

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO DE LA CICLOSPORINA A (CsA) SOBRE LA LIPOPEROXIDACION Y RECUPERACION CLINICA EN RATAS CON LESION TRAUMATICA DE MEDULA ESPINAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

IVONNE ESMERALDA DUARTE UBALDO

ASESORES: DR. JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS
BIOL. MA. DE LOS ANGELES ARACELI DIAZ RUIZ



MEXICO, D. F.

1999.

270806

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo de investigación fue realizado en las instalaciones del Centro de Investigación del Proyecto Camina A.C., y en la Unidad de Investigación Clínica en Neurología y Neurocirugía del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

JURADO:

MVZ. CARLOS VILLAGRAN VELEZ

MVZ CARLOS A. TENA BETANCOURT

MVZ MIGUEL ANGEL MARTÍNEZ CASTILLO

MVZ VERONICA GRAULLERA RIVERA

DEDICATORIA

A ti Señor que siempre has estado a mi lado mostrándome a cada paso tu cariño y confianza.

A mis padres, Miguel y Cristina porque aún en los momentos más difíciles han creído en mí y nunca me han negado su apoyo.

A ti Omar, hermano y gran amigo, por esos momentos maravillosos y porque sin aquellas palabras y actos de apoyo incondicional no hubiese logrado llegar a este día.

A mi mami Rosa a quien me une un lazo de cariño excepcional.

Agradecimientos

Muchas veces en mi vida he olvidado que aquellas cosas más simples hacen de lo pequeño algo extraordinario, es por ello que me permito mencionar a aquellas personas que han formado parte de mi vida enriqueciéndola de mil formas con sus consejos, experiencias y amistad.

A Viviana quien me ha hecho revivir los momentos felices de ternura, inocencia y maldad de la niñez.

A mi gran amiga Alejandra, porque me ha enseñado el verdadero significado de la amistad y ha estado conmigo en una parte muy importante de mi vida.

A mis primos Juan Gabriel y Carmen por esos maravillosos momentos que hemos vivido y por aquellos que aún nos faltan.

A mis tíos Juan y Malena quienes representan mi segundo hogar.

A mis amigos: Lili, Mary, Claudia, Norma, Tere, Caro, Mayda, Carmen, Luis Antonio, Clarita, Gaby, Erika y Wurmuner con quienes he compartido momentos agradables y nunca me dejaron desistir.

Muy especialmente a todos los integrantes de la familia Gutiérrez Olvera por todos los sucesos inolvidables que hemos compartido.

A José, Alicia, Edgar, Lic. Amando y Luis Enrique por la amistad que me han brindado.

A mis profesores quienes me han transmitido sus conocimientos y experiencias a lo largo de mi carrera.

No puedo dejar de mencionar a una gran amiga, la Dra Maricela Ortega quien me introdujo en el maravilloso mundo de la investigación.

Al Dr Ibarra y Araceli, quienes me abrieron mi conocimiento al extraordinario mundo de las neurociencias y se han convertido en unos seres muy queridos.

A los Caminantes: Beto, Angelina, María Luisa, Paty y José Antonio por esas largas charlas que hicieron más ameno el trabajo.

Al Sr Fidel López y Don Guillermo González por el apoyo en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

Resumen	1-2
Introducción	
Generalidades sobre el sistema nervioso.....	3
Generalidades sobre inflamación.....	6
Generalidades sobre lipoperoxidación.....	14
Lesión traumática de médula espinal.....	17
Generalidades sobre ciclosporina A.....	21
Justificación.....	24
Planteamiento del problema.....	24
Hipótesis	25
Objetivos	25
Material y métodos	
Diseño experimental.....	26
Técnicas.....	27
Análisis estadístico.....	29
Consideraciones éticas.....	30
Resultados	
Cuantificación de la lipoperoxidación.....	31
Evaluación clínica.....	31
Discusión	33
Literatura citada	37
Figuras	
Corte transversal de médula espinal.....	42
Médula espinal y estructuras adyacentes.....	42
Estructura general de la neurona.....	43
Daño tisular durante la respuesta inflamatoria.....	43
Acciones destructivas de las especies reactivas de oxígeno.....	44
Mecanismo de acción de la ciclosporina A.....	44
Acciones antiinflamatorias de la ciclosporina A.....	45
Aparato estereotáxico.....	46
Técnica de Triggs y Willmore.....	46
Pruebas clínicas.....	47
Gráficas 1 a 7.....	48-51

RESUMEN

DUARTE UBALDO IVONNE ESMERALDA. *Efecto de la ciclosporina A (CsA A) sobre la lipoperoxidación y recuperación clínica en ratas con lesión traumática de médula espinal.*

Después de que se origina una lesión traumática de médula espinal (LTME) se desencadenan una serie de mecanismos secundarios que destruyen el parénquima medular y ocasionan daños neurológicos irreversibles. Uno de estos mecanismos es la lipoperoxidación, proceso que consiste en el ataque de los radicales libres (RL) a los ácidos grasos de la membrana celular, lo cual genera una reacción en cadena que termina en un daño celular que se traduce en deficiencias motoras permanentes. Después de la lesión, las células fagocíticas llegan en grandes cantidades al sitio dañado y son responsables en gran parte de la producción de RL. La ciclosporina A (CsA) es un fármaco inmunosupresor con actividad antiinflamatoria que en determinado momento podría disminuir la llegada de las células fagocíticas y con ello también disminuiría la producción de RL y consecuentemente la lipoperoxidación que se origina después de una LTME. Además la CsA también ha sido propuesta como fármaco neuroprotector y promotor de la regeneración neuronal, efectos que implicarían muchas más ventajas para lograr una mejor recuperación clínica después de una LTME. Con el objetivo de cuantificar y comparar la lipoperoxidación y recuperación clínica en ratas con LTME sometidas o no a tratamiento con CsA, se estudiaron un total de 94 ratas adultas, hembras de la cepa Wistar con un peso de 250-300g. El estudio en general se dividió dos fases: en la primera fase se realizó la cuantificación de la lipoperoxidación para lo cual se utilizaron 54 ratas divididas en 9 grupos de 6 animales cada uno. De estos grupos uno fue estudiado en condiciones normales (sin ningún procedimiento quirúrgico ni LTME), otros tres grupos fueron sometidos sólo al procedimiento quirúrgico (laminectomía) sin ser lesionados; a uno de ellos se le administró CsA y a otro se le aplicó sulfato ferroso en el sitio de la cirugía. A los 5 grupos restantes se les realizó una lesión severa tipo contusión a nivel de T8-T9, de éstos, 4 recibieron tratamiento con CsA bajo un esquema previamente establecido iniciando en cada grupo a diferentes tiempos: 1, 2, 6 y 12 horas después de la lesión. La cuantificación de la lipoperoxidación se realizó a las 24 horas después del procedimiento quirúrgico mediante la técnica de fluorescencia descrita por Triggs y Willmore. Para la segunda fase (evaluación clínica) se utilizaron 40 ratas divididas en 5 grupos de 8 animales cada uno. En todos los grupos se realizó una lesión tipo contusión, uno de los grupos no recibió tratamiento con CsA y el resto de los grupos fueron sometidos a un tratamiento con CsA bajo un esquema previamente establecido iniciando en cada uno a la 1, 2, 6 y 12 horas después de la lesión. Las pruebas clínicas utilizadas fueron: la prueba del plano inclinado y la prueba de

locomoción libre sobre el piso ó escala de Tarlov. Para la cuantificación de la lipoperoxidación los datos fueron analizados mediante la prueba estadística ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey, mientras que para la evaluación clínica los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Los resultados mostraron una disminución significativa ($p < 0.05$) de la lipoperoxidación en los grupos tratados con CsA en comparación con el grupo no tratado; observándose que dicha disminución fue significativamente mayor en el grupo cuyo tratamiento inició a las 6 horas después de la lesión. Por otra parte las pruebas de evaluación clínica demostraron una mayor recuperación de la función motora en los animales tratados con respecto a los no tratados, a excepción del grupo cuyo tratamiento inició a las 12 horas poslesión. Estos resultados demuestran en primer término, que la administración de CsA disminuye la lipoperoxidación que se origina después de una LTME y además que este podría ser uno de los efectos por los cuales la CsA promueve una mejor recuperación clínica después de una LTME. Este trabajo aporta evidencias sobre un efecto de la CsA no descrito anteriormente y que es relevante para que éste fármaco pudiese ser una alternativa terapéutica en el manejo clínico de la LTME.

INTRODUCCION

El sistema nervioso juega un papel importante en el control y coordinación de casi todas las funciones del organismo. Para su estudio se ha dividido en dos partes: una central integradora denominada sistema nervioso central (SNC), el cual esta integrado por el encéfalo y la médula espinal y una red de comunicaciones denominada sistema nervioso periférico (SNP) que a su vez se divide en: sistema nervioso somático y sistema nervioso autónomo (1).

En el sistema nervioso central la médula espinal es el conducto a través del cual se transmiten las señales sensitivas y motoras entre el cerebro y el cuerpo (2). Cualquier daño que se infrinja a la médula espinal puede interferir con la conducción del impulso nervioso entre las neuronas del cerebro y el cuerpo, ocasionando una pérdida total o parcial de la función motora y sensitiva a partir del nivel de la lesión e incluso a regiones distantes de la misma (3). Según el nivel medular afectado puede originarse parálisis de ambas piernas (paraplejía) o de todos los miembros (tetraplejía) (2,4). De hecho la lesión traumática de la médula espinal (LTME) ha captado el interés de diferentes disciplinas científicas y asistenciales, ya que los daños que ocasiona representan un problema de gran magnitud en el cual se originan una serie de alteraciones sistémicas que rompen con la homeostasis del organismo, lo cual ha llevado al desarrollo de modelos experimentales de lesión medular y al estudio de los fenómenos de neuroplasticidad (crecimiento de colaterales nerviosas) y neurodegeneración (daño neural), además de la evolución de diferentes estrategias terapéuticas, mismos que han sido y siguen siendo de gran utilidad para entender la fisiopatología de la lesión (2,5,6,7).

GENERALIDADES SOBRE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La función del sistema nervioso consiste en recibir y percibir un estímulo, procesar la información y producir una respuesta apropiada del organismo para contribuir a su homeostasis (1). El SNC ejerce diferentes grados de control sensitivo y motor sobre la totalidad de los órganos del cuerpo, para lo cual está en permanente comunicación con ellos por medio de impulsos nerviosos conducidos por las prolongaciones axónicas de las neuronas del SNC y del SNP (8).

Anatomía

El SNC se puede dividir en cinco grandes estructuras:

- ◆ El cerebro o telencéfalo es una estructura formada por la corteza cerebral, constituida por cuatro lóbulos principales: frontal, parietal, occipital y temporal; y el núcleo basal (8). Son estructuras relacionadas con las funciones sensoriales (dolor, tacto y propiocepción), de habilidad motora fina,

actividades de aprendizaje y algunas conductas complejas como las de protección, maternal, sexual y de agresividad (8,9).

- ◆ **Diencefalo:** Región que contiene al tálamo como una estación de retransmisión para los sistemas sensoriales que se proyectan hacia la corteza cerebral y al hipotálamo, el cual controla al sistema nervioso autónomo y la secreción de hormonas hipofisarias (8,9).

- ◆ El tallo cerebral que se divide en tres regiones (8):

Mesencéfalo o cerebro medio: el cual es importante para el movimiento de los ojos y control postural subconsciente, además contiene la formación reticular que es responsable de controlar la conciencia y modificar los reflejos espinales (9).

Metencéfalo: Donde se encuentra el puente. Contiene los nervios trigéminos (par craneal V) y parte de sus núcleos que transmiten sensaciones de dolor y propiocepción de la cabeza, es entrada del nervio craneal VIII y proporciona actividad muscular masticatoria. También se localizan algunos centros respiratorios (8,9).

- ◆ **Mielencéfalo o médula oblongada:** Compuesta por varios núcleos y vías ascendentes o descendentes, en esta región se localizan los nervios craneales VI o abducens, VII o facial, VIII o vestibulococlear, IX o glosofaríngeo, X o vago, XI o espinal y XII o accesorio, los centros que controlan la respiración, la presión sanguínea y el latido cardíaco (8).

- ◆ El Cerebelo, es una estructura formada por numerosas extensiones, su función integral se refiere al control de la actividad motora voluntaria, regulación del tono muscular y mantenimiento del equilibrio (8).

- ◆ La médula espinal es la región más caudal del SNC. Es el relevo sináptico de vías motoras o descendentes que se originan en otras áreas del SNC, así como de vías para la sensación somática originada en receptores de cabeza y miembros (10). Se divide en dos porciones:

1. -La sustancia gris que tiene una forma de H o mariposa y se localiza centralmente (figura 1). Contiene los cuerpos celulares de neuronas sensoriales intermunciales y motoras bajas (10).
2. -La sustancia blanca que está dividida en grupos de axones ascendentes y descendentes llamados tractos, los cuales reciben su nombre de acuerdo al lugar donde inician y donde terminan. Se conocen tres sistemas de TRACTOS SENSORIOS: los espinocerebelares que llevan información inconsciente al cerebelo y participan en la coordinación de movimientos, el sistema dorsal de la columna que involucra a las vías que transportan propiocepción consciente o sensación de posición de miembros y tronco, además de información sobre dolor superficial localizado y el sistema espinotalámico el cual acarrea información de dolor y temperatura de todo el cuerpo. Y cuatro de TRACTOS MOTORES: rubroespinal, corticoespinal o piramidal, vestibuloespinales y

reticuloespinales estos participan en la coordinación de la actividad motora voluntaria y extensora o postural (8).

Para su protección se encuentra dentro de la estructura ósea llamada columna vertebral y además está cubierta por tres membranas de tejido conjuntivo laxo denso [figura 2] (10): la duramadre adherida al periostio de la columna vertebral, la aracnoides que forma proyecciones que la conectan con la piamadre, formando entre ambas el espacio subaracnoideo, donde circula el fluido cerebroespinal o líquido cefalorraquídeo (10).

Histología

Hay dos clases de células en el SNC: Las neuronas, responsables de las funciones características del sistema nervioso y las células de la glía o intersticiales con importantes funciones accesorias. (9,11).

Las neuronas son estructuras especializadas para recibir estímulos y conducir el impulso nervioso. Tienen distintas formas y tamaños, sin embargo todas poseen una estructura básica similar [figura 3] (9,10):

- * Cuerpo celular.- También llamado soma o pericarion, en él se encuentran las estructuras básicas de una célula: núcleo, aparato de Golgi y retículo endoplásmico entre otras (9).
- * Dendritas.- Son extensiones del cuerpo celular en forma de ramas. Funcionan como aparato receptor para recibir señales de neuronas adyacentes (9).
- * Axón.- Es un proceso tubular largo que se extiende desde el soma y termina en las terminales presinápticas. Constituye la unidad de conducción de la neurona. Transmite la información en forma de potenciales de acción. (9,11).
- * Terminales presinápticas.- Llamados botones terminales, transmiten la información a otra célula adyacente (neurona, músculo, glándulas) por medio de señales químicas (neurotransmisores) (10,11).

Las células de la glía se encargan de la protección, nutrición y el sostén del tejido nervioso (Banks 1986). Están representados por:

- Astroцитos.- Son importantes células de sostén y reparación e incluso pueden transformarse en células fagocíticas si existe una lesión. Hay dos clases de astroцитos: fibrosos o protoplásmicos, dependiendo si se encuentran en la sustancia blanca o gris respectivamente. (8,10).
- Oligodendroglíocitos.- Son células que se interdigitan entre los axones y somas de las neuronas. Son responsables de la mielinización de los axones en el SNC (10). La mielina es una membrana lipídica que cubre a los axones en intervalos regulares, estos intervalos son denominados nodos de Ranvier. Funciona como un aislante eléctrico que transmite el impulso eléctrico a una mayor velocidad (9).

- Ependimocitos.- Son células que revisten el conducto neural formado durante el desarrollo embrionario- En adultos tapizan el sistema ventricular del encéfalo y médula espinal. Participan en la formación de LCR (10).
- Microglía: Son células dispersas en el SNC, miembros del sistema reticuloendotelial con función fagocítica en lesiones menores (8,10).

Fisiología

El SNP recibe estímulos y los convierte en información útil como potenciales de acción, los cuales se transmiten al SNC, donde se origina una respuesta refleja o se transmiten a niveles de integración mayores que integran, relacionan e interpretan la información y producen la respuesta como potenciales de acción que se transmiten por las terminales nerviosas del SNC y SNP a sus órganos efectores (10).

Potencial de acción

En estado de reposo, el interior de la membrana celular es negativo, comparado con el exterior (9). Esto se debe principalmente a los iones a los cuales la membrana es semipermeable: Na^+ y K^+ . La concentración de ambos es diferente en el interior con respecto al exterior de la célula: En el interior, el K^+ se encuentra en mayor cantidad a diferencia del Na^+ (cuya concentración es menor), observándose lo contrario en el espacio extracelular (11). Cuando existe un estímulo mecánico o químico capaz de provocar una respuesta, se producen una serie de eventos: la membrana se vuelve permeable al Na^+ , el cual se precipita al interior de la célula, haciendo positivo el interior y negativo el exterior (despolarización). Poco después la membrana se vuelve impermeable al Na^+ y el K^+ sale de la célula (repolarización), entonces el interior se hace negativo con respecto al exterior (9,11). Durante la repolarización el Na^+ se saca activamente y regresa el K^+ por medio de la Bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPasa}$, en una relación 2:1 respectivamente, con lo que se restablece la concentración iónica original. La despolarización ocurre a lo largo del axón hacia su porción terminal donde es liberada la sustancia neurotransmisora, que estimula o inhibe a un receptor, neurona, glándula o músculo (11).

La velocidad de conducción depende del grosor de la vaina de mielina y del diámetro del axón. Mientras mayor es el diámetro del axón y más gruesa la capa de mielina, mayor será la velocidad de conducción (9).

GENERALIDADES SOBRE INFLAMACIÓN

La inflamación es la respuesta de los tejidos a la lesión o a la irritación. Este proceso es un mecanismo protector, cuyo objetivo final es eliminar del organismo el origen de la lesión tisular y sus consecuencias: tejido y células necróticas (12).

En la respuesta inflamatoria participan tejido conectivo, plasma, células circulantes, vasos sanguíneos y constituyentes intra y extracelulares. Según su gravedad y duración se reconocen dos tipos de inflamación: a) la inflamación aguda, caracterizada por la exudación de un líquido rico en proteínas plasmáticas y emigración de leucocitos. Su duración es de minutos a horas y b) la inflamación crónica que tiene una mayor duración y su principal característica es la presencia de linfocitos y macrófagos, así como la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo (12,13).

Inflamación aguda

La inflamación aguda comprende la reacción inmediata y temprana a un agente ofensivo. Esta reacción tiene tres componentes principales:

1. - Alteración en el calibre vascular con cambios en el flujo sanguíneo:

Después de una lesión se presenta una vasoconstricción transitoria de las arteriolas que se continúa por una vasodilatación localizada, lo cual aumenta el flujo sanguíneo durante varias horas. Posteriormente se presenta un aumento en la permeabilidad vascular acompañada por un pequeño retardo en la circulación, que genera la salida de un líquido rico en proteínas (exudado) hacia los tejidos, esto origina la concentración de los eritrocitos en los vasos y un aumento en la viscosidad de la sangre, lo cual produce una estasis sanguínea, en la que se observa la orientación periférica de los leucocitos, principalmente neutrófilos, a lo largo del endotelio vascular (marginación leucocitaria). Después de adherirse a los vasos sanguíneos, los leucocitos emigran hacia los tejidos circundantes, a través de fenestraciones entre las células endoteliales (13).

2.- Cambios estructurales en la vasculatura que permiten que las proteínas plasmáticas y leucocitos salgan de la circulación:

La permeabilidad de los vasos sanguíneos aumenta en dos etapas: la primera aparece inmediatamente y se produce por el efecto de los factores vasoactivos liberados por los tejidos lesionados y la segunda, producida después de varias horas, se debe a la contracción de las células endoteliales y perivasculares, cuya consecuencia es la separación de éstas y el escape del líquido hacia los espacios intercelulares. Otros mecanismos que aumentan la permeabilidad vascular son la necrosis y desprendimiento celular originados por la lesión endotelial directa y mediada por leucocitos, acompañada de adhesión plaquetaria y trombosis (12).

3) Migración de leucocitos desde la microcirculación y su acumulación en el foco de la lesión:

El transporte de leucocitos se puede dividir en:

-Marginación, rodación y adhesión.- Normalmente dentro de los vasos sanguíneos, los eritrocitos y leucocitos están confinados al eje central de la circulación. Sin embargo durante la inflamación, los leucocitos salen de la columna central y se ruedan hacia la periferia, concentrándose a lo largo del endotelio y se adhieren a este en ciertos puntos (marginación). Con el tiempo el endotelio se reviste completamente de leucocitos (pavimentación) (12,13). La adhesión leucocitaria está determinada por la expresión de moléculas de adhesión sobre el leucocito y/o superficie endotelial, algunas de ésta se denominan integrinas, como LFA-1, Mac-1, P150-95, ICAM-1, ELAM-1 y VCAM-1 (14).

-Migración y quimiotaxis.- Después de la pavimentación, los leucocitos se desplazan sobre la superficie endotelial e introducen sus pseudópodos en las uniones interendoteliales adquiriendo una posición entre células endoteliales y membrana basal. Finalmente los leucocitos atraviesan la membrana basal y entonces escapan hacia el espacio extravascular. Tanto neutrófilos como monocitos, linfocitos, eosinófilos y basófilos utilizan este mecanismo para llegar al sitio de la lesión (12).

Los leucocitos llegan al sitio de la lesión por medio de un proceso denominado quimiotaxis. Las sustancias quimiotácticas pueden ser: los productos bacterianos solubles, los componentes del sistema del complemento, especialmente C5a y los productos del metabolismo del ácido araquidónico por la vía lipoxigenasa, principalmente el leucotrieno B₄ (15).

-Fagocitosis y degranulación.- La fagocitosis consiste en el reconocimiento y fijación de la partícula extraña para ser ingerida por el leucocito y ser eliminada o degradada. El reconocimiento y fijación de la partícula extraña se logra por medio de factores séricos conocidos como opsoninas, las cuales se fijan a sus receptores específicos en los leucocitos. Las opsoninas principales son: el fragmento Fc de la inmunoglobulina G y M (IgG e IgM) y el factor C3b del complemento junto con sus receptores FcR y Mac-1 respectivamente (13,15).

Después que las partículas fueron opsonizadas, los leucocitos emiten prolongaciones citoplásmicas (seudópodos) que engloban la partícula y forman la vacuola fagocítica, la cual se fusiona con la membrana de un gránulo lisosómico, formando un fagolisosoma, entonces, el contenido del gránulo lisosómico es liberado (degranulación), dando lugar al paso final en la fagocitosis: la eliminación y degradación del material extraño, mediante las especies de oxígeno reactivo, además de la BPI (proteína que aumenta la permeabilidad bacteriana), lisosima, lactoferrina, algunos péptidos denominados defensinas y el pH ácido que permite la acción de hidrolasas ácidas (12,13).

Mediadores químicos de la inflamación

Los mediadores químicos de la inflamación se originan a partir del plasma o de las células lesionadas o endoteliales, algunos se encuentran en forma de precursores que se deben activar mediante diferentes procesos para poder actuar biológicamente, otros se retienen en los gránulos citoplasmáticos celulares y son sintetizados y/o secretados en respuesta a un estímulo. Una vez activados y liberados, son inactivados o eliminados rápidamente. Su actividad la realizan mediante una fijación a los receptores específicos de células blanco, las cuales también pueden liberar mediadores químicos con actividad similar e incluso opuesta a la acción inicial del mediador (12,15). Entre los mediadores químicos de la inflamación se encuentran:

-Aminas vasoactivas:

Representadas por la histamina y serotonina.

La *histamina* se forma por descarboxilación de la L-histidina. Es almacenada en células cebadas, basófilos y plaquetas y se liberan por degranulación de las células en respuesta a distintos estímulos: traumatismos, calor, reacción inmunitaria, anafilatoxinas y neuropeptidos. Entre sus funciones se encuentran la contracción del músculo liso, con lo cual incrementa la permeabilidad vascular, la quimiotaxis para eosinófilos y bloqueo de la función de linfocitos T, sin embargo dependiendo de los receptores de las células efectoras (H1 o H2) pueden presentarse respuestas inversas (12,13,15).

La *serotonina* se produce por la descarboxilación del 5-hidroxitriptófano. Es almacenada en el tracto gastrointestinal, en el sistema nervioso central y en los gránulos densos de las plaquetas, a pesar de que su papel en la respuesta inflamatoria aún no está claro, se ha observado que la serotonina aumenta la respuesta fagocítica a los quimioatrayentes, el crecimiento de fibroblastos in vitro, y estimula la formación de colágena (15).

- Proteínas plasmáticas:

Sistema cinina. La activación de este sistema conduce a la formación de bradicinina, la cual causa vasodilatación, permeabilidad aumentada, contracción del músculo liso extravascular y actúa sobre la vía del complemento al promover la formación de C5a a partir del componente C5 (12, 15).

El *sistema del complemento* consiste en una serie de proteínas plasmáticas, presentes en forma inactiva en el plasma como C1 a C9, que tienen una importante intervención en la inmunidad y la inflamación. El paso crítico en la elaboración de las funciones del complemento, es la activación de

su tercer componente (C3). Después de que se activa este componente y se genera el factor C3b, se activan los factores restantes, los cuales amplifican el proceso inflamatorio (15).

El factor C5a denominado anafilatoxina, aumenta la permeabilidad vascular y causa vasodilatación al estimular las células cebadas, también activa la vía de la lipooxigenasa en neutrófilos y monocitos, causando síntesis y liberación de mediadores inflamatorios. También causa adhesión de los neutrófilos al epitelio y ejerce quimiotaxia sobre monocitos y neutrófilos (12).

El factor C3b actúa como opsonina y favorece la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos que portan receptores de superficie celular para C3b (12).

El sistema de coagulación es una cascada enzimática cuya acción se desencadena después que se activa el primero de sus componentes: el factor de Hageman (factor XII), debido a la lesión del endotelio vascular. Las reacciones desencadenadas por la activación del factor XII forman grandes cantidades de trombina, la cual actúa sobre el fibrinógeno para producir filamentos insolubles de fibrina (13).

El factor XII también activa el sistema fibrinolítico, que a su vez activa el factor activador del plasminógeno, generando plasmina, esta enzima destruye la fibrina y libera fragmentos peptídicos, que ejercen efectos quimiotácticos sobre los neutrófilos (13).

Además este factor también actúa sobre una proenzima para generar calicreína, que actúa sobre globulinas α plasmáticas, liberando pequeños péptidos que reciben el nombre de cininas (13,15).

- Mediadores de origen lipídico

Eicosanoides: Cuando las membranas celulares son lesionadas, las fosfolipasas celulares son activadas y pueden actuar sobre los fosfolípidos de membrana, liberando ácidos grasos (15). El ácido graso que se encuentra en mayor cantidad en los fosfolípidos de membrana es el ácido araquidónico. Este puede metabolizarse mediante dos vías:

- a) La vía de la ciclooxigenasa que da lugar a la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. Estos metabolitos tienen distintas actividades biológicas, ya que algunos provocan vasoconstricción (TxA₂, PGF₂), otros causan vasodilatación (PGE₁ y PGE₂ y la prostaciclina PGI₁). Además la prostaglandina E₂ aumenta la permeabilidad vascular y parece tener efecto supresor sobre la liberación de mediadores a partir de las células cebadas, linfocitos y fagocitos (15).
- b) La vía de la lipooxigenasa que origina leucotrienos, los cuales producen vasoconstricción (C₄, D₄, E₄) y ejercen un efecto quimiotáctico para neutrófilos y eosinófilos (B₄). LTB₄ puede ser sintetizado por macrófagos y basófilos (13,15).

Factor activador de plaquetas (FAP) que estimula la agregación plaquetaria. Sus acciones son aumentar la permeabilidad vascular, ejercer un efecto quimiotáctico para neutrófilos y estimular la liberación de enzimas lisosomales y productos oxidantes reactivos (15).

-Citocinas

Son polipéptidos producidos por distintas células, principalmente macrófagos y linfocitos, que modulan la función de otros tipos celulares (14,15). Las citocinas proinflamatorias son:

- a) Interleucina 1 (IL-1). - Producida por distintas células, principalmente macrófagos y queratinocitos en respuesta a estímulos como endotoxinas, anafilatoxinas, CSF-1 (factor estimulante de colonias-1), TNF, TGF- β , por el contacto con células T e IL-1 misma. Su producción es inhibida por prostaglandinas, corticoesteroides, interleucina 10 (IL-10). Durante la reacción inflamatoria produce reacciones sistémicas como fiebre, disminución de hierro en plasma y aumento de cobre. Estimula la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular, la producción y proliferación de linfocitos CD4+ y CD8+, la síntesis de interleucinas: IL-2, IL-6, IL-8 e incluso IL-1. Aumenta la función de células presentadoras de antígenos, estimula la liberación de PGE2 y corticoesteroides, induce la maduración y proliferación de células B, síntesis de inmunoglobulinas, aumenta la función de las células asesinas (NK) y estimula la síntesis de monocinas como el TNF (16).
- b) Factor de necrosis tumoral (TNF). - Producida por macrófagos activados y otras células, incluyendo los linfocitos T, que producen una linfoxina (TNF- β) con acciones similares. Su producción es estimulada por IL-1, el factor estimulante de las colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSFs), CSF-1, interferon gamma (IFN- γ) e incluso TNF. Sus propiedades inflamatorias incluyen el aumento en la adhesión, generación del estallido respiratorio y degranulación de neutrófilos, aumento en la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, induce la producción de IL-1 y prostaglandinas en macrófagos, aumenta la proliferación de células presentadoras de antígeno (APC), la expresión del receptor de IL-2 y producción de IFN- γ (16,17).
- c) Interleucina 6 (IL-6). - Producida por macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y algunas células T. Está muy relacionada con IL-1 y TNF, ya que las tres moléculas son moduladoras de su síntesis. Es promotora de la hematopoyesis, induce la proliferación y secreción de inmunoglobulinas en células B, apoya en la proliferación de células T y su respuesta a IL-2, promueve la generación de linfocitos T citotóxicos (CD8+) y aumenta su respuesta a IL-2 (16).
- d) Interferon (IFN). - Son diferentes moléculas clasificadas basándose en las células que las producen: INF- α de leucocitos, IFN- γ de linfocitos e INF β de fibroblastos. Su producción es

estimulada por infecciones virales, componentes bacterianos, parasitarios o fungales, algunas citocinas como CSF-1 y PGDF. El IFN- γ activa a macrófagos, el INF γ - β actúa como cofactor en la mitosis de factores del crecimiento (CSF-1, PDGF y EGT-1 o factor de crecimiento epidérmico), IL-2 e IL-4, aumenta la función de las APC, induce el aumento en la expresión de los antígenos clase II del complejo principal de histocompatibilidad, aumenta la producción de IL-1 y TNF, incrementa la actividad de las células NK, su metabolismo y secreción de moléculas citolíticas, así como la liberación de histamina a partir de basófilos, estimula la proliferación de las células B y de linfocitos CD8+ (17).

e) Factor de crecimiento transformante (TGF- β). - Producido por plaquetas, riñón bovino, macrófagos activados en hueso, linfocitos T y B, algunas células tímicas, médula ósea e hígado fetal. Suprime la proliferación de leucocitos, estimula la angiogénesis y proliferación de células del tejido conectivo, tienen efectos antiproliferativos sobre células epiteliales, endoteliales, de músculo liso, hepatocitos fetales y células linfoides, eritroides y mieloides, inhibe la producción de linfocinas y síntesis del óxido nítrico (ON) a partir de macrófagos activados por INF- γ , inhibe la adhesión endotelial de leucocitos, es quimioatrayente para neutrófilos, linfocitos T y monocitos activados, estimula a los linfocitos CD4+ para diferenciarse a células th-1 productoras de IL-2 e INF α (18).

f) El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)- Producidos por macrófagos, células endoteliales, gránulos plaquetarios y fibroblastos. Estimula la proliferación de fibroblastos, funciona como factor quimiotáctico para neutrófilos y monocitos, estimula la producción de ácido hialurónico, IGF-1 y TGF β , induce la activación de la liberación enzimática, producción de oxígeno reactivo y adhesión de neutrófilos, induce la expresión de quimocinas, aumenta la expresión de los antígenos clase II del complejo principal de histocompatibilidad sobre macrófagos y tiene efectos vasoconstrictores (15).

g) Quimocinas. Su producción es inducida por mediadores endógenos como IL-1, TNF, PGDF e IFN γ (18).

La interleucina 8 (IL-8) es producida por monocitos, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos. Ejerce efecto quimiotáctico sobre neutrófilos, basófilos y células T CD4+ y CD8+, activa la liberación de enzimas a partir de neutrófilos y promueve su adhesión a células endoteliales (18).

El factor estimulante del crecimiento de melanoma (MGSA) es un producto de líneas de células oncogénicas (GRO). Son activadores y quimioatrayentes de neutrófilos. GRO estimula la hematopoyesis por medio de la producción de CSF-1 y GM-CSF. Sus actividades son similares a los de IL-8 (18).

El factor plaquetario 4 (PF4) y el CTAPIII son producidos por monocitos y plaquetas. Son factores quimiotácticos para fibroblastos y neutrófilos (15,18).

ENA 78.- Producido por células epiteliales en respuesta a IL-1 y TNF. Ejerce acción quimiotáctica sobre neutrófilos (15,18).

IP10.- Liberado por monocitos, queratinocitos y células endoteliales en respuesta a INF γ . Funciona como quimioatractivo para linfocitos activados (15,18).

MCAF o MCP-1.- Producido por monocitos, fibroblastos y células endoteliales. Es factor quimiotáctico para monocitos y basófilos, activa la degranulación de monocitos y basófilos, es citostático para células tumorales y regula la expresión de moléculas de adhesión (15,18).

I-309.- conocido como TCA-3, producido por linfocitos activados, actúa como quimioatractivo para monocitos (15,18).

RANTES.- Liberado por monocitos y plaquetas, es factor quimiotáctico para monocitos y células de memoria, promueve la adhesión endotelial de linfocitos T y estimula la degranulación de basófilos (18).

LD-78 o muMIP-1.- Atrae monocitos, linfocitos T activados, principalmente CD8+, linfocitos B y eosinófilos. ACT-2 es una molécula similar a LD-78 que atrae principalmente linfocitos CD4+, activa la producción de TNF, IL-6 e IL-1 a partir de macrófagos. Estimulan la adhesión endotelial de linfocitos T (18).

Como se puede observar, las citocinas estimulan la producción de una cascada de citocinas diferentes que se modulan unas con otras, ya sea potencializando sus efectos o bien contrarrestándolos (12,18).

Inflamación crónica

La transición de aguda a crónica ocurre cuando la respuesta inflamatoria aguda no puede ser resuelta. Se caracteriza por la entrada nociva de células mononucleares que incluyen macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, destrucción tisular y fibrosis (12).

Los *macrófagos* tienen el potencial de ser activados, lo que origina un aumento en el tamaño de la célula, de sus enzimas lisosomales y de su poder fagocítico (15). Las señales de activación incluyen linfocinas secretadas por linfocitos T sensibilizadas, endotoxinas y contacto con superficies cubiertas por fibronectina u otras sustancias químicas, algunas de las cuales se generan durante la inflamación aguda (12). Después de la activación, los macrófagos secretan una gran variedad de productos biológicamente activos (enzimas, proteínas plasmáticas, metabolitos reactivos del oxígeno, productos del metabolismo del ácido araquidónico, citocinas, etc.) que son mediadores importantes de la destrucción tisular característica de la inflamación crónica (15).

Los *linfocitos* son otros tipos celulares presentes que tienen una relación recíproca con los macrófagos. Los linfocitos son activados y producen linfocinas, una de éstas, el $\text{INF-}\gamma$, es un estimulador principal de los macrófagos. Las monocinas (productos de los macrófagos) a su vez activan a los linfocitos que por sí mismos también producen mediadores inflamatorios (12).

Las *células plasmáticas* producen anticuerpos que se dirigen contra componentes alterados de los tejidos (12). Finalmente la fibrosis es una característica de una reacción inflamatoria crónica (12).

Una función crítica de la inflamación es el transporte de leucocitos al sitio de la lesión para eliminar el agente extraño y degradar el tejido necrótico, ya que en muchos casos los leucocitos pueden prolongar la inflamación e inducir el daño tisular [ver figura 4] al liberar sus enzimas lisosomales, mediadores químicos, especies reactivas de oxígeno y productos del metabolismo del ácido araquidónico hacia el espacio extracelular (12,13,15), muchas de estas sustancias provocan el daño tisular mediante el proceso de lipoperoxidación (19,20).

GENERALIDADES SOBRE LIPOPEROXIDACIÓN

La interacción de los radicales libres con los ácidos grasos se denomina lipoperoxidación (21). La lesión tisular mediada por radicales libres (RL) es el resultado de reacciones anormales e incontroladas de estas moléculas con varios compartimentos celulares [ver figura 5] (20). Los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de membrana y el colesterol son las estructuras celulares más susceptibles de ser atacados por los RL. (19, 22).

Radicales libres

Son moléculas altamente reactivas que tienen uno o más electrones desapareados ya sea por pérdida o ganancia de ellos (21). Los radicales libres (RL) conocidos incluyen los singuletes delta y sigma del oxígeno ($^2\text{O}_2$), el anión superóxido ($^1\text{O}_2$) y el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y su principal precursor el peróxido de hidrógeno [H_2O_2] (4). Otros radicales libres son el azufre (S), nitrógeno (N), cloro (Cl), carbono (C), etc., estos radicales son susceptibles de asociarse con el oxígeno y formar otros radicales como el óxido nítrico ($\bullet\text{ON}$). Los metales como el Fe, Mn, Co, Ni y Cu que pueden contener electrones sin aparear también pueden considerarse radicales libres (21,23).

Fuentes de radicales libres

◊ RL de oxígeno: Existe un gran número de fuentes para la formación de este tipo de radicales.

a) *Mitocondria*. Usualmente la mitocondria reduce el 95% del oxígeno consumido por las células a agua por medio del transporte secuencial de cuatro electrones. En condiciones normales el 1 al 2% del flujo

de electrones mitocondrial es transformado en el radical superóxido. El superóxido (1O_2) es eficientemente dismutado a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la enzima superóxido dismutasa (SOD) para evitar que cause daño (21,23).

b)*Catecolaminas*. La fase de isquemia durante un insulto está caracterizada por la liberación de norepinefrina y dopamina a partir de la innervación simpática de la zona. Estas catecolaminas son desdobladas por medio de la enzima monoamino oxidasa, lo cual involucra la oxidación de un sustrato y la producción de electrones, que pueden reaccionar con moléculas de oxígeno y producir radicales hidroxilo ($OH\bullet$) y también peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (4,21,23).

c)*Xantina oxidasa*. Esta enzima realiza la oxidación de hipoxantina y xantina a ácido úrico, reacción en la cual se produce la reducción de oxígeno molecular a superóxido. La xantina oxidasa se ha encontrado en células endoteliales capilares incluyendo los capilares cerebrales, además del parénquima cerebral (4,19,24).

d)*El estallido respiratorio de neutrófilos*. La activación de los fagocitos mononucleares, principalmente neutrófilos involucra el incremento en su consumo de oxígeno, proceso conocido como "estallido respiratorio". Los neutrófilos poseen sobre su superficie la NADPH oxidasa que oxida la NADPH (dinucleótido de nicotinamida adenina reducida), proceso en el cual se reduce el oxígeno a superóxido (1O_2). El 1O_2 es convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), principalmente por dismutación espontánea y otro tanto por la superóxido dismutasa. Luego el H_2O_2 se reduce por la enzima mieloperoxidasa (presente en los granos azurófilos) y presencia de Cl a ácido hipocloroso (HOCl), ambos productos son muy tóxicos (19,20,25).

e)*El radical hidroxilo ($\bullet OH$)* se produce por varios mecanismos, uno de ellos, la reacción de Fenton, se debe a la reacción del peróxido de hidrógeno con sales de hierro: $H_2O_2 + Fe^{2+} = Fe^{3+} + \bullet OH$. Este radical es muy tóxico ya que es capaz de extraer electrones de una gran cantidad de compuestos con la formación de nuevos radicales que pueden oxidar otras sustancias (23).

f)*Macrófagos*. Entre los numerosos productos de secreción de estas células se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS) como son el superóxido (1O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso (HOCl), además de las especies reactivas de nitrógeno que incluyen el óxido nítrico ($\bullet ON$), nitrito y dióxido de nitrógeno (26). El $\bullet ON$ puede formar peroxinitrito, esta molécula puede reaccionar en soluciones acuosas para formar ácido peroxinitroso, el cual mediante rearrreglos

moleculares genera nitrato, $\bullet\text{OH}$ y dióxido de nitrógeno. El peroxinitrito es una molécula que favorece la lipoperoxidación (27).

g) *Cascada del ácido araquidónico*. Durante la producción de metabolitos del ácido araquidónico se generan los radicales superóxido e hidroxilo como subproductos (4, 20).

El proceso de lipoperoxidación

La lipoperoxidación se inicia cuando un radical libre remueve un átomo de hidrógeno de un metileno de la cadena de carbonos de la membrana celular(21,22), esto genera un radical de ácido graso, (ya que existe un electrón desapareado en el átomo de carbono afectado). Después de varios arreglos internos, el radical de ácido graso reacciona con oxígeno molecular produciendo radicales lipoperoxil ($\text{ROO}\bullet$) y alquil lipido (19,21,24), los que a su vez sustraen hidrógeno de otras moléculas de ácidos grasos, produciendo hidroperoxidos de lipido (R-OOH), que se descomponen fácilmente y forman radicales alcoxi ($\text{RO}\bullet$) y peroxi ($\text{ROO}\bullet$) estableciéndose una reacción en cadena durante la cual se liberan productos alifáticos que alteran el núcleo hidrofóbico de la membrana, ocasionando un desarreglo estructural de la misma (20,21,24). El proceso termina al disminuir los sustratos debido a la acción de sustancias endógenas y exógenas antioxidantes (19,20,23).

Defensas antioxidantes del organismo

La toxicidad de los radicales libres es minimizada a través de los mecanismos de defensa celulares como:

**Superóxido dismutasa (SOD)*. Es una enzima que convierte al ion superóxido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se conocen dos formas de esta enzima : la SOD dependiente de manganeso, que se encuentra en la mitocondria y la SOD cobre-zinc que se encuentra en el citosol. El sistema nervioso tiene una cantidad moderada de ésta (20,21,22,23).

* *Catalasa*. Enzima que transforma el H_2O_2 en agua y oxígeno. Se encuentra en grandes cantidades en los peroxisomas del hígado, riñón y eritrocitos, pero no en el SNC (20,21,23).

**Glutation peroxidasa (GSH peroxidasa) y glutacion reductasa*. La GSH peroxidasa es una enzima citosólica cuyo cofactor es el selenio. Transforma el H_2O_2 en dos moléculas de agua, en esta reacción participan dos moléculas de glutacion reducido (GSH) que ceden dos hidrógenos y se forma entre ellas un enlace disulfuro (GSSG) . El glutacion se regenera mediante la glutacion reductasa en presencia de NADPH. Los lipoperoxidos son reducidos en presencia de glutacion. Esta presente en el sistema nervioso en cantidades moderadas (21,22,23).

**Vitamina A.* Incluyendo los betacarotenos y carotenoides de los pigmentos de las plantas. Se ha observado su efecto antioxidante *in vitro*. A altas concentraciones protegen del riesgo de cancer y enfermedades cardiovasculares. Su efecto antioxidante aún no está claro (21,22).

**Vitamina E.* Es un grupo de compuestos entre los cuales el tocoferol es el más importante. Bloquea la cadena de Lipoperoxidación al donar un átomo de hidrógeno al radical peroxilo (ROO•) convirtiéndose en un radical poco reactivo. Su deficiencia causa degeneración de algunos tejidos, principalmente músculo estriado (21,22).

**Vitamina C.* Por una parte recicla radicales tocoferilo, es un buen atrapador de radicales libres y detoxifica contaminantes del aire (ozono, óxidos de nitrógeno), sin embargo en altas concentraciones parece tener efectos prooxidantes. Existe en grandes cantidades en el SNC (21,22).

**Flavonoides y otros fenoles.* Estos productos inhiben las lipooxigenasas y pueden ser prooxidantes al mezclarse con iones de cobre y hierro (21).

**Proteínas que se unen a metales:* Transferrina, ceruloplasmina, ferritina y metalotionina. Distribuidas en diferentes tejidos (20).

El organismo genera radicales libres (RL) en bajas concentraciones como consecuencia del metabolismo realizado en muchos procesos fisiológicos, sin embargo cuando su producción no es controlada, como sucede en muchas condiciones patológicas, los RL se convierten en moléculas demasiado reactivas que llegan a ser destructivas para células y tejidos (20).

LESION TRAUMATICA DE MEDULA ESPINAL (LTME)

La LTME es un término amplio que se refiere al daño causado en la médula espinal debido a innumerables causas que originan condiciones indeseables que pueden culminar con la muerte (3,4).

Antecedentes

Hace 5000 años los egipcios realizaron la primera descripción de una LTME y sus efectos, desde entonces y hasta mediados de los años cuarenta, en este siglo, la mayoría de los pacientes morían durante las primeras semanas a consecuencia del trauma inicial, por infecciones y otras complicaciones sistémicas (28). Posteriormente, con el avance en distintas disciplinas científicas y clínicas (farmacología, rehabilitación, cirugía, etc.) se mejoró notablemente la posibilidad de sobrevivir. A pesar de ello, la incidencia de morbi-mortalidad sigue siendo considerablemente elevada, aún en centros especializados en este tipo de lesión (3,28). El tratamiento médico y la recuperación del individuo tiene un alto costo debido a los recursos tecnológicos que se necesitan y las limitaciones que se observan para reintegrar al individuo a sus actividades productivas (28). En México, a diferencia de

otros países, no se cuenta con un estudio epidemiológico que describa la incidencia, mortalidad, evolución postraumática y el costo de atención médica de este tipo de lesiones.

Fisiopatología de la lesión traumática de médula espinal (LTME)

La LTME ocasiona un daño mecánico directo en el sitio de la lesión. Además existe una lesión retardada que se desarrolla de horas a días después de la lesión mecánica, esto ha permitido dividir la fisiopatología de la LTME en "lesión primaria" y "lesión secundaria" (4).

La *lesión primaria* es el resultado directo del trauma inicial y sus consecuencias varían de acuerdo al tipo e intensidad del mismo (4).

La *lesión secundaria* es producida por una secuencia de eventos que siguen a la lesión primaria. Los estudios experimentales y las observaciones clínicas han establecido que la lesión secundaria de la LTME es originada por una serie de cambios fisiopatológicos tiempo-dependientes, que inician en los primeros minutos de la lesión y continúan durante los siguientes días e incluso meses (4). Las alteraciones que ocurren en el tejido nervioso generan una cascada de eventos que originan una mayor destrucción del parénquima medular y daño neural irreversible (2,4,7,24).

Estos procesos secundarios destructivos incluyen alteraciones bioquímicas como son: disminución de la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPasa}$ (29), la desregulación iónica que lleva al aumento intracelular de calcio y sodio y a la disminución del potasio y magnesio intracelular. El incremento de calcio inhibe las funciones mitocondriales y genera la activación de enzimas líticas como proteasas y fosfolipasas que favorecen la liberación de ácidos grasos a partir de los fosfolípidos de membrana (2,4).

La acción de las fosfolipasas da lugar a la formación de productos propios de la desintegración de la membrana (ácido araquidónico, leucotrienos y tromboxanos), originando la pérdida estructural y funcional de los constituyentes de la membrana (pe: el colesterol) (2,4,29,30).

Además, la producción de radicales libres y peroxidación de lípidos, la acumulación de lactato, liberación de neurotransmisores con efecto tóxico tales como aminoácidos excitatorios, monoaminas y neuropéptidos son mecanismos que también contribuyen a la lesión y muchos de ellos originan la alteración del flujo sanguíneo, isquemia local, formación de edema, necrosis del tejido, desmielinización e inflamación (2,4,30).

Respuesta inflamatoria después de una lesión traumática de médula espinal (LTME)

Casi inmediatamente después del traumatismo ocurre una reacción inflamatoria que involucra la acción de mediadores químicos, como la bradicinina y sus precursores (31), citocinas: interleucina 1,

interleucina 2, interleucina 6, factor de necrosis tumoral alfa (NTF α), etc. (32,33,34) y la participación de células inflamatorias, lo que origina la activación de células inmunológicas residentes (astrocitos y microglia) y de las reclutadas desde la periferia: macrófagos, linfocitos, etc. (35).

La respuesta al trauma involucra dos ondas de infiltración celular (36):

La primera, dominada por células polimorfonucleares (PMN) que predomina durante las primeras horas (36). Los neutrófilos se aparecen en la pared de venas y vénulas adyacentes a la lesión en las primeras 3 a 4 horas (37,38), siendo observados en el tejido hasta las 8 a 24 horas posteriores a la lesión (38). La respuesta inflamatoria se ve reflejada por el aumento en el número de leucocitos en el líquido cefalorraquídeo (39), la infiltración de células PMN en el sitio de lesión (4,38); el incremento en los niveles de leucotrienos (LT), principalmente LT B_4 , así como en la actividad de la mieloperoxidasa (40). Además en estudios experimentales se ha demostrado que entre las 3 y 12 horas posteriores a la lesión, existe un aumento significativo de la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la cual participa en la infiltración tisular de los neutrófilos (41).

La segunda se caracteriza por la presencia de macrófagos, mismos que se observan en los primeros dos días y alcanzan un pico a los 5 a 7 días posesión (36). Dos días posesión existe proliferación y reclutamiento de macrófagos y microglia, siendo mayor de los 4 a 8 días (37), además después de la lesión se han detectado productos de estas células (IL-1) (34). Durante esta fase también se ha observado infiltración linfocitaria de los 3 a los 7 días posesión (35).

A pesar de que se le han conferido efectos benéficos a la respuesta inflamatoria (42.), después una LTME dicha respuesta puede ser la responsable de la necrosis del tejido lesionado y circundante (42,43,44). De hecho la respuesta inflamatoria, es parcialmente responsable de la producción de radicales libres después de una LTME (42,45), dichas moléculas reactivas dañan las células nerviosas y endoteliales originando el fenómeno conocido como lipoperoxidación (23,24).

Lipoperoxidación y lesión traumática de médula espinal (LTME)

Uno de los mecanismos secundarios de la LTME es la lipoperoxidación causada por radicales libres [RL] (4, 23,24,46).

El sistema nervioso es susceptible al daño por RL, debido a que los lípidos de membrana son ricos en colesterol y ácidos grasos poliinsaturados, además de que es rico en hierro y ácido ascórbico (los cuales catalizan la producción de RL) y cuenta con pocas defensas antioxidantes (23), por lo tanto las lesiones al SN promueven un ambiente favorable para la producción de RL y reacciones de lipoperoxidación (46).

La hidrólisis de los fosfolípidos de membrana y liberación de ácidos grasos es un evento bifásico con una fase temprana y otra tardía. La acumulación de ácidos grasos poliinsaturados poslesión muestra un pico inicial que ocurre de los 5 a 15 minutos después del insulto (29), observándose en mayor cantidad a los 30 minutos (4) y recuperando los niveles normales a la hora poslesión. Posteriormente se incrementan de nuevo los niveles a las 4 horas alcanzando un pico máximo a las 24 horas (29). La lipoperoxidación inicia a los 15 minutos de la lesión, elevándose significativamente durante la primera hora, cuatro horas después de la lesión disminuye (47,48,49) para posteriormente incrementarse otra vez hasta alcanzar un pico máximo a las 24 horas (47). Se ha observado que después de una LTME los niveles de la superóxido dismutasa no cambian y los niveles de catalasa y glutatión peroxidasa no se elevan sino hasta después de 24 horas de la lesión (47), lo cual quiere decir que mientras la producción de RL se encuentra aumentada, el tejido medular no cuenta con los mecanismos de defensa antioxidantes para contrarrestarlos (4,23). Así pues, existe un gran desequilibrio y los RL inician la peroxidación de las membranas de las células nerviosas, de la glía y de los vasos sanguíneos (46).

El proceso de lipoperoxidación, una vez iniciado, origina una cascada de reacciones que se traducen en la pérdida de la fluidez de la membrana y de su potencial al aumentar la permeabilidad al calcio, lo cual provoca una reducción en la generación y transmisión del impulso nervioso además de la desintegración de la membrana celular (22,24), a lo que sigue una cascada de eventos que culminan en isquemia tisular y posibles deficiencias neurológicas permanentes (4,46). Por ello diversas investigaciones han conducido al desarrollo de estrategias terapéuticas que limiten el daño ocasionado por la lipoperoxidación, entre los que tenemos la utilización de:

1. Antioxidantes o secuestradores de radicales libres: Estas sustancias se unen a los radicales libres, convirtiéndolos en moléculas menos reactivas. Algunos estudios han demostrado el efecto neuroprotector del tratamiento con Vitamina E, desafortunadamente el tratamiento debe iniciarse antes de la lesión, por lo cual su utilidad clínica es limitada (50). El uso de la vitamina C limita la isquemia postraumática, sin embargo en altas concentraciones ésta se transforma en una sustancia prooxidante, por lo que su utilidad clínica es limitada. La desferroxamina y la superóxido dismutasa han mostrado potencial terapéutico en modelos experimentales de lesión en el SNC (6).
2. Moduladores del metabolismo del ácido araquidónico: De manera experimental se han utilizado inhibidores de la ciclooxigenasa (ibuprofeno) o de la sintetasa de tromboxanos (U63447A), observándose que limitan el desarrollo de la isquemia poslesión y recuperación neurológica (6).
3. Metilprednisolona: Es un glucocorticoide esteroide sintético, utilizado ampliamente por su actividad antiinflamatoria (2,51,52). Se utiliza en el tratamiento de lesiones de médula espinal debido al efecto que tiene sobre la lipoperoxidación, mismo que se debe a la inhibición de la

hidrólisis de lípidos de membrana y formación de prostaglandinas y tromboxanos al inhibir la fosfolipasa A₂. Además tiene otros efectos benéficos: refuerzo del metabolismo energético, prevención del desarrollo de isquemia poslesión y la degradación de neurofilamentos. (51,52), efectos que contribuyen a la atenuación de la degeneración neural postraumática, lo cual ya ha sido demostrado en estudios clínicos (50,51).

4. 21-aminoesteroides (Lazaroides): Son fármacos con una actividad similar a la metilprednisolona, pero carecen de su actividad glucocorticoide (53). Sus acciones farmacológicas incluyen: inhibición de la lipoperoxidación al actuar como secuestrador de radicales libres (específicamente lipoperoxil e hidroxilo), y molécula queladora de hierro (50,53). Actúa manteniendo los niveles de vitamina E después de una lesión al SNC, además actúa sobre el núcleo hidrofóbico de las membranas celulares con un efecto estabilizador sobre éstas (50). En modelos experimentales de *lesión medular* se ha observado que promueve la recuperación clínica de los animales y previene la disminución del flujo sanguíneo (53).
5. Metilaminocromanos: Son fármacos desarrollados a partir de los lazaroides, a los que se reemplaza una parte de su estructura química por la estructura cíclica antioxidante de la vitamina E (pe. el cromanol). Tiene acciones farmacológicas similares a los lazaroides pero en mayor potencia (5 veces aproximadamente). Se ha demostrado un aumento en la recuperación neurológica de ratones con lesión cerebral tratados con éste fármaco (50).
6. Pirilopirimidinas: Fármacos derivados de los lazaroides que han mostrado *in vitro* una actividad 100 veces mayor como inhibidores de la lipoperoxidación que sus antecesores. Su acción como inhibidor de la lipoperoxidación se debe a que es capaz de donar electrones a moléculas reactivas, convirtiéndose en una molécula atrapadora de radicales libres (54).

En algunos de estos casos se han logrado obtener buenos resultados, sin embargo en ninguno de ellos han sido totalmente satisfactorios. Por tal motivo aún se continúa con estudios que buscan la mejor terapia para el tratamiento de la LTME.

Así pues, sabiendo que la respuesta inflamatoria juega un papel importante en la producción de radicales libres y consecuentemente en la lipoperoxidación (42,45), parecería interesante la utilización un fármaco como la ciclosporina A (CsA) que además de tener un efecto inmunosupresor y antiinflamatorio puede tener un importante efecto como neuroprotector y promotor de la regeneración neural (55).

GENERALIDADES SOBRE CICLOSPORINA A (CsA)

La ciclosporina (CsA) es un polipéptido cíclico lipofílico de 11 aminoácidos con un peso molecular de 1,202.6, extraído del hongo *Tolypocladium inflatum* Gams. (56,57). Este fármaco es un

supresor específico de Linfocitos T cooperadores (CD4+ o Th), con efecto directo sobre la respuesta inmune primaria. Su sitio inmunosupresor se localiza en los aminoácidos colocados en las posiciones 1, 2, 3 y 11 (56). Su efecto es inhibir la activación y proliferación de los linfocitos T en forma selectiva, produciendo menor toxicidad al no actuar sobre la proliferación de otras células (56,58).

Mecanismo de acción

La ciclosporina A (CsA) penetra al interior de la célula, donde se une a una proteína citoplasmática: la ciclofilina (CyPA), formando un complejo denominado ciclofilina-ciclosporina A (CyPA-CSA) (58,59). El complejo CyPA-CsA se une a la molécula citoplasmática calcineurina, inhibiendo su actividad de fosfatasa lo cual impide la entrada al compartimiento citosólico del factor de activación nuclear de células T (NF-ATc), evitando así la transcripción del RNA_m que codifica la producción de IL2 y otras citocinas (57,59), impidiendo la producción de éstas moléculas y con ello la inhibición de otros eventos inmunológicos [ver figura 6] (55,57).

Absorción

La CsA se administra mediante la vía intravenosa y oral. Cuando se administra por vía intravenosa, el total de la dosis ingresa a la circulación, sin embargo su absorción por vía oral es muy variable debido a la absorción lenta e incompleta que se lleva a cabo en el intestino delgado, en un proceso dependiente de la secreción biliar, de tal manera que su absorción es alterada en problemas biliares (colestasis) o gastrointestinales (hipomotilidad, retardo en vaciamiento gástrico, diarrea, etc.) (56).

Distribución

Este fármaco se une, en su mayor parte, con lipoproteínas de alta, baja y muy baja densidad y quilomicrones, encontrándose libre en plasma en pequeñas cantidades (56). Se deposita en mayor cantidad en el hígado, seguido por el páncreas, grasa, sangre, corazón, pulmón, riñón, tejido muscular y nervioso (56).

Metabolismo

La CsA se metaboliza en el hígado mediante la vía de la citocromooxidasa P450, identificándose hasta 12 metabolitos los cuales conservan su estructura cíclica. La administración con drogas que interactuen con el sistema de la citocromooxidasa P450, como el ketoconazol, nifampicina, metilprednisolona, fenobarbital, entre otros, afecta su biodisponibilidad (56,57).

Eliminación

Su eliminación ocurre en un 94% a través de la bilis y sólo un 6% por vía renal (56).

Acciones

Además de funcionar como inmunosupresor la CsA también ejerce una acción antiinflamatoria al inhibir la transcripción de interleucina 2 (IL-2) y de otras citocinas (57) como: la interleucina 6 (IL-6) que es un potente citocina proinflamatoria, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que aumenta la expresión de moléculas de adhesión celular y es un potente activador de neutrófilos (17), la IL-8 que es un agente quimiotáctico muy potente para neutrófilos, la IL-4 que estimula la degranulación de mastocitos y basófilos, células inflamatorias por excelencia, IL-5 que estimula la degranulación de eosinófilos, así como del interferon gamma (IFN γ) que estimula a los macrófagos para la producción de IL-1, que es una citocina inflamatoria muy activa (15). Sin embargo existen evidencias de que la CsA ejerce algunos de sus efectos antiinflamatorios independientemente de la inhibición de la transcripción de estas citocinas [ver figura 7] (60). Al unirse a la ciclofilina, la CsA inhibe la actividad proinflamatoria de ésta molécula, ya que la ciclofilina extracelular secretada por los macrófagos desempeña un papel importante como citocina proinflamatoria (61). Además la CsA también actúa como un potente inhibidor de la liberación de histamina a partir de las células cebadas (62). Es capaz de inhibir la degranulación de basófilos (59) e incluso algunos trabajos han sugerido que posee la capacidad de inhibir la vía de la ciclooxigenasa en el metabolismo del ácido araquidónico, evitando la liberación de prostaglandina D₂, que es una sustancia con acciones inflamatorias importantes (62). Más aún, como la calcineurina es una molécula importante para la motilidad de los neutrófilos, la CsA es capaz de evitar la motilidad de los neutrófilos y con ello su llegada al sitio de lesión (63). También podría evitar la muerte celular por calcio de neuronas y células inmunológicas, debido a que la calcineurina participa en la muerte celular activada por calcio de estas células (60) y, por otra parte, podría funcionar como agente neuroprotector, al evitar la producción de óxido nítrico, o como un agente promotor del crecimiento axonal, al permitir la actividad de la proteína estimuladora del crecimiento axonal GAP-43 (55).

Se han observado alteraciones nerviosas como depresión, dolor de cabeza, somnolencia e incluso temores, también dermatológicas (hiperplasia gingival) y gastrointestinales (diarrea, náusea, vómito), además necrosis hepática, colestasis, osteoporosis, trombosis y necrosis tubular renal (56).

La ciclosporina A (CsA) es un fármaco accesible cuyos resultados en la clínica apoyan su eficacia. A diferencia de otras drogas se han realizado estudios sobre su farmacocinética en modelos de LTME (64) con el establecimiento de su esquema de administración en los mismos (65). Se ha

observado que la administración de CsA en animales con LTME podría promover la regeneración axonal y la recuperación funcional (55, 66) Esta recuperación posiblemente se deba a la acción inmunosupresora del fármaco (CsA) que inhibe los mecanismos autoinmunes y la respuesta inflamatoria que impiden la regeneración axonal (35,36,66), no obstante, el mecanismo de acción de la CsA sugiere que la regeneración axonal observada en experimentos previos (55,66) puede deberse a mecanismos no inmunomediados como podría ser el efecto neuroprotector al actuar sobre la óxido nítrico sintasa (ONS) o como un agente promotor del crecimiento axonal, al permitir la actividad de la proteína estimuladora del crecimiento axonal GAP-43 (55).

Justificación

La producción de radicales libres (RL) es uno de los eventos secundarios que promueven el daño en el tejido neural e impiden la regeneración después de una lesión traumática de médula espinal (LTME) (2,4), por ello se han desarrollado estudios sobre estrategias terapéuticas que disminuyan el efecto dañino mediado por RL (lipoperoxidación) (7). Una fuente importante de radicales libres lo constituyen las células inflamatorias (19,21,25) que llegan en gran cantidad inmediatamente después de la lesión (35,36,42). La CsA es un fármaco que podría ser de gran utilidad para disminuir la respuesta inflamatoria y con ello disminuir el daño causado por los RL, promoviendo así la recuperación clínica después de una LTME. Actualmente no existen estudios que evalúen el efecto de la CsA sobre la lipoperoxidación después de una LTME

Planteamiento del problema

- ¿Debido a la acción antiinflamatoria de la ciclosporina A, la administración de ésta disminuirá la lipoperoxidación en la zona de lesión después de una LTME?
- Si la administración de ciclosporina A disminuye la lipoperoxidación y con ello el daño al tejido neural, entonces ¿Promoverá una mejor recuperación clínica en animales lesionados?

HIPÓTESIS

- La administración de CsA disminuirá los niveles de lipoperoxidación en la zona de lesión después de una LTME.
- La administración de CsA promoverá una mayor recuperación clínica de los animales con LTME.

OBJETIVOS:

1. - Cuantificar y comparar la lipoperoxidación en la zona de lesión en ratas con y sin tratamiento con Ciclosporina A.
2. - Evaluar y comparar el grado de recuperación clínica en ratas lesionadas con y sin tratamiento con ciclosporina A.

MATERIAL Y METODOS

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron un total de 94 ratas adultas de la cepa Wistar, hembras, con un peso de 200-250 gr. Los animales fueron proporcionados por el centro de investigación del PROYECTO CAMINA A.C. Durante el desarrollo del proyecto a todos los animales se les proporcionó agua y alimento *ad-libitum*. El alimento proporcionado se encuentra en presentación de pellet, de marca nacional.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio experimental se dividió en dos partes:

Parte 1. -Cuantificación de la lipoperoxidación en el sitio de la lesión.

Se utilizaron 54 ratas distribuidas en ocho grupos de 6 animales cada uno con las siguientes características:

Grupo I. Ratas sin laminectomía, sin lesión traumática de médula espinal (LTME) y sin tratamiento.

Grupo II. Ratas con laminectomía y sin tratamiento.

Grupo III. Ratas con laminectomía y con tratamiento.

Grupo IV. Ratas con laminectomía y aplicación de sulfato ferroso (FeSO_4)

Grupo V. Ratas con LTME, sin tratamiento.

Grupo VI. Ratas con LTME, con tratamiento 1 hora después de la lesión.

Grupo VII. Ratas con LTME, con tratamiento 2 horas después de la lesión.

Grupo VIII. Ratas con LTME, con tratamiento 6 horas después de la lesión.

Grupo IX. Ratas con LTME, con tratamiento 12 horas después de la lesión.

Los animales fueron sacrificados a las 24 horas posteriores al procedimiento quirúrgico.

La cuantificación de la lipoperoxidación se realizó por medio de la técnica descrita por Triggs y Willmore para determinar los productos fluorescentes de la lipoperoxidación (67).

Nota importante: El grupo IV se agregó al diseño experimental debido a que el sulfato ferroso (FeSO_4) es un prooxidante muy poderoso de tal manera que nos permitió tener un control de la lipoperoxidación y demostrar la veracidad de la técnica.

Parte 2.-Evaluación de la recuperación clínica.

Se utilizaron 40 ratas distribuidas en cinco grupos de 8 animales cada uno con las siguientes características:

Grupo I. Ratas con LTME, sin tratamiento

Grupo II. Ratas con LTME, con tratamiento 1 hora después de la lesión.

Grupo III. Ratas con LTME, con tratamiento 2 horas después de la lesión.

Grupo IV. Ratas con LTME, con tratamiento 6 horas después de la lesión.

Grupo V. Ratas con LTME, con tratamiento 12 horas después de la lesión.

Las ratas se evaluaron durante los 30 días siguientes a la lesión mediante dos pruebas que permiten detectar el grado de recuperación funcional. Se realizó la evaluación clínica mediante la prueba de locomoción libre sobre el piso (68) diariamente durante los primeros 10 días poslesión, los siguientes 10 días se evaluaron cada 3er día y por último cada ocho días hasta su sacrificio. La otra prueba utilizada fue la prueba del plano inclinado (69) que se realizó cada tercer día durante la primera semana poslesión y posteriormente cada 5 días hasta su sacrificio (día 30 poslesión).

TECNICAS

Cirugía y lesión

A excepción del grupo I correspondiente a la parte I de este trabajo, todos los animales fueron sometidos al siguiente procedimiento: Se anestesiaron con pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg de peso vía intraperitoneal. Previa asepsia del área toraco-lumbar, se incidieron 2 cm de piel entre los niveles T4 a T12 para exponer el músculo e incidirlo longitudinalmente de tal manera que se expusieron los procesos espinosos vertebrales, posteriormente se realizó una laminectomía a nivel de T8-T9 para exponer la médula espinal sin dañar las meninges. En los animales que fueron sometidos a LTME, la lesión se realizó mediante el método de Allen modificado para ratas (70), el cual consiste en colocar al animal en un aparato estereotáxico y dejar caer sobre la médula espinal expuesta un peso de 15 gramos a través de un tubo guía, a una altura de 10 cm [figura 8]. La lesión se verificó mediante la observación bajo microscopio de la presencia de un hematoma central en el área de impacto. Finalmente se cerró por planos mediante la sutura con Vycril 4-0 y se aplicó un cicatrizante tópico.

Administración de CsA

Dado que el calibre venoso de la especie utilizada es muy pequeño, resulta muy difícil la aplicación endovenosa del fármaco utilizado, por lo que para facilitar el manejo de los animales se eligió administrar la ciclosporina A vía intraperitoneal a una dosis de 2.5mg/kg cada 12 horas (65), solo durante las primeras 72 horas después de la lesión. Se utilizó ciclosporina A solución intravenosa, en presentación de 50 mg/ml (Sandimmune^{MR}, Sandoz), la cual se diluyó en una solución de cloruro de sodio al 0.9%, mezclándose mediante agitación a 2000 r.p.m. durante dos minutos. De la mezcla se tomaba la cantidad necesaria para inyectar la dosis correspondiente mediante una jeringa de insulina estéril, previa agitación de la mezcla.

Aplicación del sulfato ferroso (FeSO₄)

Para el grupo con sulfato ferroso, éste se aplicó directamente en el sitio de la laminectomía. Se utilizó 1 µl de FeSO₄ a una molaridad de 0.2M.

Cuidados posquirúrgicos

Después de la lesión los animales se colocaron en una incubadora (unidad de cuidados intensivos) donde se proporciona temperatura y humedad controlada. En el caso de la fase experimental 2 (evaluación clínica); los animales fueron colocados en un cuarto de alojamiento para su posterior evaluación clínica dentro de cajas de poliestireno, con cama de viruta de madera estéril, la cual se cambió diariamente. La vejiga urinaria e intestino fueron estimulados manualmente cada 12 horas hasta la recuperación de su automatismo.

Cuantificación de Lipoperoxidación

Se realizó por medio de la técnica descrita por Triggs y Wilmore (67) para determinar las bases de Shiff y el polimalondialdehído; que son productos finales de la lipoperoxidación con capacidad de emitir fluorescencia con un espectro de 370 nm de excitación y 430 nm de emisión [figura 9].

Previo sacrificio de cada animal, se obtuvo un segmento de médula espinal de aproximadamente 1 cm, éste fue pesado y posteriormente homogeneizado en 3 ml de solución salina. De ésta mezcla se tomó 1 ml al cual se adicionaron 4 ml de una solución de cloroformo--metanol preparada en una proporción de 2:1 respectivamente. Después de una ligera agitación por 10 segundos, la mezcla se dejó en refrigeración durante 30 minutos bajo condiciones de oscuridad (esto permite la separación de la mezcla en dos fases: cloroformica y metanólica). Posteriormente la fase metanólica fue eliminada y se utilizó 1 ml de la fase cloroformica a la cual se incorporó 0.1 ml de metanol. Previa agitación manual, la mezcla fue leída en un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Helmer MPF-44A, calibrado a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión.

Antes de la lectura se ajustó la sensibilidad del espectrofotómetro a 330 unidades de fluorescencia con una solución estándar de quinina (1microg/ml). La solución estándar de quinina se preparó de la siguiente manera: Se mezclaron 10 mg de quinina en 100 ml de H₂SO₄ al 0.5 M. De ésta mezcla se tomó 0.1 ml y se aforó a 100 ml de H₂SO₄ a partir de la cual se tomaron 0.9 ml para medir la fluorescencia y ajustarla.

Los resultados se expresaron en unidades de fluorescencia por gramo de tejido.

Parte2.-Evaluación de la recuperación clínica.

Antes de ser sometidos al procedimiento quirúrgico, todos los animales utilizados para esta parte del proyecto fueron evaluados por medio de dos pruebas:

a)Prueba de locomoción libre sobre el piso.

Se realizó mediante la escala de Tarlov (68), la cual evalúa el grado de recuperación en la locomoción del tren posterior sobre la base de 6 grados [figura 10]:

Grado 0: No se observa movilidad en las extremidades posteriores.

Grado 1.-Movimientos de tipo reflejo.

Grado 2.-Movimientos voluntarios de las patas, incoordinados con la marcha, sin base de sustentación.

Grado 3.-Movimientos coordinados y voluntarios de los miembros posteriores, con base de sustentación, sin embargo aún pierde el equilibrio.

Grado 4.-Movimientos coordinados y voluntarios de los miembros posteriores, con base de sustentación, sin perder el equilibrio, pero se observan alteraciones en la base de soporte.

Grado 5.- Marcha normal.

b)Prueba del Plano inclinado

Prueba diseñada por Rivlin y Tator (69) que evalúa la capacidad que tienen los animales para soportar su propio peso al ser levantados en una plataforma [figura 10]. El animal se coloca en una tabla de corcho con posibilidad de inclinarse de los 0 a los 90 grados. La posición de la tabla se va modificando de 5 en 5 grados, anotando el número máximo de grados que el animal tolera sin caer durante 5 segundos. Se evalúan tres posiciones diferentes: Cabeza arriba, derecha e izquierda.

Análisis estadístico

Cuantificación de la lipoperoxidación

Debido a que la distribución de los resultados fue homogénea, se realizó una ANOVA de una vía seguida por la prueba de Tukey, considerando significativa una $p = 0 < 0.05$.

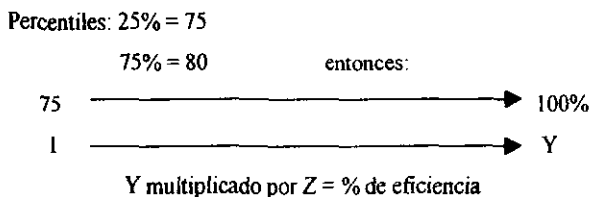
Evaluación de la recuperación clínica

Para conocer la diferencia estadística entre los grupos estudiados experimentales en cada día de la evaluación, se realizó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, tomándose como significativa una $p = 0 < 0.05$

Consideraciones técnicas para la evaluación clínica

Para ambas pruebas se tomó como base de comparación los valores obtenidos en todos los animales antes de ser lesionados. Primero se obtuvieron los parámetros de normalidad, considerando como límites de normalidad a los valores encontrados entre el percentil 25 y 75 (de la curva de distribución). Los valores del percentil 25 se consideraron como el 100% de la eficiencia de la prueba. La asignación de 0 o 100% se obtuvo de la siguiente manera: primeramente se realizó una regla de tres, en donde el 100% fue el valor de la percentila 25 y se obtuvo el porcentaje correspondiente a cada unidad, posteriormente el porcentaje buscado se obtuvo en función del valor obtenido en la prueba clínica.

Ejemplo:



Donde:

Y = Factor (porcentaje correspondiente a cada unidad)

Z = Valor obtenido en la prueba clínica

Consideraciones éticas

Para la realización de este proyecto los animales fueron manejados bajo los lineamientos establecidos por el Reglamento para el Cuidado y Uso de los Animales en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, aprobado por el H. Consejo Técnico en 1988. Además se tomaron en cuenta los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud [Título séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación, Ley General de Salud 1990} (71).

RESULTADOS

CUANTIFICACION DE LA LIPOPEROXIDACION

En la Gráfica 1 se muestran los resultados obtenidos al cuantificar la lipoperoxidación en los 8 grupos estudiados. Se puede observar la lipoperoxidación en los animales que no fueron sometidos a procedimientos quirúrgicos (normales), la cual fué similar a los valores de los animales con laminectomía y estadísticamente menor a la de las ratas que fueron lesionadas ($p < 0.05$). En lo que respecta a los animales laminectomizados tratados o no con CsA, la lipoperoxidación fue muy similar entre ellos. En cuanto al grupo con laminectomía y sulfato ferroso (FeSO_4) se observa que existe un aumento en la lipoperoxidación en gran cantidad, lo que demuestra que la técnica estuvo bien realizada. Por otra parte, los animales lesionados y tratados con CsA mostraron también una lipoperoxidación que fue significativamente menor ($p < 0.05$) a la presentada por los animales lesionados no tratados, llegando a ser hasta 77% menor cuando el fármaco se administró 1 h después de la lesión. Sin embargo, cuando la CsA se administró 12 h después de la lesión, dicha disminución sólo llegó a ser del 34%.

EVALUACION CLINICA

Plano inclinado

Los resultados obtenidos en el plano inclinado en posición vertical se muestran en la Gráfica 2. Se observa que hasta el día 25 el grupo con tratamiento iniciado a las 2 horas después de la LTME presentó una mejor recuperación funcional (66%) con relación al grupo sin tratamiento (59.9%). En el resto de los grupos tratados no se presentó dicha diferencia, finalizando con una recuperación funcional igual a la presentada por el grupo no tratado (59.9%). No existieron diferencias significativas entre los grupos ($p=0.3$).

Los resultados obtenidos al día 30 después de la lesión se observan en la Gráfica 3. No existe diferencia en el porcentaje de recuperación alcanzada entre los grupos tratados con CsA y el grupo no tratado. Únicamente el grupo con CsA a las 2 horas alcanzó un porcentaje de inclinación 7% mayor al grupo sin tratamiento, sin embargo, no existió diferencia estadística ($p=0.3$).

La Gráfica 4 muestra los resultados en la evaluación clínica de plano inclinado en posición horizontal. Se observa que los grupos con tratamiento con CsA alcanzaron una mejor recuperación clínica que el grupo de los animales lesionados (entre 5 y 10% más). Se puede observar que los grupos cuyo tratamiento inició a la 1ª y 2ª hora después de la lesión mostraron una recuperación

mayor que los otros grupos tratados (con inicio de tratamiento a las 6 y 12 horas). No hubo diferencia estadísticamente significativa en ningún grupo. ($p=0.08$)

Los resultados obtenidos en la evaluación clínica del plano inclinado en posición horizontal al final del tiempo de estudio (30 días) se muestran en la Gráfica 5. Todos los grupos tratados presentaron una mejor recuperación que el grupo sin tratamiento, el incremento en la recuperación fue de 5% (grupos con tratamiento a las 1, 6 y 12 horas) hasta 9% en el grupo con tratamiento a las 2 horas posesión. Estos valores no muestran diferencia estadística significativa ($p=0.08$)

Escala de Tarlov

La Gráfica 6 muestra la recuperación funcional entre el grupo con LTME sin tratamiento y los grupos con LTME y tratamiento con CsA iniciado a diferentes tiempos después de la lesión. Se observa que 10 días después de la lesión, los animales tratados con CsA presentaron una mejor recuperación al compararse con los animales del grupo no tratado, la cual se mantuvo hasta el final del estudio. Entre los grupos de animales tratados, el grupo cuyo tratamiento inició a las 6 horas fue el que obtuvo un porcentaje mayor de recuperación (55%) que los otros grupos, más aún este es el único grupo que presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.02$), no así en los otros grupos ($p=0.90$)

En la Gráfica 7 se muestra el porcentaje de recuperación clínica alcanzada al final del tiempo de estudio (30 días). En todos los grupos con tratamiento (CsA) existe un porcentaje de recuperación mayor en comparación al grupo sin tratamiento. Este incremento en el porcentaje de recuperación va de un 3% en el grupo con tratamiento iniciado a las 12 horas hasta un 13% en el grupo con tratamiento iniciado a las 6 horas posesión. La diferencia significativa con respecto al grupo sin tratamiento solo se presentó en el grupo con CsA a las 6 horas ($p=0.02$).

DISCUSION

Una lesión al sistema nervioso promueve la producción de radicales libres y con ello reacciones de lipoperoxidación (46). Estos procesos forman parte de la serie de mecanismos autodestructivos responsables del daño tisular irreversible que se observa después de una LTME y que se traduce en deficiencias neurológicas permanentes (4,24,30,46). Por ello, entre las diferentes estrategias terapéuticas utilizadas en el tratamiento de la LTME se ha recurrido al empleo de sustancias que eviten el daño ocasionado por la lipoperoxidación, ya sea al actuar como secuestradores de radicales libres (como la vitamina D o vitamina C) o bien al actuar sobre las fuentes productoras de éstas moléculas: metabolismo del ácido araquidónico, metabolismo de la xantina oxidasa e incluso sobre la respuesta inflamatoria (6,50). Con respecto a ésta última se ha observado que el empleo de agentes antiinflamatorios disminuye la necrosis progresiva y la extensión del daño secundario a una LTME (43,72,73,74). La acción benéfica de éstas sustancias se ha atribuido a su efecto sobre la producción de radicales libres y lipoperoxidación, sin embargo, muchos de éstos estudios no han basado el esquema de tratamiento en el conocimiento de la farmacocinética de la droga, lo que dificulta la interpretación de los resultados y limita su utilidad clínica (6), así pues, es necesario la realización de estudios con fármacos cuya investigación farmacológica esté bien establecida y que además muestren tener efectos benéficos sobre los procesos destructivos secundarios a una LTME (2,6,42,44). Debido a la acción antiinflamatoria de la CsA, éste fármaco podría ser de gran utilidad al disminuir el daño causado por los RL, promoviendo así la recuperación clínica después de una LTME.

El presente trabajo permite demostrar que los valores obtenidos en los animales laminectomizados son muy similares a los provenientes de los animales sin ningún procedimiento quirúrgico, esto demuestra que la realización de la laminectomía no lesiona el tejido medular e indica que éste procedimiento no influye sobre los resultados que se observan en los animales lesionados sin tratamiento, en los cuales se observa un aumento significativo de la lipoperoxidación.

Por otra parte se observó que la administración de CsA a diferentes tiempos después de la lesión provocó una disminución significativa de la lipoperoxidación con relación a los animales lesionados sin tratamiento. Estos resultados demuestran por primera vez que la administración de la ciclosporina (CsA) disminuye la lipoperoxidación en ratas con LTME. Además, es importante mencionar que la disminución de la lipoperoxidación fue variable dependiendo del tiempo en que se administró la CsA, observándose que al iniciar el tratamiento durante las primeras 6 horas la lipoperoxidación disminuyó en gran proporción, no así en el grupo de animales cuyo tratamiento inició a las 12 horas después de la lesión. La disminución significativa de la lipoperoxidación

observada en los distintos grupos con tratamiento sugiere que la CsA puede actuar en distintas vías involucradas en la producción de radicales libres y consecuentemente en la peroxidación de lípidos. Primeramente la disminución en la lipoperoxidación podría deberse en gran parte a que la CsA ejerce una acción inhibitoria sobre la migración de los neutrófilos (63), ya que al inhibir la llegada de éstos al sitio de lesión, impide la producción de radicales libres a partir de éstas células y consecuentemente disminuye la lipoperoxidación. Por otra parte, el efecto observado en éste trabajo también podría ser el resultado de la acción inhibitoria de la CsA sobre la vía de la ciclooxigenasa (62) ya que al inhibir a la ciclooxigenasa, estaría disminuyendo la producción de los radicales superóxido e hidroxilo que se generan como subproductos durante la producción de metabolitos del ácido araquidónico (4,21,23). Otro mecanismo probable del efecto de la CsA observado en este trabajo puede deberse a que éste fármaco inhibe la sintasa del óxido nítrico (ONS -del inglés óxido nítrico synthase) (55), la cual es una enzima que produce el óxido nítrico, mismo que es un radical libre que también favorece la lipoperoxidación (27,75). Por último, los resultados muestran que al administrarse la CsA 12 horas después de la lesión se observó un incremento en la lipoperoxidación en comparación con los grupos que iniciaron el tratamiento durante las primeras 6 horas después de la lesión, esta diferencia puede explicarse porque de acuerdo a la cinética de la lipoperoxidación, ésta muestra dos marcados incrementos, uno de los cuales se inicia hacia las 8-9 horas postlesión (47,49), de tal manera que al iniciar el tratamiento hasta las 12 horas después de la lesión, la CsA ejerce su acción benéfica al disminuir la lipoperoxidación, pero tal efecto no es similar al observado en los animales tratados durante las primeras 6 horas porque en éstos la lipoperoxidación es controlada desde su inicio y se evita con ello la posibilidad de que aumente con el tiempo, mientras que al iniciar hasta 12 horas después de la lesión se ha permitido que se desarrolle el segundo aumento en los niveles de lipoperoxidación y por tanto la acción del fármaco es menor.

Así pues, la reducción en la lipoperoxidación observada en los animales tratados con CsA se asoció a la mejor recuperación funcional observada en las pruebas de evaluación clínica en los animales tratados con CsA con respecto a los no tratados. Aunque no todos los resultados mostraron una diferencia significativa, la realidad es que en todos los animales tratados, sin importar la hora de inicio del tratamiento, se observó una tendencia a la mejor recuperación clínica. En este caso la falta de significancia, pudo deberse al tamaño de la muestra, por lo cual es necesario incrementar el número de animales en estudios posteriores. Sin embargo el porcentaje de recuperación de los animales tratados con CsA alcanzó hasta un 13% más que los animales sin tratamiento, tal resultado fue mayor en un 4% al obtenido en estudios realizados con metilprednisolona en los cuales la mejoría clínica observada (de un 9% mejor que los pacientes no tratados) es considerada buena a tal

grado que actualmente es el fármaco de elección en la fase aguda de la LTME (4,50,76), por lo que éstos resultados apoyan incluso la aplicación de la CsA en humanos con LTME.

Sí bien estos resultados apoyan lo mencionado por Faden y colaboradores (29), respecto a que las disfunciones motoras que siguen a la lesión medular, pueden ser modificadas mediante un tratamiento adecuado que inicie dentro de las primeras 24 horas posteriores a la lesión, también hacen pensar que el margen para iniciar alguna estrategia terapéutica debe realizarse lo más rápido posible después de la lesión, ya que en el presente trabajo el grado de recuperación obtenido al final del estudio varío dependiendo del tiempo de inicio del tratamiento, observándose una mejor recuperación clínica en los animales cuyo tratamiento se inició durante las primeras 6 horas poslesión, no así en los animales que iniciaron su tratamiento a las 12 horas, con lo que podemos observar que si bien tenemos hasta 12 horas para disminuir el efecto nocivo de la lipoperoxidación, no es así para la recuperación clínica, para la cual iniciar el tratamiento 12 horas después del traumatismo ya es muy tarde. En otros estudios se ha observado una mejor recuperación funcional en animales tratados con CsA que en animales sin tratamiento (55,66), sin embargo, en esos estudios se evaluó el efecto de la administración de la CsA a largo plazo, lo que podría incluir fenómenos de regeneración propiamente dichos, a diferencia de este trabajo en el cual la administración de CsA fue a corto plazo (72 horas), lo que indicaría que la recuperación observada puede deberse a la inhibición de fenómenos de fase aguda como la lipoperoxidación. Se han realizado estudios experimentales con otros fármacos antiinflamatorios como la naloxona (73), indometacina (43) y la metilprednisolona (72) en los cuales se demuestra la capacidad de éstos para disminuir la lipoperoxidación, sin embargo, con la CsA por su mecanismo de acción existe la posibilidad de adicionar otros efectos benéficos como la inhibición del óxido nítrico, la promoción de la regeneración y la inhibición de la respuesta autoinmune secundaria a una LTME (55) lo que la convierte en un fármaco con grandes perspectivas. Además, el hecho de que la CsA, favorezca una mejor recuperación clínica en los animales con tratamiento (55,66), de que cuente con un esquema de tratamiento basado en estudios farmacocinéticos (64,65), se encuentre disponible en el mercado, y que a diferencia de otros fármacos cuya efectividad sólo es observada si se administra antes de la lesión (6,50) o dentro de las primeras dos horas poslesión (6,45,50,72,73); tiene la posibilidad de poder administrarse hasta 6 horas después de la lesión, la convierten en un buen candidato para ser tomada en consideración como una alternativa terapéutica en el tratamiento de la LTME.

Por otra parte, la metilprednisolona es un fármaco ampliamente utilizado en la LTME (50,76) y aunque aún no se sabe el mecanismo acto por el cual disminuye la lipoperoxidación, su dosis óptima en estudios experimentales aún no está bien definida y no todos los estudios experimentales muestran resultados satisfactorios, es el fármaco con el cual se deben comparar los

nuevos tratamientos en la LTME (53,72), por lo que se hace necesario realizar un estudio comparativo de la CsA con la metilprednisolona, así como determinar si tienen efectos antagonicos o sumatorios.

CONCLUSIONES

1. La administración de la ciclosporina A después de una LTME disminuye la lipoperoxidación.
2. El límite de tiempo para iniciar el tratamiento con CsA y disminuir la lipoperoxidación es de 6 horas después de la lesión.
3. La disminución en la lipoperoxidación, se traduce en una mayor recuperación de la actividad motora.

PERSPECTIVAS

1. En estudios posteriores es importante esclarecer cual es el mecanismo por el cual la CsA actúa sobre la lipoperoxidación.
2. Realizar la comparación de la CsA con la metilprednisolona en cuanto a su efecto sobre la lipoperoxidación, preservación del tejido y recuperación clínica, así como su posible efecto antagonico o sumatorio.

LITERATURA CITADA

1. Sumano LH, Ocampo CL. *Farmacología veterinaria*. México: McGraw-Hill, 1992.
2. Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Pharmacol Rev* 1996;41:404-416.
3. Das GD, Das KG, Brasko J, Riedl M, Rai P, Rajeswari V. Spinal traumas: some postoperative complications in experimental animals. *Brain Res Bull* 1989;22:33-37.
4. Braund KG, Shores A, Brawner WR. The etiology, pathology and pathophysiology of acute spinal trauma. *Vet Med* 1990;85:684-691.
5. Das GD. Perspectives in natomy and pathology of paraplegia in experimenta animals. *Brain Res Bull* 1989;22:7-32.
6. Faden A, Salzman S. Pharmacological strategies in CNS trauma. *TIPS* 1992;13:29-35.
7. Guizar SG. *Transplantes a la médula espinal postraumatica como modelo de neuroprotección (tesis de maestría en ciencias biomédicas)*. México, D.F. México:Facultad de Medicine. UNAM, 1992.
8. Valadez RJ. *Neuroanatomía funcional*. LUNAF. México:INNyN, UNAM, 1998.
9. Cunningham JG. *Fisiología veterinaria*. México: Interamericana. 1994.
10. Banks WJ. *Histología veterinaria aplicada*. México: El Manual Moderno, 1986.
11. Browser D. *Introduction to the anatomy and physiology of the nervous system*. 5a ed. United States:Blackwell Scientific publications, 1988.
12. Kumar SL, Cotran P, Robbins W. *Patología humana*. México:Interamericana. 1995.
13. Tizard I. *Inmunología veterinaria*. México:Interamericana, 1989.
14. Osborn L. Endothelial adhesion molecules in inflammation. *Cell* 1990;62:3-5.
15. Gallin JI. Inflammation. In William EP, editor. *Fundamental immunology*. New York:Raven Press, 1993: 1015-1032.
16. Akira S, Hirano T, Tga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional citokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J* 1990;4:2860-2867.
17. Klebannof SJ, Vadas MA, Harlan JM. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1986;136:4220-4225.
18. Oppenheim JJ, Zachariae C, Mukaida N, Matsuschuma K. Properties of the novel proinflammatory supergene citokine family. *Annu Rev Immunol* 1991; 1278-1280.

19. Treinen MM. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. *Exp Med Biol* 1994;336:17-27.
20. Catherin A. Formation of free radical and mechanism of action in normal biological processes and pathological states. In Rice-Evans, Burden RH. *Free radical damage and its control*. Netherlands:Elsevier Science, 1994:131-153.
21. Zentella PM, Saldaña BY. Papel fisiológico de los radicales libres. *Bol Educ Bioq* 1996; 15: 152-161.
22. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen radical and the nervous system. *TINS* 1985;8:12-25.
23. Ikeda Y, Long M. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurg* 1990;27:1-11.
24. Brown SA, Hall ED. Role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of shock and trauma, with focus on central nervous system injuries. *J Am Vet Med Assoc* 1992;200:1849-1858.
25. Thelen M, Dewald B, Baggiolini M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Pharmacol Rev* 1993;73:797-821.
26. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 1988;141:2407-2412.
27. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991;288: 481-487.
28. Stover SI, Fine PR. The epidemiology and economics of spinal cord injury. *Paraplegia* 1987; 25:225-228.
29. Faden AI, Chan PH, Longar S. Alterations in lipid metabolism, Na⁺,K⁺--ATPase activity and tissue water content of spinal cord following experimental traumatic injury. *J Neurochem* 1987;48:1809_1816.
30. Horrocks LA, Demediuk P, Saunder RD, Dugan L, Clendenon NR, Means ED, et al. The degradation of phospholipids, formation of metabolites of arachidonic acid and demyelination following experimental spinal cord injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 1985; 2:115-120.
31. Francel PC. Bradykinin and neuronal injury. *J Neurotrauma* 1992;9 Suppl 1:S27-S45.
32. Segal IJ, Gonzalez E, Yousefi S, Jamshidipour L, Brunnemann S. Circulating levels of IL-2r, ICAM-1 and IL-6 in spinal cord injuries. *Arch Phys Med Rehabil* 1997;78:44-47.
33. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Harada N, Johno M et al. Activated protein C reduces the severity of compression-induced spinal cord injury in rats by inhibiting activation of leukocytes. *J neurosci* 1998;18:1393-1398.
34. Wang CX, Olschwaka JA, Wrathall JR. Increase of interleukin-1 Beta mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat. *Brain Res* 1997;759:190-196.

35. Popovich PG, Weip P, Stokes BT. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol* 1997;377:443-464.
36. Blight AR. Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1992; 9 Suppl 1: S83-S91.
37. Dussart I, Schwab ME. Secondary cell death and the inflammation reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J neurosci* 1994; 6:712-724.
38. Means ED, Anderson DK. Neuronophagia by leukocytes in experimental spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 1983;42:707-719.
39. Travlos A, Anthon HO, Wing DC. Cerebrospinal fluid cell count following spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 1994;75:293-296.
40. Hsu CY, Halushka PV, Hogan EL, Cox RD. Increased thromboxane level in experimental spinal cord injury. *J Neurol Sci* 1986;74:289-296.
41. Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Nakauchi K, Niwa M, Kawai Y, et al. Involvement of an intercellular adhesion molecule, 1-dependent pathway in the pathogenesis of secondary changes after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 1996; 66:1525-1531.
42. Lotan M, Schwartz M. Crosstalk between the immune system and the nervous system in response to injury: implication for regeneration. *FASEB J* 1994;8:1026-1033.
43. Zhang Z, Krebs CJ, Guth L. Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. *Exp Neurol* 1997;143:141-152.
44. Rothwell NJ, Relton JK. Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the CNS. *Neurosci Biobehav Rev* 1993;17:217-227.
45. Taoka Y, Okajim K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, et al. Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neurosci* 1997;79:1177-1182.
46. Hall ED. Free radical in central nervous system injury. In Rice-Evans, Burden RH. *Free radical damage and its control*. Netherlands: Elsevier Science, 1994: 217-230.
47. Azbill RD, Mu X, Buce-Keller AJ, Mattson MP, Springer JE. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res* 1997;765:283-290.
48. Barut S, Cambolat A, Bilge T, Cocknesel B, Kaya U. Lipid peroxidation in experimental cord injury: time-level relationship. *Neurosurg Rev* 1993;16:53-59.
49. Quian H, Liu D. The time of course of malondialdehyde production following impact injury to rat spinal cord as measured by microdialysis and high pressure liquid chromatography. *Neurochem Res* 1997;22:1231-1236.
50. Hall ED, Yonkers PA, Andrus PK, Cox WJ, Anderson DK. Biochemistry and pharmacology of lipid antioxidants in acute brain spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1992;9 Suppl 2:S425-S442.

51. Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg* 1992;76:13-22.
52. Xu JA, Qu ZX, Hogan EL, Perot LJ: Protective effect of methylprednisolone on vascular injury in rat spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1992;9:245-253.
53. Coates JR, Sorjonen DC, Simpson ST, Cox RN, Wright CJ, Hudson AA, Finn Bodner ST, et al. Clinicopathology effect of a 21-Aminoosteroid compound (U74389G) on high dose methylprednisolone on spinal cord function after stimulated spinal cord trauma. *Vet Surg* 1995;24:128139.
54. Hall ED, Andrus PK, Smith SL, Fleck TJ, Scherch HM, Lutzke BS, et al. Pyrrolopyrimidines: novel Brain-penetrating antioxidants with neuroprotective activity in brain injury and ischemia models. *L Pharmacol Exp Ther* 1997;281:895-904.
55. Ibarra AJA. Efecto de la inmunodepresión sobre el proceso de degeneración de la médula espinal lesionada experimentalmente (tesis de doctorado en ciencias biomédicas) México, D.F. México: Facultad de Medicina, UNAM, 1998.
56. Kahan BD. Cyclosporine. *New Eng J Med* 1989;321:1725-1726.
57. Ritter JM, Lewis DL, Timothy GK. A textbook of clinical pharmacology, 3a ed. Gran Bretaña: Edward Arnold, 1995.
58. Ryffel B. Pharmacology of Cyclosporine VI. Cellular activation: regulation of intracellular events by cyclosporine. *Pharmacol Rev* 1989;41:404-416.
59. Bierer BE, Hollander G, Truman D, Brakoff SJ. Cyclosporin A and FK506: Molecular mechanism of immunosuppression and probes for transplantation biology. *Curr Opin Immunol* 1993;5:763-773.
60. Shibasaki F, Mckee F. Calcineurin functions in Ca⁺⁺-activated cell death in mammalian cells. *J Cell Biol* 1995;131:735-743.
61. Sherry B, Harlot N, Strap A, Cream A. Identification of ciclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:3511-3515.
62. Stelletto C, de paulis A, cicarelli A, Cirillo R, Patella V, casorale V, et al. Anti-inflammatory effect of cyclosporin A on human skin mast cells. *J Invest Dermatol* 1992;98:800-804.
63. Hendey B, Maxfield FR. Regulation of neutrophil motility and adhesion by intracellular calcium transients. *Blood Cells* 1993; 99:143-161.
64. Ibarra A, Guizar SG, Correa D, Kretshmer R, Grijalva I, Madrazo I, et al. Alteration of Cyclosporin-A pharmacokinetics after experimental spinal cord injury. *J Neurol* 1996;13:267-272.
65. Ibarra A, Reyes J, Martinez S, Correa D, Guizar SG, Grijalva I, et al. Use of Cyclosporin-A in experimental spinal cord injury: design of a dosing strategy to maintain therapeutic levels. *J Neurol* 1996;13:569-572.

66. Palladini G, Caronti B, Pozzessere G, Teichner A, Buttarelli F, Morselli E, et al. Treatment with Cyclosporine A promotes axonal regeneration un rats submitted to transverse section of the spinal cord -II_ recovery of function. *J Brain Res* 1996;37:145-153.
67. Triggs WJ, Willmore LJ: In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe⁺⁺ injection. *J Neurochem* 1984;42:976-978.
68. Tarlov IM, Klinger H. Spinal cord compression studies. *Arch Neurol Psychiatry* 1954;71:271-290.
69. Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg* 1977;47:577-581.
70. Allen AR. Surgery of experimental lesions of spinal cordequivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. *J. Am Med Assoc* 1911;57:878-880.
71. Ley General de Salud. Título séptimo: De la Investigación que incluye la utilización de animales de experimentación. Editorial Porrúa, 6ª ed, México, D.F. 1990;430-431.
72. Ross IB, Tator CH, Theriault E. Effect of nimodipine or methylprednisolone on recovery from acute experimental spinal cord injury in rats. *Sur Neurol* 1993;40:461-470.
73. Idan F, Polta S, Oner A, Isbin T, Gocer AI, Tap O et al. Effects of naloxone on sodium-potassium-activated and magnesium-dependent adenosine 5'-triphosphatase activity and lipid peroxidation and early structural findings after spina cord injury. *Neurosurg* 1995; 36:797-805.
74. Bartholdi D, Schwab ME. Methylprednisolone inhibits early inflammatory processes but not ischemic cell death after experimental spinal cord lesion in the rat. *Brain Res* 1995;672:177-186.
75. Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Tsuchiya K, Niwa Mtsutsumishita Y. Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord. *Free Rad Biol Med* 1996; 20:1-9.
76. Bracken M.B, Shepard M.J, Collins W.F. Methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal cord injury: One year follow-up data. Results of the second National Acute Spinal Cord injury Study. *J Neurosurgery* 1992; 76:23-31.

F I G U R A S

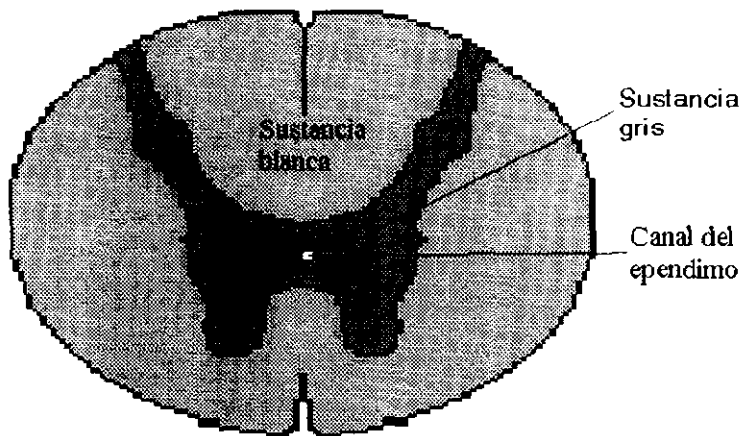


Figura 1. Representación de un corte transversal de médula espinal. (Chudler D. En www.weber.u.washington.edu/chudler/mcreb.html)

MEDULA ESPINAL Y ESTRUCTURAS ADYACENTES

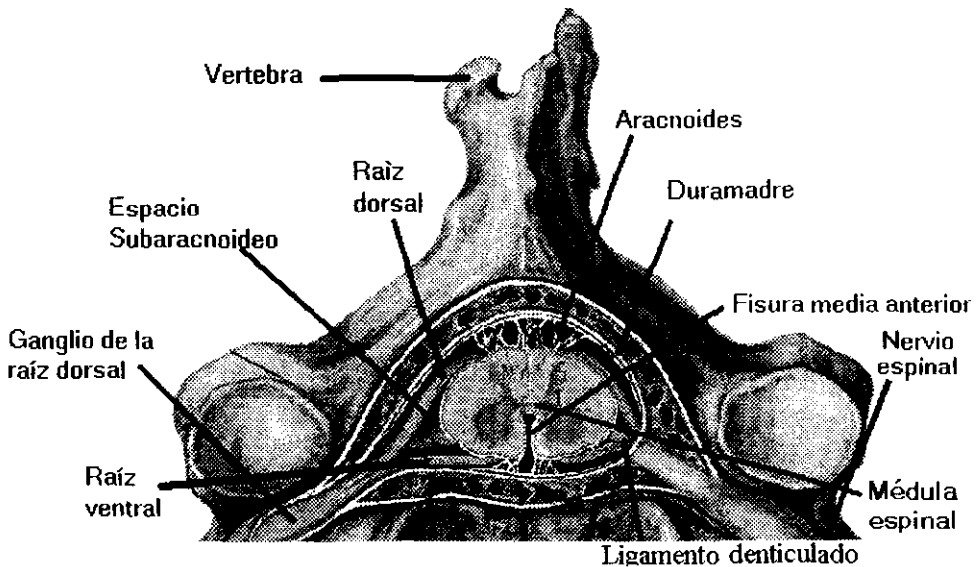


Figura 2. Esquema de un corte transversal de la columna vertebral. (Williams T, Nedzad G, Brain anatomy. ([www.Uh.org/providers/textbooks/brain anatomy/ch/text/section9.html](http://www.Uh.org/providers/textbooks/brain%20anatomy/ch/text/section9.html)))

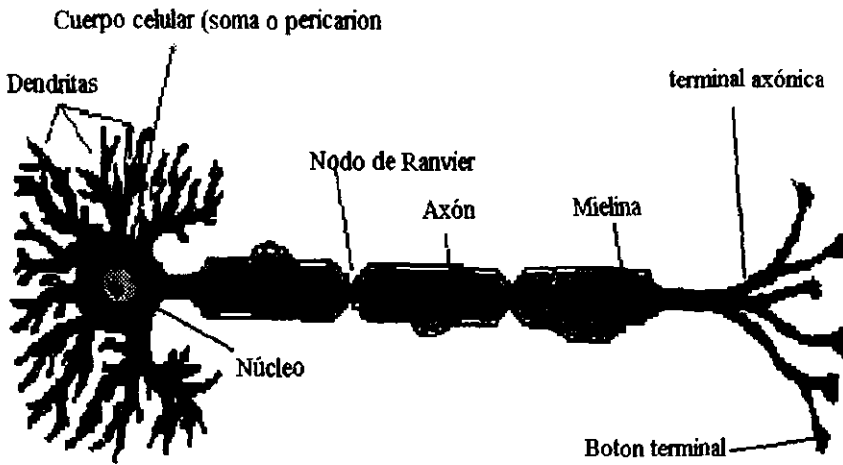


Figura 3. Estructura básica de una neurona. (Chudler D. En www.weber.u.washington.edu/chudler/mcreb.html)

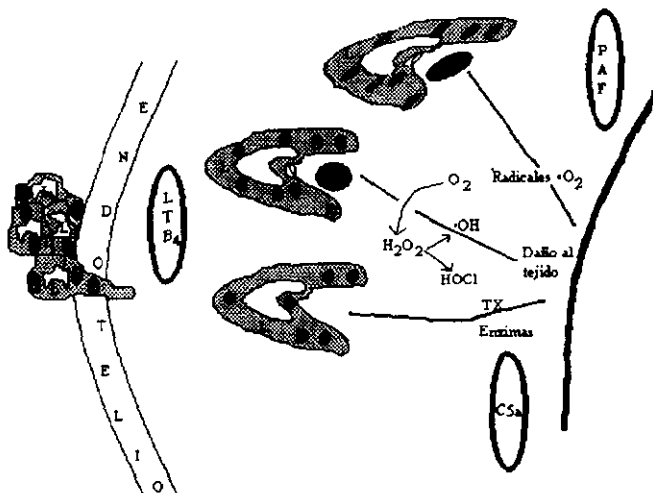


Figura 4. Representación del daño tisular que puede originarse durante una respuesta inflamatoria incontrolada. Leucocitos (L), quimioatrayentes: leucotrieno B₄ (LTB₄), factor de agregación plaquetaria (PAF) y factor C_{5a} del complemento (C_{5a}). Radical superóxido (•O₂), radical hidroxilo (•OH), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), oxígeno molecular (O₂), tromboxanos (TX). (I.E.D.U)

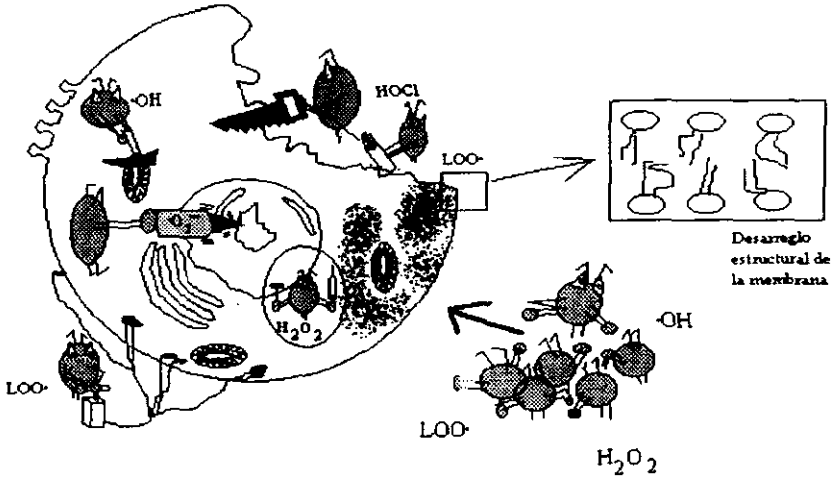


Figura 5. Representación caricaturizada de las múltiples acciones destructivas de varias especies reactivas de oxígeno (entre ellas radicales libres) sobre la membrana celular, organelos y cromatina. Liperoxidos (LOO•), radical hidroxilo (•OH), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radical superóxido (•O₂), ácido hipocloroso (HOCl). (Modificado a partir de Treinen MM. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. Exp Med biol 1994; 336:18)

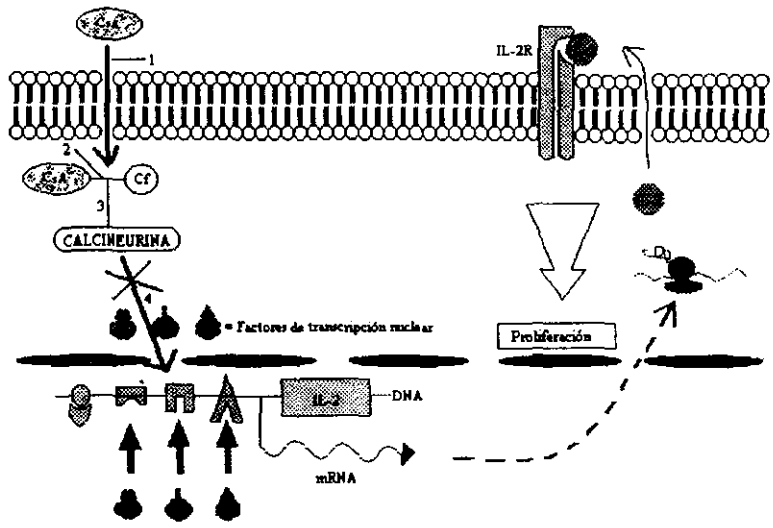
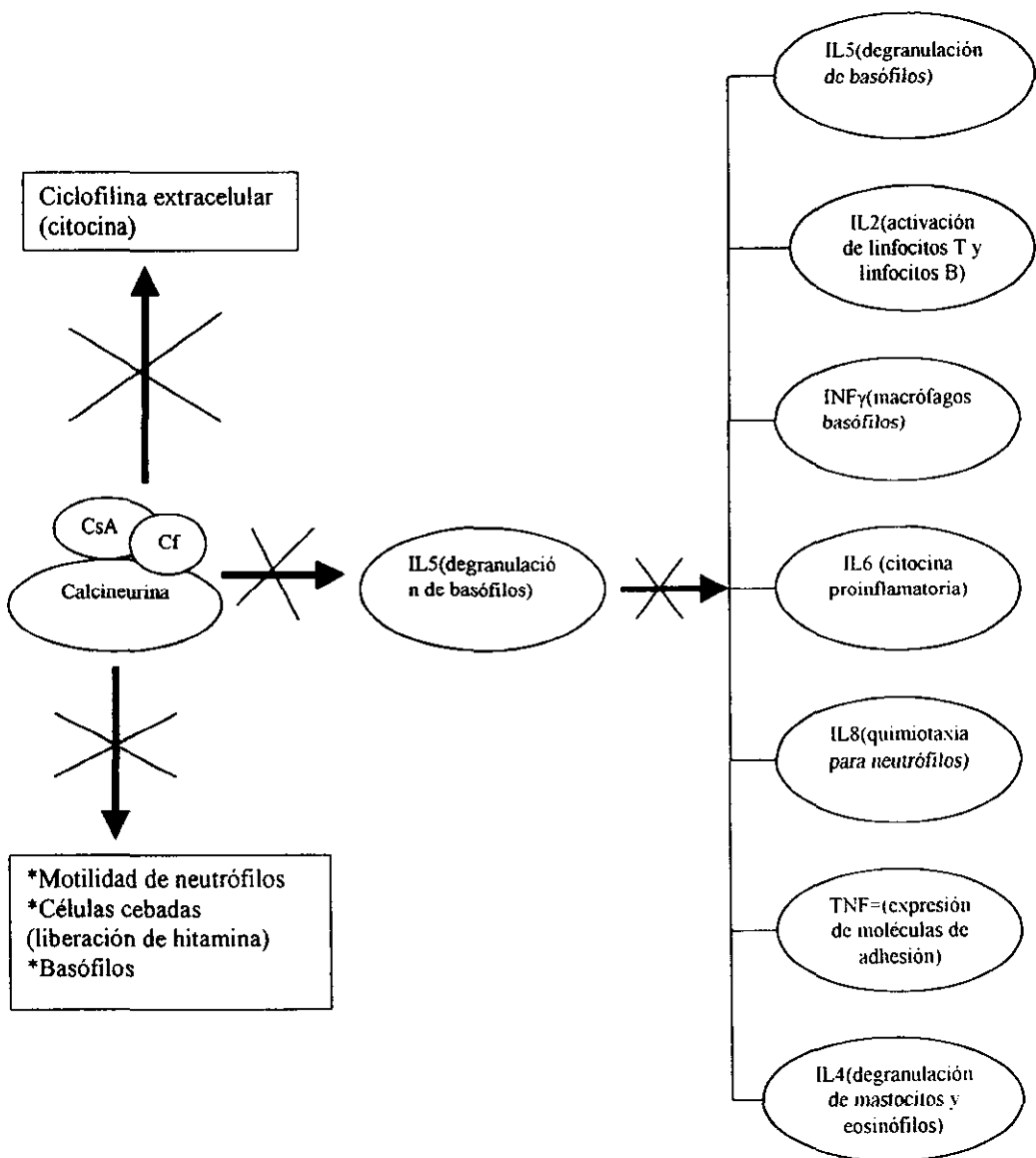


Figura 6. Mecanismo de acción de la CsA. La CsA atraviesa la membrana celular (1) y penetra al citoplasma donde se une a una proteína denominada ciclofilina (2), formando un complejo molecular que se une a la proteína llamada calcineurina (3), impidiendo entonces el paso de los factores nucleares de transcripción al interior del núcleo celular (4). De esta manera impide la producción de linfocinas. Ciclosporina A (CsA), ciclofilina (Cf), interleucina 2 (IL-2), ácido ribonucleico mensajero (mRNA), ácido desoxirribonucleico (DNA), receptor para interleucina 2 (IL-2R). (Versión modificada a partir de Borel J.F. Mechanism of action of cyclosporin A and rationale for use in nephrotic syndrome. Clin Nephrol. 1991; 35:S23-S30)

Figura 7. Mecanismos antiinflamatorios de la ciclosporina A



CsA= ciclosporina A, Cf=ciclofilina, IL=interleucina, TNF= Factor de necrosis tumora, INF γ =interferon gamma. (I.E.D.U)

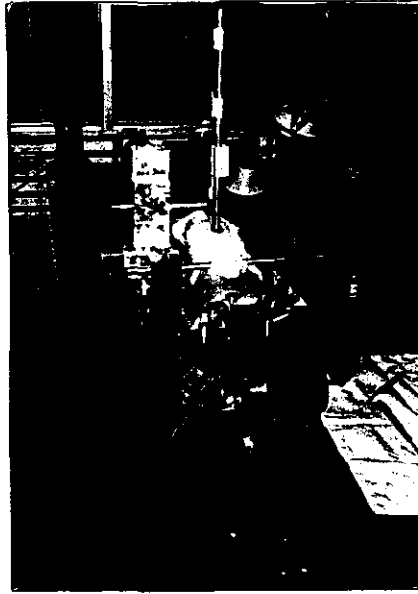


Figura 8. Aparato estereotáxico utilizado para realizar la lesión tipo contusión. Tubo Guía (T), sujetadores (S), plancha (P).

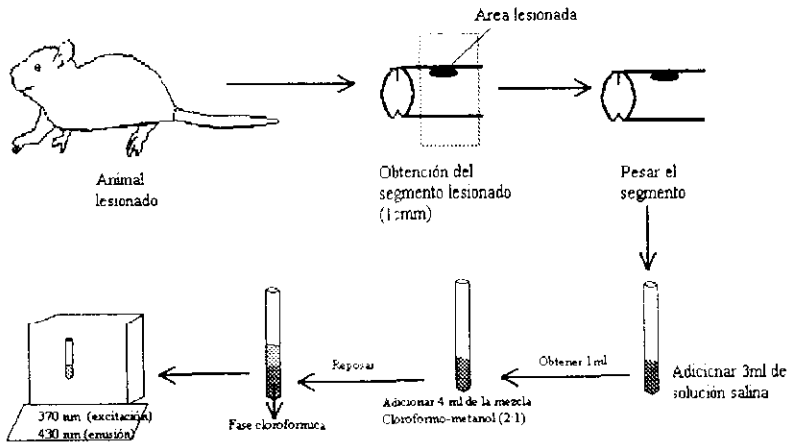


Figura 9. Diagrama que muestra el procedimiento de la técnica de Triggs y Willmore para la cuantificación de la lipoperoxidación. (I.F.D.U.)

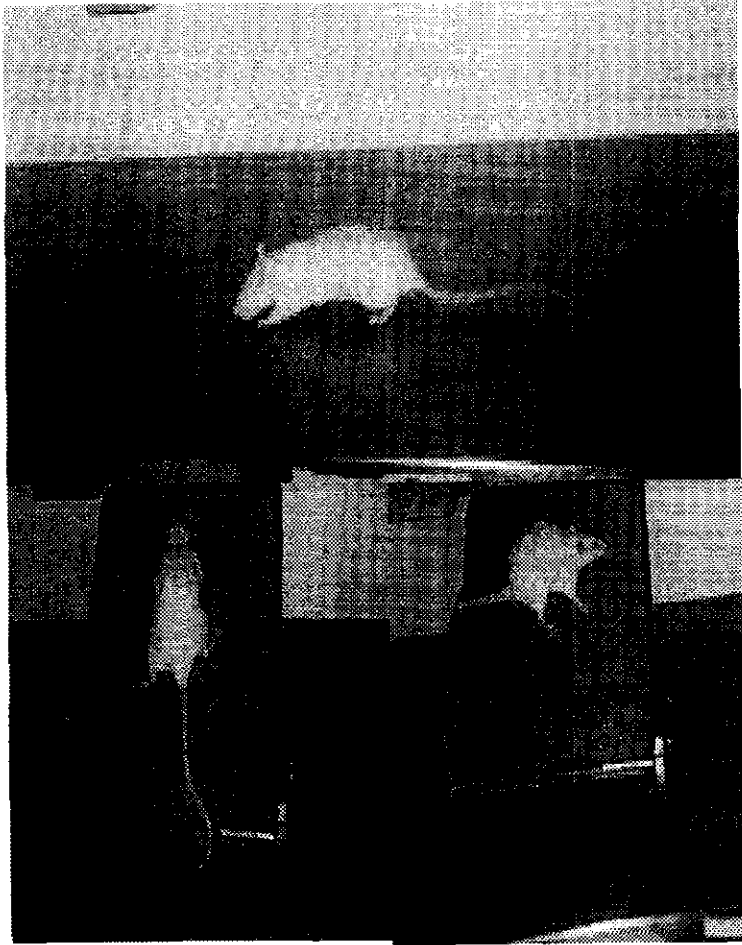
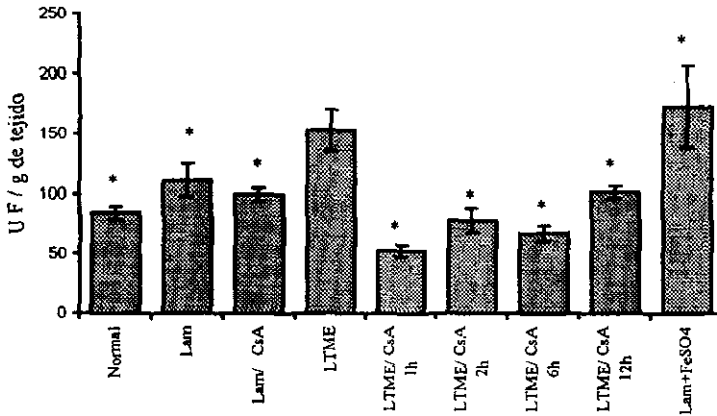


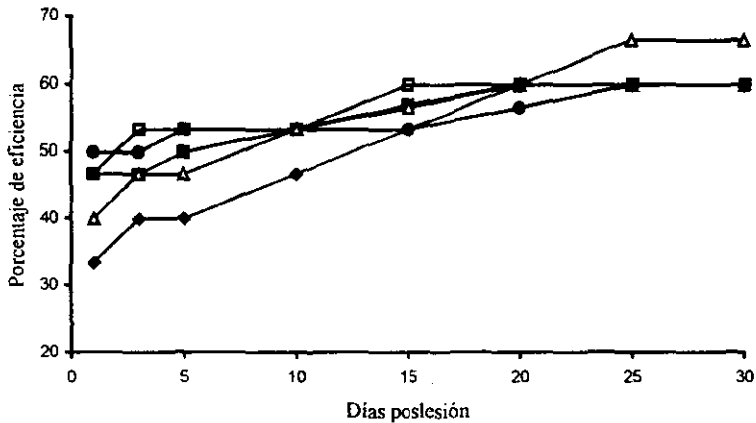
Figura 10. Pruebas clínicas realizadas en este trabajo. Prueba de locomoción libre sobre el piso (A), Plano inclinado en posición vertical (B) y plano inclinado posición horizontal (C).

Gráfica 1



Gráfica 1. Cuantificación de la liperoxidación en el tejido medular de ratas 24 horas después del procedimiento quirúrgico. Ratas sin procedimiento quirúrgico (normal), con laminectomía (lam), con laminectomía y tratamiento con CsA (lam/CsA), con lesión y sin tratamiento (LTME), con lesión y con tratamiento con CsA: 1 hora después de la lesión (LTME/CsA 1h), 2 h después de la lesión (LTME/CsA 2h), 6 h después de la lesión (LTME/CsA 6h), 12 h. después de la lesión (LTME/CsA 12h) y con laminectomía más la aplicación de sulfato ferroso (lam+FeSO₄). Los valores corresponden al promedio \pm error estándar de 6 animales por grupo. *Diferencia significativa con respecto al grupo con LTME sin CsA ($p < 0.05$) mediante la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. UF= Unidades de fluorescencia.

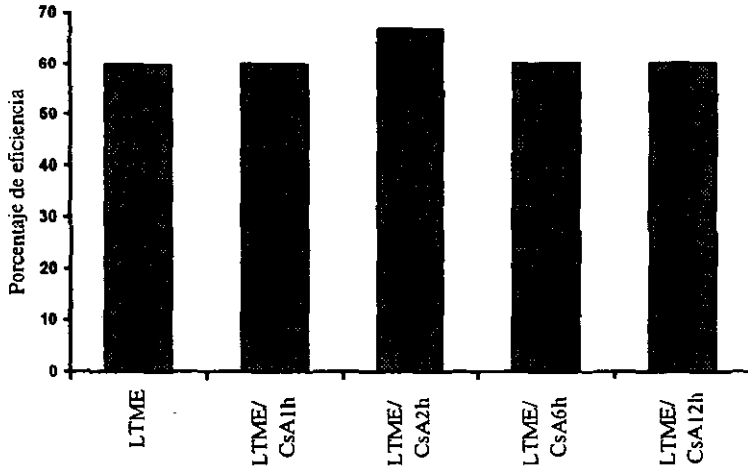
Gráfica 2



Gráfica 2. Resultados en el plano inclinado vertical. Animales con LTME sin tratamiento (●), con LTME + administración de CsA 1 hora posesión (■), con LTME + CsA 2 horas posesión (▲), con LTME + CsA 6 horas posesión (◆) y con LTME + CsA a las 12 horas posesión (□). Los valores corresponden a la mediana de 8 animales.

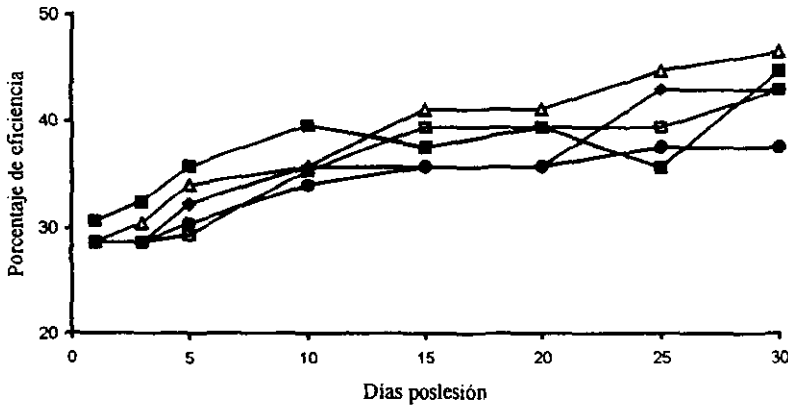
Gráfica 3

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA



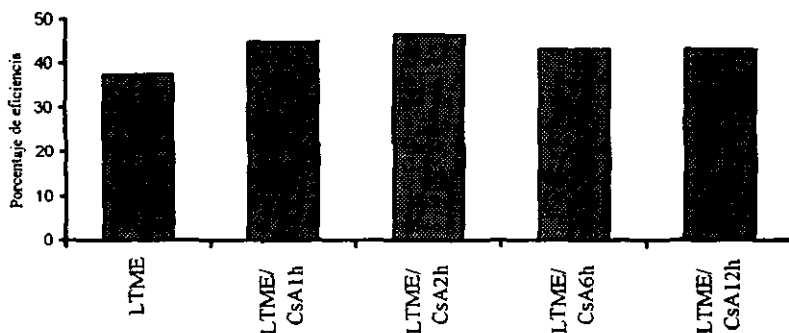
Gráfica 3. Evaluación clínica realizada con el plano inclinado con las ratas en posición vertical a los 30 días posteriores a la LTME en cada uno de los grupos estudiados. Son los valores de las medianas de 8 animales.

Gráfica 4



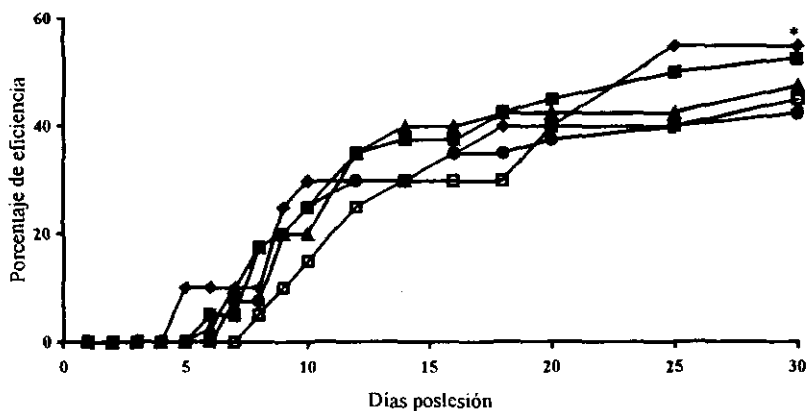
Gráfica 4. Resultados obtenidos en el plano inclinado posición horizontal. Animales con LTME sin tratamiento (●), con LTME + administración de CsA 1 hora posesión (■), con LTME + CsA 2 horas posesión (▲), con LTME + CsA 6 horas posesión (◆) y con LTME + CsA a las 12 horas posesión (□). Los valores corresponden a la mediana de 8 animales.

Gráfica 5



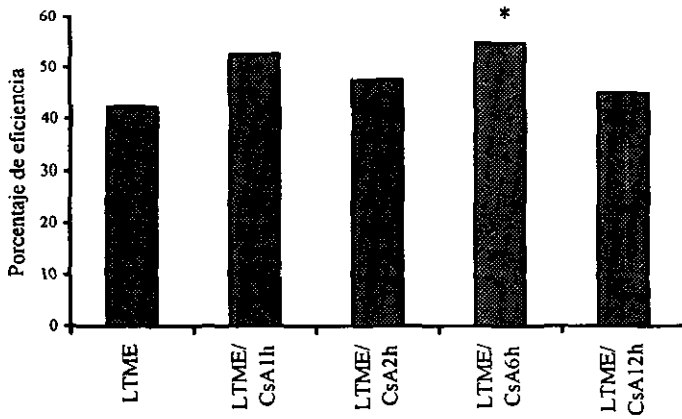
Gráfica 5. Evaluación clínica realizada con el plano inclinado con las ratas en posición horizontal a los 30 días posteriores a la LTME en cada uno de los grupos estudiados. Son los valores de las medianas de 8 animales.

Gráfica 6



Gráfica 6. Evaluación clínica realizada con la escala de Tarlov en ratas con LTME sin tratamiento (●), con LTME + administración de CsA 1 hora posesión (■), con LTME + CsA 2 horas posesión (▲), con LTME + CsA 6 horas posesión (◆) y con LTME + CsA a las 12 horas posesión (□). Los valores corresponden a la mediana de 8 animales. * Diferencia significativa con respecto al grupo con LTME sin CsA ($p=0.02$) mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

Gráfica 7



Gráfica 7. Evaluación clínica realizada con la escala de Tarlov a los 30 días posteriores a la LTME en cada uno de los grupos estudiados. Son los valores de las medianas de 8 animales en cada grupo. * Diferencia significativa con respecto al grupo lesionado sin CsA. * Diferencia significativa con respecto al grupo lesionado sin CsA.