia para analizar marcadores específicos para para neuronas (NeuN, Figura 19), glía (S100 β y GFAP, Figuras 20 y 21), microglía (Iba1, Figura 21).

Con respecto a la cuantificación neuronal, los resultados obtenidos para estos experimentos se resumen en la Figura 19. En los paneles A, C y E se observan imágenes representativas de las distintas regiones espinales para todos los tratamientos analizados. Al realizar una cuantificación del número de neuronas utilizando el programa ImageJ, tal como se describe previamente, se observó una reducción significativa del número de neuronas al realizar tratamientos con KA en las regiones ventrales y dorsales. Por otra parte, al realizar contratamientos con CBO y simultáneamente, al inducir la lesión por KA no se observaron diferencias en cuanto al número de neuronas presentes en este grupo experimental respecto al grupo control en las zonas ventrales, centrales y dorsales. Por otra parte, al comparar el co-tratamientos KA+CBO con el grupo lesionado (KA) se observó un aumento significativo del número de neuronas (Figura 19, F). Estos resultados demostrarían la existencia de un efecto neuroprotector inducido por el tratamiento con CBO que reduce el grado del daño provocado por la presencia de KA sobre la población de células neuronales sobre todo en la región dorsal.

Tal como está demostrado en los estudios previos del laboratorio (Mazzone and Nistri, 2014) y como se representa en la Figura 20, la expresión de S100 β no varió significativamente luego de 4 horas de inducir el daño químico por KA. En la Figura 20 se representan las imágenes obtenidas para los grupos lesionados químicamente con KA y/o luego del agregado de CBO. Por otro lado, como se encuentra resumido en los histogramas obtenidos para las regiones ventrales, centrales y dorsales la intensidad de fluorescencia media cuantificada, tal como se describe en la metodología, no mostró diferencias significativas en las distintas condiciones experimentales analizadas (Figura 20, B, D y F). Para confirmar los resultados obtenidos sobre el efecto glial se utilizó otro marcado para astrocitos (GFAP, Figura 21 A) y microglia (Iba1, Figura 21 B). Si bien estos datos requieren un análisis cuantitativo, tal como se evidencia en la Figura 21 B es de esperar que las poblaciones microgliales presenten una variación en cuanto a su morfología y el desarrollo de sus procesos, cambiando de una forma ameboidea a ramificada, lo cual indicaría una diferencia en cuanto a su activación (Mazzone et al., 2013).

Finalmente, con el objetivo de evaluar la muerte celular y tal como se describió previamente en la metodología, se cuantificó el porcentaje de células que presentan condensación de su cromatina como estimación del proceso de muerte celular (Burgoyne, 1999), específicamente correlacionado con la desaparición de neuronas, tal como se ha demostrado previamente (Mazzone et al., 2010). Para cuantificar la relación entre las células que presentan núcleos con cromatina condensada y células normales, se calculó el porcentaje de núcleos picnóticos luego de cada tratamiento en relación a los núcleos totales en las distintas zonas de la médula espinal. Como se ve representado en la Figura 22, y en concordancia con los resultados previos del laboratorio (Mazzone et al., 2010), se observó un aumento en la condensación de la cromatina nuclear (picnosis) luego del tratamiento por KA en todas las regiones analizadas (Figura 22, B, D y F). Asimismo, la región dorsal presentó la mayor cantidad de núcleos picnóticos en comparación al resto de las regiones. Con respecto a los grupos tratados con CBO, luego de inducir una lesión química (KA+CBO) se observó una reducción significativa de núcleos picnóticos en las regiones ventrales y dorsales. Por otra parte, los tratamientos con CBO solo, al igual que el grupo control, no mostró variaciones significativas en la condensación de la cromatina. Estos resultados, en correlación con los efectos sobre el número de neuronas descriptas previamente mediante la tinción de NeuN, demostrarían un posible efecto neuroprotector del CBO, sobre todo en las regiones dorsales y ventrales espinales.



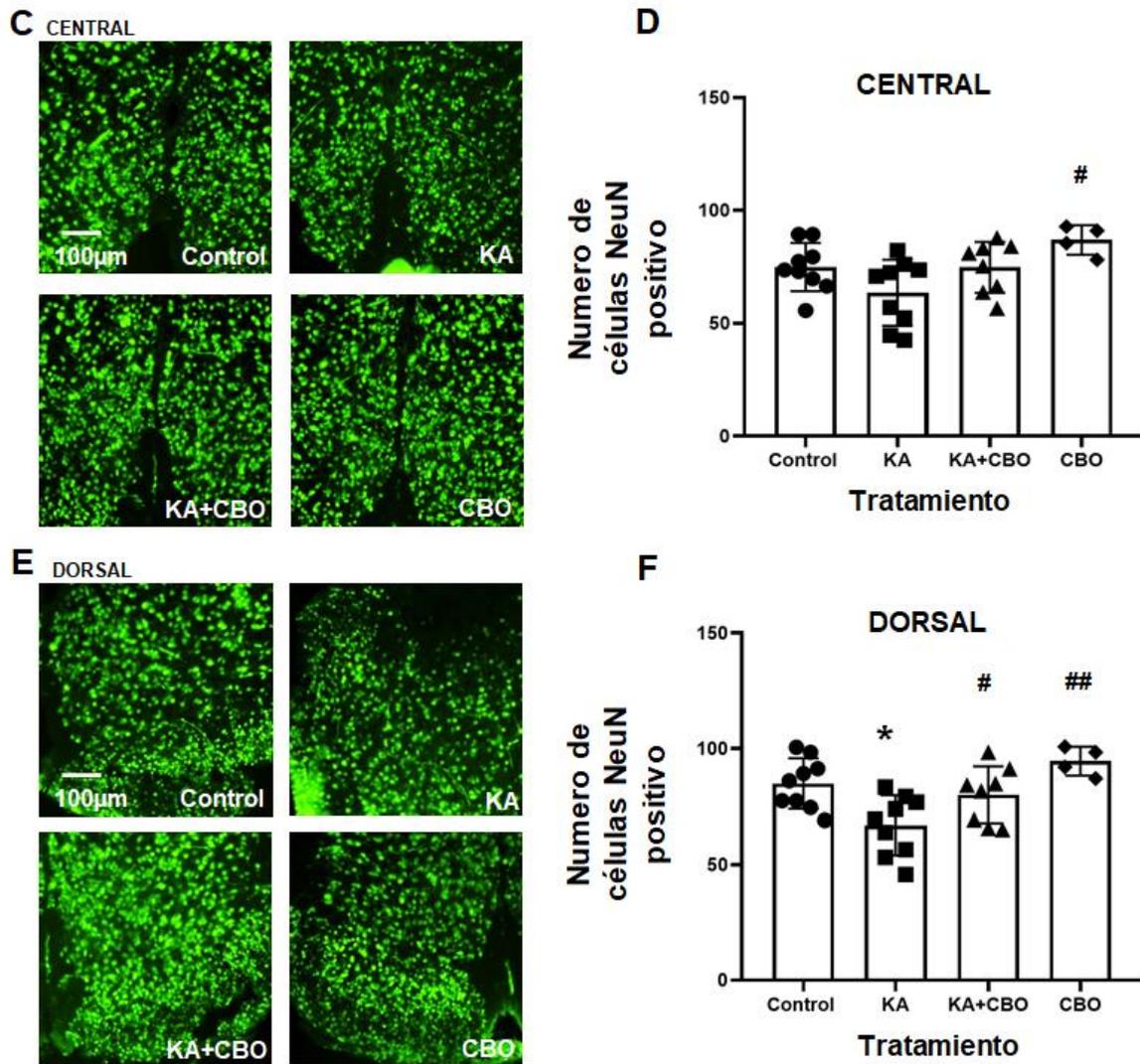


Figura 19. Evaluación del CBO en las neuronas luego de LME inducidas por KA en modelos in vitro. (A, C, E) Imágenes representativas del número de neuronas (marcadas con NeuN) en médulas control, luego de la aplicación de KA y/o CBO en las regiones ventrales, centrales y dorsales (A, C y E, respectivamente). (B, D, F) Histogramas representativos de la cuantificación del número de neuronas los distintos tratamientos realizados en las regiones precedentes. ($n=3-9$, ANOVA: $p=0.002$, $*p<0.05$ vs control, # $p<0.05$ vs KA, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, #### $p<0.0001$, prueba de comparaciones múltiples comparaciones por el test Tukey).

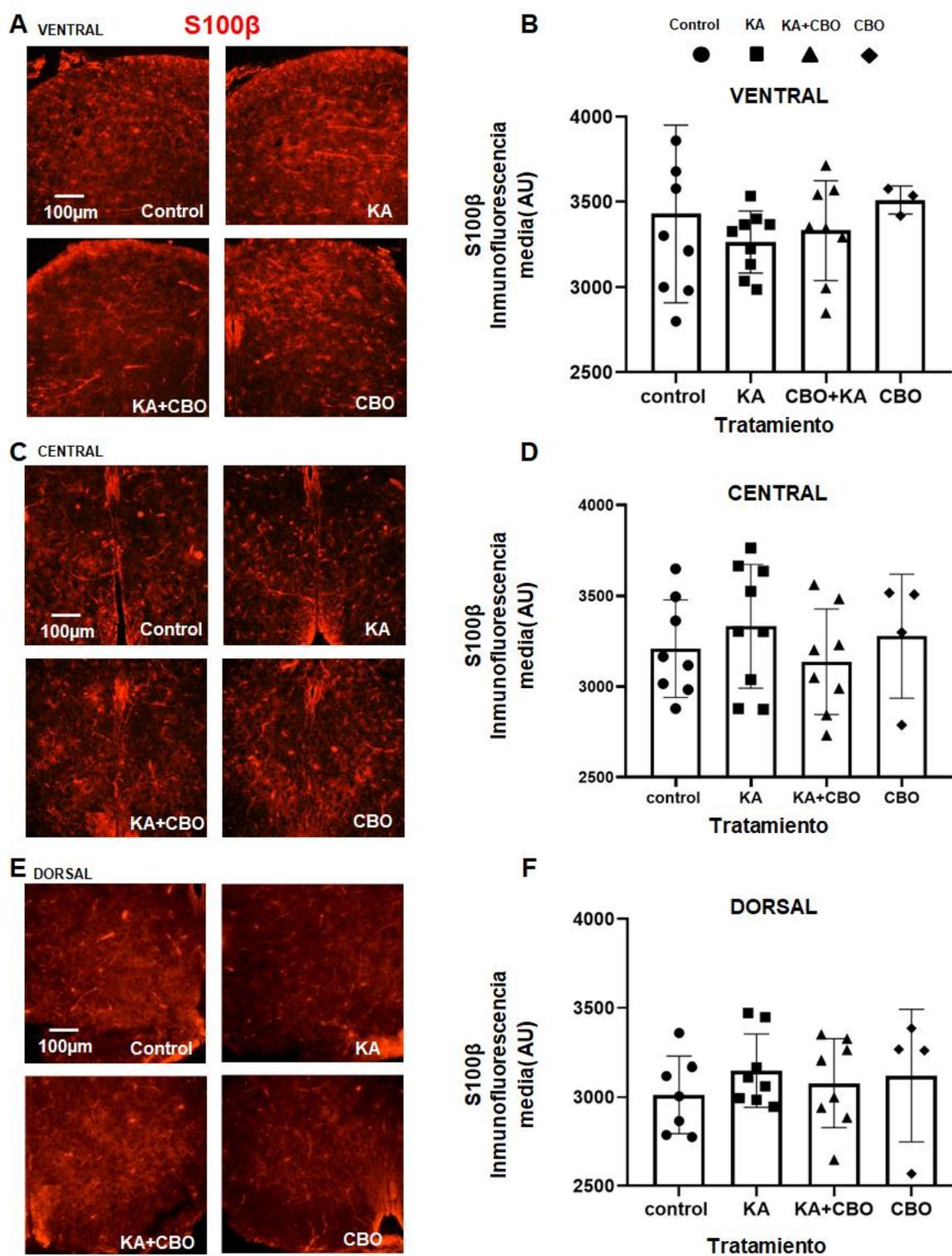


Figura 20. Evaluación del efecto en células gliales de CBO en LME inducidas por KA en modelos *in vitro*. (A, C, E) Imágenes representativas de tinción de astrocitos (S100 β) en médulas control, luego

de la aplicación de KA y/o CBO en las regiones ventrales, centrales y dorsales (A, C y E, respectivamente). (B, D, F) Histogramas representativos del análisis de expresión, en unidades arbitrarias de fluorescencia media (AU) en los distintos tratamientos realizados en las regiones precedentes ($n=3-9$, ANOVA: ns).

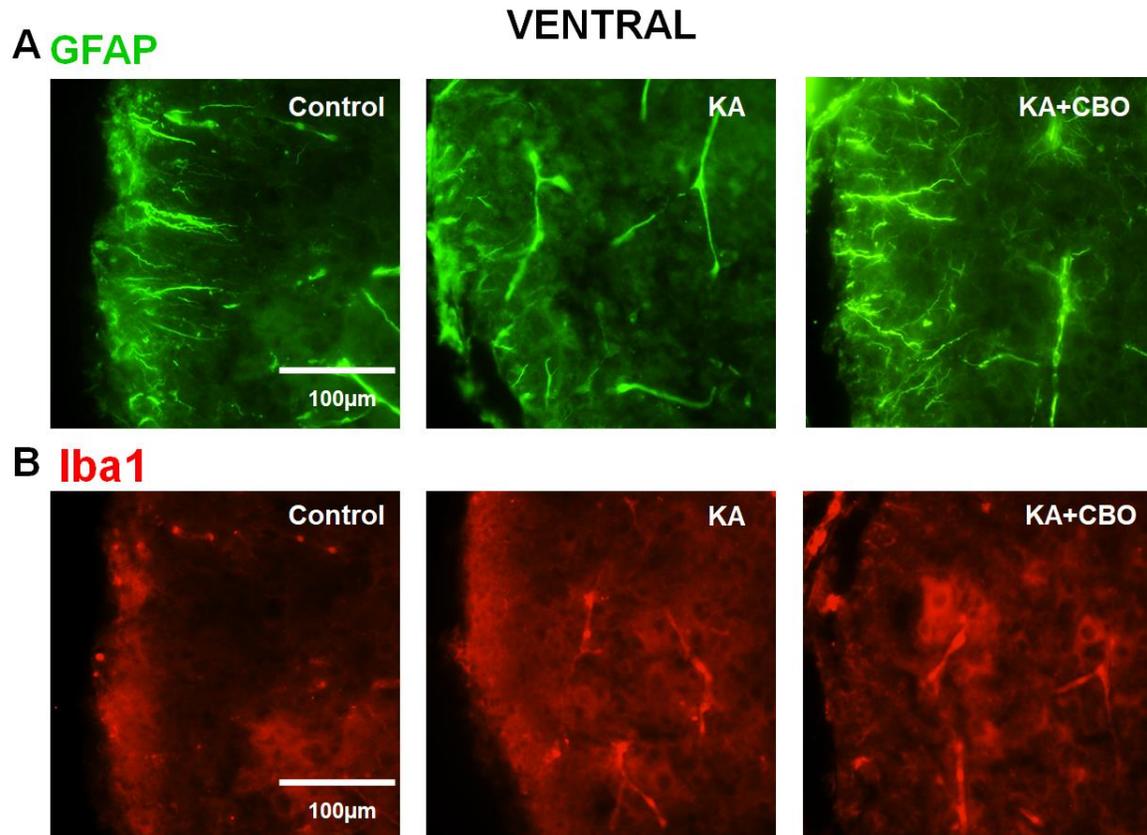


Figura 21. Marcadores gliales (GFAP) y microgliales (Iba1) en la médula espinal tras su tratamiento con KA. (A) Imágenes representativas de la intensidad de tinción fibrilar de GFAP y tinción microglial Iba1 positiva (B) en una médula espinal lesionada mediante la aplicación de KA para los cuatro tratamientos realizados (Control, KA, KA+CBO y CBO) en la región ventrales.

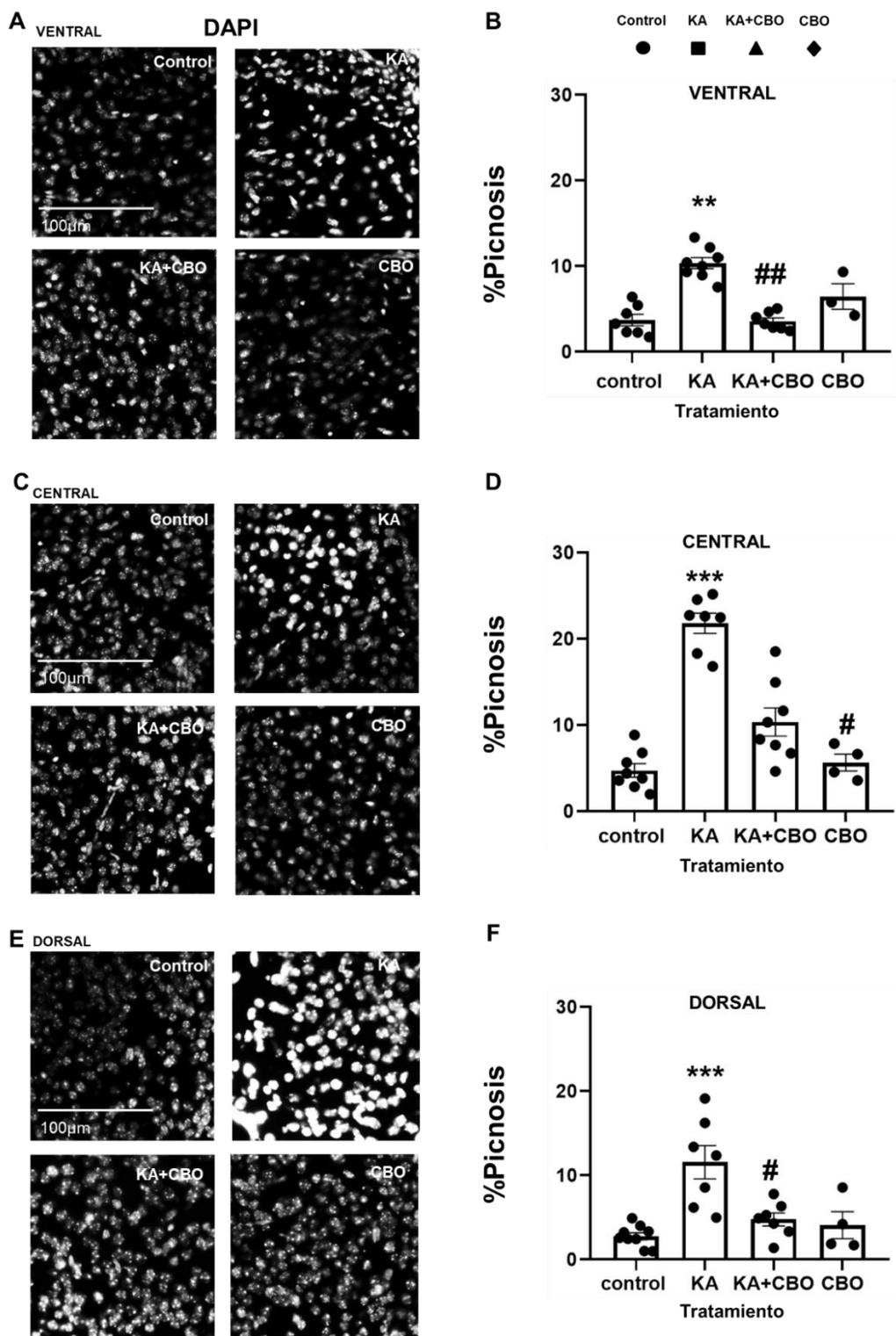


Figura 22. Evaluación del efecto de CBO para la morfología nuclear en LME inducidas por KA en modelos *in vitro*. (A, C, E) Imágenes visualizadas mediante la tinción nuclear con DAPI en médulas

control, luego de la aplicación de KA y/o CBO en las regiones ventrales, centrales y dorsales (A, C y E, respectivamente) donde se evidencia la aparición diferencial de los núcleos picnóticos. (B, D, F) Histogramas representativos de la cuantificación del valor promedio de número de núcleos picnóticos en las regiones, expresado como porcentaje del total de núcleos en los distintos tratamientos analizados. (n=3-8, Análisis de varianza de un factor de Kruskal-Wallis sobre rangos $P = <0,001$, ** $p<0.01$ vs control, *** $p<0.001$, # $p<0.05$ vs KA, ## $p<0.01$, prueba de comparaciones múltiples comparaciones por el test Dunnett y Mann-Whitney).

Discusión

Los resultados presentados en esta tesis intentan relacionar las alteraciones observadas en los patrones locomotores con los cambios de las diferentes poblaciones celulares en las distintas condiciones experimentales luego de una LME, con el objetivo de identificar procesos clave y posibles blancos terapéuticos a fin de potenciar los tratamientos de neuroprotección. Específicamente, se plantearon tratamientos de relacionados con la vía de señalización purinérgica y su modulación en dos modelos murinos de LME, *in vivo* e *in vitro*. Los primeros resultados obtenidos con los distintos tipos de LME, química y traumática, mostraron una disfunción motora inmediata debida posiblemente a la separación de las vías de control descendente de los circuitos espinales locales (Grillner and Jessell, 2009). Como se ha postulado en la literatura, las LME alteran la función motora al desconectar los circuitos neuronales por encima y por debajo de la lesión, impidiendo las entradas sensoriales en las redes neuronales caudales a la lesión (Grillner and Jessell, 2009). Es por ello que comprender la organización y función del circuito locomotor durante el proceso de recuperación es tan complejo, debido en parte a la multiplicidad de conexiones sinápticas involucradas (supraespinales y espinales) y los tipos celulares afectados por las LME (Grillner and Jessell, 2009).

Caminar es un acto locomotor que requiere la coordinación del tronco, extremidades, músculos y distintas articulaciones del cuerpo. Durante la locomoción es esencial que las articulaciones se muevan rítmicamente y de manera coordinada, con precisión, para permitir los movimientos estereotipados que ocurren durante las fases de balanceo y postura en cada ciclo del paso. Estos procesos se ven modificados sustancialmente luego de una LME. La médula espinal contiene los circuitos neuronales básicos necesarios para generar los movimientos locomotores coordinados independientemente de los impulsos que llegan de la corteza cerebral. Tal como se demostró en los experimentos realizados por Sherrington, utilizando un modelo de gatos descerebrados, es posible realizar movimientos rudimentarios aún luego de ser afectados por lesiones espinales. Posteriormente, en 1911, Graham Brown realizó observaciones similares, utilizando el mismo modelo de gatos descerebrados con una lesión de la médula espinal en el segmento torácico (T12). En estos estudios se llegó a la conclusión que los mecanismos básicos del movimiento pueden reproducirse sin la necesidad de comandos descendentes de la corteza (Whelan, 1996). Hoy en día, la existencia de redes nerviosas productoras de movimientos rítmicos específicos, sin conciencia, esfuerzo y, sobre todo, sin la ayuda de la retroalimentación aferente periférica, es indiscutible para un gran número de vertebrados (Whelan, 1996). Estos circuitos neurales especializados se denominan "Osciladores neuronales" o "generadores de patrones centrales" (GPC)(MacKay-Lyons, 2002). Es actualmente aceptado que la médula espinal puede generar una actividad locomotora en ausencia de las aportaciones de los centros superiores y retroalimentación aferente, lo que lleva el

concepto de una red intrínseca de GPC (McCrea and Rybak, 2008). Por otra parte, la actividad rítmica locomotora de flexión y extensión es controlada por un grupo de interneuronas que se encuentran estrechamente acopladas a las motoneuronas responsables directamente de la locomoción (Büschges et al., 2011). En las LME se afecta el circuito de control locomotor espacial y temporalmente dependiendo del tipo e intensidad de daño, de forma bilateral (Takeoka et al., 2014). Específicamente, se producen cambios en la coordinación, que probablemente se extiendan más allá de una sola extremidad e involucrarían más de un tipo celular. Por lo tanto, la cuantificación de las contribuciones espaciales y temporales, al igual que la coordinación y déficits en marcha luego de las lesiones, puede aportar nuevos blancos de tratamiento en las estrategias de rehabilitación.

Los resultados obtenidos en la presente tesis demuestran que los **modelos *in vivo*** empleados son útiles para representar distintos aspectos funcionales de las LME (Figuras 12-14, 16, 18). Por otra parte, los modelos *in vitro* de LME, utilizados en la presente tesis, permiten interpretar la actividad locomotora ficticia tal como la representada *in vivo* (Whelan, 1996; Pearson et al., 2003), y a su vez permiten una interpretación de las poblaciones celulares afectadas mediante técnicas histológicas, (Figuras 17, 19-22). Estos resultados concuerdan con los estudios previos e investigaciones realizadas en roedores y humanos (Ilha et al., 2019). Específicamente, se ha demostrado que la mayoría de las LME humanas son anatómicamente incompletas, con axones preservados que abarcan los segmentos espinales dañados. Sin embargo, alrededor de la mitad de estos pacientes experimentan una pérdida total del control muscular y la sensibilidad por debajo del nivel de la lesión (Chen et al., 2018). Sin duda, la reorganización de los circuitos locomotores dañados y la neurodegeneración representa un desafío clínico luego de una LME completa, donde las consecuencias suelen ser irreparables e irreversibles. Es por ello que es de vital importancia interpretar la capacidad intrínseca de los sistemas neuronales preservados para reorganizarse y postular nuevas estrategias de regeneración (van den Brand et al., 2012). Las conexiones descendentes dañadas que se establecen *de novo*, luego de una LME, podrían interactuar con los circuitos espinales locales no dañados para restablecer los patrones locomotores básicos (Maeda et al., 2020). Por el contrario, las tareas de precisión que requieran un circuito específico y refinado, y que probablemente dependan de las vías ascendentes, exhibirían una disfunción persistente y más compleja luego de una LME completa (Takeoka et al., 2014). Sin embargo, debido a la complejidad en los eventos de coordinación locomotora, las discrepancias de modelos y/o grados de lesión es difícil reproducir todos los aspectos clínicos de una LME. Los resultados obtenidos en la presente tesis podrían correlacionarse con una disrupción diferencial de las vías descendentes contralateral e ipsilateral bajo distintas intervenciones experimentales empleadas, sean estas lesiones químicas por el uso de KA o mediante compresiones espinales. Por ejemplo, en las lesiones químicas, inducidas por el uso de KA (1 y 5 mM), se podrían preservar las proyecciones que cruzan la línea

media en comparación con las proyecciones dañadas luego de las lesiones por compresión, donde se observa un daño locomotor más drástico e irreversible (Figuras 12-14). Específicamente estos resultados podrían ejemplificar las diferencias obtenidas en cuanto al tipo de lesión, grado de daño y evolución de los distintos tipos de LME que pueden observarse en la clínica.

Mecanismos de neuroprotección farmacológica luego de una LME

Estudios previos desarrollados en el laboratorio permitieron dilucidar la composición celular básica en cuanto al número de neuronas, motoneuronas, células gliales, entre otros tipos celulares, luego de distintas manipulaciones experimentales para imitar procesos fisiopatológicos (Cifra et al., 2012a). Específicamente, estos estudios han demostrado utilizando técnicas de inmunohistoquímica, que la población glial S100 β positiva es más abundante en la materia blanca de la zona ventral espinal lumbar. En las regiones central y dorsal, los astrocitos, presentes, son menos abundantes en comparación con el número de neuronas (Cifra et al., 2012a). Resulta posible suponer que el número limitado de astrocitos en la región dorsal es un factor importante que confiere una mayor vulnerabilidad de las neuronas a la excitotoxicidad en esa región (Taccola et al., 2008; Mazzone et al., 2010). Este efecto estaría mediado por una menor capacidad de los astrocitos para contrarrestar la concentración extracelular de glutamato tal como se ha demostrado en los estudios previos del laboratorio (Mazzone and Nistri, 2011c). Específicamente, y tal como se ha postulado en estudios clínicos, la población glial S100 β está involucrada en el proceso de protección, reparación, actuando como biomarcador para predecir el pronóstico y evolución de una lesión aguda de la lesión (Mazzone and Nistri, 2014).

Por otra parte, y tal como descripto previamente, la liberación excesiva del glutamato desencadenada y amplifica el proceso de daño secundario (Doble, 1999). Concomitantemente con la liberación de glutamato se ha podido demostrar que existe una liberación de ATP al realizar tratamientos con KA (Figura 6). Estos resultados concordarían con la hipótesis que las respuestas postsinápticas excitatorias estarían reguladas también en parte por la señalización purinérgica (Burnstock and Wood, 1996). En este contexto, se sabe que la señalización purinérgica juega un papel importante en la transmisión somatosensorial y nociceptiva de la médula espinal en las distintas condiciones fisiopatológicas (Inoue and Tsuda, 2020). Este proceso está mediado fundamentalmente por los receptores P2X y P2Y, canales iónicos activados por ATP, que median las respuestas postsinápticas excitatorias (Burnstock and Wood, 1996; Ralevic, 2021). Las funciones de los receptores purinérgicos P2X (Kennedy, 2021) en la señalización del dolor neuropático se han estudiado ampliamente con el objetivo de dilucidar los mecanismos subyacentes al dolor persistente y como un importante objetivo terapéutico luego de las LME.

Actualmente se han descrito distintas intervenciones farmacológicas para el manejo y la reducción del dolor neuropático y las reacciones inmunes relacionadas con agonistas, antagonistas selectivos y moduladores alostéricos de los receptores P2X4 y P2X7, que se encuentran actualmente bajo estudio para su uso clínico (Illes et al., 2021). Por ejemplo, recientemente se demostró en ratones que la expresión de receptores P2X7, cuya actividad y expresión es inducida por morfina, regulan el proceso de activación microglial y la tolerancia antinociceptiva, modulando a su vez la expresión de la proteína del inflammasoma NLRP3 (Wang et al., 2020). Asimismo, se demostró en modelos de LME por contusión en ratas que una combinación de los inhibidores (lomerizine, YM872 y oxATP) de los canales iónicos de Ca^{2+} dependientes de voltaje, de los receptores AMPA y de los receptores P2X7, respectivamente, limitan reversiblemente y por mecanismos aún no del todo esclarecidos, las consecuencias secundarias de la lesión (O'Hare Doig et al., 2020). Por otra parte, se ha demostrado también que la activación de P2X4 en varios tipos celulares está involucrada en el proceso de inflamación en respuesta a una alta liberación de ATP, asociado a múltiples patologías, si bien es aún un objetivo terapéutico poco estudiado (Suurväli et al., 2017). El efecto de distintos compuestos naturales para mitigar los efectos nociceptivos luego de una LME ha suscitado gran interés para mitigar la alodinia, hiperalgesia o el dolor crónico y reducir la inflamación inducida luego de las LME (Park et al., 2004). Se ha demostrado que la deshidrocoerybulbina, un alcaloide natural, redujo significativamente la expresión del receptor P2X4 y la concentración de Ca^{2+} intracelular inducida por ATP, logrando reducir la alodinia mecánica en modelos de contusión espinal en ratas (Wang et al., 2019). Nuestros estudios suman evidencia a la importancia de los receptores purinérgicos luego de una LME, los resultados aquí obtenidos serán continuados con vista de determinar mecanismo de acción molecular y rol en el proceso de neurodegeneración espinal mediante futuros experimentos.

Actualmente, la combinación de fármacos y terapias regenerativas se postulan como una herramienta terapéutica de gran interés en el tratamiento de patologías neurodegenerativas multifactoriales y crónicas tal como las LME (Silva et al., 2013; Ahuja et al., 2017a). Entre ellos se han descrito distintas sustancias naturales que permitirían disminuir los efectos colaterales de los fármacos tradicionales con la ventaja de poder ser considerada una terapia personalizada. Específicamente, distintos estudios han demostrado la eficacia del resveratrol, un polifenol natural producido en varias plantas y que actúa como fitoalexina contra patógenos como bacterias u hongos, para contrarrestar los déficits motores (Feng et al., 2016) y promueve la recuperación de las habilidades de memoria y aprendizaje espacial y de referencia evaluadas por la prueba del laberinto acuático de Morris después de una lesión traumática cerebral (Feng et al., 2016; Shi et al., 2018). Se ha demostrado también que luego de una hemorragia subaracnoidea, el tratamiento temprano con resveratrol mejoró la función neurológica (Xie et al., 2019), aumentó el apetito, la actividad locomotora, la estabilidad al caminar (Zhang et al., 2021) y redujo la tasa de mortalidad (Xie et al.,

2019). Finalmente, se ha demostrado que realizar pretratamientos con resveratrol mejoró significativamente los resultados funcionales (simetría corporal, marcha, escalada, comportamiento circular, simetría de las extremidades anteriores, movimiento circular obligatorio y respuesta de los bigotes) después de accidentes cerebrovasculares (Koronowski et al., 2017).

Si bien el uso CBP luego de LME en relación con la activación de los receptores P2X4 y P2X7 dependientes de ATP requiere un estudio más profundo, los resultados de la presente tesis evidencian una mejora significativa de la actividad locomotora (Figuras 16 y 18) y una prevención significativa de la neurodegeneración luego del tratamiento por KA, sobre todo en la región dorsal espinal (Figuras 19, 22). Si bien dilucidar el mecanismo molecular será el objetivo de futuras investigaciones, estos estudios demuestran que la modulación adecuada de las células inmunitarias productoras de inflamación mediante la modulación de factores bioactivos podría intervenir a nivel tisular, tanto en la cicatrización como la respuesta inmunitaria para incrementar la velocidad del proceso de regeneración (Ahuja et al., 2017b). Los efectos neuroprotectores logrados estarían mediados, al menos en parte, por la modulación de la activación microglial y posiblemente la actividad de P2X4. Esta hipótesis fue confirmada en estudios previos realizados en lesiones de compresión de las raíces del ganglio dorsal en ratas (Teng et al., 2019). Como se ha demostrado previamente las células microgliales, estas son un tipo celular de expresión ubicua en toda la médula espinal (Cifra et al., 2012a) y poseen efectos moduladores asociados con neuroprogenitores endógenos que favorecerían la plasticidad locomotora (Mazzone et al., 2013).

Distintos estudios recientes han propuesto que la regulación de P2X4 mediante el uso de derivados de la cromogranina A, colorantes biodegradables (Verde rápido CFC) o antagonistas selectivos (NP-1815-PX) es útil para reducir el dolor neuropático y los mecanismos proinflamatorios asociados a la LME (Matsumura et al., 2016; Deng et al., 2018; Xu et al., 2018). En la presente tesis se ha estudiado el efecto del agregado de CBO, un antagonista de los receptores P2X (Friedle et al., 2010; Illes et al., 2021) et al., 2010; Illes et al., 2021). Si bien el agregado de CBO mediante su aplicación intraperitoneal inmediatamente luego de la inducción de la LME no ha resultado en mejoras significativas en los patrones locomotores estudiados como la distancia recorrida (Figura 18 A-B), si disminuye significativamente el tiempo de inmovilidad en comparación con el grupo KA (Figura 18 C). Los resultados obtenidos histológicamente en el modelo de lesión *in vitro* permitirían concluir que un antagonista de los receptores P2X prevendría la neurodegeneración sobre todo en la zona dorsal y ventral espinal, dado que el co-tratamiento con KA y CBO previene significativamente la reducción del número de neuronas y condensación de la cromatina en comparación al grupo KA (Figura 19, 22). Estos resultados se asociarían a los datos referidos por la literatura donde el asta dorsal de la médula espinal es un punto de conversión fundamental para las señales de fibra A β sensibles a las

respuestas conductuales nociceptivas dadas por un conjunto de interneuronas inhibitorias (Tashima et al., 2021).

Estudios previos han demostrado que luego de inducir una lesión química por KA, estas se asemejan a las que se producen poco después de una lesión medular aguda donde se observa una pérdida de la capacidad locomotora utilizando modelos *in vitro* de LME (Taccola et al., 2008). Por otra parte, y tal como se ha demostrado previamente, los mecanismos de neurodegeneración estarían río abajo de la liberación de glutamato inducidos por KA (Mazzone and Nistri, 2011d). El daño secundario que amplificaría el mecanismo de autodestrucción del tejido dañado, podría darse por mecanismos de muerte celular caspasa dependiente e independiente (Galluzzi et al., 2007). Por otra parte, otro posible mecanismo de muerte celular es la autofagia, un fenómeno más lento en la que partes del citoplasma son aisladas en vacuolas y finalmente digeridas por las hidrolasas lisosomales del citoplasma. La autofagia puede contribuir a la muerte celular apoptótica o constituir una defensa celular independiente contra el estrés agudo, donde puede ocurrir la denominada muerte celular autofágica. Finalmente, puede ocurrir la muerte celular por necrosis, la cual incluye un aumento del volumen celular (oncosis) que finalmente produce la ruptura de la membrana plasmática, y el desmantelamiento desorganizado de los orgánulos (Galluzzi et al., 2007). Como se ha demostrado en los estudios previos del laboratorio, las neuronas son más vulnerables a la excitotoxicidad y más resistentes a perturbaciones metabólicas inducidas con medios patológicos (PM) (Kuzhandaivel et al., 2011). Por el contrario, luego de la aplicación de PM las células gliales mueren predominantemente por el proceso de apoptosis, proceso caspasa dependiente, en el cual se mantiene la morfología celular redondeada, con condensación y fragmentación del ADN, mínimas modificaciones de las organelas, y conservación de la membrana plasmática intacta (Galluzzi et al., 2007). Por el contrario, el mecanismo de neurodegeneración estaría dado principalmente por hiperactivación de la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) con el consiguiente daño del ADN y el colapso del metabolismo mitocondrial, denominado parthanatos. La activación de los receptores de glutamato por el KA, provoca el aumento intracelular de Ca^{2+} , esto a su vez activa la formación de peroxinitrito que induce daños en el ADN, activando así la PARP-1 que inicia la síntesis de PAR, que interactúa con la mitocondria modificando su potencial de membrana, permitiendo la translocación del inductor de apoptosis (AIF) al núcleo, un proceso que conduce a la muerte celular (Kuzhandaivel et al., 2011). Tal como fue evaluado mediante la técnica de Western blot, el KA induciría la expresión de PARP-1, asociada a la fracción nuclear de la célula, proceso progresivo durante las primeras 24 h después de la lesión excitotóxica (Mazzone and Nistri, 2011b), sin activación de la caspasa-3, marcador típico del proceso de apoptosis (Kuzhandaivel et al., 2010). Interesantemente, el desarrollo de los distintos tipos de vías de muerte celular puede verse entrelazados e incluso presentar transiciones entre una u otra según los distintos tipos celulares

afectados y el modelo de daño. De esta forma, se amplía el espectro en el desarrollo de distintos procesos de muerte celular paralelos a la apoptosis y la necrosis, como el recién mencionado parthanatos el cual es de especial relevancia en los procesos de muerte neuronal inducidos por daño químico mediante KA, como los evaluados en la presente tesis. En los modelos *in vitro* de lesión inducida por KA realizados en esta tesis, uno de los parámetros analizados fue la condensación de la cromatina y presencia de picnosis nuclear, el daño evocado por este proceso se presentó principiante en todas regiones de la médula espinal (Figura 22), siendo la región dorsal la más afectada, tal como demostrado en los estudios previos (Taccola et al., 2008; Mazzone et al., 2010). Estos resultados se encuentran en concordancia con estudios previos basados en la diferenciación y evaluación de los efectos del KA en cultivos *in vitro* de medulas espinales de ratones neonatales, en los cuales luego de la aplicación de KA se observó un aumento significativo la picnosis nuclear y la desaparición de la señal NeuN, en las regiones centrales y dorsales luego de 12h (Kuzhandaivel et al., 2010).

Los resultados obtenidos en la presente tesis sugieren que los mecanismos tempranos de muerte excitotóxica podrían estar mediados por la activación de los receptores P2X. Este efecto sería de gran relevancia sobre todo en la zona dorsal y central, dada su mayor expresión de este tipo de receptores en esta región. En concordancia con esto y tal como evidenciado en la introducción de esta tesis, distintos estudios demuestran la preponderancia del asta dorsal, y la activación de los receptores P2X, para la generación de dolor neuropático en modelos de lesión espinal (Illes et al., 2020).

Consideraciones Finales

Si bien las investigaciones de terapias traslacionales, quirúrgicas y farmacológicas, están progresando con rapidez para prevenir la evolución de la LME (Hu et al., 2021), la disfunción de la actividad locomotora sigue siendo una condición debilitante permanente e irreversible, dado en parte por la ineficacia de los fármacos disponibles y el desconocimiento de posibles nuevos puntos de regulación. Los resultados aportados en la presente tesis pretenden interpretar la correlación de la cascada de eventos secundarios asociados a las LME y la señalización purinérgica. Específicamente, los resultados obtenidos permitirían relacionar la liberación de glutamato, ATP y la posterior activación de los receptores P2X4 y P2X7 para contrarrestar el mecanismo de excitotoxicidad y la neurodegeneración inducido ante la LME (Figura 23). Si bien quedan varios puntos por estudiar con relación al mecanismo de acción (serán encarados en la continuación de este trabajo de Tesina, como parte de la Tesis Doctoral), la interpretación de estos resultados es de vital importancia para generar estrategias terapéuticas y/o nuevos biomarcadores que permitan limitar las consecuencias de las LME efectivamente y en su fase más temprana posible.

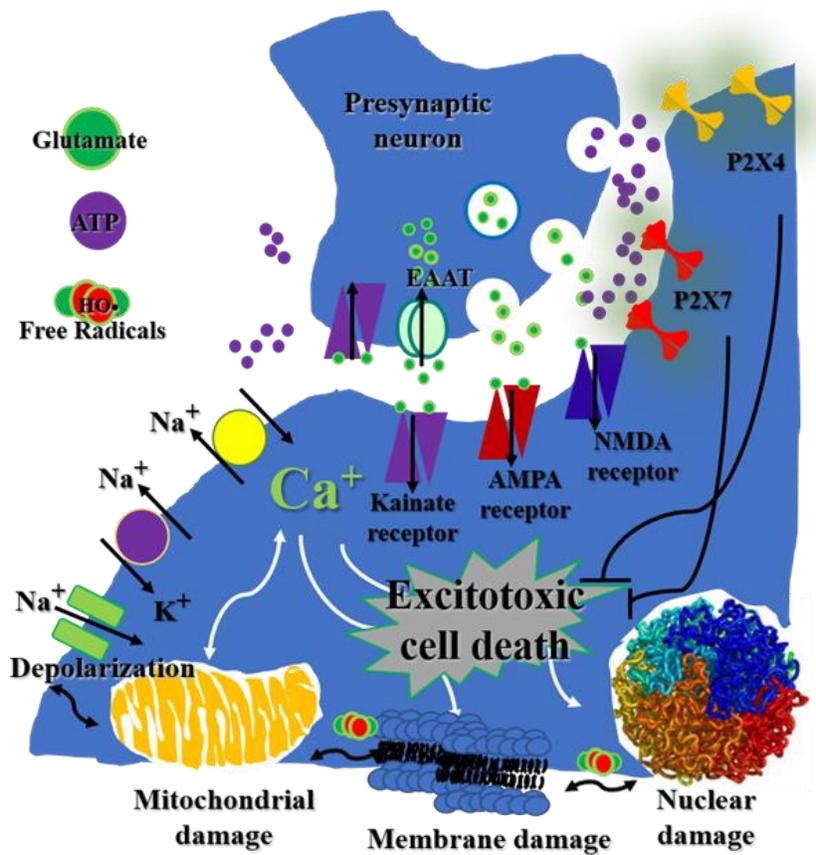


Figura 23. Diagrama esquemático del principal mecanismo de lesión secundaria desencadenada por la liberación de glutamato y ATP, la generación de radicales libres y su relación con la señalización purinérgica luego de las LME.

Referencias

- Ahuja, C. S., Badhiwala, J. H., and Fehlings, M. G. (2020). "Time is spine": the importance of early intervention for traumatic spinal cord injury. *Spinal Cord* 58, 1037–1039. doi:10.1038/s41393-020-0477-8.
- Ahuja, C. S., Nori, S., Tetreault, L., Wilson, J., Kwon, B., Harrop, J., et al. (2017a). Traumatic Spinal Cord Injury-Repair and Regeneration. *Neurosurgery* 80, S9–S22. doi:10.1093/neuros/nyw080.
- Ahuja, C. S., Wilson, J. R., Nori, S., Kotter, M. R. N., Druschel, C., Curt, A., et al. (2017b). Traumatic spinal cord injury. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17018. doi:10.1038/nrdp.2017.18.
- Akaike, K., Tanaka, S., Tojo, H., Fukumoto, S., Imamura, S., and Takigawa, M. (2001). Kainic acid-induced dorsal and ventral hippocampal seizures in rats. *Brain Res.* 900, 65–71.
- Angelova, P. R., Vinogradova, D., Neganova, M. E., Serkova, T. P., Sokolov, V. V., Bachurin, S. O., et al. (2019). Pharmacological Sequestration of Mitochondrial Calcium Uptake Protects Neurons Against Glutamate Excitotoxicity. *Mol Neurobiol* 56, 2244–2255. doi:10.1007/s12035-018-1204-8.
- Ballesteros Plaza, V., Marré Pacheco, B., Martínez Aguilar, C., Fleiderman Valenzuela, J., and Zamorano Pérez, J. J. (2012). Lesión de la médula espinal: actualización bibliográfica: fisiopatología y tratamiento inicial. *Coluna/Columna* 11, 73–76. doi:10.1590/S1808-18512012000100014.
- Barrera RM, et al. (2013). "Epidemiología de la lesión traumática medular." in *Premio S.L.A.O.T- 50º Congreso Argentino de Ortopedia y Traumatología (www.aaot.org.ar)* Available at: www.aaot.org.ar.
- Basso, D. M., Fisher, L. C., Anderson, A. J., Jakeman, L. B., McTigue, D. M., and Popovich, P. G. (2006). Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J. Neurotrauma* 23, 635–659. doi:10.1089/neu.2006.23.635.
- Bazan PL (2004). Lesión medular post-traumática. Tratamiento Multidisciplinario. *Revista de la Asociación Platense de Ortopedia y Traumatología* 1.
- Bracken, M. B., Shepard, M. J., Collins, W. F., Holford, T. R., Young, W., Baskin, D. S., et al. (1990). A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med* 322, 1405–1411. doi:10.1056/NEJM199005173222001.
- Bracken, M. B., Shepard, M. J., Holford, T. R., Leo-Summers, L., Aldrich, E. F., Fazl, M., et al. (1997). Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the

treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA* 277, 1597–1604.

Bracken, M. B., Shepard, M. J., Holford, T. R., Leo-Summers, L., Aldrich, E. F., Fazl, M., et al. (1998). Methylprednisolone or tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury: 1-year follow up. Results of the third National Acute Spinal Cord Injury randomized controlled trial. *J Neurosurg* 89, 699–706. doi:10.3171/jns.1998.89.5.0699.

Burgoyne, L. A. (1999). The mechanisms of pyknosis: hypercondensation and death. *Exp. Cell Res.* 248, 214–222.

Burnstock, G. (2020). Introduction to Purinergic Signalling in the Brain. *Adv Exp Med Biol* 1202, 1–12. doi:10.1007/978-3-030-30651-9_1.

Burnstock, G., and Wood, J. N. (1996). Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr Opin Neurobiol* 6, 526–532. doi:10.1016/s0959-4388(96)80060-2.

Büschges, A., Scholz, H., and El Manira, A. (2011). New moves in motor control. *Curr Biol* 21, R513-524. doi:10.1016/j.cub.2011.05.029.

Cazalets, J. R., Sqalli-Houssaini, Y., and Clarac, F. (1992). Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *J. Physiol* 455, 187–204.

Chen, B., Li, Y., Yu, B., Zhang, Z., Brommer, B., Williams, P. R., et al. (2018). Reactivation of Dormant Relay Pathways in Injured Spinal Cord by KCC2 Manipulations. *Cell* 174, 1599. doi:10.1016/j.cell.2018.08.050.

Choi, D. W. (1985). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett* 58, 293–297. doi:10.1016/0304-3940(85)90069-2.

Choi, D. W. (1992). Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23, 1261–1276.

Cifra, A., Mazzone, G. L., Nani, F., Nistri, A., and Mladinic, M. (2012a). Postnatal developmental profile of neurons and glia in motor nuclei of the brainstem and spinal cord, and its comparison with organotypic slice cultures. *Dev Neurobiol* 72, 1140–1160. doi:10.1002/dneu.20991.

Cifra, A., Mazzone, G. L., and Nistri, A. (2012b). Riluzole: What It Does to Spinal and Brainstem Neurons and How It Does It. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry.* doi:10.1177/1073858412444932.

- Cummings, B. J., Engesser-Cesar, C., Cadena, G., and Anderson, A. J. (2007). Adaptation of a ladder beam walking task to assess locomotor recovery in mice following spinal cord injury. *Behav. Brain Res.* 177, 232–241. doi:10.1016/j.bbr.2006.11.042.
- Deng, Z., Li, C., Liu, C., Du, E., and Xu, C. (2018). Catestatin is involved in neuropathic pain mediated by purinergic receptor P2X4 in the spinal microglia of rats. *Brain Res Bull* 142, 138–146. doi:10.1016/j.brainresbull.2018.07.003.
- Deumens, R., Mazzone, G. L., and Taccola, G. (2013). Early spread of hyperexcitability to caudal dorsal horn networks after a chemically-induced lesion of the rat spinal cord in vitro. *Neuroscience* 229, 155–163. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.10.036.
- Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L., and Falzoni, S. (2017). The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* 47, 15–31. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.020.
- Di Virgilio, F., Schmalzing, G., and Markwardt, F. (2018). The Elusive P2X7 Macropore. *Trends Cell Biol* 28, 392–404. doi:10.1016/j.tcb.2018.01.005.
- Dimar, J. R., Glassman, S. D., Raque, G. H., Zhang, Y. P., and Shields, C. B. (1999). The influence of spinal canal narrowing and timing of decompression on neurologic recovery after spinal cord contusion in a rat model. *Spine (Phila Pa 1976)* 24, 1623–1633. doi:10.1097/00007632-199908150-00002.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22, 391–397.
- Doble, A. (1999). The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol. Ther.* 81, 163–221.
- Du, X.-J., Chen, Y.-X., Zheng, Z.-C., Wang, N., Wang, X.-Y., and Kong, F.-E. (2019). Neural stem cell transplantation inhibits glial cell proliferation and P2X receptor-mediated neuropathic pain in spinal cord injury rats. *Neural Regen Res* 14, 876–885. doi:10.4103/1673-5374.249236.
- Farag, A., Lashen, S., and Eltaysh, R. (2019). Histoarchitecture restoration of cerebellar sub-layers as a response to estradiol treatment following Kainic acid-induced spinal cord injury. *Cell Tissue Res.* 376, 309–323. doi:10.1007/s00441-019-02992-1.
- Feng, Y., Cui, Y., Gao, J.-L., Li, R., Jiang, X.-H., Tian, Y.-X., et al. (2016). Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in rats: Involvement of synaptic proteins and neuronal autophagy. *Mol Med Rep* 13, 5248–5254. doi:10.3892/mmr.2016.5201.

- Friedle, S. A., Curet, M. A., and Watters, J. J. (2010). Recent patents on novel P2X(7) receptor antagonists and their potential for reducing central nervous system inflammation. *Recent Pat CNS Drug Discov* 5, 35–45. doi:10.2174/157488910789753530.
- Fukuhara, N., Imai, Y., Sakakibara, A., Morita, K., Kitayama, S., Tanne, K., et al. (2000). Regulation of the development of allodynia by intrathecally administered P2 purinoceptor agonists and antagonists in mice. *Neurosci Lett* 292, 25–28. doi:10.1016/s0304-3940(00)01427-0.
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., et al. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 14, 1237–1243. doi:10.1038/sj.cdd.4402148.
- Gelin, C. F., Bhattacharya, A., and Letavic, M. A. (2020). P2X7 receptor antagonists for the treatment of systemic inflammatory disorders. *Prog Med Chem* 59, 63–99. doi:10.1016/bs.pmch.2019.11.002.
- Gómez, A., Nieto-Díaz, M., Del Águila, Á., and Arias, E. (2018). BAMOS: A recording application for BAso MOuse scale of locomotion in experimental models of spinal cord injury. *Comput. Biol. Med.* 96, 32–40. doi:10.1016/j.combiomed.2018.02.021.
- Gordon, I. T., Dunbar, M. J., Vanneste, K. J., and Whelan, P. J. (2008). Interaction Between Developing Spinal Locomotor Networks in the Neonatal Mouse. *Journal of Neurophysiology* 100, 117–128. doi:10.1152/jn.00829.2007.
- Grillner, S., and Jessell, T. M. (2009). Measured motion: searching for simplicity in spinal locomotor networks. *Curr Opin Neurobiol* 19, 572–586. doi:10.1016/j.conb.2009.10.011.
- Gu, J. G., and MacDermott, A. B. (1997). Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature* 389, 749–753. doi:10.1038/39639.
- Guzman-Lenis, M. S., Navarro, X., and Casas, C. (2009). Drug screening of neuroprotective agents on an organotypic-based model of spinal cord excitotoxic damage. *Restor. Neurol. Neurosci.* 27, 335–349.
- Hall, E. D., and Braughler, J. M. (1981). Acute effects of intravenous glucocorticoid pretreatment on the in vitro peroxidation of cat spinal cord tissue. *Exp Neurol* 73, 321–324. doi:10.1016/0014-4886(81)90067-4.
- Hall, E. D., and Braughler, J. M. (1982). Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and Na⁺ + K⁺)-ATPase activity. Dose-response analysis during 1st hour after contusion injury in the cat. *J Neurosurg* 57, 247–253. doi:10.3171/jns.1982.57.2.0247.

- Hall, E. D., and Springer, J. E. (2004). Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx* 1, 80–100.
- Hu, X.-C., Lu, Y.-B., Yang, Y.-N., Kang, X.-W., Wang, Y.-G., Ma, B., et al. (2021). Progress in clinical trials of cell transplantation for the treatment of spinal cord injury: how many questions remain unanswered? *Neural Regen Res* 16, 405–413. doi:10.4103/1673-5374.293130.
- Ilha, J., Meireles, A., de Freitas, G. R., do Espírito Santo, C. C., Machado-Pereira, N. A. M. M., Swarowsky, A., et al. (2019). Overground gait training promotes functional recovery and cortical neuroplasticity in an incomplete spinal cord injury model. *Life Sci* 232, 116627. doi:10.1016/j.lfs.2019.116627.
- Illes, P., Khan, T. M., and Rubini, P. (2017). Neuronal P2X7 Receptors Revisited: Do They Really Exist? *J Neurosci* 37, 7049–7062. doi:10.1523/JNEUROSCI.3103-16.2017.
- Illes, P., Müller, C. E., Jacobson, K. A., Grutter, T., Nicke, A., Fountain, S. J., et al. (2021). Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review 30. *Br J Pharmacol* 178, 489–514. doi:10.1111/bph.15299.
- Illes, P., Verkhratsky, A., and Tang, Y. (2019). Pathological ATPergic Signaling in Major Depression and Bipolar Disorder. *Front Mol Neurosci* 12, 331. doi:10.3389/fnmol.2019.00331.
- Illes, P., Xu, G.-Y., and Tang, Y. (2020). Purinergic Signaling in the Central Nervous System in Health and Disease. *Neurosci Bull* 36, 1239–1241. doi:10.1007/s12264-020-00602-7.
- Inoue, K., and Tsuda, M. (2020). Nociceptive signaling mediated by P2X3, P2X4 and P2X7 receptors. *Biochem Pharmacol*, 114309. doi:10.1016/j.bcp.2020.114309.
- Inoue, K., and Tsuda, M. (2021). Nociceptive signaling mediated by P2X3, P2X4 and P2X7 receptors. *Biochem Pharmacol* 187, 114309. doi:10.1016/j.bcp.2020.114309.
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., and Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 57, 1–9. doi:10.1016/s0169-328x(98)00040-0.
- Jensen, T. S., Baron, R., Haanpää, M., Kalso, E., Loeser, J. D., Rice, A. S. C., et al. (2011). A new definition of neuropathic pain. *Pain* 152, 2204–2205. doi:10.1016/j.pain.2011.06.017.
- Joshi, M., and Fehlings, M. G. (2002a). Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: Part 1. Clip design, behavioral outcomes, and histopathology. *J. Neurotrauma* 19, 175–190. doi:10.1089/08977150252806947.

- Joshi, M., and Fehlings, M. G. (2002b). Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: Part 2. Quantitative neuroanatomical assessment and analysis of the relationships between axonal tracts, residual tissue, and locomotor recovery. *J. Neurotrauma* 19, 191–203. doi:10.1089/08977150252806956.
- Juhasova J (2015). Time course of spinal doublecortin expression in developing rat and porcine spinal cord: implication in in vivo neural precursor grafting studies. *Cell Mol Neurobiol.* 35, 57–70.
- Kennedy, C. (2021). The P2Y/P2X divide: How it began. *Biochem Pharmacol* 187, 114408. doi:10.1016/j.bcp.2021.114408.
- Khorasanizadeh, M., Yousefifard, M., Eskian, M., Lu, Y., Chalangari, M., Harrop, J. S., et al. (2019). Neurological recovery following traumatic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *J Neurosurg Spine*, 1–17. doi:10.3171/2018.10.SPINE18802.
- Klussmann, S., and Martin-Villalba, A. (2005). Molecular targets in spinal cord injury. *J. Mol. Med.* 83, 657–671. doi:10.1007/s00109-005-0663-3.
- Koronowski, K. B., Khoury, N., Saul, I., Loris, Z. B., Cohan, C. H., Stradecki-Cohan, H. M., et al. (2017). Neuronal SIRT1 (Silent Information Regulator 2 Homologue 1) Regulates Glycolysis and Mediates Resveratrol-Induced Ischemic Tolerance. *Stroke* 48, 3117–3125. doi:10.1161/STROKEAHA.117.018562.
- Kuzhandaivel, A., Nistri, A., Mazzone, G. L., and Mladinic, M. (2011). Molecular Mechanisms Underlying Cell Death in Spinal Networks in Relation to Locomotor Activity After Acute Injury in vitro. *Front Cell Neurosci* 5, 9. doi:10.3389/fncel.2011.00009.
- Kuzhandaivel, A., Nistri, A., and Mladinic, M. (2010). Kainate-mediated excitotoxicity induces neuronal death in the rat spinal cord in vitro via a PARP-1 dependent cell death pathway (Parthanatos). *Cell Mol Neurobiol* 30, 1001–1012. doi:10.1007/s10571-010-9531-y.
- Lamanauskas, N., and Nistri, A. (2008). Riluzole blocks persistent Na⁺ and Ca²⁺ currents and modulates release of glutamate via presynaptic NMDA receptors on neonatal rat hypoglossal motoneurons in vitro. *Eur J Neurosci* 27, 2501–2514. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06211.x.
- Lau, A., and Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.* 460, 525–542.
- Ludwing, R. (2015). *Anatomía y Fisiología del Sistema Nervioso*.
- MacKay-Lyons, M. (2002). Central pattern generation of locomotion: a review of the evidence. *Phys Ther* 82, 69–83. doi:10.1093/ptj/82.1.69.

Marques, S. A., Garcez, V. F., Del Bel, E. A., and Martinez, A. M. B. (2009). A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: morphological and functional assessment. *J. Neurosci. Methods* 177, 183–193. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.10.015.

Masoodifar, M., Hajihashemi, S., Pazhoohan, S., Nazemi, S., and Mojadadi, M.-S. (2021). Effect of the conditioned medium of mesenchymal stem cells on the expression levels of P2X4 and P2X7 purinergic receptors in the spinal cord of rats with neuropathic pain. *Purinergic Signal* 17, 143–150. doi:10.1007/s11302-020-09756-5.

Matsumura, Y., Yamashita, T., Sasaki, A., Nakata, E., Kohno, K., Masuda, T., et al. (2016). A novel P2X4 receptor-selective antagonist produces anti-allodynic effect in a mouse model of herpetic pain. *Sci Rep* 6, 32461. doi:10.1038/srep32461.

Mazzone, G. L., Cockey, S., Bertossi, R., Fiore, E. J., Mazzolini, G., and Aquino, J. B. (2019). In vivo effect of a single dose of mesenchymal stem cells exogenously expressing IGF-I in a spinal cord compression model. in (Villa Carlos Paz, Cordoba, Argentina).

Mazzone, G. L., Margaryan, G., Kuzhandaivel, A., Nasrabad, S. E., Mladinic, M., and Nistri, A. (2010). Kainate-induced delayed onset of excitotoxicity with functional loss unrelated to the extent of neuronal damage in the in vitro spinal cord. *Neuroscience* 168, 451–462. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.03.055.

Mazzone, G. L., Mladinic, M., and Nistri, A. (2013). Excitotoxic cell death induces delayed proliferation of endogenous neuroprogenitor cells in organotypic slice cultures of the rat spinal cord. *Cell Death Dis* 4, e902. doi:10.1038/cddis.2013.431.

Mazzone, G. L., Moncada Herrera, W., Poodts, M., Roncoroni, J., Cockey, S., Sierra, R., et al. (2020). Histologic and functional outcome of excitotoxic and traumatic in vivo spinal cord injury models. in (Argentina).

Mazzone, G. L., and Nistri, A. (2011a). Delayed neuroprotection by riluzole against excitotoxic damage evoked by kainate on rat organotypic spinal cord cultures. *Neuroscience* 190, 318–327. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.013.

Mazzone, G. L., and Nistri, A. (2011b). Effect of the PARP-1 inhibitor PJ 34 on excitotoxic damage evoked by kainate on rat spinal cord organotypic slices. *Cell Mol Neurobiol* 31, 469–478. doi:10.1007/s10571-010-9640-7.

Mazzone, G. L., and Nistri, A. (2011c). Electrochemical detection of endogenous glutamate release from rat spinal cord organotypic slices as a real-time method to monitor excitotoxicity. *J. Neurosci. Methods* 197, 128–132. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.01.033.

- Mazzone, G. L., and Nistri, A. (2011d). Electrochemical detection of endogenous glutamate release from rat spinal cord organotypic slices as a real-time method to monitor excitotoxicity. *J Neurosci Methods* 197, 128–132. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.01.033.
- Mazzone, G. L., and Nistri, A. (2014). S100 β as an early biomarker of excitotoxic damage in spinal cord organotypic cultures. *J. Neurochem.* 130, 598–604. doi:10.1111/jnc.12748.
- Mazzone, G. L., Veeraraghavan, P., Gonzalez-Inchauspe, C., Nistri, A., and Uchitel, O. D. (2017). ASIC channel inhibition enhances excitotoxic neuronal death in an in vitro model of spinal cord injury. *Neuroscience* 343, 398–410. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.12.008.
- McCrea, D. A., and Rybak, I. A. (2008). Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Res Rev* 57, 134–146. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.08.006.
- McDonald, J. W., and Sadowsky, C. (2002). Spinal-cord injury. *Lancet* 359, 417–425.
- O'Hare Doig, R. L., Santhakumar, S., Fehily, B., Raja, S., Solomon, T., Bartlett, C. A., et al. (2020). Acute Cellular and Functional Changes With a Combinatorial Treatment of Ion Channel Inhibitors Following Spinal Cord Injury. *Front Mol Neurosci* 13, 85. doi:10.3389/fnmol.2020.00085.
- Okada, M., Nakagawa, T., Minami, M., and Satoh, M. (2002). Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y nucleotide receptor agonists UTP and UDP in normal and neuropathic pain model rats. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 66–73. doi:10.1124/jpet.102.036079.
- Park, E., Velumian, A. A., and Fehlings, M. G. (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, 754–774.
- Pearson, K. G., Acharya, H., and Fouad, K. (2005). A new electrode configuration for recording electromyographic activity in behaving mice. *J. Neurosci. Methods* 148, 36–42. doi:10.1016/j.jneumeth.2005.04.006.
- Pearson, S. A., Mouihate, A., Pittman, Q. J., and Whelan, P. J. (2003). Peptidergic activation of locomotor pattern generators in the neonatal spinal cord. *J. Neurosci.* 23, 10154–10163.
- Peng, W., Cotrina, M. L., Han, X., Yu, H., Bekar, L., Blum, L., et al. (2009). Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12489–12493. doi:10.1073/pnas.0902531106.
- Ralevic, V. (2021). History of Geoff Burnstock's research on P2 receptors. *Biochem Pharmacol* 187, 114358. doi:10.1016/j.bcp.2020.114358.

- Ronsyn, M. W., Berneman, Z. N., Van Tendeloo, V. F. I., Jorens, P. G., and Ponsaerts, P. (2008). Can cell therapy heal a spinal cord injury? *Spinal Cord* 46, 532–539. doi:10.1038/sc.2008.13.
- Rossignol, S., Schwab, M., Schwartz, M., and Fehlings, M. G. (2007). Spinal cord injury: time to move? *J.Neurosci.* 27, 11782–11792.
- Schwab, J. M., Brichtel, K., Mueller, C.-A., Failli, V., Kaps, H.-P., Tuli, S. K., et al. (2006). Experimental strategies to promote spinal cord regeneration—an integrative perspective. *Progress in Neurobiology* 78, 91–116. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.12.004.
- Schwab, M. E. (2002). Repairing the injured spinal cord. *Science* 295, 1029–1031. doi:10.1126/science.1067840.
- Shi, Z., Qiu, W., Xiao, G., Cheng, J., and Zhang, N. (2018). Resveratrol Attenuates Cognitive Deficits of Traumatic Brain Injury by Activating p38 Signaling in the Brain. *Med Sci Monit* 24, 1097–1103. doi:10.12659/msm.909042.
- Sibilla, S., and Ballerini, L. (2009). GABAergic and glycinergic interneuron expression during spinal cord development: dynamic interplay between inhibition and excitation in the control of ventral network outputs. *Prog.Neurobiol.* 89, 46–60.
- Silva, N. A., Sousa, N., Reis, R. L., and Salgado, A. J. (2013). From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. *Prog. Neurobiol.* doi:10.1016/j.pneurobio.2013.11.002.
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., et al. (2001). Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 276, 125–132. doi:10.1074/jbc.M006781200.
- Spenger, C., Braschler, U. F., Streit, J., and Luscher, H. R. (1991). An Organotypic Spinal Cord - Dorsal Root Ganglion - Skeletal Muscle Coculture of Embryonic Rat. I. The Morphological Correlates of the Spinal Reflex Arc. *Eur.J.Neurosci.* 3, 1037–1053. doi:https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1991.tb00041.x.
- Streit, J. (1996). Mechanisms of pattern generation in co-cultures of embryonic spinal cord and skeletal muscle. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14, 137–148. doi:https://doi.org/10.1016/0736-5748(95)00093-3.
- Streit, J., Spenger, C., and Luscher, H. R. (1991). An Organotypic Spinal Cord - Dorsal Root Ganglion - Skeletal Muscle Coculture of Embryonic Rat. II. Functional Evidence for the Formation of Spinal Reflex Arcs In Vitro. *Eur.J.Neurosci.* 3, 1054–1068. doi:https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1991.tb00042.x.

- Suurväli, J., Boudinot, P., Kanellopoulos, J., and Rüütel Boudinot, S. (2017). P2X4: A fast and sensitive purinergic receptor. *Biomed J* 40, 245–256. doi:10.1016/j.bj.2017.06.010.
- Taccola, G., Margaryan, G., Mladinic, M., and Nistri, A. (2008). Kainate and metabolic perturbation mimicking spinal injury differentially contribute to early damage of locomotor networks in the in vitro neonatal rat spinal cord. *Neuroscience* 155, 538–555. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.06.008.
- Takeoka, A., Vollenweider, I., Courtine, G., and Arber, S. (2014). Muscle spindle feedback directs locomotor recovery and circuit reorganization after spinal cord injury. *Cell* 159, 1626–1639. doi:10.1016/j.cell.2014.11.019.
- Tam, T. H., and Salter, M. W. (2021). Purinergic signalling in spinal pain processing. *Purinergic Signal* 17, 49–54. doi:10.1007/s11302-020-09748-5.
- Tashima, R., Koga, K., Yoshikawa, Y., Sekine, M., Watanabe, M., Tozaki-Saitoh, H., et al. (2021). A subset of spinal dorsal horn interneurons crucial for gating touch-evoked pain-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, e2021220118. doi:10.1073/pnas.2021220118.
- Tator, C. H. (1998). Biology of neurological recovery and functional restoration after spinal cord injury. *Neurosurgery* 42, 696–707; discussion 707-708. doi:10.1097/00006123-199804000-00007.
- Teng, Y., Zhang, Y., Yue, S., Chen, H., Qu, Y., Wei, H., et al. (2019). Intrathecal injection of bone marrow stromal cells attenuates neuropathic pain via inhibition of P2X4R in spinal cord microglia. *J Neuroinflammation* 16, 271. doi:10.1186/s12974-019-1631-0.
- Thayer, S. A., and Wang, G. J. (1995). Glutamate-induced calcium loads: effects on energy metabolism and neuronal viability. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22, 303–304. doi:10.1111/j.1440-1681.1995.tb02004.x.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M. W., et al. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 778–783. doi:10.1038/nature01786.
- Tsuda, M., Ueno, S., and Inoue, K. (1999). In vivo pathway of thermal hyperalgesia by intrathecal administration of alpha,beta-methylene ATP in mouse spinal cord: involvement of the glutamate-NMDA receptor system. *Br J Pharmacol* 127, 449–456. doi:10.1038/sj.bjp.0702582.
- Ulmann, L., Hatcher, J. P., Hughes, J. P., Chaumont, S., Green, P. J., Conquet, F., et al. (2008). Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J Neurosci* 28, 11263–11268. doi:10.1523/JNEUROSCI.2308-08.2008.

- Van Den Berg, M., Castellote, J. M., Mahillo-Fernandez, I., and de Pedro-Cuesta, J. (2011). Incidence of traumatic spinal cord injury in Aragón, Spain (1972-2008). *J. Neurotrauma* 28, 469–477. doi:10.1089/neu.2010.1608.
- van den Brand, R., Heutschi, J., Barraud, Q., DiGiovanna, J., Bartholdi, K., Huerlimann, M., et al. (2012). Restoring voluntary control of locomotion after paralyzing spinal cord injury. *Science* 336, 1182–1185. doi:10.1126/science.1217416.
- Voglis, G., and Tavernarakis, N. (2006). The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO Rep* 7, 1104–1110. doi:10.1038/sj.embor.7400830.
- Wang, G. J., and Thayer, S. A. (1996). Sequestration of glutamate-induced Ca²⁺ loads by mitochondria in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 76, 1611–1621. doi:10.1152/jn.1996.76.3.1611.
- Wang, H., Zhang, Y., Ma, X., Wang, W., Xu, X., Huang, M., et al. (2020). Spinal TLR4/P2X7 Receptor-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation Contributes to the Development of Tolerance to Morphine-Induced Antinociception. *J Inflamm Res* 13, 571–582. doi:10.2147/JIR.S266995.
- Wang, S.-J., Wang, K.-Y., and Wang, W.-C. (2004a). Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience* 125, 191–201. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.01.019.
- Wang, X., Arcuino, G., Takano, T., Lin, J., Peng, W. G., Wan, P., et al. (2004b). P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med* 10, 821–827. doi:10.1038/nm1082.
- Wang, Z., Mei, W., Wang, Q., Guo, R., Liu, P., Wang, Y., et al. (2019). Role of Dehydrocorybulbine in Neuropathic Pain After Spinal Cord Injury Mediated by P2X4 Receptor. *Mol Cells* 42, 143–150. doi:10.14348/molcells.2018.0028.
- Whelan, P. J. (1996). Control of locomotion in the decerebrate cat. *Progress in Neurobiology* 49, 481–515. doi:10.1016/0301-0082(96)00028-7.
- Wilson, J. R., Tetreault, L. A., Kwon, B. K., Arnold, P. M., Mroz, T. E., Shaffrey, C., et al. (2017). Timing of Decompression in Patients With Acute Spinal Cord Injury: A Systematic Review. *Global Spine J* 7, 95S–115S. doi:10.1177/2192568217701716.
- Witiw, C. D., and Fehlings, M. G. (2015). Acute Spinal Cord Injury. *J Spinal Disord Tech* 28, 202–210. doi:10.1097/BSD.0000000000000287.
- Wokke, J. (1996). Riluzole. *Lancet* 348, 795–799. doi:10.1016/S0140-6736(96)03181-9.

Xie, Y.-K., Zhou, X., Yuan, H.-T., Qiu, J., Xin, D.-Q., Chu, X.-L., et al. (2019). Resveratrol reduces brain injury after subarachnoid hemorrhage by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *Neural Regen Res* 14, 1734–1742. doi:10.4103/1673-5374.257529.

Xu, F., Yang, J., Lu, F., Liu, R., Zheng, J., Zhang, J., et al. (2018). Fast Green FCF Alleviates Pain Hypersensitivity and Down-Regulates the Levels of Spinal P2X4 Expression and Pro-inflammatory Cytokines in a Rodent Inflammatory Pain Model. *Front Pharmacol* 9, 534. doi:10.3389/fphar.2018.00534.

Zhang, Y., Huang, F., Xu, Y., Xiang, W., and Xie, C. (2021). TRPV1 is involved in the antinociceptive effects of resveratrol in paclitaxel-induced neuropathic pain. *All Life* 14, 66–74. doi:10.1080/26895293.2020.1861111.