

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 899**

51 Int. Cl.:

A61K 31/74 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/765 (2006.01)

A61K 31/77 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02741682 .5**

96 Fecha de presentación: **24.04.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1389121**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.02.2004**

54 Título: **Método y composiciones para tratar lesiones en tejido nervioso de mamífero**

30 Prioridad:
24.04.2001 US 286200 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.06.2012

73 Titular/es:
**Purdue Research Foundation
Office of Technology Commercialization 1281
Win Henschel Boulevard
West Lafayette, IN 47906 , US**

72 Inventor/es:
**SHI, Riyl y
BORGES, Richard, B.**

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 382 899 T3

DESCRIPCIÓN

Método y composiciones para tratar lesiones en tejido nervioso de mamífero

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a métodos para tratar tejido nervioso de mamífero lesionado incluyendo pero sin limitarse a la médula espinal. Específicamente, la invención se refiere a métodos para tratar tejido nervioso lesionado a través de una aplicación *in vivo* de un agente de fusión de biomembrana. También se describen composiciones farmacéuticas para tratar una médula espinal lesionada.

Antecedentes de la invención

El daño mecánico al sistema nervioso de mamíferos a veces da como resultado deficiencias funcionales irreversibles. La mayoría de las deficiencias funcionales asociadas con traumatismo tanto al sistema nervioso periférico (SNP) como al sistema nervioso central (SNC) son resultado del daño a la fibra nerviosa o axón, que bloquea el flujo de tráfico de impulsos nerviosos a lo largo de la fibra nerviosa. Esto puede deberse a una discontinuidad física en la conducción producida por axotomía. El bloqueo puede producirse también cuando la membrana ya no funciona como barrera iónica, y/o se desmieliniza localmente [Honmou, O. y Young, W. (1995) Traumatic injury to the spinal axons (Waxman, S.G., Kocsis, J.D., Stys, P.K., Eds.): The Axon, New York: Oxford UP, págs. 480-503; Maxwell, W.L. (1996): Histopathological changes at central nodes of ravier after stretch-injury, Microscopy Research and Technique, 34:522-535; Maxwell, W.L., Watt, C., Graham, D.I., Gennarelli, T.A. (1993): Ultrastructural evidence of axonal shearing as a result of lateral acceleration of the head in non-human primates, Acta Neuropathol, 86:136-144; Maxwell, W.L., Graham, D.I. (1997): Loss of axonal microtubules and neurofilaments after stretch-injury to guinea pig optic nerve fibers, J Neurotrauma, 14:603-614; Blight, A.R (1993): Remyelination, Revascularization, and Recovery of Function in Experimental Spinal Cord Injury (Seil, F.J., Ed.): Advances in Neurobiology: Neural Injury and Regeneration, Vol. 59, New York, Raven Press, págs. 91-103]. En cualquier caso, las deficiencias funcionales se producen debido a la rotura en la conducción del impulso nervioso. Ahora se entiende incluso que las deficiencias conductuales graves asociadas con la lesión de la médula espinal se deben en gran parte al daño mecánico inicial a la sustancia blanca [Blight, A.R.: Morphometric analysis of a model of spinal cord injury in guinea pigs, with conductual evidence of delayed secondary pathology, J. Neurolog. Sci., 103: 156-171, 1991]. Episodios tardíos aunque progresivos de lo que se denomina "lesión secundaria" [Honmou y Young, W. (1995): Traumatic injury to the spinal axons (Waxman, S.G., Kocsis, J.D., Stys, P.K., Eds.): The Axon, New York: Oxford UP págs. 480-503; Young, W. (1993): Secondary injury mechanisms in acute spinal cord injury, J. Emerg. Med, 11:13-22.] amplían posteriormente la lesión lo que conduce al cuadro clínico típico de una médula espinal contusionada cavitada, y pérdida conductual de difícil curación.

En mamíferos, la sección transversal del axón conduce a la pérdida irreversible del segmento de prolongación del nervio distal por degeneración walleriana, mientras que el segmento proximal puede sobrevivir. En el SNP, puede restablecerse la función mediante la regeneración endógena de segmentos proximales por trayectos de fasciculación proporcionados tanto por tejido conjuntivo como por "tubos" de células de Schwann que pueden persistir durante cantidades de tiempo variables tras la lesión (Bisby, M.A. (1995): Regeneration of peripheral nervous system axons (Waxman, S.G., Kocsis, J.D., Stys, P.K., Eds.): The Axon Book, New York, The Oxford University Press, págs. 553-578]. El nivel de la lesión es crítico para la reparación fascicular clínica sin embargo, dado que la tasa de regeneración (aproximadamente 1 mm/día) puede no ser suficiente para evitar la pérdida de tejidos diana dependiendo de su inervación (tal como unidades motrices en músculo estriado). En el SNC, los segmentos distales de fibras nerviosas no se regeneran, y su pérdida produce células "diana" no funcionales, que suelen requerir inervación para mantener su integridad. Una última estrategia para potenciar la recuperación de una lesión de SNC es inducir o facilitar la regeneración de la sustancia blanca por diversos medios.

En la práctica clínica, la sección transversal de médula espinal aguda es poco común mientras que el daño mecánico por compresión/contusión es típico. En el SNP, son comunes la sección transversal, la lesión por estiramiento así como la lesión por compresión de troncos nerviosos. Sin embargo, el daño mecánico local grave de cualquier tipo de membrana de fibra nerviosa puede aún iniciar un proceso que conduzca a axotomía y a la pérdida irreparable de segmentos distales. Estos acontecimientos comienzan habitualmente con un fallo en la capacidad del axolema de separar y mantener diferencias críticas en iones entre los compartimentos extracelulares e intracelulares, en particular de calcio.

Los efectos devastadores de la lesión en la médula espinal de mamífero no son inmediatos. La lesión mecánica grave inicia una destrucción retardada de tejido de médula espinal produciendo una pérdida en la conducción de impulsos nerviosos asociada con una disolución local progresiva de fibras nerviosas (axones) [Honmou, O. y Young, W. (1995) The Axon (Waxman, S.G., et al., Eds.) págs. 480-529, Oxford University Press, New York; Griffin, J.W. et al. (1995) The Axon (Waxman, S.G., et al., Eds.) págs. 375-390, Oxford University Press, New York]. Esta pérdida de comunicación sensorial y motriz a través del sitio de la lesión puede producir un parálisis permanente y pérdida de sensación en regiones por debajo del nivel de la lesión espinal. Además, queda claro que la mayoría de los efectos dañinos de la "lesión secundaria" progresiva [Young, W. (1993) J. Emerg. Med. 11:13-22] de parénquima de

médula espinal relativos a la pérdida de función conductual es el efecto que tiene sobre la sustancia blanca. La lesión mecánica, bioquímica y anóxica/isquémica localizada de la sustancia blanca puede ser suficiente para provocar que los axolemas no funcionen como protección o barrera al intercambio no regulado de iones [Honmou, O. y Young, W. (1995) *The Axon* (Waxman, S.G., *et al.*, Eds.) págs. 480-529, Oxford University Press, New York].

5 Esto a su vez compromete tanto la integridad estructural de esta región de la fibra nerviosa como su capacidad para conducir impulsos a lo largo del cable. Por ejemplo, Ca^{2+} intracelular elevado induce la despolimerización de microtúbulos y microfilamentos produciendo una destrucción local del citoesqueleto [Griffin, J.W. *et al.* (1995) *The Axon* (Waxman, S.G., *et al.*, Eds.) págs. 375-390, Oxford University Press, New York; Maxwell, W.L., *et al.* (1995) *J. Neurocytology* 24:925-942; Maxwell, W.L., *et al.* *J. Neurotrauma* 16: 273-284].

10 El movimiento no restringido de Ca^{++} por su gradiente electroquímico hacia la célula conduce a una destrucción de las membranas y del citosol, y es un acontecimiento clave inicial en toda lesión mecánica de fibras nerviosas así como otras lesiones isquémicas tales como traumatismo craneal y accidente cerebrovascular [Borgens, R.B., Jaffe, L.F., Cohen, M.J. (1980): Large and persistent electrical currents enter the transected spinal cord of the lamprey eel, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 77:1209-1213; Borgens, R.B. (1988): Voltage gradients and ionic currents in injured and regenerating axons, *Advances in Neurology*, 47: 51-66; Maxwell, W.L. (1996): Histopathological changes at central nodes of ravier after stretch-injury, *Microscopy Research and Technique*, 34:522-535; Maxwell, W.L., Graham, D.I. (1997): Loss of axonal microtubules and neurofilaments after stretch-injury to guinea pig optic nervous fibres, *J. Neurotrauma*, 14:603-614; Maxwell, W.L., Watt, C., Graham, D.I., Gennarelli, T.A. (1993): Ultrastructural evidence of axonal shearing as a result of lateral acceleration of the head in non-human primates, *Acta Neuropathol*, 86:136-144; Honou y Young, 1995, Lee *et al.*, 1999; Stys *et al.*, 1990]. Na^+ también entra en la región localizada del ataque a membrana, despolarizando la membrana y facilitando la liberación de depósitos intracelulares de Ca^{++} [Carafoli, E., Crompton, M. (1976): Calcium ions and mitochondria (Duncan, C.J., Ed.): Symposium of the Society for Experimental Biology: Calcium and Biological Systems, Vol. 30, New York, Cambridge University Press, págs. 89-115; Borgens, R.B., Jaffe, L.F., Cohen, M.J. (1980): Large and persistent electrical currents enter the transected spinal cord of the lamprey eel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77:1209-1213; 1988; Borgens, R.B. (1988): Voltage gradients and ionic currents in injured and regenerating axons, *Advances in Neurology*, 47: 51-66]. El éxodo de potasio también empuja el potencial de reposo de la membrana hacia el potencial de Nernst para K^+ contribuyendo a la región localizada de inexcitabilidad y al bloqueo de la conducción de impulsos nerviosos por la conducción incluso en membranas intactas. Por tanto, cuando K^+ desciende rápidamente su gradiente electroquímico fuera de la célula, la concentración extracelular elevada resultante contribuye al bloqueo de conducción localizado [Honmou, O. y Young, W. (1995) *The axon* (Waxman. S. G., *et al.*, Eds.) págs. 480-529. Oxford University Press, New York Shi, R. *et al.*, (1997) *Society for Neuroscience Abstracts*, 108:16]. Sin embargo es la reacción en cadena progresiva de acontecimientos activados por la entrada de Ca^{++} en la célula lo que inicialmente conduce a la disolución progresiva del axón, ayudada en fases posteriores por el acontecimiento agudo mediante procesos moleculares complejos adicionales tales como la iniciación de trayectos de peroxidación lipídica y la formación de metabolitos de oxígeno "radical libre".

40 Existen varias clases de moléculas que ya se ha demostrado que pueden sellar membranas celulares o de hecho fusionar membranas entre sí [Nakajima, N., Ikada, Y. (1994): Fusogenic activity of various water-soluble polymers, *J. Biomaterials Sci., Polymer Ed.*, 6:751- 9]. Estos polímeros biocompatibles también pueden solucionar las discontinuidades en el plano de la membrana para obtener un plasmalema sin romper, y/o insertarse en el defecto de membrana, sellándola y revirtiendo la permeabilización.

45 Se conoce desde hace más de treinta años que el polietilenglicol (PEG) fusiona muchas células entre sí para formar una célula gigante. La aplicación de esta macromolécula hidrófila se ha aprovechado para formar conjugados multicelulares con el fin de intercambiar material genético, formación de hibridomas, o como modelo para fusión vesicular endógena [Davidson, R. L., O'Malley, K. A., Wheeler, T. B. (1976): Induction of mammalian somatic cell hybridization by polyethylene glycol, *Somat. Cell Genet.*, 2:271-280; Lee, J. Lentz, B. R. (1997): Evolution of lipid structures during model membrane fusion and the relation of this process to cell membrane fusion, *Biochemistry*, 36:6251-6259; Lentz, B. R. (1994): Induced membrane fusion; Potential mechanism and relation to cell fusion events, *Chem. and Phys. of Lipids*, 73:91-106]. También se ha usado PEG para fusionar muchas células de feocromocitoma (PC-12; células similares a neuronas) entre sí para producir grandes unidades individuales que facilitan mediciones neurofisiológicas *in vitro* así como para fusionar los extremos cortados de axones gigantes de invertebrado individuales *in vitro* [O'Laque, P. H., Huttner, S. L. (1980): Physiological and morphological studies of rat pheochromocytoma cells (PC12) chemically fused and grown in culture, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 77:1701-1705; Krause, T. L., Bittner, G. D. (1990,1991): Rapid morphological fusion of severed myelinated axons by polyethylene glycol, *PNAS*, 87:1471-1475].

60 Borgens & Shi (2000) *FASEB J.* 14: 27-35, Shi & Borgens (1999) *Journal of Neurofisiology* 81 (5): 2406-2414 y Shi & Borgens (2000) *Journal of Neurocytology* 29: 633-643 dan a conocer que la aplicación directa de polietilenglicol (PEG) en el sitio de una lesión por compresión de médula espinal de un animal o en una médula espinal lesionada aislada condujo a recuperación de la lesión a través de reparación molecular.

65 Se necesitan métodos y composiciones para tratar lesiones de médula espinal de mamífero. La presente invención trata estas necesidades.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de tejido nervioso de mamífero lesionado de la médula espinal o el sistema nervioso central, restableciéndose o aumentándose la conducción de potenciales de acción a través del tejido nervioso lesionado. La invención se refiere más particularmente a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un agente de fusión de biomembrana tal como se define a continuación, administrándose dicha composición al paciente de modo que el agente de fusión de biomembrana se suministra a través del sistema vascular del paciente al sitio del tejido nervioso lesionado, particularmente tejido nervioso de la médula espinal. El agente de fusión de biomembrana es un polialquilenglicol del grupo que consiste en polimetilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol, polipentilenglicol, polihexilenglicol, poliheptilenglicol, polioctilenglicol, polinonilenglicol y polidecilenglicol.

Por tanto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una lesión de tejido nervioso de la médula espinal o el sistema nervioso central de un paciente mamífero, restableciéndose o aumentándose la conducción de potenciales de acción a través del tejido nervioso lesionado, comprendiendo la composición una cantidad eficaz de un polialquilenglicol seleccionado del grupo que consiste en polimetilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol, polipentilenglicol, polihexilenglicol, poliheptilenglicol, polioctilenglicol, polinonilenglicol y polidecilenglicol, administrándose dicha composición al paciente de modo que el polialquilenglicol se suministra a través del sistema vascular del paciente al sitio del tejido nervioso lesionado; y opcionalmente un vehículo farmacéutico.

El agente de fusión de biomembrana puede administrarse al paciente por vía parenteral. Preferiblemente, el agente de fusión de biomembrana es de una cantidad tal que su suministro al sitio de la lesión a través del riego sanguíneo tras la inyección del agente de fusión de biomembrana en el paciente es eficaz para reparar fibras nerviosas lesionadas. La inyección puede ser una inyección intravascular, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal de una cantidad eficaz del agente de fusión de biomembrana de modo que se suministra una cantidad eficaz al sitio de la lesión de tejido nervioso.

También se dan a conocer agentes de fusión de biomembrana que adoptan la forma de un polímero hidrófilo tal como un copolímero de bloque de polietilenglicol/polipropilenglicol tal como óxido de etileno-óxido de propileno-óxido de etileno (EPAN), u otro tensioactivo biocompatible hidrófilo tal como dextranos. Se dan a conocer tensioactivos no iónicos y pueden adoptar la forma de un polímero anfipático tal como una poloxamina.

Lo más preferiblemente, el agente de fusión de biomembrana es polietilenglicol (PEG) $(\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH})$, donde n preferiblemente oscila entre 4 y aproximadamente 570 o más, más preferiblemente entre aproximadamente 30 y aproximadamente 100. Se usa PEG como disolvente para muchos compuestos usados en medicina. Por ejemplo, se usa PEG como vehículo para medios de contraste usados en radiología, y un disolvente para factores hematopoyéticos administrados mediante infusión a pacientes hemofílicos.

También se dan a conocer poloxámeros (véase la sección de Definiciones a continuación). Algunos de estos polímeros tribloque consisten en polímeros de PEG con un núcleo de propilenglicol. Los tamaños de las cadenas poliméricas individuales no son críticos para la acción del poloxámero, y el poloxámero también puede inyectarse en el torrente sanguíneo o aplicarse de manera tópica de la misma manera que el PEG. (Los poloxámeros también son polímeros anfipáticos en mayor o menor medida dependiendo de los números relativos de grupos de etilenglicol y propilenglicol.)

En el desarrollo de la presente invención, se hizo un seguimiento de la distribución de un agente de fusión de biomembrana, más particularmente, PEG, en animales con lesiones de médula espinal y se encontró que PEG se dirige específicamente a la lesión hemorrágica en la médula espinal tras cualquier medio para introducirla en el riego sanguíneo (por ejemplo, por vía parenteral tal como inyección intravenosa, subcutánea o intraperitoneal, por vía transdérmica, por vía oral, a través de administración bucal o a través de otra vía de administración). Además, PEG parece bañar de manera más uniforme el sitio de la lesión cuando se suministra a través del riego sanguíneo que cuando se aplica a la lesión directamente. Al someter a prueba la aplicación o administración de PEG a cobayas con la médula espinal lesionada, se ha observado que la recuperación de funciones (tanto en la conducción de impulsos nerviosos a través de la lesión de médula espinal como en la recuperación conductual) ha sido idéntica a la determinada previamente en respuesta a aplicación tópica (directa) de PEG al sitio de lesión de tejido nervioso.

Este es un hallazgo espectacular e inesperado. Una única dosis de un agente de fusión de biomembrana tal como PEG en disolución acuosa administrada bajo la piel del lomo (inyección subcutánea) revertirá muchas deficiencias funcionales en lesiones de médula espinal graves o producidas por traumatismo en cobayas cuando las dosis se administra hasta de seis (6) a ocho (8) horas tras la lesión. El PEG migra a y se adhiere selectivamente al sitio de una lesión de tejido nervioso de mamífero y funciona ahí como agente de fusión de biomembrana.

Las pruebas muestran que la aplicación o administración de un agente de fusión de biomembrana tal como PEG a lesiones de médula espinal por aplastamiento/contusión graves *in situ* produce la recuperación funcional de un

comportamiento mediado por la médula espinal identificado en mamíferos de prueba así como una rápida recuperación de impulsos nerviosos registrados que ascienden por la médula espinal a través de la lesión original. Estas recuperaciones fisiológicas y conductuales tras una lesión de médula espinal grave en mamíferos de prueba no son temporales sino bastante estables, mejorando incluso con el paso del tiempo. Además, la aplicación de un agente de fusión de biomembrana tal como PEG puede retrasarse durante al menos 8 horas tras la lesión de médula espinal sin que pierda su eficacia.

Por consiguiente, la presente invención contempla una composición para su uso en el tratamiento de tejido nervioso de la médula espinal o el sistema nervioso central de un mamífero lesionado, preferiblemente un ser humano, en la que se restablece o aumenta la conducción de potenciales de acción a través del tejido nervioso lesionado, comprendiendo dicha composición una cantidad eficaz de un polialquilenglicol (u óxido) seleccionado del grupo que consiste en polimetilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol, polipentilenglicol, polihexilenglicol, poliheptilenglicol, polioctilenglicol, polinonilenglicol y polidecilenglicol y mezclas de los mismos, administrándose dicha composición al paciente de modo que el polialquilenalcohol se suministra a través del sistema vascular del paciente al sitio del tejido nervioso lesionado. Preferiblemente, el tratamiento incluye una inyección del agente de fusión de biomembrana en un paciente por vía parenteral, incluyendo vía intravascular, vía intramuscular, vía subcutánea, vía intraperitoneal, o a través de cualquier otra vía que dé como resultado un suministro del agente de fusión de biomembrana al sitio de la lesión a través del sistema vascular.

El agente de fusión de biomembrana es un polialquilenglicol seleccionado del grupo que consiste en polialquilenglicol C₁ a C₁₀ tal como polimetilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol, polipentilenglicol, polihexilenglicol, poliheptilenglicol, polioctilenglicol, polinonilenglicol y polidecilenglicol. El agente de fusión de biomembrana puede adoptar la forma de manera más general de cualquier mezcla de agentes individuales aceptable, tales como mezclas de dos o más polialquilenglicoles, mezclas de polialquilenglicoles con copolímeros de bloque de polialquilenglicoles. El uso de polietilenglicol y polipropilenglicol se prefiere particularmente para su uso en la presente invención, siendo polietilenglicol el más preferido. En algunas aplicaciones, la administración se facilita usando un agente de fusión de biomembrana que tiene una viscosidad reducida, por ejemplo, reducida en relación con la viscosidad a temperatura ambiente por calentamiento. Sin embargo, queda claro que puede conseguirse una viscosidad adecuadamente baja seleccionando un molécula de bajo peso molecular como agente de fusión de biomembrana e inyectando el agente tras calentar el agente hasta una temperatura admisiblemente elevada.

En una forma de la invención, el tratamiento de una médula espinal de mamífero lesionada también implica administrar directa o indirectamente (por cualquier vía de administración incluyendo a través del sistema vascular) una cantidad eficaz de un bloqueante de los canales de potasio al sitio del daño al tejido nervioso, junto con una cantidad eficaz de un agente de fusión de biomembrana seleccionado. El bloqueante de los canales de potasio puede ser, por ejemplo, una piridina amino-sustituida, tal como 4-aminopiridina.

En una realización preferida, la invención proporciona una composición para su uso tal como se ha definido anteriormente, que comprende además una cantidad eficaz de un bloqueante de los canales de potasio tal como se describió anteriormente. Se ha encontrado inesperadamente que tales composiciones tratan de manera sinérgica una médula espinal dañada.

Cuando el agente de fusión de biomembrana adopta la forma de polietilenglicol, se administra en una cantidad eficaz y preferiblemente dentro del intervalo de dosificación de aproximadamente 15 a 50 mg de PEG por peso corporal del paciente en kilogramos cuando el PEG tiene un peso de aproximadamente 1500 a 4000 Dalton. El agente de fusión se administra preferiblemente en combinación con un vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptables, más preferiblemente en una solución salina inyectable estéril tal como solución de Ringer lactato o cualquier otro "fluido" i.v. administrado habitualmente tras un traumatismo como tratamiento para choque y/o pérdida de sangre. Cualquier copolímero de polialquilenos que tenga un uso clínico seguro como tratamiento inyectable en otros contextos es adecuado para su uso en un método para tratar tejido nervioso lesionado según la presente invención.

También se da a conocer un agente de fusión que es un poloxámero, un copolímero de bloque de polietileno-polipropileno-polietileno, o una poloxamina, que se administra preferiblemente en una solución salina estéril isotónica tal como una solución de Ringer lactato, solución salina isotónica estéril según USP, soluciones de Krebs, u otra disolución de "fluidos" i.v. a dosificaciones de agente de fusión de 50 - 150 mg/kg del peso corporal del paciente, por ejemplo, aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. La disolución acuosa se prepara de tal manera que la inyección es aproximadamente de 1 cc. Los poloxámeros se acompañan preferiblemente de un potente antioxidante. Por ejemplo, pueden añadirse 0,4 g de un antioxidante natural, vitamina C, a la disolución madre de P188 350 mg/Kg. Cualquier tensioactivo o polímero anfipático no iónico que tengan un uso clínico seguro como tratamiento inyectable en otros contextos se da a conocer para su uso en un método para tratar tejido nervioso lesionado.

La metodología de la presente invención permitirá a un médico o a un profesional médico (por ejemplo, neurocirujano) volver a conectar física y funcionalmente prolongaciones de célula nerviosa completamente seccionadas (axones), así como rescatar inmediatamente prolongaciones nerviosas aplastadas que de otro modo evolucionarían en axotomía y en pérdida irreversible del segmento axónico distal. Este resultado es sorprendente.

La metodología de la presente invención es inesperada y espectacular por al menos cuatro motivos más significativos:

1) Un agente de fusión de biomembrana tal como se da a conocer en el presente documento puede suministrarse mediante una jeringa de tuberculina y una aguja fina (calibre 26) insertada justo bajo la vaina de los nervios periféricos próximos al sitio de aplastamiento o estiramiento y/o mediante inyección i.v.. Esta operación se ha realizado con PEG y poloxámero en cobayas adultas con lesiones por aplastamiento locales en el nervio ciático de la pata. Las observaciones revelaron recuperaciones muy rápidas (de minutos a 1 hora) de conducción de impulsos nerviosos a través de la lesión y recuperaciones de función muscular en la parte inferior de la pata (extinguida originalmente por el aplastamiento del nervio en cuestión).

2) La administración de un agente de fusión de biomembrana a través del riego sanguíneo de un paciente con tejido nervioso lesionado libera al neurocirujano encargado del requisito absoluto de exponer quirúrgicamente el sitio de la lesión de tejido nervioso, por ejemplo, para eliminar el recubrimiento duro de la médula espinal (la duramadre), antes de realizar una aplicación tópica del agente de fusión.

3) La introducción de agentes de fusión de biomembrana a través del riego sanguíneo facilita enormemente el tiempo en el que estos agentes podrían suministrarse clínicamente. Los agentes de fusión pueden suministrarse como componente de fluidos i.v. que se preparan de manera convencional incluso en el lugar del accidente de minutos a horas tras la lesión.

4) La introducción de un agente de fusión de biomembrana tal como PEG a través de la vasculatura (riego sanguíneo) también permite el uso de esta terapia en casos de traumatismo craneal grave, así como hemorragia cerebral (accidente cerebrovascular). Estos traumatismos no habrían estado accesibles para la aplicación tópica y eliminación de disoluciones de agente de fusión, pero están perfectamente accesibles para el tratamiento mediante inyección i.v. a través de los fluidos i.v. normales que se administran continuamente a pacientes con traumatismo. El traumatismo craneal y el accidente cerebrovascular son acontecimientos hemorrágicos idénticos a la lesión de médula espinal en cuanto a que las células en esas regiones del cerebro comienzan a experimentar disolución y muerte tras permeabilizarse mediante una restricción incluso temporal del riego sanguíneo. Las fisuras en las membranas de las células nerviosas pueden sellarse molecularmente y las células pueden rescatarse por la aplicación de agente de fusión al igual que en el traumatismo de médula espinal.

Una inyección de un agente de fusión de biomembrana según la presente invención debe realizarse lo antes posible tras una lesión grave en el sistema nervioso central. Dado que el agente de fusión de biomembrana se suministra a través del torrente sanguíneo, esta metodología puede usarse para tratar cualquier forma de daño por traumatismo al sistema nervioso periférico (aplastamiento o lesión en el que las fibras nerviosas no están completamente cortadas), cualquier forma de daño a la médula espinal en la que la propia médula no se corta en dos fragmentos, cualquier tipo de daño por traumatismo al cerebro tal como traumatismo por objeto contundente o concusión, y accidente cerebrovascular o aneurisma cerebral.

Por tanto, un objeto de la invención es proporcionar métodos y composiciones para tratar un daño de tejido nervioso de mamífero para restaurar al menos parcialmente la función nerviosa.

Estos y otros objetos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de las descripciones en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1B representan aparatos experimentales usados en estudios descritos en el presente documento. La figura 1A representa una vista desde arriba de la cámara de registro de sacarosa doble. En la figura 1A, de izquierda a derecha, el primer compartimento grande contiene KCl 120 mM, el compartimento grande central contiene las disoluciones de pruebas fisiológicas, tales como solución de Krebs oxigenada, y el tercer compartimento también contiene KCl 120 mM. Las cámaras pequeñas a ambos lados del compartimento central contienen sacarosa 230 mM. Se fijan en su sitio sellos formados con cubreobjetos con lubricante de silicona a alto vacío en las ubicaciones mostradas para inhibir el intercambio de los diversos medios de un compartimento al siguiente. Electrodo de AgAgCl para registrar y estimular están en serie con conectores hembra en las ubicaciones mostradas. En la parte superior de la figura 1B, se muestra una vista lateral del aparato usado para producir un aplastamiento normalizado en la médula espinal aislada en su punto central dentro del compartimento central. La posición de la lesión de médula espinal dentro de la cámara central se muestra en la parte inferior de la figura 1B. Los aparatos se describen adicionalmente a continuación.

Las figuras 2A-2B representan registros electrofisiológicos que muestran potenciales de acción compuestos (CAP) de médulas espinales control, y tratadas con PEG/4-AP. En la figura 2A, se trataron bandas de médula espinal no tratada con 4-AP 100 μ M 1 hora tras la lesión. En la figura 2B, se administró 4-AP 100 μ M 1 hora tras la aplicación de PEG. La figura 2C es un gráfico de barras de datos de grupo que muestra el aumento de amplitud en porcentaje para 5 médulas espinales control y 5 tratadas con PEG.

La figura 3 representa un mecanismo propuesto del efecto sinérgico de PEG y 4-AP tal como se describe más completamente en el ejemplo 1. La lesión de membrana obtenida mediante compresión mecánica se representa por orificios. Pequeñas cabezas de flecha representan canales de potasio.

La figura 4 representa una configuración experimental usada en los ejemplos. Se interrumpieron las rutas de impulsos nerviosos aplastando la médula espinal en la región media torácica (circuito rojo). Un procedimiento de control demostró que un fallo en la detección de SSEP se debía a un fallo de subir la conducción de impulsos nerviosos a través de la lesión mediante estimulación de un circuito neuronal no afectado por la lesión.

La figura 5 representa una exposición quirúrgica realizada en el nervio ciático de un mamífero de prueba y muestra las ramificaciones (que se cortan, véanse los métodos) del nervio ciático y el músculo gemelo. Obsérvese la posición de los dos transductores, midiendo uno la fuerza de contracción muscular y el otro el desplazamiento de las patas traseras. Se muestra la posición relativa de los electrodos de gancho que estimulan el nervio ciático proximal a su inserción en el gemelo al igual que la colocación de electrodos de disco bipolares en el músculo para registrar la propagación de AP en respuesta a la estimulación. Todos los registros se adquieren simultáneamente en tres canales de equipo de registro, usándose un cuarto canal para presentar visualmente un marcador de acontecimiento activado por el impulso de estimulación. Sólo para fines de ilustración, los dibujos no se realizan a escala.

Las figuras 6A-6D son cuatro representaciones fotográficas que muestran marcaje con polietilenglicol en médula espinal aplastada de cobaya. En las figuras 6A-6D, la distribución de FI-PEG en médula espinal aplastada se muestra usando tres tipos de aplicación. La aplicación de PEG se realizó en el plazo de 1/2 hora desde la lesión por aplastamiento de desplazamiento constante, y se evaluó mediante microscopía fluorescente de secciones transversales congeladas de 50 μm de grosor aproximadamente 24 horas después. En la figura 6A, se muestra una sección de control típica en campo oscuro (la imagen está digitalmente potenciada para revelar médula espinal marcada de manera muy débil). Tales secciones de control no lesionadas se obtuvieron recogiendo un segmento de la médula espinal de al menos 3-4 segmentos vertebrales desde el sitio de la lesión. Obsérvese el marcaje característico de PEG en una médula espinal lesionada a nivel de detección. Las flechas apuntan hacia regiones marcadas débilmente de vasculatura en la sustancia gris y en la superficie pial. La figura 6B muestra un fuerte marcaje de PEG en el epicentro del aplastamiento producido por una aplicación tópica de 2 minutos de PEG en la lesión como en informes anteriores. Las flechas apuntan hacia regiones centrales relativamente no marcadas de esta lesión. En las figuras 6C y 6D, se muestra un fuerte marcaje con FI-PEG asociado con inyección subcutánea e intravenosa respectivamente. En la figura 6C, la flecha apunta hacia un quiste que se forma alrededor del canal central inflamado. Obsérvese el marcaje extenso de tan sólo el sitio de la lesión mediante todos los métodos. Barra de escala = 500 μm

Las figuras 7A y 7B son gráficos de registros eléctricos que muestran pérdida y recuperación de conducción en nervios ciáticos de cobaya aplastados tras la administración de PEG. El primer registro eléctrico en la parte superior de ambas figuras 7A y 7B muestra un registro de SSEP típico en respuesta a estimulación del nervio tibial. Obsérvese los potenciales evocados incidente temprano e incidente tardío (P1 y P2) en la médula espinal intacta, y su inmediata eliminación por la lesión de médula espinal. Aunque no se muestra para todos los registros, el procedimiento de control de nervio mediano se realizó siempre que no se registraba un SSEP, demostrando que el fallo en el registro de CAP se debía a la lesión. En la figura 7A, se muestra un conjunto típico de registros para un animal control hasta el punto de tiempo de 1 mes cuando se concluyó el estudio. Obsérvese la falta completa de conducción de SSEP y el robusto SSEP inducido por el nervio mediano. En la figura 7B, se muestra un conjunto típico de registros eléctricos para un animal tratado con PEG. Obsérvese la eliminación del SSEP derivado de nervio tibial por la lesión de médula espinal, y el procedimiento de control de nervio mediano positivo realizado en el mismo momento de registro. Antes del final del primer día tras la lesión, se restauró la conducción de SSEP mediante inyección subcutánea de PEG realizada 6 horas tras la lesión. Los potenciales evocados recuperados continuaron mejorando en cuanto a la amplitud y latencia durante el siguiente mes de observación, y en ningún caso se perdieron los SSEP recuperados tras su recuperación. La inserción presenta la base de amplitud y tiempo para todos los registros excepto las estimulaciones de nervio mediano, que se registraron a 1/2 de esta sensibilidad, pero usando la misma base de tiempo.

Las figuras 8A - 8C son copias de imágenes de vídeo capturadas y superpuestas de una cobaya durante un periodo de estimulación de CTM con una sonda monofilamento, que muestran la recuperación conductual tras la administración subcutánea de PEG. Estas copias se derivan de un análisis de cinta de vídeo fotograma a fotograma de regímenes de estimulación de músculo cutáneo del tronco (CTM) en los que en primer lugar se determina todo el campo receptivo de CTM en la cobaya no lesionada (circunscrito). El análisis con sonda dentro de esta región de piel del lomo con una sonda monofilamento produce contracciones en la piel del lomo, mientras que el análisis con sonda fuera de la región no. Esta línea se traza en el lomo afeitado del animal sedado con un marcador mientras que el investigador analiza con sonda la región. Se graba en vídeo todo el procedimiento desde arriba, y se reconstruyen las diversas regiones tanto de campos receptivos intactos como de arreflexia a partir de estas imágenes de vídeo. Obsérvese que en todos los animales, la lesión de médula espinal torácica media elimina la capacidad de respuesta de CTM por debajo del nivel de la lesión a ambos lados (circunscrito). En animales control (figura 8A), esta región de arreflexia permaneció inalterada durante la duración del experimento. En animales

tratados con PEG (figura 8B), una región variable de los campos de CTM receptivos perdidos se recuperó en el plazo de un tiempo de tratamiento corto. Esa región muestra una región de recuperación de CTM para este animal que comprende aproximadamente el 55% del área original de pérdida de CTM. La inserción (figura 8C) muestra la imagen de vídeo a las 4 semanas que se usó para reconstruir las regiones de campos receptivos intactos y no funcionales. La matriz de puntos permite una alineación precisa y superposición de campos receptivos, así como un análisis más en profundidad del vector de movimiento de piel, la velocidad de contracción de la piel y la latencia cuando se requería (datos no mostrados).

Las figuras 9A-9D representan una parte de un examen neurológico para mediciones del desenlace y recuperación de paraplejía. Se coloca un perro sobre su costado mientras un neurólogo realiza pruebas para determinar la presencia de dolor superficial (A), dolor intenso (B) y propiocepción consciente (C y D). Se pinchó la piel del costado y las patas con hemostatos analizando con sondas para detectar una reacción del sujeto durante pruebas de respuesta a dolor superficial. La respuesta a dolor intenso se determinó de manera similar, pero apretando de manera sostenida y fuerte las articulaciones de los dedos. Se proporcionaron respuestas positivas para su comparación sometiendo a prueba las patas delanteras. Se cuantificaron las respuestas mediante una puntuación de 1-5: 1 = respuesta no detectable; 2 = una respuesta en los límites de detección, indicado mediante un estado aumentado de alerta, aumento de la respiración o impulso; 3 = atención constante al estímulo doloroso pero sin ningún comportamiento defensivo manifiesto; 4 = comportamiento levemente defensivo tal como giro abrupto de la cabeza hacia el estímulo y gemidos; 5 = respuesta completamente normal a estímulos dolorosos incluyendo aullar, morder y comportamiento agresivo. Estas puntuaciones se obtuvieron para ambos lados del cuerpo y se calculó el promedio. Se sometió a prueba la colocación propioceptiva (CP) consciente y el soporte de peso en perros proporcionando soporte lateral de las patas traseras, y girando una pazuña trasera "hacia abajo" de modo que la superficie dorsal de la pazuña (y el peso del animal) descansaran sobre la mesa (inserción C). Un animal normal devuelve vivamente la pazuña a una postura normal inmediatamente después de que el examinador libere la pazuña. Los animales parapléjicos descansan en esta postura "con los nudillos hacia abajo" durante periodos de tiempo prolongados. Las pruebas de las patas delanteras proporcionaron un control positivo. Se realizó la prueba en cada lado del cuerpo, y se puntuó en cada lado: 1 punto = ausencia completa de CP, y 2,5 puntos para una respuesta de CP positiva. Entonces se sumaron estas puntuaciones para cada animal. Se evaluó la locomoción voluntaria (no mostrada) con una puntuación similar de 1-5 puntos: 1 = completa incapacidad para dar pasos o deambular voluntariamente; 2 = capacidad para dar pasos y soportar el peso en el límite de detección, como mucho algunos pasos antes de caer (paresia); 3 = secuencias más largas de pasos, mal coordinados antes de caer (paresia), e incapaz de subir escaleras; 4 = capacidad de caminar de manera más robusta y eficaz con claras deficiencias de coordinación, soporte del peso eficaz, pero capaz de subir escaleras; 5 = capacidad para caminar de manera completamente normal, que no puede distinguirse de un animal normal. Todos los exámenes neurológicos se grabaron en vídeo como referencia y se permitieron medios puntos según el criterio del examinador. Se determinó una puntuación neurológica total (TNS) para cada animal en cada periodo de prueba sumando las puntuaciones de esas 4 pruebas independientes. Por tanto, el intervalo de puntuación posible para cualquier animal fue de 4 (un animal completamente parapléjico) a 20 (un animal completamente normal, que no puede distinguirse de uno no lesionado).

La figura 9E muestra una comparación de animales control y tratados con PEG (figura 9A-9D) para cada una de las cuatro medidas de desenlace a aproximadamente 3 días tras la lesión (aproximadamente 48 horas tras la última inyección de PEG), 1 semana, y 6-8 semanas tras la lesión. El eje de las y para cada gráfico de barras es el porcentaje de la población (es decir, 25, 50, 75%). DP = dolor intenso, SP = dolor superficial, P = colocación propioceptiva, y L = locomoción voluntaria. Los asteriscos indican cuándo una prueba de proporciones (prueba exacta de Fisher, bilateral) o una comparación de las medias (prueba de la T de Student, o la variación de Welch) revelaron significación estadística. Obsérvese la clara recuperación de medidas de desenlace en el plazo de 48 horas desde la última inyección de PEG en ese grupo, y la sorprendente mejora en el TNS en perros tratados con PEG en todos los periodos de evaluación.

La figura 10A muestra un perro sedado y la colocación de electrodos en pruebas electrofisiológicas para determinar la conducción a través de una lesión de médula espinal para determinar un potencial evocado somatosensorial (SSEP). En cada evaluación, se estimularon de cuatro a siete conjuntos de potenciales evocados (SSEP), se registraron, se calculó su promedio y se almacenaron usando un registrador Nihon Kohden ME#B - 5304K 4 Neuropak. Más particularmente, la figura 10A muestra el perro sedado y la colocación de electrodos de cable de estimulación bipolar, insertados por vía subcutánea, en la pata trasera en el área popliteal distal separados aproximadamente 0,5 - 1 cm. Estos electrodos estimularon el nervio tibial de la pata trasera (cables rojos). Se usó un procedimiento similar para estimular el nervio mediano de la pata delantera (cables). Se aplicaron trenes de estimulaciones de ondas cuadradas (0,5 - 3,0 mA de amplitud, 200/min.) para evocar impulsos nerviosos compuestos a partir de estos nervios. Para registrar potenciales evocados, se insertaron electrodos de aguja de cuero cabelludo por vía subcutánea sobre la corteza somatosensorial de manera contralateral al lado estimulado, mientras que se insertaron electrodos de referencia en el lado opuesto entre el mastoideo y el pabellón auditivo de la oreja. La colocación de electrodos de registro se facilitó mediante la estimulación del nervio mediano al comienzo, un circuito neuronal por encima de, y no afectado por, la lesión de médula espinal (inserción, circuito 2). Este procedimiento también proporcionó un registro de control positivo para validar la frecuente incapacidad para registrar potenciales evocados estimulados en la pata trasera (pero cuyos potenciales de ascensión se bloquean por la lesión

en la médula espinal (inserción, circuito 1)).

La figura 10B es un gráfico de un conjunto completo de registros de SSEP a partir del procedimiento de la figura 10A. Un grupo inferior de formas de onda en este par son los tres trenes individuales de 200 estimulaciones tal como se comenta, y una forma de onda superior es el SSEP evocado promedio (sólo se proporcionan tales SSEP promedio en registros posteriores, figuras 11A y 11B). Este registro es de un procedimiento control. Obsérvese el claro potencial evocado, registrado aproximadamente 10 ms tras la estimulación del nervio mediano.

La figura 10C es un gráfico que muestra una parte de un registro eléctrico, que presenta tres trenes de estimulación, así como el SSEP promedio como en la figura 10B. Este registro fue en respuesta a la estimulación del nervio tibial en el mismo perro parapléjico que proporcionó el registro en la figura 10B, aproximadamente 4 días tras la lesión. La eliminación completa de conducción de SSEP a través de la lesión es característica de todos los animales con paraplejia neurológicamente completa que cumplen los criterios descritos en el texto, tanto en éste como en todos los informes anteriores usando procedimientos idénticos (R. B. Borgens *et al.*, J. Restorative Neurology and Neurosci. 5, 305 (1993); R. B. Borgens *et al.*, J. Neurotrauma 16, 639 (1999)). SA = artefacto de estímulo; base de tiempo = 50 ms la pantalla completa, 5 ms/div; sensibilidad = 1,25 μ V/div.

Las figuras 11A y 11B se refieren a la recuperación inducida por PEG de la conducción de impulsos nerviosos a través del sitio de la lesión espinal. En la figura 11A, se muestra una evolución de 6 semanas de la recuperación de la conducción a través de la lesión para un perro tratado con PEG. Cada perfil son las formas de onda promedio de 3-4 trenes de 200 estimulaciones tal como se describió en las figuras 9A-9E. Hay ausencia completa de SSEP en este animal parapléjico antes de la cirugía, y aproximadamente 4 días después. El tercer perfil es un procedimiento control de nervio mediano. No hay evidencias de conducción recuperada 1 semana tras la lesión. A las 6 semanas tras la cirugía, habían vuelto dos potenciales corticales evocados diferenciados, un pico incidente normalmente temprano de aproximadamente 26 ms de latencia (P 1), y un pico incidente tardío (P 2), de aproximadamente 45 ms de latencia.

En la figura 11B, se muestra un potencial evocado de baja amplitud, larga duración, pero reproducible recuperado en el plazo de 15 min. desde una inyección lenta de PEG. Este SSEP atípico pareció segregarse en un pico incidente temprano de aproximadamente 15-20 ms de latencia, y un pico más condensado y incidente tardío (P 2) de aproximadamente 32-35 ms de latencia. SA = artefacto de estímulo. La base de tiempo y la escala de sensibilidad son tanto para la figura 11A como para la figura 11B.

Definiciones

El término "tejido nervioso" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier tejido nervioso de vertebrado, incluyendo particularmente células del sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico. Más particularmente, tejido nervioso incluye estructuras neuronales de médula espinal, nervios del sistema nervioso periférico y células nerviosas del cerebro.

La palabra "lesión" se usa en el presente documento para indicar generalmente una rotura de la membrana de una célula nerviosa, de manera que hay un colapso en la capacidad de la membrana del nervio para separar el gel salado en su interior (citoplasma) del fluido salado en el que están bañadas (fluido extracelular). Los tipos de sales en estos dos compartimentos de fluido son muy diferentes y el intercambio de iones y agua provocado por la lesión conduce a la incapacidad del nervio para producir y propagar impulsos nerviosos (y además a la muerte de la célula). La lesión es generalmente una afección estructural, física o mecánica y puede provocarse por un impacto físico, como es el caso de un aplastamiento, compresión o estiramiento de fibras nerviosas. Alternativamente, la membrana celular puede destruirse o degradarse por un desequilibrio químico o un mal funcionamiento fisiológico tal como anoxia (por ejemplo, accidente cerebrovascular), aneurisma o reperfusión. En cualquier caso, una "lesión" tal como se usa el término en el presente documento contempla más específicamente un defecto de membrana nerviosa, interrupción, fisura o rotura (en la bicapa fosfolípida) que puede tratarse y sellarse mediante la administración de un agente de fusión de biomembrana tal como se describe en el presente documento.

El término "agente de fusión de biomembrana" se usa en el presente documento para indicar todas y cualquier molécula que no sólo son compatibles con células nerviosas de vertebrados, y más específicamente de mamíferos, sino que también tienen una afinidad por membranas de células nerviosas de modo que se unen a células nerviosas lesionadas en el sitio de una lesión. Un agente de fusión de biomembrana sirve por tanto en parte como una especie de cemento biológico o material de relleno que crea puentes sobre roturas en estructuras neuronales. Este sellado es extremadamente rápido (minutos) y facilita la reparación de las estructuras neuronales dañadas mediante procesos fisiológicos naturales que se completan en momentos muy posteriores (1-7 horas). El sellado de membranas neuronales tal como se describe en el presente documento detiene de manera natural o inhibe la destrucción progresiva de tejido nervioso tras una lesión a la célula nerviosa. Los agentes de fusión de biomembrana de la presente invención son polialquilenglicoles seleccionados del grupo que consiste en polimetilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol, polipentilenglicol, polihexilenglicol, poliheptilenglicol, polioctilenglicol, polinonilenglicol y polidecilenglicol. Otros agentes de fusión de biomembrana comentados en el presente documento incluyen otros polímeros hidrófilos tales como copolímeros de bloque de polialquilenglicol tales

como copolímero de bloque de polietilenglicol/polipropilenglicol (por ejemplo, poloxámero 188) y óxido de etileno-óxido de propileno-óxido de etileno (EPAN), e incluyen además tensioactivos biocompatibles, particularmente tensioactivos no iónicos y más particularmente polímeros anfipáticos tales como poloxaminas. También puede considerarse que los poloxámeros son polímeros anfipáticos. Los poloxámeros son hidrófilos en la medida en que hay un gran número o un gran porcentaje en peso de grupos etilenglicol con respecto a grupos propilenglicol. Un agente de fusión de biomembrana tal como se usa ese término en el presente documento puede comprender una colección, mezcla, o combinación de agentes de fusión de biomembrana individuales cada uno de los cuales es eficaz por sí mismo para sellar roturas en membranas nerviosas.

El término “cantidad eficaz” cuando se usa en el presente documento con referencia a un agente de fusión de biomembrana indica una cantidad del agente que, cuando se administra a un paciente o sujeto, es suficiente para dar como resultado una mejora medible en la función eléctrica y/o conductual de un nervio que se ha dañado o lesionado tanto que el funcionamiento normal no es posible. Tal como se comenta a continuación, la eficacia del tratamiento puede determinarse de una variedad de maneras, incluyendo métodos que detectan la restauración de la función nerviosa. Con respecto al uso del término “cantidad eficaz” con otros agentes, por ejemplo, bloqueantes de los canales de potasio, el término se usa para describir una cantidad de un agente eficaz dentro del contexto del uso de ese agente en la presente invención.

El término “polímero hidrófilo” significa cualquier macromolécula (pesos moleculares de 200 Dalton y superiores) que muestra una afinidad o atracción por moléculas de agua y que comprende múltiples casos de una subunidad idéntica (“monómero”) conectados entre sí en estructuras en cadena y/o ramificadas.

Un “tensioactivo” es una molécula que muestra tanto afinidad o atracción por moléculas polares tales como agua como afinidad o atracción por moléculas no polares tales como lípidos, grasas, aceites y lubricantes. Un “tensioactivo no iónico” es eléctricamente neutro, es decir, no lleva carga positiva ni negativa. Sin embargo, un tensioactivo no iónico puede tener variaciones cuánticas localizadas en la carga que conducen, por ejemplo, a una subestructura polar lo que pone en evidencia una afinidad por otras estructuras moleculares polares tales como moléculas de agua. En el contexto de la presente descripción, los tensioactivos incluyen polímeros anfipáticos.

Un “polímero anfipático” tal como se usa ese término en el presente documento se refiere a polímeros que tienen variaciones cuánticas localizadas en la carga dan lugar a subestructuras polares y subestructuras y no polares. Las subestructuras polares ponen en evidencia una afinidad o atracción por otras estructuras moleculares polares tales como moléculas de agua (hidrófilas), mientras que las subestructuras no polares muestran una afinidad o atracción por moléculas no polares tales como lípidos, aceites, lubricantes, grasas, etc. (lipófilas).

Los poloxámeros, también denominados detergentes no iónicos, y/o polímeros tribloque, comprenden una(s) cadena(s) de polietilenglicol (bloque 1), después una cadena de polipropilenglicol (bloque 2), seguido por una(s) cadena(s) de polietilenglicol (bloque 3). Estos compuestos pueden sintetizarse en numerosas conformaciones y pesos moleculares. Los pesos de los diversos “bloques” pueden incluso variar entre sí (conduciendo a una nomenclatura complicada). Lo que tienen en común todos los poloxámeros es un grupo de cabeza hidrófobo (bloque 2), rodeado por cadenas hidrófilas (PEG). Se cree que la “cabeza” hidrófoba se inserta en el “orificio” en una membrana (en el que está expuesto el interior hidrófobo de la membrana bilaminar) mientras que los brazos de PEG hidrófilos se intercalan y enlazan con, o se unen a, la membrana cercana más normal.

El término “poloxamina” indica polímeros de bloque simétricos poliacoxilados de etilendiamina que se adaptan al tipo general $[(\text{PEG})_x-(\text{PPG})_y]_2-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}-[(\text{PPG})_y-(\text{PEG})_x]$.

La palabra “biocompatible” significa que una sustancia puede colocarse en contacto íntimo con estructuras biológicas, incluyendo células y membranas celulares, sin perjudicar el funcionamiento fisiológico continuado de las células y membranas que entran en contacto.

El término “polialquilenglicol” se refiere a una molécula que tiene la fórmula química $\text{H}(\text{O}[\text{CH}_2]_m)_n\text{OH}$ en la que m y n son números enteros distintos de cero. El número entero m tiene los siguientes valores para polialquilenglicoles a modo de ejemplo: polimetilenglicol (m=1), polietilenglicol (m=2), polipropilenglicol (m=3), polibutilenglicol (m=4), polipentilenglicol (m=5), polihexilenglicol (m=6), polihexilenglicol (m=6), polihexilenglicol (m=6), polioctilenglicol (m=8), polinonilenglicol (m=9) y polidecilenglicol (m=10).

Según la presente descripción, los polialquilenglicoles tienen un peso molecular de entre aproximadamente 200 y aproximadamente 25.000 Dalton, y preferiblemente entre aproximadamente 400 Dalton y aproximadamente 3500 Dalton.

La palabra “vehículo” se usa en el presente documento para indicar una matriz, medio o disolvente líquidos en los que se dispersan o distribuyen moléculas de un agente de fusión de biomembrana. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es uno que es biocompatible con tejidos de vertebrados y más particularmente de mamífero. Generalmente los portadores aceptables incluyen agua, soluciones salinas, entre muchos otros.

Por definición, un “bloqueante de los canales de potasio” o “bloqueante de los canales de K^+ ” es cualquier agente que se inserta específica y estéricamente en (o desactiva de otro modo) cualquiera de las diversas y cada vez más clases de canales de K^+ . Esto incluye tanto canales de activación rápida como lenta y tanto canales “dependientes como no dependientes de voltaje”. Casi todos los canales para K^+ son “dependientes” del voltaje a través de la membrana celular. Cuando esos canales se abren, K^+ tiende a moverse desde el citoplasma hacia el fluido extracelular porque está aproximadamente 100 veces más concentrado dentro que fuera de la célula. Este éxodo de K^+ (que entre otras cosas ayuda a extinguir el impulso nervioso, devolviendo el potencial de la membrana de vuelta al estado de reposo) puede por tanto “bloquearse”. En regiones de desmielinización o polarización del potencial de membrana, el bloqueo de canales de K^+ puede tanto aumentar la excitabilidad, como también extender la distancia a lo largo de una fibra nerviosa en la que puede desplazarse un impulso nervioso antes de extinguirse. En lesión de médula espinal, puede ser tan sólo unos pocos milímetros de daño de fibra nerviosa, con una membrana absolutamente normal al otro lado. Hay muchos bloqueantes de los canales de K^+ conocidos incluyendo bloqueantes reversibles (TEA) y algunas proteínas (sintetizadas a partir de venenos de serpiente) que bloquean de manera irreversible estos canales. Los bloqueantes de los canales de potasio incluyen piridinas sustituidas y, más particularmente, piridinas amino-sustituidas. La aplicación de bloqueantes de los canales de K^+ para reparar la médula espinal tal como se describe en el presente documento implica el bloqueante de los canales rápidos de potasio, de tipo I, 4-AP (4-aminopiridina) y su análogo 3,4-di-aminopiridina. Una dosificación demasiado alta, o el uso de otros bloqueantes (menos específicos y poco reversibles) puede conducir a convulsiones e incluso muerte.

El suministro de un agente de fusión de biomembrana a través de un sistema vascular de un paciente conlleva la administración de un agente de fusión de biomembrana a través de una ruta que incluye una o más venas y/o arterias del paciente. En vez de una aplicación directa en la que se inyecta el agente en el paciente en el sitio de tejido nervioso expuesto, el suministro mediado por el sistema vascular de un agente de fusión de biomembrana contempla una administración y posterior transporte del agente al sitio de un nervio lesionado a través del sistema vascular del paciente. La administración del agente de fusión de biomembrana es preferiblemente mediante inyección, por ejemplo, a través de una aguja hipodérmica o cateterización, o bien directamente en una vena o arteria o bien indirectamente mediante inyección subcutánea en tejido muscular o por vía intraperitoneal. Otros métodos también pueden ser eficaces, por ejemplo, mediante ingestión, suministro transmembrana (incluyendo suministro transdérmico), mediante supositorio, a través de inhaladores, por vía bucal o mediante implantación.

Descripción de las realizaciones preferidas

Con el propósito de fomentar la comprensión de los principios de la invención, ahora se hará referencia a realizaciones preferidas y se usará lenguaje específico para describir las mismas. No obstante se entenderá que no se pretende ninguna limitación del alcance de la invención por las mismas, contemplándose alteraciones y modificaciones adicionales de la invención, y aplicaciones adicionales de los principios de la invención tal como se ilustran en el presente documento, tal como se le ocurrirá normalmente a un experto en la técnica a la que se refiere la invención.

La presente invención proporciona métodos y composiciones para tratar tejido nervioso lesionado de un vertebrado. Los métodos y las composiciones se diseñan para restaurar al menos parcialmente la función nerviosa en el vertebrado. En un aspecto de la invención, se proporcionan métodos para tratar una médula espinal de vertebrado lesionada o dañada que incluyen poner en contacto la médula espinal con una cantidad eficaz de un agente de fusión de biomembrana. Las composiciones incluyen un agente de fusión de biomembrana, que es un polialquilenglicol seleccionado del grupo que consiste en polimetilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol, polipentilenglicol, polihexilenglicol, poliheptilenglicol, polioctilenglicol, polinonilenglicol y polidecilenglicol. Se prefiere polietilenglicol (fórmula química: $H(OCH_2CH_2)_nOH$). En realizaciones alternativas, el método puede incluir tratar el sistema nervioso con un bloqueante de los canales de potasio, preferiblemente una piridina sustituida, tal como una piridina amino-sustituida, antes, durante o después de poner en contacto la médula espinal con el agente de fusión de biomembrana. Otros aspectos de la invención proporcionan composiciones para tratar un sistema nervioso lesionado de un vertebrado. Las composiciones preferidas incluyen un agente de fusión de biomembrana y un bloqueante de los canales de potasio.

El agente de fusión de biomembrana es un polialquilenglicol. Puede usarse una amplia variedad de polialquilenglicoles, incluyendo aquellos, por ejemplo, en los que el grupo alquileo es metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decileno. Preferiblemente, el polialquilenglicol será soluble en agua y se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol y polipropilenglicol. Un polialquilenglicol más preferido es polietilenglicol. Aunque pueden usarse polialquilenglicoles de una amplia variedad de pesos moleculares (entre aproximadamente 200 Dalton y aproximadamente 25.000 Dalton) dependiendo de la capacidad del polialquilenglicol para pasar a través de diversas barreras biológicas tales como el tubo digestivo, se prefieren polialquilenglicoles de peso molecular de aproximadamente 400 a aproximadamente 3500 Dalton. Tales agentes de fusión de biomembrana pueden sintetizarse mediante métodos conocidos en la técnica o pueden adquirirse comercialmente.

El agente de fusión de biomembrana también puede ser un conjugado de polialquilenglicol/proteína tal como se conoce en la técnica, en el que la proteína ayuda preferiblemente en la eliminación de radicales libres. Por ejemplo,

el agente de fusión de biomembrana, tal como polietilenglicol u otro óxido de alquileno, puede conjugarse a catalasa para formar PEG-catalasa, o a superóxido dismutasa para formar PEG-SOD. Tales conjugados están comercialmente disponibles de Sigma. St. Louis, Mo. El agente de fusión de biomembrana, también puede conjugarse a un adhesivo quirúrgico biodegradable, tal como un adhesivo de fibrina comercial, para facilitar y

5 estabilizar la nueva unión o fusión de tejido nervioso cortado.

También se dan a conocer tensioactivos biocompatible, preferiblemente tensioactivos no iónicos y más preferiblemente polímeros anfipáticos tales como poloxámeros o poloxaminas.

10 El agente de fusión de biomembrana puede proporcionarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos incluyen, por ejemplo, agua, preferiblemente estéril e incluyendo agua destilada, y cualquier otro vehículo farmacéuticamente aceptable conocido en la técnica que no tendrá un efecto adverso sobre el tratamiento. Agua destilada estéril es un vehículo preferido en el trabajo hasta la fecha.

15 El agente de fusión de biomembrana se administra al paciente lo antes posible tras la lesión y antes de una disolución irreversible de membranas axonales y de la vaina de mielina. Aunque este periodo de tiempo puede variar dependiendo de la naturaleza y el grado de la lesión, normalmente el agente de fusión se administra inmediatamente tras producirse la lesión, y preferiblemente no más de aproximadamente 24 horas tras la lesión, pero normalmente se administra entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 8 horas tras la lesión. Aunque se prefiere el

20 tratamiento temprano, la administración del agente de fusión de biomembrana todavía puede ser beneficiosa durante hasta 2 semanas tras la lesión de nervio inicial (denominada "lesión primaria"). Esto es porque la lesión de nervio es un acontecimiento continuo, lento, progresivo, especialmente en médula espinal en la que se denomina "lesión secundaria" (Tator y Fehlings 1991, J. Neurosurgery 75:15-26).

25 El agente de fusión de biomembrana se administra a través del sistema vascular del sujeto o el paciente. El agente de fusión puede inyectarse directamente en el sistema vascular o indirectamente mediante inyección por vía intramuscular, por vía subcutánea o por vía intraperitoneal. Se ha descubierto que una administración indirecta de un agente de fusión de biomembrana tal como polietilenglicol a través del sistema vascular del paciente da inesperadamente como resultado una adherencia selectiva del agente de fusión (por ejemplo. PEG u otro agente) al

30 tejido nervioso lesionado. Hay poca o ninguna adherencia a tejido nervioso no dañado. Sin limitarse por la teoría, se cree que adhiriéndose al tejido nervioso dañado, el agente de fusión de biomembrana fomenta los procesos de cicatrización naturales de las células nerviosas dañadas.

Cuando el agente de fusión de biomembrana es un polialquilenglicol tal como PEG, la disolución de fusión comprende agente de fusión en una cantidad normalmente de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 50% en peso y preferiblemente se administra en dosis de aproximadamente 15 - 50 mg de PEG por peso corporal en kilogramos del paciente en las que el PEG tiene un peso de 1500 - 4000 Dalton. También se dan a conocer agentes de fusión de biomembrana que son polímeros anfipáticos tales como un poloxámero o una poloxamina y disoluciones de fusión que contienen normalmente tales agentes de fusión en una cantidad de aproximadamente el

40 15 a aproximadamente el 50% en peso y que se administran en dosificaciones de aproximadamente 15 - 150 mg de poloxámero o poloxamina por peso corporal en kilogramos del paciente.

También se da a conocer que el agente puede aplicarse directamente a tejido nervioso dañado que se ha expuesto, por ejemplo, a través de procedimientos quirúrgicos, y el agente puede aplicarse con cualquier dispositivo de

45 dispensación de líquido adecuado. Aunque el porcentaje en peso del agente de fusión en la composición de aplicación directa puede variar, la composición incluye normalmente agente de fusión en una cantidad de al menos aproximadamente el 40% en peso, de manera más preferible de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 50% en peso, y de la manera más preferible de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 55% en peso.

50 En el caso dado a conocer de una aplicación de contacto directo, se expone el sitio lesionado al agente de fusión durante un periodo de tiempo eficaz para tratar la lesión. Este tiempo puede variar dependiendo del tamaño de la lesión, el grado y la naturaleza de la lesión, el agente de fusión de biomembrana usado, y la concentración del agente de fusión de biomembrana. La lesión se expone normalmente al agente durante al menos aproximadamente un minuto y más preferiblemente al menos aproximadamente 2 minutos. En otra descripción, el agente de fusión

55 puede retirarse del tejido lesionado que está tratándose antes de la aparición de cambios perjudiciales en el tejido. En otra descripción, el tejido lesionado se expone al agente de fusión durante no más de aproximadamente 5 minutos. Tras tratarse la región lesionada del sistema nervioso con el agente de fusión, puede retirarse mediante aspiración y lavarse el sitio tratado con una disolución de biolavado, tal como solución de Krebs isotónica tal como se describe en los ejemplos. Entonces puede retirarse el exceso de agente de fusión y/o solución de Krebs mediante

60 aspiración.

En otra forma de la invención, el método puede incluir además administrar al paciente o sujeto una cantidad eficaz de un bloqueante de los canales de potasio. En el caso dado a conocer de una aplicación de contacto directo de un agente de fusión de biomembrana, el sitio lesionado se pone en contacto con una cantidad eficaz de un bloqueante de los canales de potasio además del agente de fusión de biomembrana. Puede usarse una variedad de

65 bloqueantes de los canales de potasio, incluyendo piridinas sustituidas. Los bloqueantes de los canales de potasio

preferidos incluyen aquellos que mejoran la conducción del potencial de acción en tejido lesionado, incluyendo 3,4-diaminopiridina, 4-metilaminopiridina y ampidina. En una forma preferida de la invención, la piridina está sustituida con un grupo amino, más preferiblemente en la posición 4 del anillo. Además, se ha descubierto inesperadamente que el tratamiento de una médula espinal de mamífero lesionada con un bloqueante de los canales de potasio, tal como 4-aminopiridina, tras el tratamiento con un agente de fusión, tal como polietilenglicol, puede dar como resultado una reparación sinérgica de la médula espinal. Por ejemplo, la conducción de potenciales de acción compuestos (CAP) aumenta cuando se usan ambos agentes en un porcentaje superior a la suma del porcentaje de aumento de conducción de CAP cuando se tratan médulas espinales lesionadas solo o bien con el agente de fusión o bien con el bloqueante de los canales de potasio.

Aunque el sistema nervioso lesionado puede ponerse en contacto con el bloqueante de los canales de potasio antes de, o al mismo tiempo que, tratar con el agente de fusión, el sistema se pone preferiblemente en contacto con el bloqueante después del tratamiento con el agente de fusión. El bloqueante de los canales de potasio puede aplicarse de una manera similar al agente de fusión. La cantidad del bloqueante de los canales de potasio eficaz en el tratamiento o la reparación del sistema nervioso lesionado, tal como médula espinal de mamífero lesionada, también dependerá de manera similar de los factores mencionados anteriormente. Cuando el bloqueante de los canales de potasio es 4-aminopiridina, se aplica normalmente a una concentración de aproximadamente 10-100 ng/ml de líquido cefalorraquídeo y de manera adicionalmente preferible de aproximadamente 50-100 ng/ml de líquido cefalorraquídeo. Tras el tratamiento con 4-aminopiridina, puede retirarse de manera similar mediante aspiración y lavarse el sitio de la lesión con el agente de biolavado.

Aún en otras formas de la invención, el método puede incluir tratar la lesión con un polialquilenglicol, así como con otros compuestos y/o composiciones de tratamiento convencionales. Por ejemplo, además del tratamiento con un polialquilenglicol, la lesión puede tratarse con un esteroide, tal como metilprednisolona.

Puede tratarse una amplia variedad de lesiones en la presente invención. En diversas formas de la invención, la lesión puede surgir de una compresión u otra contusión de la médula espinal, aplastamiento de la médula espinal o corte de la médula espinal, o anoxia (por ejemplo, accidente cerebrovascular), aneurisma o reperfusión.

La eficacia del tratamiento puede determinarse de una variedad de maneras, incluyendo métodos que detectan la restauración de la función nerviosa. La restauración o el aumento en la conducción de potenciales de acción, tales como CAP, a través del sitio lesionado se usan como indicador de que la función nerviosa se ha restaurado al menos parcialmente tal como se describe en los ejemplos. Se considera que la función nerviosa se ha restaurado al menos parcialmente si hay un aumento en la conducción de potenciales de acción tras el tratamiento. Preferiblemente, el tratamiento se realizará de manera suficiente para lograr un aumento de al menos aproximadamente el 10% en la conducción de CAP. Además, también puede observarse la restauración de la continuidad anatómica mediante exploración con microscopía óptica de alta resolución y/o mediante difusión de colorantes fluorescentes intracelulares a través del tejido nervioso reparado, tal como axones reparados, o mediante observación directa de membranas axonales reparadas. Adicionalmente, en aplicaciones en seres humanos, la eficacia de tratamientos preferidos puede observarse mediante la restauración de más de un nivel de raíz espinal según se determina mediante la puntuación motriz de la American Spinal Injury Association (ASIA, asociación americana de lesión espinal) y/o la puntuación de la National Animal Spinal Cord Injury Study (NASCIS, estudio nacional de lesión de médula espinal en animales) tal como se conoce en la técnica y se describe en Wagih *et al.*, (1996) Spine 21:614-619. Además, en aplicaciones veterinarias, también puede usarse un análisis conductual del reflejo del músculo cutáneo del tronco (CTM), tal como se comenta más completamente en los ejemplos, para determinar la eficacia del tratamiento, y si se ha restaurado al menos parcialmente la función nerviosa. Usando este análisis, se considera que la función nerviosa se ha restaurado al menos parcialmente si hay un aumento del comportamiento reflejo tras el tratamiento, pero se prefiere de manera deseable que los tratamientos logren un aumento de al menos aproximadamente un 10% en el área de recuperación conductual de CTM.

Aún en otros aspectos de la invención, se proporcionan composiciones para su uso en el tratamiento de una lesión en tejido nervioso de la médula espinal o sistema nervioso central de un vertebrado. Las composiciones se diseñan para restaurar al menos parcialmente la función nerviosa tal como se describe a continuación. En una forma, una composición incluye un agente de fusión de biomembrana y un bloqueante de los canales de potasio tal como se ha definido anteriormente. El agente de fusión de biomembrana es un polialquilenglicol y un bloqueante de los canales de potasio preferido es una piridina sustituida. En formas más preferidas de la invención, el polialquilenglicol es polietilenglicol y el bloqueante de los canales de potasio es una piridina amino-sustituida, tal como 4-aminopiridina. La composición puede estar en un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como se describió anteriormente.

Aunque los métodos y las composiciones de la invención son útiles en el tratamiento de una amplia variedad de vertebrados, pueden usarse ventajosamente para tratar mamíferos y preferiblemente seres humanos. Además, aunque los métodos y las composiciones son ventajosos y sorprendentemente útiles en el tratamiento de la médula espinal, también pueden usarse en el tratamiento del sistema nervioso central, u otras áreas en las que están presentes axones dañados.

Ahora se hará referencia a ejemplos específicos para ilustrar las composiciones y los métodos descritos

anteriormente. Debe entenderse que los ejemplos se proporcionan para ilustrar realizaciones preferidas y que no se pretende por ello ninguna limitación del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Bloqueo de los canales de potasio como complemento a la recuperación de conducción mediada por PEG

Este ejemplo muestra que el tratamiento de médulas espinales lesionadas *in vitro* tanto con un bloqueante de los canales de potasio como con un agente de fusión de biomembrana permite la recuperación sinérgica de potenciales de acción compuestos (CAP).

Una característica común de las células lesionadas es perder el potasio intracelular hacia el medio extracelular a través de la membrana comprometida. En los axones, esto puede ser suficiente para suprimir la conducción del potencial de acción. Por tanto, se intentó determinar si el bloqueo de los canales rápidos de potasio con 4-AP afectaría a las propiedades de conducción inmediatamente tras la reparación con PEG.

Se aplastaron y aislaron médulas espinales y se trataron con PEG tal como se describe en el ejemplo 1. También se realizó un análisis en la cámara de registro de sacarosa doble.

Aislamiento *in vitro* de la médula espinal

Para estos estudios se usaron cobayas hembras adultas de 350-500 gramos de peso corporal. Se aisló la médula espinal de animales profundamente anestesiados [(clorhidrato de ketamina 60 mg/kg, maleato de acepromazina 0,6 mg/kg y xilazina 10 mg/kg, vía intramuscular (i.m.)). Tras la anestesia, se sometieron los animales a perfusión de manera transcardiaca con solución de Krebs fría (1 50°C) (NaCl, 124 mM; KCl, 2 mM; KH₂PO₄, 1,2 mM; MgSO₄, 1,3 mM; CaCl₂, 11,2 mM; dextrosa, 10 mM; NaHCO₃, 26 mM; ascorbato de sodio, 10 mM; equilibrada con el 95% de O₂ y el 5% de CO₂). Se retiró rápidamente la columna vertebral usando fórceps y tijeras para huesos mediante técnicas descritas anteriormente [Shi, R. y Blight, A.R. (1996) J. of Neurophysiology, 76(3): 1572-1579; Shi, R. y Blight, A.R. (1997) Neuroscience 77(2):553562]. Se dividió la médula espinal en cuatro bandas longitudinales, primero mediante división sagital en la línea media, luego separando las mitades dorsal y ventral con una hoja de escalpelo contra un bloque de plástico. Para este estudio sólo se usó la sustancia blanca ventral. Estas bandas de 35-38 mm de longitud de sustancia blanca de médula espinal se denominarán habitualmente a continuación "médulas" o "médulas espinales" para facilitar la descripción. Las médulas espinales se mantuvieron en solución de Krebs oxigenada de manera continua durante una hora antes de montarlas dentro de la cámara de registro. Esto se realizó para garantizar su recuperación de la disección antes de comenzar los experimentos.

Técnica de registro de espacio de sacarosa doble

La cámara de registro de espacio de sacarosa doble se muestra en las figuras 1A y 1B y ya se ha descrito en publicaciones anteriores [Shi, R. y Blight, A.R. (1996) J. of Neurofisiology, 76(3):1572-1579; Shi, R. y Blight, A.R. (1997) Neuroscience 77(2):553-562]. En resumen, la banda de sustancia blanca de médula espinal aislada se soportó en una cámara de tres compartimentos. El compartimento central se sometió a superfusión continua con solución de Krebs oxigenada (aproximadamente 2 ml/min.) con una bomba peristáltica. Los compartimentos en ambos extremos se llenaron con cloruro de potasio isotónico (1120 mM), y los canales de espacio con sacarosa 230 mM. La banda de sustancia blanca se selló a cada lado de los canales de espacio de sacarosa con fragmentos conformados de cubreobjetos de vidrio que también bloquearon el flujo de fluido en el estrecho espacio entre el cubreobjetos y la superficie tisular. Obsérvese que la cámara central es un potencial de toma de tierra para el registro. La disolución de sacarosa se hizo pasar continuamente a través del espacio a una velocidad de 1 ml/min. Se estimularon los axones dentro de la banda de médula espinal y se registraron los potenciales de acción compuestos (CAP) en el extremo opuesto de la banda de sustancia blanca mediante electrodos de plata - cloruro de plata colocados dentro de las cámaras laterales y el baño central tal como se muestra en la figura 1B. Específicamente, se estimularon los potenciales de acción en el lado izquierdo de la banda de médula espinal tal como se muestra en la figura, se condujeron a través de la médula espinal en el compartimento central (incluyendo también el sitio de la lesión), y se registraron en el lado derecho de la banda de médula espinal tal como se muestra. Se suministraron los estímulos a través de unidades de aislamiento de estímulo en la forma de puntos unipolares de corriente constante de 0,1 ms. Se usó un amplificador en puente convencional con compensación de capacidad (Neurodata Instruments) para amplificar la señal. Estos datos se digitalizaron y se almacenaron en una cinta de vídeo con un dispositivo Neurorecorder de Neurodata Instruments para el análisis posterior. Durante el experimento, la solución de Krebs oxigenada perfundió de manera continua el tramo de médula espinal aislado, mientras que se mantuvo la temperatura a 37°C.

Se digitalizó cada prueba electrofisiológica en tiempo real y se capturó en el ordenador para una evaluación cuantitativa posterior. También se registraron todos los registros en una cinta magnética VHS como medio de documentación de seguridad. Todas las disoluciones usadas en el procedimiento de reparación de PEG se realizaron en el día de su utilización.

La lesión por compresión

Se produjo una lesión por compresión normalizada con una varilla controlada por motor de velocidad gradual que comprimió la médula espinal mientras se suspendía dentro de la cámara de registro (figura 1 B). En resumen, se comprimió la banda de sustancia blanca aislada contra una plataforma de Plexiglass, plástica, elevada, plana en el centro de la cámara de registro con la punta aplanada de una varilla de Plexiglass. Se hizo avanzar la punta hacia abajo hasta entrar en contacto con el tejido a una velocidad normalizada de aproximadamente 25 pm/s. El movimiento descendente de la varilla se controló con un motor de velocidad gradual para producir un aplastamiento graduado de manera fina sólo suficiente para eliminar toda la propagación de CAP (que se monitorizó de manera continua durante el procedimiento). El extremo de la varilla con la punta aplanada proporcionó una superficie de compresión de 2,5 mm a lo largo de la longitud del tejido, y una anchura transversal de 7 mm, de manera que siempre fue más ancha que la banda de médula espinal, incluso bajo compresión completa. La colocación de la varilla de compresión se llevó a cabo con un micromanipulador. Se registraron simultáneamente los CAP durante el proceso de la lesión. Se detuvo la compresión cuando se eliminaron completamente los CAP. Se mantuvo el estado de fallo completo de CAP durante 15 segundos adicionales antes de retirar rápidamente la varilla de la superficie de la médula para aliviar la presión. Entonces se documentó la recuperación del CAP. El perfil de recuperación básico tras una compresión normalizada de este tipo en solución de Krebs normal se ha caracterizado y publicado anteriormente [Shi, R. y Blight, A.R. (1996) J. of Neurophysiology, 76(3): 1572-1579].

Procedimiento de reparación con PEG

El procedimiento de reparación con PEG incluyó las siguientes etapas:

1) El funcionamiento fisiológico típico de la banda de sustancia blanca aislada retirada en la cámara de registro requirió aproximadamente de media a 1 hora de tiempo de incubación mientras estaba sumergida en una solución de Krebs oxigenada para estabilizarse. En los experimentos iniciales, una vez que se había estabilizado la propagación del CAP, se sustituyó la solución de Krebs por una de Krebs libre de Ca^{2+} (Ca^{2+} sustituido por una cantidad equimolar de Mg^{2+}).

2) A continuación se aplastó la banda de médula espinal mediante las técnicas descritas anteriormente, mientras que se continuó con la estimulación y registro simultáneos.

3) Se aplicó una disolución de PEG en agua destilada (50% en peso) mediante inyección a presión a través de una micropipeta. Se añadió un colorante vital a la disolución de PEG para monitorizar su aplicación continua al sitio de lesión en una corriente de aproximadamente 0,5 mm de ancho durante aproximadamente 1-2 minutos. Se aplicó el PEG a un lado de la lesión, se lavó y se retiró inmediatamente mediante la aspiración constante en el otro lado usando una segunda pipeta.

4) Inmediatamente después de la aplicación de PEG, se sustituyó el medio de baño en la cámara central por una corriente continua de solución de Krebs normal oxigenada. Se monitorizaron de manera continua las propiedades fisiológicas de la médula espinal tratada con PEG durante 1 hora. Habitualmente, fue evidente un CAP de recuperación débil en el plazo de 6-15 minutos tras la aplicación de PEG.

Se llevaron a cabo pruebas de la respuesta de los axones "en recuperación" a la aplicación adicional del bloqueante de los canales rápidos de potasio, 4 aminopiridina (4-AP). En este ensayo, se trataron 5 médulas separadas con una aplicación de PEG tal como se describió anteriormente y se compararon con 5 médulas control. Una hora después de la compresión, se aplicó 4-AP 100 pM (en solución de Krebs) durante 15 minutos y a continuación se eliminó mediante lavado con solución de Krebs normal tal como se describió anteriormente.

La figura 2A muestra la mejora del CAP en una médula espinal aplastada (pero no tratada con PEG) mediante 4-AP. En este registro individual, se muestra el CAP recuperado inicial 1 hora tras la lesión, y el CAP mejorado tras el tratamiento con 4-AP 100 pM se superpone al mismo. Siguiendo la documentación del CAP mejorado con 4-AP, se eliminó el bloqueante mediante lavado, y se sustituyó el medio en el compartimento central por solución de Krebs normal. El CAP disminuyó hasta niveles previos al tratamiento en 15 minutos y no pudo distinguirse del registro original. Esta forma de onda final se superpone en los otros dos CAP en la figura 2A aunque no puede discriminarse del registro eléctrico previo al tratamiento. En esta única prueba, 4AP mejoró de manera reversible el CAP recuperado en aproximadamente un 40%.

La figura 2B muestra una prueba idéntica realizada en una médula espinal tratada con PEG, en la que se administró 4-AP 1 hora después de la aplicación de PEG. En esta prueba individual, el segundo CAP se mejoró de manera reversible en aproximadamente un 70%.

Tras casi duplicar el CAP, el 4-AP se eliminó por lavado tal como se describió anteriormente, y el CAP disminuyó hasta niveles previos al tratamiento como en el caso de los controles (figura 2A).

La figura 2C muestra los datos de grupo, incluyendo 5 médulas espinales en cada grupo. La mejora en porcentaje

de la recuperación mediada por PEG para los datos de grupo refleja lo comentado anteriormente para los experimentos individuales (mejora de aproximadamente un 70% en el grupo experimental; de aproximadamente un 40% en el grupo control). Esta mejora experimental fue superior de manera estadísticamente significativa a lo observado en los controles. ($p < 0,05$, prueba de la t de Student para datos independientes).

Aunque sin limitarse a la teoría, la figura 3 muestra un mecanismo propuesto del efecto sinérgico de PEG y 4-AP. En la parte superior se representa esquemáticamente una compresión mecánica grave de un axón mielinizado. Obsérvese que la vaina de mielina envuelve altas densidades de canales W rápidos agrupados en la zona paranodal. Un aplastamiento grave lleva a una exposición de los canales de potasio de la zona paranodal por una retirada o colapso de las láminas de mielina en este sitio [Shi, R. y Blight, A.R. (1996): Neuroscience, 77:553-562]. La exposición de los canales de potasio dependientes del voltaje tras la lesión elevará la conductancia de K^+ impidiendo adicionalmente la conducción a través de esta parte dañada de la membrana (la zona gris muestra "orificios" en la membrana comprometida). En preparaciones control, de esta alteración localizada del axolema resulta un bloqueo de la conducción de parcial a completo, que puede evolucionar a una separación completa del axón y una pérdida del segmento axónico distal por degeneración Walleriana (lado izquierdo de la figura 3). En axones tratados con PEG (lado derecho de la figura 3), la reparación de la membrana lleva a una conservación de los axones lesionados así como a mejoras en sus capacidades de conducción (zonas grises; los orificios de la membrana están ahora sellados). Sin embargo, la alta conductancia de K^+ a través de los canales de K^+ que aún están expuestos en el sitio de reparación en las fibras nerviosas tratadas con PEG aún puede suprimir la conducción en cierta medida. Se espera que un bloqueo de estos canales con 4 AP (figura 3, cabezas de flecha pequeñas; inferior derecha) reduzca cualquier conductancia de K^+ hacia fuera y por tanto mejore la conducción.

Sumario de los resultados

En el plazo de algunos minutos desde la aplicación del polímero PEG soluble en agua, se produjo una recuperación inmediata de la propagación del CAP a través de la lesión. La amplitud del CAP recuperado aumentó lentamente con el tiempo hasta un pico de aproximadamente un 20% de la amplitud de CAP inicial. Además, este nivel de recuperación a) siempre fue superior de manera estadísticamente significativa a las amplitudes control, b) se observó en cada punto de tiempo sometido a prueba, y c) se produjo en un 100% de las médulas espinales tratadas de manera experimental. Es evidente que una aplicación tópica de PEG puede reparar inmediatamente una lesión grave por compresión en la médula espinal de un mamífero llevando a aumentos significativos en la recuperación funcional tal como se define por la capacidad mejorada para propagar impulsos nerviosos a través de la lesión. Este informe es el primero en demostrar la reparación mediada por PEG de tejido nervioso aplastado de mamífero.

Se ha mostrado que un medio equilibrado fisiológico y la disolución de PEG mencionada anteriormente es todo lo que se requiere para producir una reparación funcionalmente significativa en médulas espinales de mamíferos (véase a continuación). Además, en otros experimentos, en los que se fusionaron médulas espinales de cobaya completamente seccionadas con PEG, se ha demostrado que no había ningún peso molecular de PEG específico crítico para el procedimiento, habiendo sometido a prueba disoluciones de PEG usando 400, 1400, 1500, 2000 y 3700 Dalton (observaciones no publicadas).

En este estudio fisiológico, se han determinado similitudes y diferencias entre los mecanismos naturales de la reparación axónica y los mediados por PEG. En primer lugar, un análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados de amplitudes de CAP anteriores y posteriores a la lesión sugiere que la reparación mediada por PEG puede ocurrir por todos los niveles de umbrales de estímulo, que reflejan diámetros de axón, como en el caso del proceso de recuperación natural en bandas de médula espinal no tratadas. Dicho de otro modo, todos los axones espinales independientemente de su calibre son igualmente susceptibles de reparación mediada por PEG [véase Shi, R y Blight, A.R. (1996) Neuroscience 77: 553-562 para un análisis similar de recuperación axónica de lesión por compresión]. Las diferencias entre la reparación natural y la producida por la aplicación de PEG son más asombrosas. En primer lugar, esta lesión es muy grave; un 30% de las médulas espinales control nunca recuperaron ninguna capacidad para conducir CAP durante el periodo de evaluación de 1 hora tras la lesión. Por otro lado, no hubo ningún caso en el que PEG no iniciara una recuperación fisiológica medible. A un nivel más sutil, parece haber una amplitud de CAP ligeramente reducida durante el periodo refractario relativo en CAP mediados sólo por PEG en relación con las médulas control. Una explicación para esta observación puede ser que en las médulas control una población de axones gravemente comprometidos y disfuncionales puede pasar a ser completamente no funcional, mostrando propiedades de conducción más normales en la población que sobrevive a la lesión. El PEG puede rescatar una parte de estos axones gravemente comprometidos, reclutándolos en el CAP, y quizás explicando sus propiedades de conducción ligeramente diferentes.

La evaluación *in vitro* descrita anteriormente de la anatomía de reparación axónica tras la compresión mecánica ha mostrado que una aplicación de 2 minutos de PEG produjo un sellado de las lesiones de membrana en el sitio de una compresión normalizada. El sellado se indicó por la exclusión de la captación de peroxidasa del rábano por fibras lesionadas en el grupo tratado con PEG en comparación con médulas espinales tratadas de manera simulada (J. Neurocytology, 2001, en prensa). Tal reparación inmediata de ruptura de membrana suficiente para inhibir la captación de colorantes de gran peso molecular también debe detener o reducir la permeabilización, permitiendo el flujo no específico de iones a través de la misma. Aunque sin limitarse a la teoría, se cree que este comportamiento

de “sellado” del PEG tanto restablece la excitabilidad como invierte la disolución anatómica de la fibra nerviosa. Este procedimiento puede aplicarse ventajosamente para tratar traumatismo neurológico agudo, grave. Además de mejoras inmediatas en la conducción, la reparación de axones aplastados en los nervios periféricos que lleva a un rescate de sus segmentos distales proporcionaría el beneficio añadido de reducir la atrofia o degeneración de células diana o los denominados “órganos finales”. Además, la fusión medida por PEG de axones incluso seccionados podría pasar a ser un componente de las técnicas de injerto microquirúrgico puesto que la resección convencional de los troncos nerviosos periféricos antes del injerto fascicular expone las puntas cortadas de los segmentos axónicos proximales y distales, haciendo que estén disponibles para la fusión.

Ejemplo 2

Recuperación rápida de lesión de médula espinal tras polietilenglicol administrado por vía subcutánea

Este ejemplo demuestra que un agente de fusión de biomembrana, específicamente el polímero hidrófilo PEG, puede introducirse de manera segura en el torrente sanguíneo por diversas vías de administración, y que el PEG administrado se dirige específicamente a una contusión hemorrágica de una médula espinal de cobaya adulta. Una única inyección subcutánea (30% en peso por peso en solución salina estéril) realizada 6 horas tras la lesión espinal fue suficiente para producir una recuperación rápida de propagación del CAP a través de la lesión, acompañado por un nivel significativo de recuperación conductual en animales tratados con PEG solamente.

Los resultados de estas pruebas muestran (1) que PEG se dirige específicamente a la contusión de la médula espinal independientemente de si se aplica directamente a la lesión espinal expuesta, o por inyección intravenosa o subcutánea, y (2) que una única inyección subcutánea de PEG aproximadamente 6 horas tras una SCI grave es suficiente para inducir una inversión rápida de las pérdidas funcionales en casi todas las cobayas adultas tratadas con PEG en comparación con la persistencia de estas deficiencias en casi todos los animales tratados de manera simulada. El suministro intravascular de PEG con el fin de tratar y reparar tejido nervioso lesionado también se ha investigado en un entorno clínico usando casos producidos de manera natural de paraplejía en perros, como se comentará a continuación en el presente documento.

Dibujo figura 4: Modelo conductual y evaluación fisiológica

Este dibujo muestra el circuito neuronal del reflejo del músculo cutáneo del tronco (CTM), y su interrupción por una lesión espinal. Los receptores sensoriales nociceptivos en la piel proyectan sus axones al interior de la médula espinal en cada segmento vertebral de manera bilateral a través de los nervios cutáneos dorsales. Éstos forman una sinapsis dentro de la médula espinal y proyectan nervios sensoriales ascendentes de 2º orden en el cordón ventral de la sustancia blanca a la zona cervical en la que forman una sinapsis en constelaciones organizadas de manera bilateral de neuronas motoras del CTM. Las neuronas motoras del CTM proyectan sus axones fuera de la médula en los lados derecho e izquierdo a través del plexo braquial, en el que inervan el músculo cutáneo de la piel a través de la rama torácica lateral del plexo. Cuando la médula espinal está intacta, la estimulación táctil de la piel del lomo dentro del campo receptivo del CTM provoca una contracción sucesiva de la piel. La estimulación fuera de los campos receptivos de la piel del lomo no da como resultado contracciones de la piel. Una lesión de la médula espinal (dibujada sólo en el lado izquierdo de la médula con fines descriptivos) interrumpe la rama ascendente de este circuito produciendo una zona de arreflexia en la piel ipsilateral a la lesión y en el mismo lado. La exploración con sondas táctil dentro de esta zona no produce contracciones del CTM, habitualmente durante la vida del animal. La estimulación de la piel del lomo por encima del nivel de esta lesión unilateral, o en el lado derecho produce contracciones del CTM, puesto que estos campos receptivos permanecen inalterados por la lesión unilateral del lado izquierdo de la médula espinal.

Métodos

Cirugía y lesión de médula espinal en animales

Se anestesiaron cobayas adultas (< 300 g) con una inyección intramuscular de ketamina HCl 100 mg/kg y xilazina 20 mg/kg y se expuso la médula espinal mediante laminectomía dorsal. Se aplastó la médula torácica media con fórceps romos especiales que tenían un fiador. Esta lesión por desplazamiento constante, normalizada [Moriarty, L.J., Duerstock, B.S., Bajaj, C.L., Lin, K., y Borgens, R.B. (1998) Two and three dimensional computer graphic evaluation of the subacute spinal cord injury, J. Neurologic. Sci., 155, 121-137] ha producido una lesión anatómica más consistente de la médula y una pérdida conductual más consistente entre animales que las lesiones por impacto constante (tal como las producidas por las diversas técnicas de caída de peso). Se sacrificaron los animales con anestesia profunda seguida de perfusión/fijación. Se determinó la ubicación de un PEG marcado con FITC (F1-PEG) en la médula espinal sacrificando a los animales para su procesamiento histológico aproximadamente 24 horas tras la aplicación o inyección de F1-PEG. Se diseccionaron las médulas espinales de los animales, y se seccionaron los segmentos de médula espinal que contenían los sitios de lesión y un segmento intacto, más rostral, con un micrótopo de congelación y se evaluaron con un microscopio fluorescente. Las secciones transversales histológicas tenían un espesor de 5 µm y se observaron en un microscopio fluorescente Olympus Van Ox usando longitudes de onda de excitación de 495 y 545 nm y filtros de barrera de 475 y 590 nm, respectivamente. Se

captaron imágenes digitales en el ordenador con una cámara Optronics DEI 750.

Para someter a prueba los efectos de las inyecciones subcutáneas de PEG, se anestesiaron cobayas adultas y se expusieron sus médulas espinales torácicas medias quirúrgicamente y a continuación se aplastaron mediante una técnica normalizada. [Blight, A.R. (1991): Morphometric analysis of a model of spinal cord injury in guinea pigs, with behavioral evidence of delayed secondary pathology, J. Neurolog. Sci., 103: 156-171]. Se dividieron veinte animales en grupos iguales de 10. Un grupo recibió una única inyección subcutánea de PEG (1400 PM) bajo la piel del cuello (0,5 cc; 30% en solución de Ringer lactato estéril; SLR). El grupo control tratado de manera simulada recibió una única inyección del vehículo, Ringer lactato. Sólo esta inyección subcutánea por cada animal se realizó aproximadamente 6 horas tras la lesión de médula espinal. Se llevaron a cabo pruebas de CTM y registros de SSEP en los 20 animales antes de la lesión de médula espinal, 1 día, 1 semana, 2 semanas, y 4 semanas tras la lesión.

Seguimiento de la distribución de PEG en médula espinal lesionada

Se usó el PEG marcado con FITC (aproximadamente 1400 Dalton; preparado por Molecular Probes, Chatsworth, Ca) para seguir la distribución de PEG tras diferentes vías de administración. Se aplicó F1-PEG, al 50% en peso por peso en SLR directamente al sitio de la lesión de médula espinal expuesta (con la duramadre retirada) usando una pipeta Pasteur en dos animales. Como en experimentos anteriores [Borgens, R. y Shi, R. (2000) Immediate recovery from spinal cord injury through molecular repair of nerve membranes with polyethylene glycol, FASEB 14, 27-35], se eliminó PEG mediante aspiración y se irrigó la zona con SLR dos minutos después. Se realizó una inyección subcutánea de 1 cc de F1-PEG (30% p/p en SLR) bajo la piel del cuello en dos cobayas con lesión espinal usando una aguja de calibre 22. Para la inyección intravenosa, se expuso quirúrgicamente la vena yugular y se inyectó 1 cc de FL-PEG usando una aguja de calibre 26. También se administró PEG, al 30% en Ringer lactato mediante inyección intraperitoneal en un caso.

Estudios de conducción *in vivo*

Las deficiencias funcionales producidas por SCI se provocan en gran parte por la pérdida de conducción de impulsos nerviosos por tramos dañados de manera mecánica de fibras nerviosas en la sustancia blanca de la médula espinal [Blight, A.R. (1993) Remyelination, Revascularization, and Recovery of Function in Experimental Spinal Cord Injury, Advances in Neurobiology: Neural Injury and Regeneration (Seil, F.J. Ed.), vol. 59, págs. 91-103, Raven Press, Nueva York]. Por consiguiente, se evaluó la pérdida y recuperación de la conducción del potencial de acción compuesto (CAP) a través de la lesión de médula espinal mediante técnicas de potenciales evocados (pruebas de potenciales evocados somatosensoriales o SSEP). La estimulación del nervio tibial de las patas traseras produjo descargas ascendentes de impulsos nerviosos registrados en la corteza sensorial contralateral del cerebro. Éstos se eliminaron entre el sitio de estimulación y registro por la lesión espinal, abolición inmediata del registro de estos picos (registros tras el aplastamiento). Cada registro eléctrico estaba constituido por un tren de estímulos de 200 estimulaciones (onda cuadrada < 2mA, duración de 200 μ s a 3 Hz). Se realizaron tres conjuntos de estos registros en cada periodo de medición y se calculó el promedio para producir la forma de onda única presentada en los datos siguientes. El aspecto de los registros originales antes de antes del cálculo del promedio por ordenador puede hallarse en informes anteriores [Borgens, R. y Shi, R. (2000) Immediate recovery from spinal cord injury through molecular repair of nerve membranes with polyethylene glycol, FASEB 14, 27-35]. La conducción de impulsos nerviosos a través de un circuito de nervio mediano tras la estimulación del nervio mediano de la pata anterior (no afectado por la lesión de la médula espinal a nivel torácico medio) fue un procedimiento control durante el registro de SSEP. Este régimen de estimulación control se llevó a cabo en cualquier circunstancia en la que se produjo un fallo en el registro de los potenciales evocados en la corteza en respuesta a una estimulación del nervio tibial de las patas traseras, para eliminar la posibilidad de que estos fallos fueran "falsos negativos". Se realizó el registro y el cálculo del promedio de SSEP con un estimulador/registrador Nihon Kohden Neuropak 4 y un ordenador PowerMac G3. Se consiguió el cálculo del área por debajo del pico de SSEP (P1) incidente temprano trazando una línea de referencia por debajo de la base del pico, y determinando el área unitaria contenida dentro de la misma como píxeles usando el software IP Lab Spectrum.

Estudios conductuales

Como índice de recuperación conductual, se realizan evaluaciones de contracción dependiente de la médula espinal de la piel del lomo en animales, el reflejo del músculo cutáneo del tronco (CTM) [Blight, A.R., McGinnis, M.E., y Borgens, R.B. (1990): Cutaneus trunci muscle reflex of the guinea pig, J. Comp. Neurol., 296, 614-633; Borgens, R.B. (1992): Applied Voltages in Spinal Cord Reconstruction: History, Strategies, and Behavioral Models, in Spinal Cord Dysfunction, volumen III: Functional Stimulation, (Illis, L.S. ed.), capítulo 5, págs. 110-145, Oxford Medical Publications, Oxford]. La pérdida conductual del CTM tras la lesión en la médula espinal se observa como una zona de la piel del lomo que ya no responde, por contracción muscular a estimulación táctil local [Blight, A.R., McGinnis, M.E., y Borgens, R.B. (1990): Cutaneus trunci muscle reflex of the guinea pig, J. Comp. Neurol., 296, 614-633; Borgens, R.B. (1992): Applied Voltages in Spinal Cord Reconstruction: History, Strategies, and Behavioral Models, in Spinal Cord Dysfunction, Volumen III. Functional Stimulation, (Illis, L.S. ed.), capítulo 5, págs. 110-145, Oxford Medical Publications, Oxford; Borgens, R.B., Blight, A.R., y McGinnis, M.E. (1990): Functional recovery after spinal cord hemisection in guinea pigs: The effects of applied electric fields, J. Comp. Neurol., 296, 634-653; Borgens, R.B.,

Blight A.R., y McGinnis M.E. (1987): Behavioral recovery induced by applied electric fields after spinal cord hemisection in guinea pig, *Science*, 238, 366-369]. Esta arreflexia no se recupera durante la vida del animal si se corta el tramo de CTM ascendente relevante (e identificado) dentro del cordón ventral puesto que se ha identificado el circuito neuronal completo subyacente a este comportamiento [Blight, A.R., McGinnis, M.E., y Borgens, R.B. (1990): Cutaneus trunci muscle reflex of the guinea pig, *J. Comp. Neurol.*, 296, 614-633]. Tras una lesión por aplastamiento bilateral grave de la médula espinal torácica media (tal como se usa en este caso), se produce una región bilateral de arreflexia de piel del lomo que todavía muestra una capacidad muy limitada para recuperarse espontáneamente [Borgens, R. y Shi, R. (2000): Immediate recovery from spinal cord injury through molecular repair of nerve membranes with polyethylene glycol, *FASEB*, 14, 27-35; Borgens, R.B. (1992): Applied Voltages in Spinal Cord Reconstruction: History, Strategies, and Behavioral Models, in *Spinal Cord Dysfunction*, Volumen III: Functional Estimulation. (Illis, L.S. ed.), capítulo 5, págs. 110-145, Oxford Medical Publications, Oxford]. Se produce una región de recuperación de piel del lomo variable en respuesta a la lesión por aplastamiento en una proporción relativamente pequeña de animales con lesión espinal (se estima una tasa de recuperación global < 15% en los animales no tratados basándose en más de una década de experiencia usando este reflejo como índice de integridad de sustancia blanca). Además, no hay proliferación compensatoria de inervación cutánea en campos receptivos no funcionales que pudieran imitar la recuperación mediada centralmente de la función del CTM, ya que estas regiones de la piel no están denervadas [Blight, A.R., McGinnis, M.E., y Borgens, R.B. (1990): Cutaneus trunci muscle reflex of the guinea pig, *J. Comp. Neurol.*, 296, 614-633; Borgens, R.B., Blight, A.R., y McGinnis, M.E. (1990): Functional recovery after spinal cord hemisection in guinea pigs: The effects of applied electric fields, *J. Comp. Neurol.*, 296, 634-653]. Detalles completos del circuito identificado anatómicamente, su fisiología, pérdida conductual y monitorización, y otras pruebas del CTM como modelo de lesión de médula espinal pueden encontrarse en informes previos [Blight, A.R., McGinnis, M.E., y Borgens, R.B. (1990): Cutaneus trunci muscle reflex of the guinea pig, *J. Comp. Neurol.*, 296, 614-633; Borgens, R.B. (1992): Applied Voltages in Spinal Cord Reconstruction: History, Strategies, and Behavioral Models, in *Spinal Cord Dysfunction*, Volumen III: Functional Stimulation, (Illis, L.S. ed.), capítulo 5, págs. 110-145, Oxford Medical Publications, Oxford; Borgens, R.B., Blight, A.R., y McGinnis, M.E. (1990): Functional recovery after spinal cord hemisection in guinea pigs: The effects of applied electric fields, *J. Comp. Neurol.*, 296, 634-653; Borgens, R.B., Blight, A.R., y McGinnis, M.E. (1987): Behavioral recovery induced by applied electric fields after spinal cord hemisection in guinea pig, *Science*, 238, 366-369].

No se realizaron evaluaciones de la capacidad de caminar, rendimiento en plano inclinado, subir por una cuerda, u otras medidas directas o indirectas dependientes del funcionamiento de las patas traseras en roedores con lesión espinal. Estas pruebas son de interpretación más subjetiva, no se basan en circuitos neuronales identificados y no pueden discriminar suficientemente los movimientos dependientes de reflejos de patas traseras bilaterales intactas de los basados en el funcionamiento restablecido de tramos dañados de sustancia blanca.

Datos estadísticos

Se llevó a cabo la comparación de las proporciones de animales en cada grupo usando la prueba exacta de Fisher, bilateral; y una comparación de medias con la prueba de Mann Whitney no paramétrica bilateral en el software Instant.

Resultados

PEG marcado con FITC en médula espinal

Se marcaron débilmente regiones muy localizadas de tejido de médula espinal que rodea a capilares y vasos sanguíneos en las regiones rostral o caudal de médula espinal no lesionadas de la lesión, casi al nivel de detección (figura 6A). Este marcaje débil fue evidente alrededor de los vasos más grandes de la sustancia gris y de aquellos asociados con la superficie pial. Las regiones aplastadas de médula espinal se marcaron fuertemente en todos los animales, independientemente de los medios de administración de F1-PEG. Además, este marcaje intenso del parénquima de la médula espinal se confinó a la región de la sustancia blanca y gris contusionada, pero no se extendió al parénquima de la médula espinal adyacente, intacto (figura 6, B-D). En resumen, PEG marcó específicamente la lesión de médula espinal pero no los tejidos no dañados de las regiones adyacentes.

Recuperación mediada por PEG de la conducción

Antes de la lesión por aplastamiento de la médula espinal, SSEP evocados del nervio tibial habitualmente se segregan en picos incidentes temprano y tardío de CAP registrados a partir de la corteza sensorial (P1 y P2) [Borgens, R. y Shi, R. (2000): Immediate recovery from spinal cord injury through molecular repair of nerve membranes with polyethylene glycol, *FASEB*, 14, 27-35]. Como en lo experimentos anteriores, estos picos se eliminan completamente tras un aplastamiento por desplazamiento constante grave en la médula espinal torácica media (figura 4).

Durante 1 mes de observación tras una única inyección de PEG o una inyección de vehículo en animales control, ningún animal control recuperó la capacidad para conducir CAP a través de la lesión, tal como se midió mediante registro de SSEP en comparación con una recuperación variable de magnitudes de CAP que se registró que

llegaban a la corteza sensorimotriz en el 100% de los animales tratados con PEG ($P = 0,0001$; prueba exacta de Fisher bilateral; figura 7B; tabla 1).

Tabla 1

Tratamiento	N.º de animales	% de pérdida, área de areflexia ¹	% de CTM recuperado ²	N.º de CTM recuperado ²	N.º de SSEP recuperado ³	Área: CAP(P1) antes de lesión en píxeles ⁴	Área: CAP(P1) tras lesión en píxeles ⁴	Estadística ⁵
PEG	10	43,6 $\square$ 0,03	32,7 $\square$ 7,5	7/10	10/10	17026 $\square$ 258	11482 $\square$ 144	$P=0,14$
Recuento	10	42,5 $\square$ 0,02		0/10	0/10			
		$P=0,8^6$		$P=0,003^7$	$P=0,001^6$			

5 ¹El % de pérdida del campo receptivo del CTM = área unitaria de areflexia en mm²/campo receptivo intacto total antes de la lesión en mm²

²El porcentaje promedio (y EEM) de la región anterior de areflexia que se recuperó tras el tratamiento con PEG en 1 mes

³Número de animales recuperados/número total de animales

⁴El área unitaria en píxeles que comprende el pico de SSEP incidente temprano (véanse los métodos)

⁵Comparación de CAP antes y después de la lesión CAP; prueba de Mann Whitney, bilateral

10 ⁶Prueba exacta de Fisher, bilateral

⁷Prueba de Mann Whitney, bilateral

Una disminución en la amplitud y la duración prolongada del CAP es típica de los impulsos nerviosos en recuperación. Por tanto, es tanto útil como posible comparar en cambio en la forma de CAP antes de la lesión y tras la recuperación para determinar un índice relativo del grado de recuperación de CAP. En este estudio se midió el área bajo el pico incidente temprano (P1) en píxeles en animales tratados con PEG solamente (puesto que no hubo recuperaciones de SSEP en animales control). Si el 100% de todas las fibras nerviosas individuales que contribuyen al CAP se reclutaba de nuevo en la conducción posterior a la lesión (pero con una amplitud disminuida y un periodo de latencia prolongado), el área bajo la curva media normalizada (CAP por encima del nivel inicial) dividida entre los mismos datos de antes de la lesión se aproximaba a la unidad (1,0). En este experimento, la integración de la magnitud (en mV) y la latencia (en ms) de SSEP P1 de los animales tratados con PEG dividida entre los mismos datos de antes de la lesión equivalía a 0,88 (media antes de la lesión = 1706, EEM = 2583 píxeles. Media tras PEG = 11482, EEM = 1445 píxeles, $N = 10$). Las comparaciones estadísticas de datos emparejados de estos datos también confirmaron que no había una diferencia estadísticamente significativa en sus medias, lo que sugiere adicionalmente el cambio limitado en el CAP tras la recuperación mediada por PEG ($P = 0,14$, prueba de la T de Student, comparación de datos emparejados, bilateral). Todos estos cálculos juntos sugieren un reclutamiento significativo de fibras nerviosas lesionadas en la conducción de CAP tras el tratamiento con PEG que no se habría producido de otro modo.

30 Recuperación del reflejo de CTM

Se comparó cuantitativamente la porción de animales recuperados y no recuperados, así como el área unitaria de los campos receptivos de CTM recuperados entre animales control y a los que se ha inyectado PEG. El área unitaria de piel de lomo que no respondía a la estimulación de CTM tras la lesión (pero antes del tratamiento con PEG) fue estadísticamente similar en ambos grupos ($P = 0,81$; prueba de Mann Whitney, bilateral; tabla 1). Por tanto, la lesión espinal produjo un nivel similar de pérdida conductual de CTM en todos los animales. En los 10 animales tratados con PEG, 3 recuperaron la función de CTM en el plazo de 24 horas de la inyección, 3 más en el plazo de la primera semana del tratamiento, y 7 a las dos semanas. El área de piel de lomo en recuperación de estos diez animales continuó aumentando en tamaño hasta la semana cuatro cuando se finalizó el experimento. El área media de campos receptivos de CTM recuperados fue de aproximadamente el 33%. Ningún animal control de los 10 mostró recuperación espontánea de ningún fragmento del campo receptivo del CTM durante la observación de 1 mes (que se observó por primera vez en la semana 4). La diferencia en la frecuencia de recuperación entre los animales a los que se inyectó PEG y a los que se inyectó de manera simulada fue estadísticamente significativa ($P \leq 0,03$, prueba exacta de Fisher, bilateral). También se lograron resultados similares en un número más pequeño de animales con lesión espinal en respuesta a una única inyección intraperitoneal de PEG (datos no mostrados).

Discusión

Se conoce bien que PEG puede fusionar numerosas células individuales *in vitro* en una célula gigante, así como unir las membranas de neuronas y axones gigantes de invertebrados [Bittner, G.D., Ballinger, M.L., y Raymond, M.A. (1986): Reconnection of severed nerve axones with polyethylene glycol, Brain Research, 367, 351-355; Davidson, R.L. y Gerald, P.S. (1976): Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridization by polyethylene glycol, Somat. Cell Genet., 2, 165-176; O'Laigue, P.H. y Hunter, S.L. (1980): Physiological and morphological studies of rat pheochromocytoma cells (PC 12) chemically fused and grown in culture, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 77, 1701-1705]. Como "prueba de concepto" de la capacidad de reparación de la aplicación de PEG, se volvieron a conectar fisiológica y anatómicamente cantidades variables de axones de sustancia blanca de cobaya cortados completamente en médula espinal aislada [Shi, R., Borgens, R.B., y Blight, A.R. (1999): Functional reconnection of

severed mammalian spinal cord axons with polyethylene glycol, J. Neurotrauma, 16, 727-738]. Este resultado es menos relevante para la lesión clínica de médula espinal puesto que las secciones transversales son poco comunes, pero establecen la fase para pruebas adicionales de la utilidad del polímero en tramos de fibra nerviosa de SNC y SNP gravemente aplastados.

En informes previos se ha demostrado que la reversión de la pérdida de conducción en médula espinal lesionada estaba asociada con un sellado mediado por PEG de fisuras en la membrana del nervio producidas por daño mecánico [Shi, R y Borgens, R.B. (2001): Anatomical repair of nerve membranes in crushed mammalian spinal cord with polyethylene glycol, J Neurocytol, en prensa]. Las fisuras en la membrana del nervio permiten el intercambio no regulado de iones entre los compartimentos extracelular e intracelular. Esto produce un colapso local inmediato en el potencial de membrana y el fallo de conducción de impulsos nerviosos a través de esta región del axón. Este bloqueo de conducción inicial representa la pérdida funcional inmediata tras SCI, que llega a ser permanente debido a la degeneración anatómica progresiva del parénquima espinal y las fibras nerviosas lesionadas, denominada "lesión secundaria" [Young, W. (1993): Secondary injury mechanisms in acute spinal cord injury, J. Emerg. Med., 11, 13-22; Tator, C.H. y Fehlings, M. G. (1991): Review the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms, J. Neurosurg 75,15-26]. El notable aumento en el Na^+ y el Ca^{++} citosólicos que se desplazan hacia abajo por sus gradientes de concentración al interior de la célula (o regiones locales de su prolongación) a través de membrana comprometida está implicado en la destrucción del citoesqueleto de la célula y desencadena una cascada de cambios degenerativos que si no se frena, conduce a axotomía, y en ocasiones a muerte celular [Borgens, R.B. (1988): Voltage gradients and ionic currents in injured and regenerating axons, Advances in Neurology, Vol. 47: Functional Recovery in Neurological Diseases, (Waxman, S.G., ed.), págs. 51-66 Raven Press, Nueva York; Maxwell, W.L. y Graham, D.I. (1997): Loss of axonal microtubules and neurofilaments after stretch-injury to guinea pig optic nerve fibres, J Neurotrauma, 14, 603-614]. Hay una clara evidencia de que el tratamiento con PEG interviene en este proceso sellando la membrana, restaurando rápidamente su capacidad para propagar impulsos nerviosos e inhibiendo la disolución progresiva de las células de la médula espinal basándose en el fallo de las propiedades de barrera de la membrana. Este resultado se demostró usando una prueba de exclusión de colorante en la que el tratamiento con PEG inhibió en gran manera la captación de un marcador de peroxidasa de rábano (HRP; aproximadamente 40.000 Dalton) en axones dañados de médula espinal de cobaya aplastada. Este efecto también fue independiente del calibre del axón [Shi, R. y Borgens, R.B. (2001): Anatomical repair of nerve membranes in crushed mammalian spinal cord with polyethylene glycol, J Neurocytol, en prensa]. Sin embargo, este sellado producido por PEG no es perfecto, pese a la recuperación de la excitabilidad de membrana. Se han realizado informes de que la aplicación local del bloqueante de los canales rápidos de potasio 4-aminopiridina casi duplica la magnitud del CAP recuperado en pruebas *in vitro* [Shi, R. y Borgens, R. (1999): Acute repair of crushed guinea pig spinal cord by polyethylene glycol, J. Neurophysiology, 81, 2406-2414], lo que sugiere que la región de la membrana sellada por PEG todavía tiene pérdidas de potasio.

Las fisuras de membrana secundarias a daño mecánico suficientemente grandes como para permitir la captación de marcadores intracelulares de peso molecular grande tales como peroxidasa de rábano (HRP), un medio común para introducir tales marcadores en las neuronas [Borgens, R.B., Blight, A.R. y Murphy, D.J. (1986): Axonal regeneration in spinal cord injury: A Perspective and new technique, J. Comp. Neurol., 250, 157-167; Malmgren, L. y Olsson, (1977): A sensitive histochemical method for light and electron microscope demonstration of horseradish peroxidase, Y. J. Histochem. Cytochem., 25, 1280-1283], probablemente evolucionan hasta un tamaño tal que conduce a axotomía secundaria. La destrucción de la sustancia blanca se ha implicado en la producción de una señal robusta para los procesos inflamatorios que destruyen adicionalmente las células y tejidos de la médula espinal, un daño esencialmente colateral para las células sanas. La histología de las lesiones de médula espinal tratadas con PEG se ha comparado con controles mediante técnicas de reconstrucción de médula espinal en 3 D cuantitativas gestionadas por ordenador [Duerstock, B.S., Bajaj, C.L., Pascucci, V., Schikore, D., Lin, K-N., y Borgens, R.B. (2000): Advances in three-dimensional reconstructions of the experimental spinal cord injury, Computer Medical Imaging and Graphics, 24 (6), 389-406]. En estos estudios, una aplicación tópica de PEG produjo lesiones de médula espinal de 1 mes de menor volumen, y que poseían menos cavitación que la medida en animales control (lo que va a notificarse en otra parte). Estos datos sugieren fuertemente que el sellado polimérico de membranas de células nerviosas también se refleja en una reducción global en la patología de la médula espinal que puede observarse muchas semanas después.

Continúa la evaluación de la capacidad de este agente y de otros polímeros de sellado de membrana solubles en agua tales como los poloxámeros y las poloxaminas [Padanlam, J.T., Bischof, J.C., Cravalho, E.G., Tompkins, R.G., Yarmush, M.L. y Toner, M. (1994): Effectiveness of Poloxamer 188 in arresting calcein leakage from thermally damaged isolated skeletal muscle cells. Ann N.Y. Acad Sci. 92, 111-123; Palmer, J.S., Cromie, W.J. y Lee, R.C. (1998): Surfactant administration reduces testicular ischemia-reperfusion injury, J. Urology, 159, 2136-2139; Lee, R., River, L.P., Pan, F.S., Wollmann, L. Jr. y R.L. (1992): Surfactant-induced sealing delectropermeabilized skeletal muscle membranes in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 4524-4528] como tratamientos novedosos para la lesión grave del SNC y el SNP, así como para el traumatismo craneal y el accidente cerebrovascular.

Puesto que la inyección de PEG puede realizarse muchas horas tras la lesión, se han iniciado pruebas clínicas de una administración de PEG intravenosa (i.v.) para casos naturales, agudos, graves de paraplejia en perros [Borgens, R.B., Toombs, J.P., Blight A.R., McGinnis M.E., Bauer, M.S., Widmer, W.R. y Cook Jr., W.R. (1993): Effects of applied

electric fields on clinical cases of complete paraplegia in dogs, *J. Restorative Neurology and Neurosci.*, 5, 305-322; Borgens, R.B., Toombs, J.P., Breur, G., Widmer, W.R., Water, D., Harbath, A.M., March, P. y Adams, L.G. (1999): An imposed oscillating electrical field improves the recovery of function in neurologically complete paraplegic dogs, *J. of Neurotrauma*, 16, 639-657]. Este medio de desarrollo clínico es único para este centro de investigación de médula espinal y se ha usado previamente para desarrollar otros dos tratamientos derivados de animales de laboratorio para la lesión espinal [Borgens, R.B., Toombs, J.P., Breur, G., Widmer, W.R., Water, D., Harbath, A.M., March, P. y Adams, L.G. (1999): An imposed oscillating electrical field improves the recovery of function in neurologically complete paraplegic dogs, *J. of Neurotrauma*, 16, 639-657; Blight, A.R., Toombs, J.P., Bauer, M.S. y Widmer, W.R. (1991): The effects of 4-aminopyridine on neurological deficits in chronic cases of traumatic spinal cord injury in dogs: a phase I clinical trial, *J. Neurotrauma*, 8, 103-119] en pruebas clínicas en seres humanos. En este nuevo ensayo, la administración de PEG es un complemento al tratamiento de rutina de perros con lesión espinal neurológicamente completa, puesto que el polímero puede introducirse de manera segura en los fluidos i.v. administrados poco después de su ingreso en el hospital. Aunque todavía no se ha completado este ensayo clínico, las observaciones preliminares son alentadoras, y parecen demostrar recuperaciones inesperadas de diversas funciones en el plazo de horas a algunos días tras las inyecciones de PEG.

Ejemplo 3

Un polímero hidrófilo intravenoso induce la recuperación rápida de paraplejía clínica en perros

Este ejemplo demuestra una recuperación veloz, sorprendente y estadísticamente significativa de múltiples funciones en casos clínicos de paraplejía grave, aguda que se produce de manera natural en perros. La recuperación de la función se produjo en respuesta a una combinación de polietilenglicol (PEG) aplicado por vía tópica y administrado por vía intravenosa. Se produjeron rápidamente recuperaciones de las funciones sensoriales y motoras en todos los puntos de tiempo estudiados entre los 3 días y las 6-8 semanas tras la lesión.

Ingreso y tratamiento

Se ingresaron perros con lesiones de médula espinal en los servicios de urgencias de los University Veterinary Teaching Hospitals (UVTH) en la universidad de Texas A&M, College Station, Texas, y en la Universidad de Purdue, West Lafayette, Indiana. Se cumplió un protocolo idéntico para el ingreso, la evaluación neurológica, el tratamiento y el seguimiento (R.B. Borgens *et al.*, *J. Restorative Neurology and Neurosci.* 5, 305 (1993); R.B. Borgens *et al.*, *J. Neurotrauma* 16, 639 (1999)) por cada centro de investigación. En circunstancias especiales, se dispuso de obtención de imágenes por tomografía de rayos X computerizada (TC) además de la radiografía y la mielografía de rutina en el centro de Texas, mientras que el estudio electrofisiológico de la conducción de impulsos nerviosos a través de la lesión de médula espinal mediante pruebas de potencial evocado se realizó en la Universidad de Purdue.

Se realizó un examen radiológico de cada perro (figuras 9A-9D), y un examen neurológico meticuloso, grabado en vídeo (figura 10A) que incluyó: 1) pruebas de dolor intenso en las patas traseras y los dedos, 2) apreciación de dolor superficial por debajo del nivel de la lesión en el costado, parte inferior de las patas y dedos, 3) evaluación propioceptiva de las patas traseras (es decir, propiocepción consciente), 4) evaluación de soporte de peso de las patas traseras y locomoción voluntaria, y 5) pruebas de reflejo espinal (reflejos patelar, tibial, craneal, retirada de flexor y ciático). Las pruebas 1-4 también se usaron como medidas funcionales del desenlace y se puntuaron cuantitativamente usando técnicas y métodos notificados previamente (R.B. Borgens *et al.*, *J. Restorative Neurology and Neurosci.* 5, 305 (1993); R.B. Borgens *et al.*, *J. Neurotrauma* 16, 639 (1999)) (figura 10A). Estos datos proporcionaron entonces una puntuación neurológica total (TNS) (R.B. Borgens *et al.*, *J. Restorative Neurology and Neurosci.* 5, 305 (1993); R.B. Borgens *et al.*, *J. Neurotrauma* 16, 639 (1999)) para cada perro en el punto de tiempo sometido a prueba. Puesto que la recuperación neurológica varía en su expresión entre animales, el medio más válido para comparar desenlaces es mediante la comparación de la TNS (R.B. Borgens *et al.*, *J. Restorative Neurology and Neurosci.* 5, 305 (1993)). Todos los perros admitidos en el ensayo clínico poseían los peores signos clínicos para lesión espinal secundaria a compresión de médula espinal caracterizada por paraplejía completa, incontinencia urinaria y fecal, y falta de respuesta a dolor intenso [lesiones de grado 5 (J.R. Coates, *Comon Neurological Problems* 30, 77 (2000))]. Estas pruebas funcionales (y otras, véase a continuación) también se usaron como criterio de exclusión, de manera que no se incluyeron en el ensayo perros neurológicamente "incompletos". Adicionalmente, sólo fueron candidatos del estudio perros parapléjicos con síndrome de neurona motora superior (auténticas lesiones de médula espinal). Una falta persistente de reflejo, o hiporreflexia de la(s) parte(s) inferior(es) de la(s) pata(s) reveló compromiso segmentario del conjunto de circuitos de la médula espinal o "secuelas de neurona motora inferior". Esto fue suficiente para excluir a los animales del estudio (R.B. Borgens *et al.*, *J. Restorative Neurology and Neurosci.* 5, 305 (1993); R.B. Borgens *et al.*, *J. Neurotrauma* 16, 639 (1999)). Durante la evaluación clínica inicial, se pidió a los propietarios que revisaran un documento relativo al tratamiento experimental, y luego se solicitó que firmaran un consentimiento informado sobre si deseaban participar en el estudio.

A continuación, los perros parapléjicos recibieron la primera de dos inyecciones intravenosas de PEG. Más tarde, pero en el plazo de 24 horas del ingreso, se determinó la ubicación de la lesión mediante mielografía y radiografía de inspección (figuras 9A-9D). Este último examen garantizó que la mielomalacia estaba limitada a menos de 1

segmento vertebral. Todos los perros recibieron una inyección de succinato sódico de metilprednisolona (30 mg/kg de peso corporal), se les aplicó anestesia general y se sometieron a cirugía. Todos los perros lesionados recibieron tratamiento veterinario según las normas asistenciales de estas lesiones, incluyendo descompresión quirúrgica del sitio afectado y fijación de la columna vertebral cuando se requirió. Se retiró la duramadre durante la cirugía de descompresión, exponiendo la lesión de médula espinal, y se dispuso una capa de aproximadamente 1 cc de disolución de PEG (aproximadamente 2000 Dalton, al 50% p/p en solución salina estéril; 150 mg/kg de peso corporal) sobre el sitio de la lesión. El polímero se aspiró de la superficie de la médula expuesta en el plazo de 2 min. de aplicación, a continuación se lavó la región con solución de Ringer estéril, y estos fluidos también se aspiraron. Se colocó superficialmente un injerto de panículo adiposo, se cerró la incisión, y se llevó a los animales a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) para su recuperación. En el plazo de 24 horas tras la cirugía, se realizó una segunda inyección de PEG, idéntica a la primera, habitualmente en la UCI. Se monitorizó a los animales dentro del hospital durante 7-10 días, y se realizó un examen neurológico completo, grabado en vídeo como el original, aproximadamente 3 días (74 ± 9 horas) tras la cirugía, aproximadamente 1 semana tras la cirugía en el alta ($6,8 \pm 1,2$ días) y a las 6-8 semanas tras la cirugía en una nueva comprobación. Como en los ensayos clínicos anteriores, se facilitó a los propietarios instrucciones detalladas relativas al cuidado de sus animales (es decir presión de vejiga, cuidado cutáneo, etc.) e, inicialmente, al uso de sillas de ruedas (sillas K-9, Montana) para ayudar en la rehabilitación del perro (R.B. Borgens *et al.*, J. Restorative Neurology and Neurosci. 5, 305 (1993); R.B. Borgens *et al.*, J. Neurotrauma 16, 639 (1999)). Sin embargo, esta última práctica se interrumpió tras sólo 3 ingresos porque la recuperación de función fue tan rápida (véase a continuación) que hizo innecesario el uso de la silla.

Perros control

Durante el desarrollo del protocolo experimental, los perros parapléjicos se recuperaron rápida e inesperadamente en el plazo de algunos días tras la administración de PEG. Los neurocirujanos participantes consideraron poco ético llevar a cabo un procedimiento de control (inyección intravenosa del disolvente para PEG: solución salina estéril) ya que sabían muy bien que los animales propiedad de estos clientes sufrirían pérdidas conductuales para toda la vida variables, pero graves (R.B. Borgens *et al.*, J. Neurotrauma 16, 639 (1999)). Debido al intervalo de aproximadamente 48 horas en el tratamiento, tampoco fue posible realizar un único estudio cruzado. Por tanto, se tomó la decisión médica de usar controles históricos en lugar de inyectar a tales animales con lesiones graves agua salina estéril. Se obtuvieron datos de control históricos relevantes para perros tratados de manera simulada de estudios recientes publicados y revisados por expertos realizados en el centro de Indiana (R.B. Borgens *et al.*, J. Restorative Neurology and Neurosci. 5, 305 (1993); R.B. Borgens *et al.*, J. Neurotrauma 16, 639 (1999)). Estos perros control 1) también se incluyeron en ensayos clínicos veterinarios limitados a sólo casos neurológicamente completos de paraplejía canina aguda, 2) recibieron tratamiento convencional idéntico tal como se describió anteriormente, 3) se evaluaron neurológicamente mediante métodos idénticos, y se excluyeron de los estudios según criterios de exclusión idénticos (R.B. Borgens *et al.*, J. Restorative Neurology and Neurosci. 5, 305 (1993); R.B. Borgens *et al.*, J. Neurotrauma 16, 639 (1999)) (véanse las figuras 9A-9E y las figuras 11A y 11B), se evaluaron en los mismos puntos de tiempo, y 5) en la mayoría de los casos, se obtuvieron sus puntuaciones neurológicas por los mismos investigadores participantes en este ensayo (R.W., G.B., J.T., RB). Es importante hacer hincapié en que todos los investigadores eran completamente ciegos para el estado experimental o de control de todos los perros incluidos en estos ensayos previos. El uso de estos procedimientos idénticos en la inclusión y particularmente en la puntuación de las funciones neurológicas produjo poca o ninguna variación entre los múltiples investigadores cuando se compararon sus puntuaciones individuales (R.B. Borgens *et al.*, J. Restorative Neurology and Neurosci. 5, 305 (1993); R.B. Borgens *et al.*, J. Neurotrauma 16, 639 (1999)). La validez de esta comparación parece ser eminentemente superior que los datos reunidos a partir de la bibliografía veterinaria. Estas últimas investigaciones: i) no usan múltiples funciones neurológicas como criterios de exclusión para limitar la posibilidad de que las evaluaciones incluyan perros neurológicamente incompletos, ii) no informan de un eje completo de comportamiento neurológico incluyendo la función de reflejos espinales inferiores relevantes, iii) no usan las mediciones de desenlace usadas en este caso, o iv) no evalúan a los animales en los mismos puntos de tiempo tras la cirugía.

Para la comparación, se disponía de historias médicas completas, hojas de puntuación y cintas de vídeo para 14 perros control (tratados de manera simulada) desde 1993 (R.B. Borgens *et al.*, J. Restorative Neurology and Neurosci. 5, 305 (1993)) y 11 perros control desde 1999 (3) (25 perros totales para su comparación con 20 perros tratados con PEG). Además, en este último ensayo clínico (R.B. Borgens *et al.*, J. Neurotrauma 16, 639 (1999)), la aplicación experimental (estimulación del campo oscilante) se retrasó en 12 perros experimentales durante aproximadamente 96 horas tras la cirugía para determinar qué recuperación funcional temprana, si la había, podía asociarse con la cirugía y con el tratamiento con esteroides solos. Se notificó el estado neurológico de este subconjunto de perros (R.B. Borgens *et al.*, J. Neurotrauma 16, 639 (1999)). Estos datos proporcionaron entonces un total de 37 perros control para comparar con 20 perros tratados con PEG en el punto de tiempo de 3 días, y 25 perros control para su comparación en las comprobaciones neurológicas de 1 semana y 6-8 semanas.

Respuestas clínicas a la administración del polímero en perros parapléjicos

El indicador más sensible de recuperación funcional temprana en casos clínicos de paraplejía canina neurológicamente completa es la reaparición de respuesta a dolor intenso en patas traseras y dedos (R.B. Borgens *et al.*, J. Restorative Neurology and Neurosci. 5, 305 (1993); R.B. Borgens *et al.*, J. Neurotrauma 16, 639 (1999); J.R.

Coates, *Comon Neurological Problems* 30, 77 (2000)). Esto se evaluó en 17 de los 20 perros con lesión aguda tratados con PEG aproximadamente 3 días tras la cirugía (aproximadamente 48 horas tras la segunda inyección de PEG (figura 10A)). Durante este tiempo, 4 de los 17 perros tratados con PEG recuperaron el dolor intenso, mientras que sólo lo hizo uno de los 37 perros control ($P=0,03$; prueba exacta de Fisher, bilateral, en esta comparación de proporciones y en todas las posteriores).

La comparación de la TNS media en este momento, números derivados en su mayor parte de las recuperaciones en el dolor intenso y superficial, se mejoró notablemente de manera estadísticamente significativa en el grupo tratado con PEG en comparación con los controles ($P = 0,009$; la comparación de medias en este caso y más adelante se realizó usando la prueba de la T de Student, bilateral, o la variación de Welch, figuras 9A-9E).

Aunque más de la mitad de la población de perros tratados con PEG había recuperado las respuestas a dolor intenso en 1 semana tras el tratamiento, las mejoras en el dolor intenso en 25 perros control eliminaron la significación en esta comparación funcional entre los grupos en este punto de tiempo ($P = 0,2$). Sin embargo, las recuperaciones en propiocepción, mejora en soporte de peso en las patas traseras y capacidad para caminar voluntariamente en 8 perros tratados con PEG de 20 en este momento fueron inigualables por mejoras de este tipo en los perros control. El análisis reveló una notable mejora estadísticamente significativa en las TNS de los perros tratados con PEG en este punto de tiempo ($P = 0,007$; figuras 9A-9E).

Las puntuaciones neurológicas totales de los perros control mostraron una mejora modesta y progresiva en la nueva comprobación a las 6 semanas, sin embargo, esto siguió siendo evidente como mejoras principales en la calidad de apreciación del dolor (R.B. Borgens *et al.*, *J. Restorative Neurology and Neurosci.* 5, 305 (1993); R.B. Borgens *et al.*, *J. Neurotrauma* 16, 639 (1999)). Por tanto, no hubo diferencia significativa entre los perros tratados con PEG y control cuando se compararon las proporciones de animales con respuestas positivas a dolor intenso y superficial ($P = 0,1$ y $0,6$, respectivamente). Sin embargo, esta mejora en la apreciación del dolor no se correspondía con ninguna de las medidas de desenlace evaluadas en los perros control. El treinta y cinco por ciento (7 de 20) de los perros tratados con PEG recuperaron la propiocepción medible en 6 semanas, mientras que sólo 1 de 25 (4%) de los animales control habían mejorado la propiocepción ($P = 0,01$). Por lo menos el 70% de todos los perros tratados con PEG (14 de 20) podían caminar voluntariamente, en comparación con sólo el 28% (7 de 25) de los controles ($P = 0,007$). Además, la calidad global de la recuperación funcional secundaria a la administración de PEG en la nueva comprobación a las 6 semanas (tal como se facilita por la puntuación neurológica total) mejoró sorprendentemente mediante el tratamiento con PEG en relación con los controles ($P \leq 0,0008$; figuras 9A-9E).

Cualitativamente, los dos grupos parecieron bastante diferentes de una manera enmascarada por la simple enumeración de las proporciones y puntuaciones neurológicas cuantitativas. El posible intervalo de puntuación neurológica total de un perro individual fue de 4 (un perro totalmente parapléjico) a 20 (un perro totalmente normal (véanse las figuras 9A-9E)). Quince de los 25 perros control (60%) permanecieron parapléjicos de manera neurológicamente completa 6-8 semanas tras la cirugía de descompresión y el tratamiento con corticosteroides, evaluándose todos ellos de manera individual con una puntuación neurológica de 4. El perro de control con mejor rendimiento tuvo una puntuación de 11 en este punto de tiempo (R.B. Borgens *et al.*, *J. Neurotrauma* 16, 639 (1999)). Sin embargo, este animal siguió estando gravemente afectado; se evaluó la locomoción sola como una puntuación de sólo 2. El tratamiento con PEG dio como resultado que un 35% (7 perros de 20) puntuaran individualmente con de 13 a 16. En la nueva comprobación a las 6-8 semanas, algunos perros habían logrado una recuperación sorprendente (hasta el punto de que sólo pudo determinarse la pérdida funcional restante mediante un examen neurológico meticuloso). Sólo 3 de 20 perros tratados con PEG (15%) seguían parapléjicos al final del periodo de observación de 6-8 semanas (una comparación altamente significativa con los controles, $P = 0,003$).

Electrofisiología y tratamiento de vejiga

Se realizaron pruebas de potencial evocado [potencial evocado somatosensorial o SSEP (R.B. Borgens *et al.*, *J. Restorative Neurology and Neurosci.* 5, 305 (1993); R.B. Borgens *et al.*, *J. Neurotrauma* 16, 639 (1999)), figuras 10A-10C] en 11 de los 12 perros tratados con PEG ingresados en el centro de Purdue para determinar si se había restaurado la conducción nerviosa a través de la lesión (figuras 10A-10C). No pudieron obtenerse registros de potencial evocado somatosensorial de manera habitual antes de la primera inyección de PEG y la cirugía debido a la necesidad de trasladar a estos animales a través de la batería de evaluaciones y a la cirugía lo antes posible tras el ingreso. Además, la mayoría de los perros no pudieron sedarse para tales pruebas en las primeras pocas horas tras el ingreso debido a la ingestión de alimentos y a otros factores de complicación. De los 11 perros en los que se realizaron pruebas electrofisiológicas de conductancia en más de dos periodos de nueva comprobación, se registró que 7 tenían SSEP positivos, mientras que 4 no demostraron evidencia de conductancia de impulso nervioso a través de la lesión. Los cuatro perros que puntuaron por encima de la TNS media de los 12 mostraron una clara recuperación de conductancia a través de la lesión. Además, pudo accederse a un animal gravemente lesionado (fractura/dislocación y subluxación de la columna vertebral) para las pruebas de SSEP durante la segunda de dos inyecciones de PEG. Este animal mostró una progresión desde un SSEP negativo (línea plana) hasta potenciales corticales de baja amplitud, larga duración, durante el periodo de inyección de 30 min. y observación del animal sedado (figuras 11A, 11B).

En contraposición, de los 11 perros control del estudio de 1993, ninguno recuperó la conducción de SSEP en incluso 6 meses tras la lesión [véase la página 313 (R.B. Borgens *et al.*, J. Restorative Neurology and Neurosci. 5, 305 (1993))]. Sólo dos perros control de 14 recuperaron conducción medible en 6-8 meses en el ensayo clínico de 1999 [véase la página 649 (R.B. Borgens *et al.*, J. Neurotrauma 16, 639 (1999))]. Esta proporción de perros tratados con PEG (7 de 11) que recuperó la conducción electrofisiológica ascendente a través de la lesión, fue estadísticamente muy significativa en comparación con la falta relativa de potenciales evocados registrados en perros control ($P=0,001$).

El estado de continencia de la vejiga debido a paraplejía es problemático en perros al igual que en el hombre. Se ha encontrado que las mediciones electrofisiológicas de micción (cistometría y perfilometría de presión uretral) aunque proporcionan datos relevantes para casos aislados de síndrome de neurona motora inferior, no se correlacionan altamente con observaciones de recuperación de continencia urinaria particularmente realizadas por los propietarios (R.B. Borgens *et al.*, J. Neurotrauma 16, 639 (1999)). Los propietarios no confunden fácilmente la incontinencia, puesto que representa una pérdida conductual principal en el “entrenamiento doméstico” del perro y es el motivo más común dado para sacrificar a sus mascotas. Además, una omisión sistemática por parte de los propietarios en la presión manual de la vejiga de perros con incontinencia conduce a un reingreso por infección en el aparato urinario. De los 20 perros tratados con PEG, los propietarios notificaron que todos excepto 6 tenían continencia, y no requerían presión de vejiga. Estos últimos animales pertenecían a un grupo de perros tratados con PEG que mostraron la menor recuperación al final del estudio. Se facilitan estos hechos como evidencia adicional, aunque escasa, de que la recuperación de la paraplejía mediada por PEG también mejoró o eliminó probablemente al menos la incontinencia urinaria.

Paraplejía en animales de laboratorio, en perros y en el hombre

La historia de la investigación de lesiones de médula espinal puede caracterizarse en parte por la búsqueda de métodos normalizados para lesiones y medios creíbles para someter a ensayo la pérdida conductual y la recuperación en animales de laboratorio (habitualmente cobayas, ratas o gatos adultos). Siembre ha habido debate y controversia relativos a estas búsquedas. En el primer caso, la dificultad se centra en diversas técnicas diferentes usadas para inducir lesión a la médula espinal expuesta. Por ejemplo, se han empleado y contrastado el impacto constante [habitualmente técnicas normalizadas de caída de peso (S.K. Somerson, y B.T. Stokes, Exp. Neurol. 96, 82 (1987))], compresión constante de la médula espinal [usando pinzas (A.S. Rivlin, C.H. Tator, Surg. Neurol. 10, 39 (1978)) o fórceps especialmente fabricados (A.R. Blight, J. Neurologic. Sci. 103, 156 (1990))] y sección transversal parcial o completa (R.B. Borgens, A.R. Blight, D.J. Murphy, J. Comp. Neurol. 250, 157 (1986)), de la médula espinal (R.B. Borgens, A.R. Blight, D.J. Murphy, J. Comp. Neurol. 250, 157 (1986)). Con la excepción de esta última técnica, un objetivo importante de estos métodos ha sido reducir la variabilidad en las lesiones, y producir una lesión hemorrágica central típica de la lesión clínica en el hombre (A.R. Blight, J. Neurologic. Sci. 103, 156 (1990); A.R. Allen, J. Am. Med. Assoc. 57, 878 (1911); C.H. Tator, M.J. Fehlings, Neurosurg. 75, 15, (1991)). Aunque pueden debatirse los éxitos de los diferentes enfoques en relación con estos objetivos, no hay duda de que las lesiones producidas en laboratorios actuales se realizan a médulas espinales quirúrgicamente expuestas de animales anestesiados produciendo un sitio de lesión inicialmente dorsal. Esto no concuerda con la mayoría de las lesiones clínicas en las que el sitio inicial de lesión de SCI (“lesión de médula espinal”) es anterior (ventral), y el efecto es en el tronco del cuerpo o el cuello (denominadas lesiones “cerradas”). Además, durante el ataque experimental a la médula, la anestesia proporciona neuroprotección (S.K. Salzman, M.M. Mendez, S. Sabato, *et al.*, Brain Res. 521, 33 (1990)), y es un factor de complicación. Por tanto, las lesiones que se producen de manera natural en perros proporcionan una comparación más directa con las lesiones clínicas en el hombre (R.B. Borgens, in Spinal Cord Dysfunction, Volumen III: Functional Stimulation, L.S. Illis, Ed. (Oxford Medical Publications, Oxford, 1992), capítulo 5).

También ha habido numerosos y diversos intentos para medir y/o cuantificar la recuperación conductual de SCI en modelos de laboratorio de lesión espinal. La medición de la locomoción de las patas traseras (M.D. Basso, M. Beattie, J.D. Bresnahan, J. Neurotrauma 12, 1 (1995)), o alguna forma de ello (A.S. Rivlin, C.H. Tator, J. of Neurosurgery 47, 577-581 (1977)), ha dominado los estudios en roedores de SCI (habitualmente debido a la idea subyacente de que los resultados podrían ser relevantes para la locomoción de las extremidades inferiores en el hombre, aunque no hay ninguna evidencia que apoye este punto de vista. Los seres humanos son los únicos mamíferos bípedos obligatorios, y caminar erguidos está completamente dominado por el control supraespinal (S. Mori, K. Matsuyama, E. Miyashita, K. Nakajima, M. Asanome, Folia Primatologica 66, 192 (1996)). En los modelos experimentales de SCI, la locomoción está dominada por pasos generados y controlados localmente (S. Rossignol, R. Dubuc, Curr. Opin. Neurobiol. 4, 894-902 (1994); A. Naito, Y. Shimizu, Y. Handa, Neurosci Res 8, 281 (1990)). Un comportamiento de caminar de este tipo a menudo se denomina “caminar de manera espinal” para diferenciarlo del comportamiento de caminar que requiere la transmisión restablecida de impulsos nerviosos a través de la lesión de médula espinal desde centros superiores. Puesto que no se requiere el tráfico restaurado de impulsos nerviosos a través de la lesión para que los animales deambulen de manera voluntaria, el comportamiento de caminar por sí mismo no representa una recuperación conductual válida con la que deducir la conducción restablecida a través de la lesión. Esto requiere el uso de métodos cinestésicos que confirmen la coordinación de las patas delanteras y traseras durante la locomoción voluntaria.

Por todos los motivos anteriores, no se han hecho intentos para desarrollar sistemas incluso más complicados para clasificar el comportamiento de caminar asociado con la paraplejia clínica en perros. En cambio, se confía en una puntuación de 5 puntos sencilla que proporciona una reflexión precisa, fiable de las crecientes capacidades en la ambulación, pero sin intentar adicionalmente indicar los mecanismos de acción neuronales subyacentes a ella (R.B. Borgens *et al.*, J. Restorative Neurology and Neurosci. 5, 305 (1993); R.B. Borgens *et al.*, J. Neurotrauma 16, 639 (1999)).

En el presente ejemplo, independientemente del mecanismo subyacente a la recuperación de la capacidad de caminar voluntariamente, un número sorprendentemente significativo de perros caminó con capacidad superior a lo que se producía en los controles. Además, la mejora estadísticamente significativa en TNS es una clara indicación de recuperación sustancial e importante en otras diversas áreas de función clínicamente relevantes, incluyendo: recuperación en la apreciación neurológica tanto del dolor intenso como superficial, recuperación de la conductancia de impulsos nerviosos ascendentes a través de la lesión, recuperación de propiocepción consciente, así como soporte de peso sustancial y capacidad para caminar voluntariamente.

La solidez de estos métodos tal como se aplica a la paraplejia que se produce de manera natural es que proporcionan un potencial real para evaluar la importancia clínica de terapias experimentales para la SCI en seres humanos (R.B. Borgens *et al.*, J. Neurotrauma 16, 639 (1999); A.R. Blight, J.P. Toombs, MS. Bauer, W.R. Widmer, J. Neurotrauma 8, 103-119 (1991)). La debilidad de este modelo de SCI es que se aprende poco acerca de la base biológica para la respuesta al tratamiento. Esto se logra más fácilmente en modelos de laboratorio en los que pueden aplicarse técnicas anatómicas y pruebas fisiológicas invasivas (R.B. Borgens, in Spinal Cord Dysfunction, Volumen III: Functional Stimulation, L.S. Illis, Ed. (Oxford Medical Publications, Oxford, 1992), capítulo 5).

Aplicación de polímero en SCI experimental

Se ha documentado que la administración de polietilenglicol tópica y/o intravascular (2000-3000 Dalton, aproximadamente al 30-50% p/p en agua) induce:

1) La rápida fusión anatómica (minutos) de axones de sustancia blanca cortados (R. Shi, R.B. Borgens, A.R. Blight, J. Neurotrauma 16, 727 (1999)) y el rápido sellado de fisuras anatómicas tanto en axones mielinizados como desmielinizados de sustancia blanca ventral de cobaya (R. Shi, R.B. Borgens, J. Neurophysiology 81, 2406 (1999)). En ambos casos, se conservó y se evaluó *in vitro* tejido neuronal en cámaras de registro de espacio de sacarosa dobles (R. Shi, A.R. Blight, Neuroscience 77, 553-562 (1997)).

2) La rápida recuperación (minutos) de conducción de impulsos nerviosos a través de la lesión en esos mismos estudios (R. Shi, R.B. Borgens, A.R. Blight, J. Neurotrauma 16, 727 (1999); R. Shi, R.B. Borgens, J. Neurophysiology 81, 2406 (1999)), o a través de lesiones por aplastamiento graves y normalizadas en la médula espinal de cobaya *in vivo*, medida mediante pruebas de SSEP (R.B. Borgens, R. Shi, FASEB 14, 27 (2000); R.B. Borgens, D.M. Bohnert, J. Neurosci. Res. 66, 1179 (2001); R.B. Borgens, R. Shi, D.M. Bohnert, J. Exp. Bio. 205, 1 (2002)).

3) La rápida recuperación (de horas a días) del reflejo de médula espinal dependiente de tramo largo (el reflejo del músculo cutáneo del tronco o CTM) (R.B. Borgens, R. Shi, FASEB 14, 27 (2000); R.B. Borgens, D.M. Bohnert, J. Neurosci. Res. 66, 1179 (2001); R.B. Borgens, R. Shi, D.M. Bohnert, J. Exp. Bio. 205, 1 (2002)), que es totalmente dependiente de la integridad de una columna de sustancia blanca identificada de axones dentro del cordón ventral de la médula espinal de la cobaya (A.R. Blight, M.E. McGinnis, R.B. Borgens, J. Comp. Neurol. 296, 614-633 (1990)) y la rata (E. Thierault, J. Diamond, J. Neurophysiol. 60, 446-447 (1988)).

Se produjo un nivel variable nivel de recuperación del reflejo de CTM (producido por compresión de la médula espinal) en > 90% de las cobayas tratadas con PEG, en comparación con un intervalo del 0-17% en las poblaciones control tratadas de manera simulada en tres estudios separados (R.B. Borgens, R. Shi, FASEB 14, 27 (2000); R.B. Borgens, D.M. Bohnert, J. Neurosci. Res. 66, 1179 (2001); R.B. Borgens, R. Shi, D.M. Bohnert, J. Exp. Bio. 205, 1 (2002)). La recuperación de los potenciales corticales se documentó como descargas restablecidas de SSEP que se midió que llegaban a la corteza a la corteza sensorimotriz tras la estimulación eléctrica del nervio tibial de la parte inferior de las patas. En todas (el 100%) las cobayas control, se eliminó tal conducción de impulsos nerviosos a través de la lesión durante el mes de observación. En los animales tratados con PEG, se recuperaron los SSEP en el 100% de la población en estas tres mismas investigaciones (R.B. Borgens, R. Shi, FASEB 14, 27 (2000); R.B. Borgens, D.M. Bohnert, J. Neurosci. Res. 66, 1179 (2001); R.B. Borgens, R. Shi, D.M. Bohnert, J. Exp. Bio. 205, 1 (2002)).

Mecanismos de terapia basada en polímeros para lesiones neurológicas

Se han revisado en la bibliografía los mecanismos de acción molecular, por ejemplo, de tensioactivos y polímeros tribloque en el sellado o la fusión de las membranas celulares. (R. B. Borgens, Neurosurgery 49, 370-379 (2001); B.R. Lentz, Chem.Phys.Lipid 73, 91 (1994); J. Lee, B.R. Lentz, Biochemistry 36, 6251 (1997); J.M. Marks, C-Y. Pan, T. Bushell, W. Cromie, R.C. Lee FASEB J15, 1107 (2001)). En resumen: un mecanismo inicial común a todos los tensioactivos hidrófilos que puede ser beneficioso para el traumatismo de tejido blando es la formación de una

película química que sella los defectos en las membranas celulares en el sitio de daño mecánico. Sin embargo, es el carácter de avidez por el agua de esta clase de polímeros hidrófilos (PEG, EPAN, y algunos dextranos) que se cree que deshidrata instantáneamente la membrana de manera local. Además, o bien la eliminación o bien la redistribución de las moléculas de agua en las proximidades de la fisura de membrana permite que el núcleo lipídico de la membrana intacta que rodea a la fisura, y quizá los elementos estructurales suspendidos en ella, se fusionen entre sí. Cuando se elimina el polímero, o se disminuye su concentración, se producen cantidades variables de auto-ensamblaje estructural en respuesta a la reintroducción de la fase acuosa de la membrana. Los polímeros tribloque tales como los poloxámeros comprenden en su mayor parte PEG (aunque también poseen un componente hidrófobo (poli(óxido de propileno)) que realmente puede dirigirse a las fisuras en las membranas) que se inserta en la fisura en la que se expone el núcleo hidrófobo de la membrana (J.M. Marks, C-Y. Pan, T. Bushell, W. Cromie, R.C. Lee FASEB J15, 1107 (2001)). Las cadenas laterales largas de PEG contribuyen probablemente al sellado de la forma descrita anteriormente. Se ha sometido a prueba el poloxámero 188 en un modelo de lesión espinal en cobayas y no se han encontrado diferencias en las recuperaciones fisiológicas y conductuales en respuesta a PEG tal como se describió anteriormente. Estos hallazgos sugieren que diversos polímeros pueden demostrar ser beneficiosos para su aplicación a traumatismo de tejidos blandos y otras lesiones del sistema nervioso (J.M. Marks, C-Y. Pan, T. Bushell, W. Cromie, R.C. Lee FASEB J 15,1107 (2001); J. Donaldson, R. Shi, R Borgens, Neurosurgery 50, 147-157 (2002)).

Probablemente, cualquier polímero molecular grande como PEG o poloxámeros, introducidos en el riego sanguíneo, se dirigirán sólo a regiones de traumatismo tisular en las que hay una pérdida de integridad vascular. Esto se ha demostrado observando la acumulación de un PEG marcado de manera fluorescente en médula espinal aplastada de cobaya (comparando la administración intravenosa, subcutánea y peritoneal con una aplicación tópica del polímero en la lesión expuesta (R.B. Borgens, D.M. Bohnert, J. Neurosci. Res. 66, 1179 (2001)). El marcaje apenas fue detectable o fue no existente en las regiones intactas de la médula espinal en estos mismos animales.

De los posibles mecanismos de acción para PEG, se han demostrado pruebas formales de sus propiedades de sellado de membranas. La captación de marcadores extracelulares aplicados tales como peroxidasa de rábano (HRP), bromuro de etidio, o el escape de deshidrogenasa láctica en el espacio extracelular, son índices excelentes de membrana celular comprometida (R. Shi, R.B. Borgens, J. Neurocytology 29, 633-643 (2000)). Tanto la captación como el escape de estos marcadores intracelulares de la sustancia blanca lesionada de la médula espinal se reducen o eliminan sorprendentemente mediante la administración de PEG. Además, la propensión al sellado axónico es igual a través de un amplio intervalo de calibres de axón (R. Shi, R.B. Borgens, J. Neurocytology 29, 633-643 (2000)).

Se plantea la hipótesis de que esta inhibición del escape de la membrana de fibras nerviosas reduce la oportunidad de que se produzca una axotomía secundaria. Esto concuerda con la observación de que las médulas tratadas con PEG están más intactas, poseen cantidades superiores de sustancia blanca intacta y un volumen de lesión reducido que la médula espinal de cobaya no tratada, tal como se muestra mediante la comparación cuantitativa de reconstrucciones tridimensionales de estas médulas espinales (B.S. Duerstock, R.B. Borgens, J Exp. Biol. 205, 13 (2002)).

En resumen, la administración intravenosa y tópica de un polímero hidrófilo en casos clínicos de lesión de médula espinal aguda neurológicamente completa en perros da como resultado una recuperación rápida e inesperada de múltiples medidas de desenlace funcional. Esta recuperación clínica rápida y completa no se observa en respuesta al tratamiento clínico/quirúrgico convencional de lesiones neurológicamente completas, incluyendo la administración de esteroides y la cirugía de descompresión (J.R. Coats *et al.*, Veterinary Surgery 24, 128-139 (1995)).

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una lesión de tejido nervioso de la médula espinal o el sistema nervioso central de un paciente mamífero, en la que se restablece o aumenta la conducción de potenciales de acción a través del tejido nervioso lesionado, comprendiendo la composición una cantidad eficaz de un polialquilenglicol seleccionado del grupo que consiste en polimetilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol, polipentilenglicol, polihexilenglicol, poliheptilenglicol, polioctilenglicol, polinonilenglicol y polidecilenglicol, en la que dicha composición se administra al paciente de modo que el polialquilenglicol se suministra a través del sistema vascular del paciente al sitio del tejido nervioso lesionado; y opcionalmente un vehículo farmacéutico.
2. Uso de un polialquilenglicol seleccionado del grupo que consiste en polimetilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol, polipentilenglicol, polihexilenglicol, poliheptilenglicol, polioctilenglicol, polinonilenglicol, y polidecilenglicol, y opcionalmente un vehículo farmacéutico para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una lesión de tejido nervioso de la médula espinal o el sistema nervioso central de un paciente mamífero, en el que se restablece o aumenta la conducción de potenciales de acción a través del tejido nervioso lesionado, en el que se administra una cantidad eficaz de dicha composición al paciente de modo que el polialquilenglicol se suministra a través del sistema vascular del paciente al sitio del tejido nervioso lesionado.
3. Composición o uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la/el que dicho polialquilenglicol es polietilenglicol o polipropilenglicol.
4. Composición o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la/el que dicho polialquilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 400 Dalton a aproximadamente 3500 Dalton.
5. Composición o uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la/el que el tejido nervioso lesionado es tejido de médula espinal.
6. Composición o uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la/el que la lesión es una lesión mecánica, traumatismo craneal, hemorragia cerebral, aneurisma cerebral, o lesión por reperfusión.
7. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 6, en la que dicha cantidad eficaz de dicho polialquilenglicol es eficaz para su inyección por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal en el paciente.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que la administración de una cantidad eficaz de dicho polialquilenglicol se realiza usando una técnica seleccionada del grupo que consiste en inyección intravascular, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal.
9. Composición o uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un bloqueante de los canales de potasio.
10. Composición o uso según la reivindicación 9, en la/el que el bloqueante de los canales de potasio es una piridina amino-sustituida.
11. Composición o uso según la reivindicación 10, en la/el que el bloqueante de los canales de potasio es 4-aminopiridina.
12. Composición o uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la/el que el restablecimiento de la función nerviosa se manifiesta por uno o más de un aumento en la conducción de los potenciales de acción, restablecimiento de la continuidad anatómica, restablecimiento de más de un nivel de raíz espinal, y un aumento en el comportamiento reflejo.

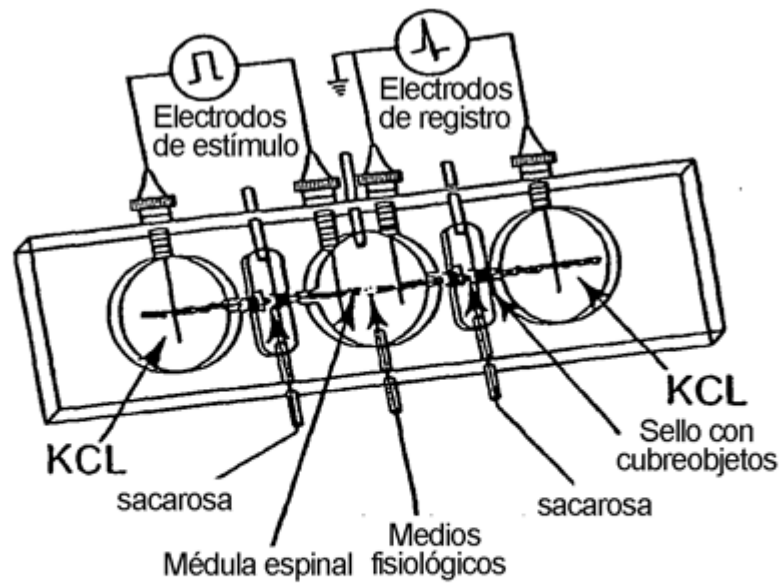


Fig. 1A

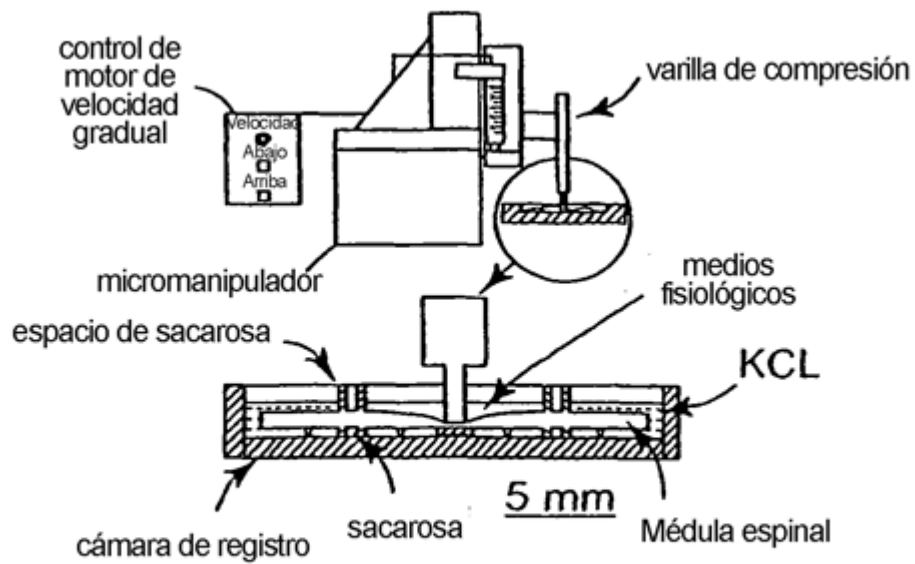


Fig. 1B

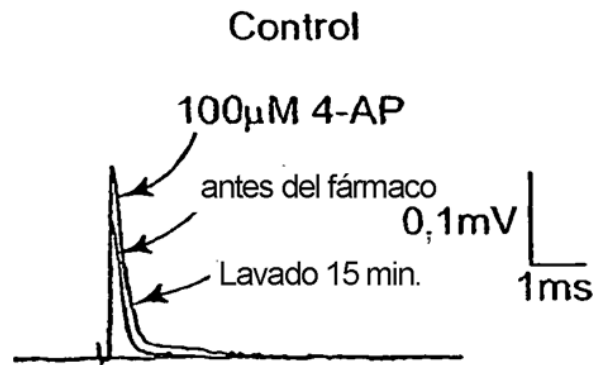


Fig. 2A

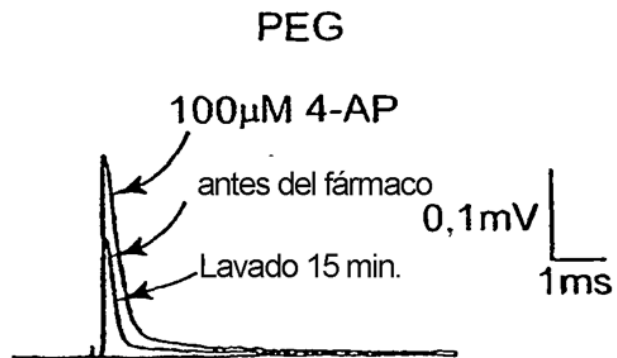


Fig. 2B

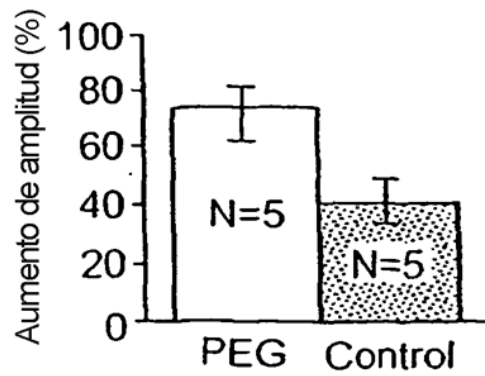


Fig. 2C

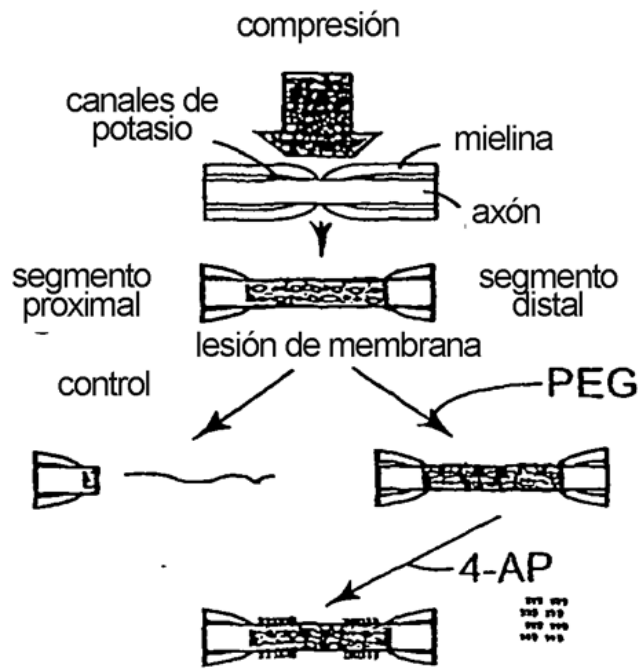


Fig. 3

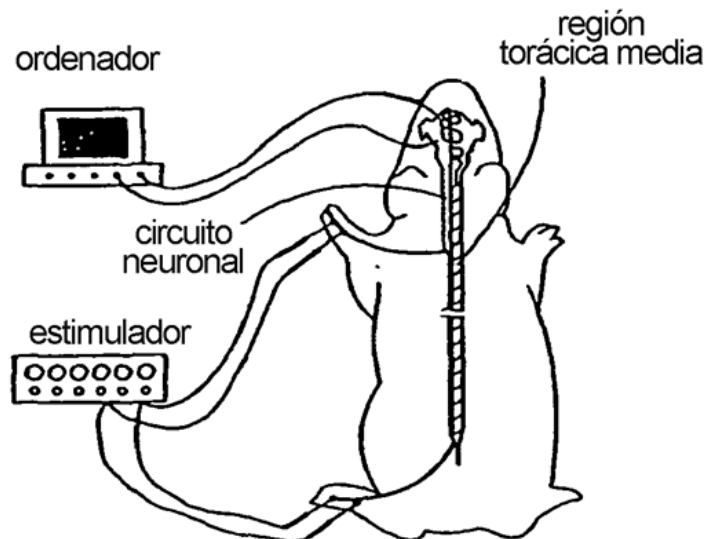


Fig. 4

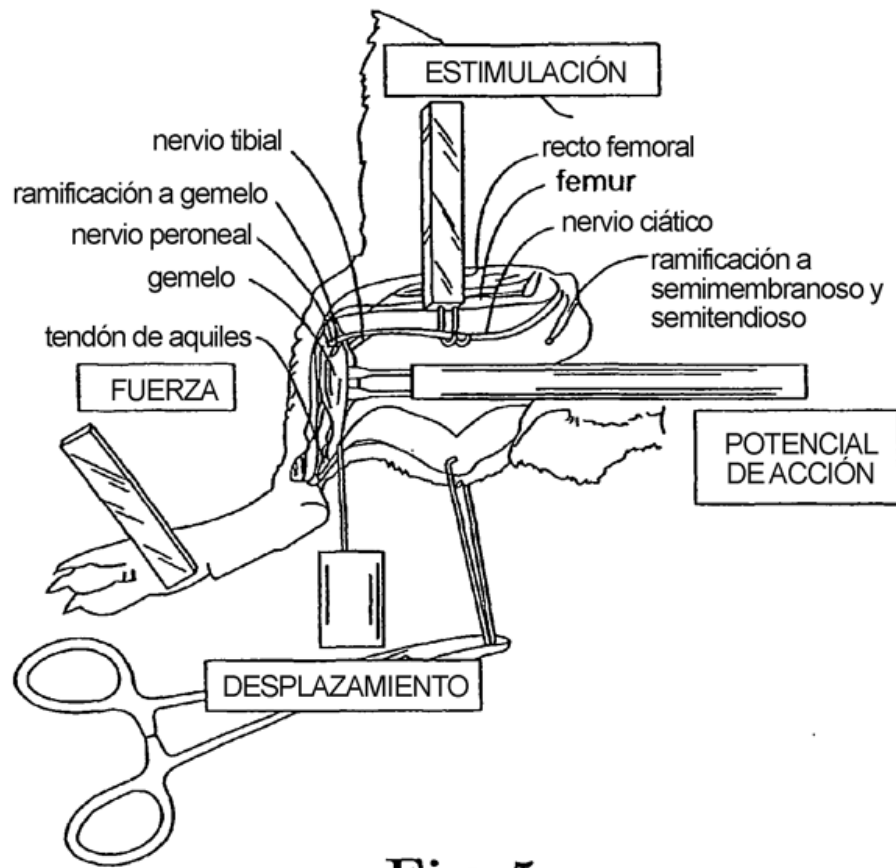


Fig. 5

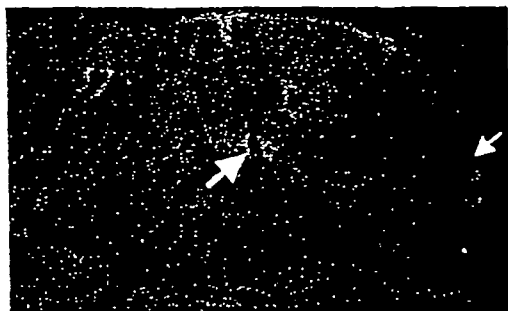


Fig. 6A



Fig. 6B



Fig. 6C

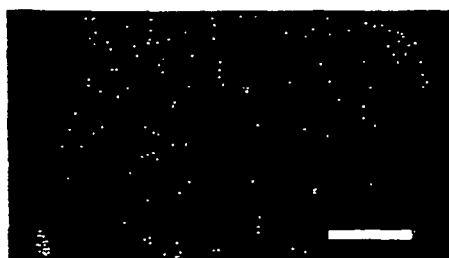


Fig. 6D

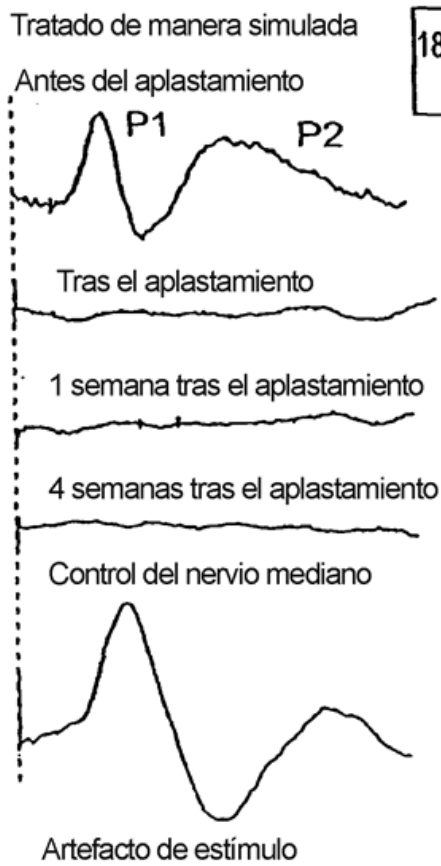


Fig. 7A

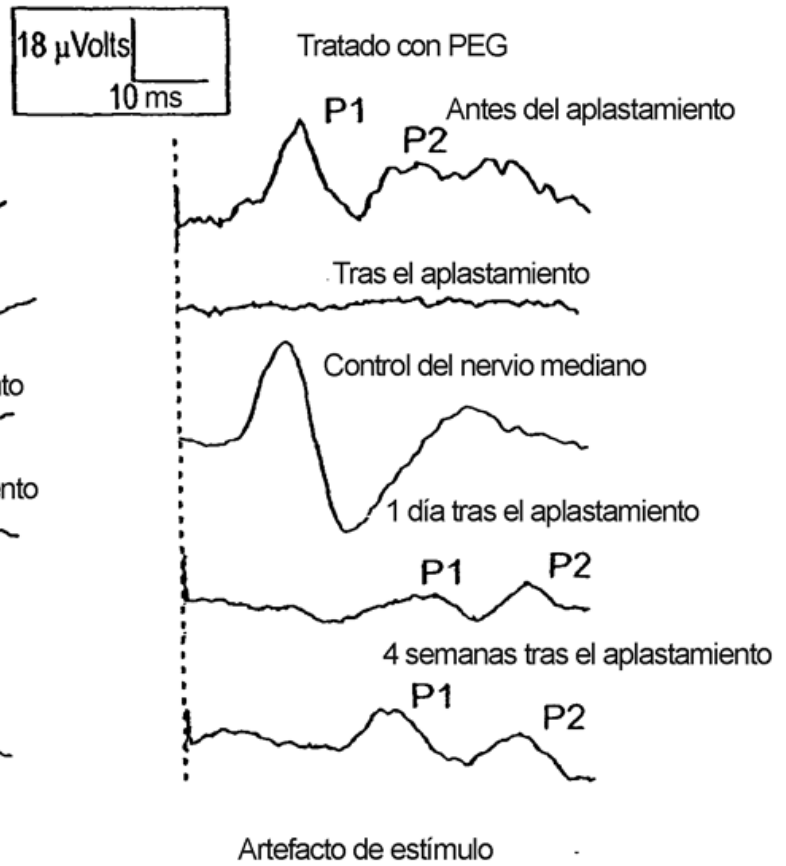
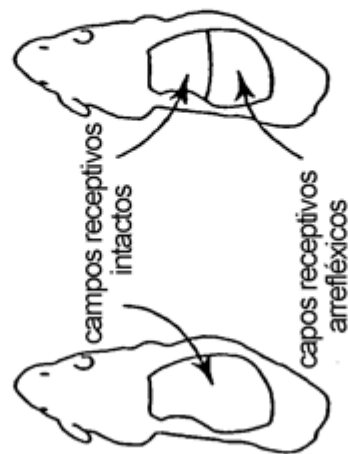


Fig. 7B

Tratado de manera simulada

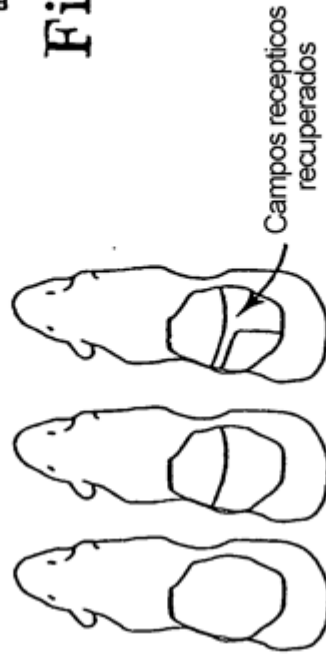


Antes del
aplastamiento

4 semanas
tras el aplastamiento

Fig. 8A

Tratado con PEG



Antes del
aplastamiento

4 semanas
tras el aplastamiento

Fig. 8B



Fig. 8C

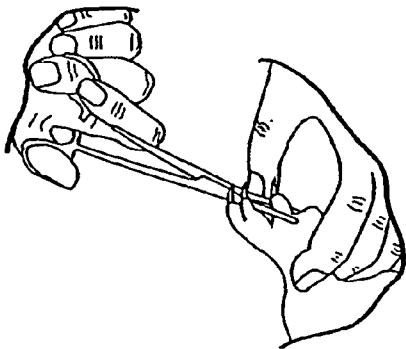


Fig. 9B

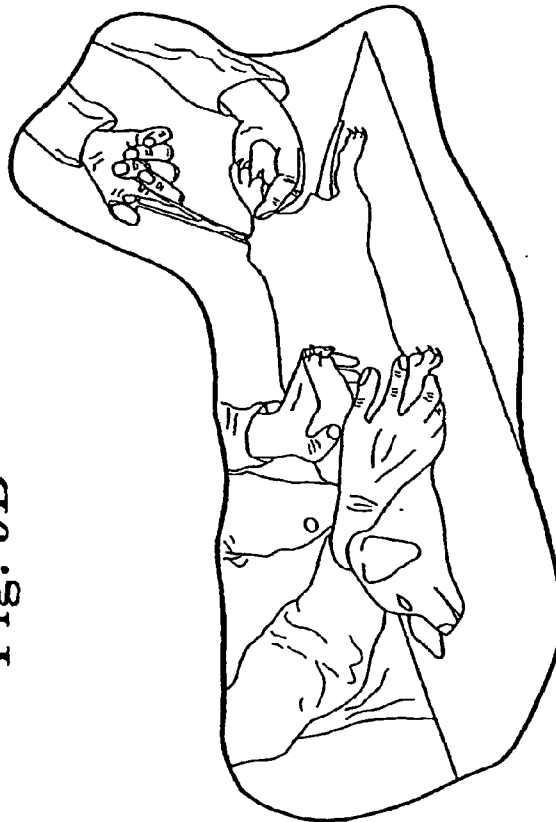


Fig. 9A

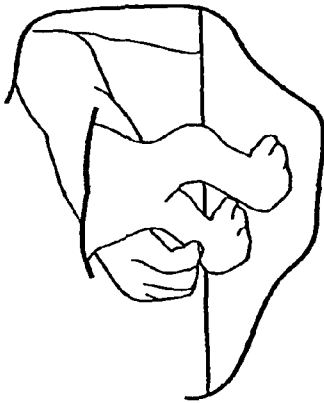


Fig. 9C

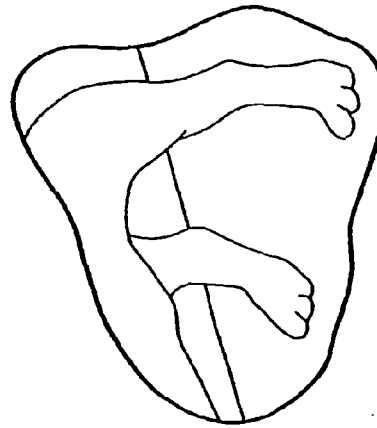


Fig. 9D

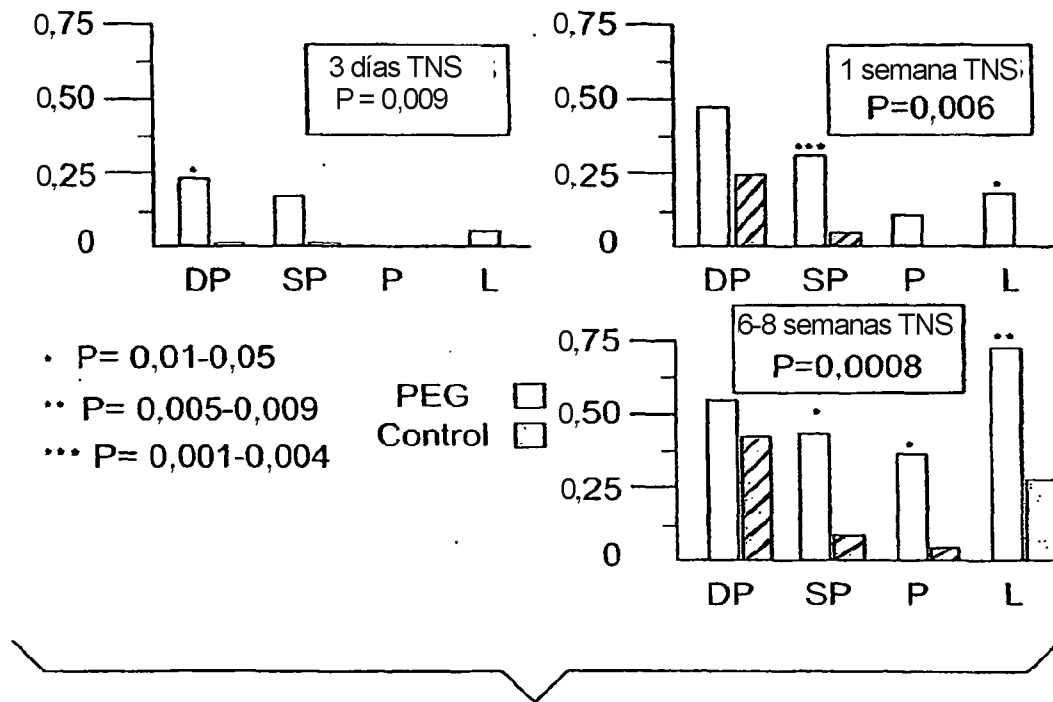


Fig. 9E

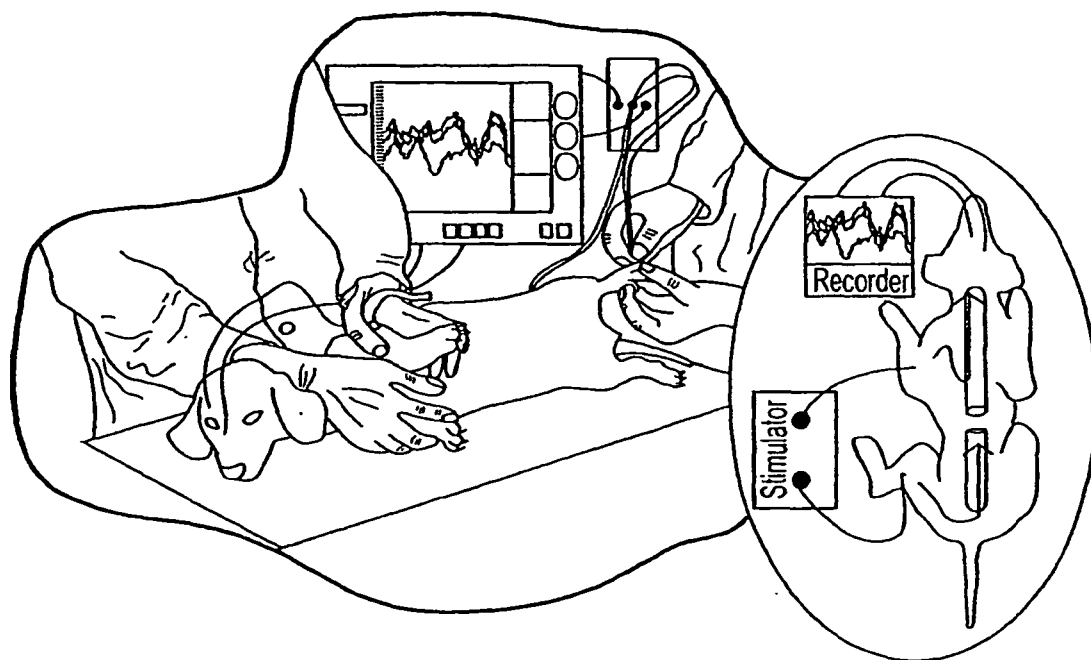


Fig. 10A

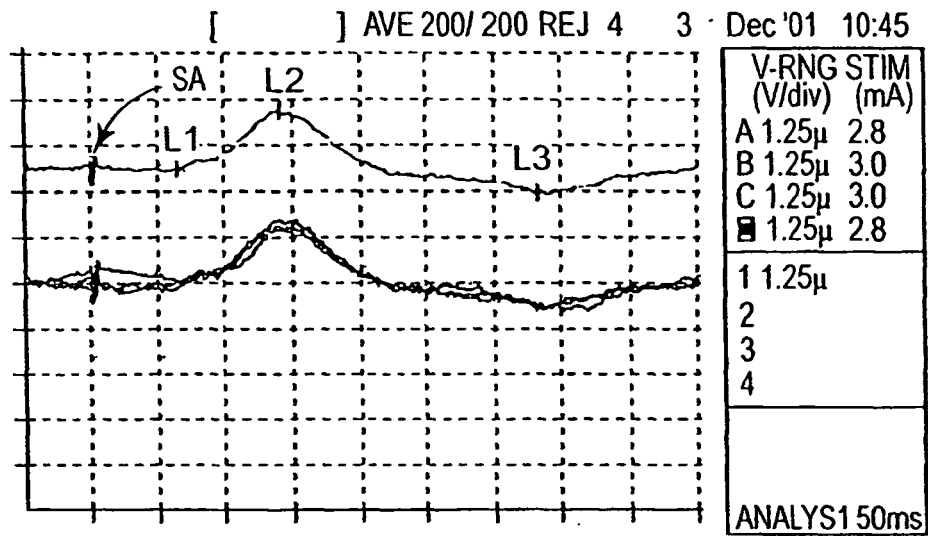


Fig. 10B

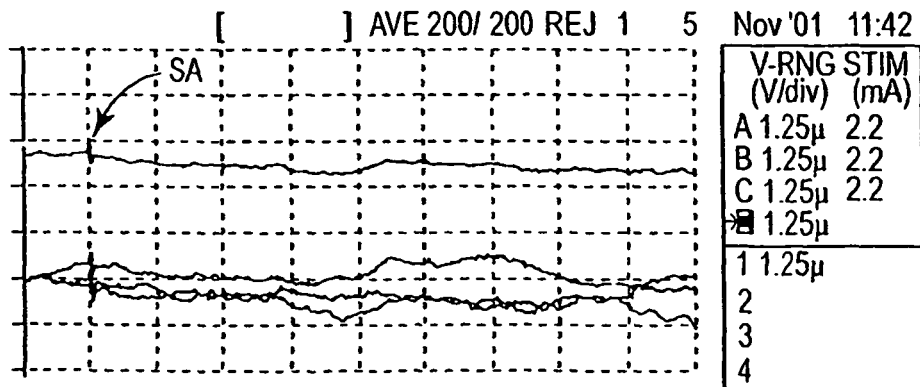


Fig. 10C

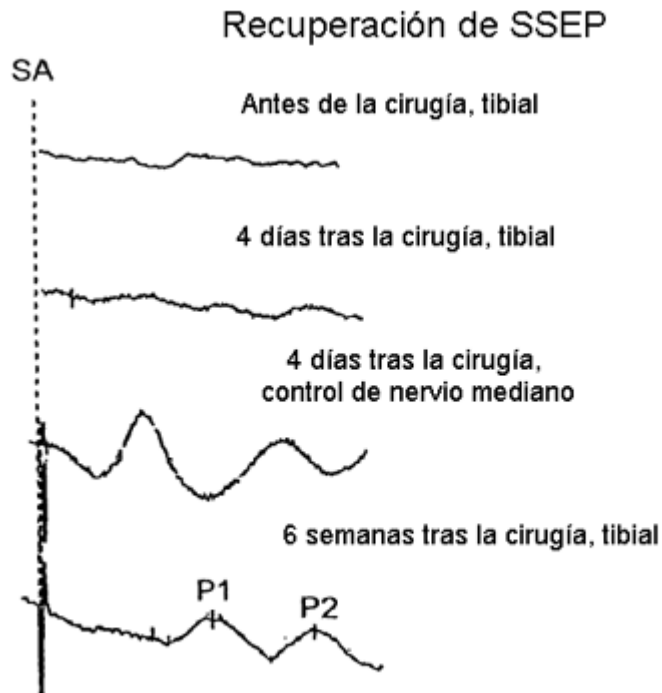


Fig. 11A

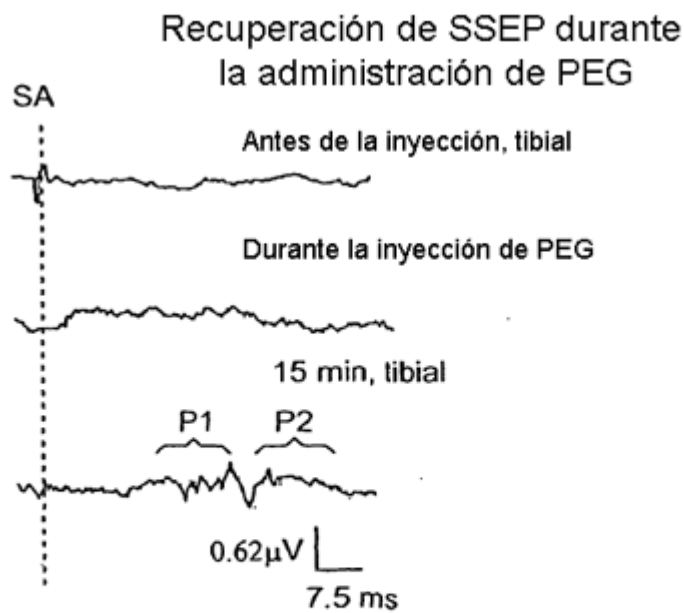


Fig. 11B