

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACION Y COMPARACION DE LA EFICACIA DE LA
CICLOSPORINA-A Y LA METILPREDNISOLONA SOBRE LA
LIPOPEROXIDACION Y LA RECUPERACION MOTORA DE
RATAS CON LESION TRAUMATICA DE LA MEDULA ESPINAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A :

BIOL. MARIA DE LOS ANGELES ARACELI DIAZ RUIZ

6174719



IMSS

DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS

MEXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO

Dr. Juan Antonio Ibarra Arias

Investigador Asociado C

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas

Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. Gabriel Guízar Sahagún

Investigador Titular

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas

Instituto Mexicano del Seguro Social

Dra. Dolores Correa Beltrán

Directora de Investigación

Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Investigador Titular

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de
Neuroquímica del Instituto Nacional de
Neurología y Neurocirugía,
En la Unidad de Investigación Médica en
Enfermedades Neurológicas del
Instituto Mexicano del Seguro Social y
en el laboratorio de Neuroinmunología
del centro de investigación del proyecto CAMINA.

DEDICO ESTA TESIS

A Dios.

A mi esposo Francisco.

A mis hijos Francisco Daniel, Amairani y Luis Eduardo.

A mis padres Reynaldo y María de los Angeles.

A mis hermanos Reynaldo, Gabriel, Juan Carlos, Patricia y Miguel Angel.

A mi abuelita Isabel.

A la familia Osornio en especial a la Sra. Isabel.

A toda mi familia y amigos.

*“Al final de la vida, lo único que cuenta es lo que hayamos hecho
por Dios y por nuestros hermanos los hombres”.*

P. Marcial Maciel

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del Comité Tutorial por su orientación y consejos importantes en mi formación.

A los miembros del Jurado por el tiempo que dedicaron para enriquecer mas el trabajo.

A Ivonee Duarte y Alberto Mora por el gran apoyo que me brindaron en el trabajo experimental.

Al Sr. Fidel López cuyo trabajo en el bioterio fue de gran importancia.

A Sr. Salvador Harari y a su familia por el entusiasmo que tienen, sin el cual el proyecto CAMINA no existiría.

A todas las personas que de una u otra forma colaboraron para la realización de este trabajo.

“Gracias”.

Para realizar el trabajo de investigación y obtener el grado de Maestra en Ciencias (Biología Celular) estuve becada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con número de registro120655.

INDICE

RESUMEN.....	1
ANTECEDENTES	3
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	3
ANATOMÍA.....	3
<i>Membranas de revestimiento.....</i>	<i>3</i>
<i>Divisiones de la médula espinal.....</i>	<i>5</i>
<i>Segmentos de la médula espinal.....</i>	<i>7</i>
<i>Substancia gris.....</i>	<i>7</i>
<i>Substancia blanca.....</i>	<i>8</i>
HISTOLOGÍA.....	11
<i>Barrera hematoencefálica.....</i>	<i>12</i>
FISIOLOGÍA.....	13
<i>Potencial de acción.....</i>	<i>13</i>
RESPUESTA INFLAMATORIA.....	15
CONTROL DE LA INFLAMACIÓN.	15
<i>Histamina (aminas vasoactivas).....</i>	<i>15</i>
<i>5-Hidroxitriptamina (5HT).....</i>	<i>16</i>
<i>Factor activador de las plaquetas (PAF).....</i>	<i>16</i>
<i>Factor quimiotáctico neutrofílico (NDF).....</i>	<i>16</i>

<i>Componentes del sistema del complemento (C3a, C5a)</i>	16
<i>Bradicidina</i>	16
<i>Fibrinopéptidos y productos de degradación de la fibrina</i>	17
<i>Eicosanoides:Prostaglandinas (PGs), Tromboxanos (TXs), Leucotrienos (LTs)</i>	17
RESPUESTA INMUNE	17
RESPUESTA HUMORAL	18
RESPUESTA CELULAR	20
<i>Citocinas</i>	21
<i>Interleucina 1</i>	21
<i>Interleucina 2</i>	22
<i>Interleucina 3</i>	22
<i>Interleucina 4</i>	22
<i>Interleucina 5</i>	23
<i>Interleucina 6</i>	23
<i>Interleucina 8</i>	24
<i>Interleucina 10</i>	24
<i>Interleucina 12</i>	24
<i>Interferón gamma</i>	24
<i>Factor de necrosis tumoral alfa</i>	24
<i>Factor de necrosis tumoral beta</i>	24

BIOLOGIA DE LOS RADICALES DEL OXÍGENO	26
RADICALES DERIVADOS DEL OXÍGENO.....	27
PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE RADICALES.....	27
<i>Anión superóxido</i>	27
<i>Radical hidroxilo</i>	29
LIPOPEROXIDACIÓN.....	32
FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA	
DE LA MÉDULA ESPINAL	34
NEUROPROTECCIÓN EN LA MÉDULA ESPINAL	40
CLENBUTEROL.....	40
ACEITE DE OLIVA.....	41
ESTEROIDE U-74006.....	41
21-AMINOESTEROIDES.....	41
METILAMINOCROMANOS.....	42
PIRRILOPIRIMIDINAS.....	42
METILPREDNISOLONA.....	42
<i>Generalidades sobre la metilprednisolona</i>	42
CICLOSPORINA-A.....	45
<i>Metabolismo</i>	45
<i>Absorción</i>	45
<i>Eliminación</i>	45
<i>Biodisponibilidad</i>	45

	IV
JUSTIFICACIÓN	49
HIPÓTESIS	50
OBJETIVOS	51
MATERIALES Y MÉTODO	52
DETERMINACIÓN DE LA MÁXIMA LIPOPEROXIDACIÓN DESPUÉS DE UNA LTME.....	52
EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA CICLOSPORINA-A Y LA MATILPREDNISOLONA SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN, LA RECUPERACIÓN MOTORA Y LA SOBREVIDA.....	53
ESQUEMA DE ADMINISTRACIÓN.....	54
MODELO DE LESIÓN.....	54
TÉCNICA PARA CUANTIFICAR LOS PRODUCTOS FINALES DE LA LIPOPEROXIDACIÓN.....	54
PRUEBA CLÍNICA DE EVALUACIÓN MOTORA.....	56
<i>Prueba de deambulación libre sobre el piso</i>	56
ESTADÍSTICA.....	58
CONSIDERACIONES ÉTICAS DEL USO DE ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN.....	58
RESULTADOS	59
DETERMINACIÓN DEL TIEMPO EN EL QUE SE PRODUCE LA MAXIMA LIPOPEROXIDACIÓN.....	59

EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA CICLOSPORINA-A Y LA METILPREDNISOLONA SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN.....	60
PRUEBAS DE EVALUACIÓN CLÍNICA.....	64
ESCALA DE TARLOV.....	64
SOBREVIDA.....	68
DISCUSIÓN.....	70
CONCLUSIONES.....	78
PERSPECTIVAS.....	79
REFERENCIAS.....	80

RESUMEN

Después de una lesión traumática en la médula espinal el daño al tejido es originado en primera instancia por el mecanismo de lesión propiamente dicho (lesión primaria). Posteriormente el daño se incrementa por la acción de una serie de mecanismos autodestructivos (lesión secundaria) que originan una gradual degeneración del tejido nervioso. Entre estos mecanismos, destaca el fenómeno de lipoperoxidación que es el ataque de especies reactivas de oxígeno a los componentes celulares, incluyendo a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de las membranas. La lipoperoxidación se origina en gran parte por la extensa respuesta inflamatoria desencadenada después de una lesión. Para prevenir este fenómeno, existen enzimas específicas antioxidantes, sin embargo el sistema nervioso central es especialmente deficiente en la actividad de estas enzimas en comparación con otros tejidos. Además el tejido neural es muy sensible al daño originado por radicales libres debido a su alta tasa metabólica y la gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que presenta. Por estas razones, después de una lesión, es necesario tratar de disminuir este fenómeno. Con relación a lesión traumática de la médula espinal, se ha recurrido al uso de algunos fármacos como la Metilprednisolona, que disminuye la lipoperoxidación. Hasta el momento éste es el único fármaco utilizado en pacientes después de una lesión en la médula espinal, sin embargo aunque es el que mejores resultados ha brindado, estos no son del todo satisfactorios. La ciclosporina-A por su mecanismo de acción, podría inhibir diferentes procesos relacionados principalmente con la respuesta inflamatoria y la formación de radicales libres, funcionando así como un protector del tejido neural. Además éste fármaco a diferencia de la metilprednisolona, puede alcanzar sus efectos terapéuticos administrándose a dosis racionales y bien estandarizadas para individuos con lesión de la médula espinal, disminuyendo con ello en gran parte los efectos no deseados (infecciones) provocados principalmente por la inmunosupresión generada. Así pues, la ciclosporina-A podría ser una buena opción para disminuir en parte el fenómeno de lipoperoxidación pero sin tener los efectos secundarios generados por las megadosis utilizadas para la metilprednisolona. En el presente trabajo se evaluó y comparó la eficacia de la ciclosporina-A y de la metilprednisolona sobre la lipoperoxidación, la recuperación

motora y la sobrevida de animales sometidos a una lesión traumática de la médula espinal. Para tal efecto, se utilizaron 248 ratas adultas, hembras de 200 a 250 g de peso a las que se les realizó una lesión tipo contusión severa dejando caer un peso de 15 g de una altura de 10 cm a nivel de T-9. El trabajo experimental se dividió en 3 estudios, el primero, fue para determinar la producción máxima de lipoperoxidación después de una lesión, para ello se formaron 3 grupos experimentales, de los cuales, a dos de ellos se les practicó una laminectomía y se les administró sulfato ferroso o solución salina y al tercero se le sometió a lesión de la médula espinal. Los tiempos de evaluación se realizaron a 2, 4, 8 y 24 h después del procedimiento quirúrgico. El segundo y tercer estudios fueron para cuantificar la lipoperoxidación y la recuperación motora así como la sobrevida en animales tratados con ciclosporina-A, metilprednisolona, ciclosporina-A más metilprednisolona y vehículo; la cuantificación de la lipoperoxidación se realizó 24 h después del procedimiento quirúrgico. En otra serie de animales, se evaluó la recuperación motora por medio de una prueba (escala de Tarlov) y la sobrevida (con el método de Kaplan-Meier) durante 30 días después de la lesión. Los resultados demuestran que la ciclosporina-A inhibe la lipoperoxidación con la misma eficiencia que la metilprednisolona, observándose, que su administración durante las primeras 6 h resulta ser muy eficiente; sin embargo, la mejor inhibición se observó cuando se administra 1 h después de la lesión. Por otro lado el vehículo (aceite de oliva) también fue capaz de inhibir la lipoperoxidación con la misma intensidad que la ciclosporina-A y la metilprednisolona. Con respecto a la evaluación motora, se observó una mayor recuperación ($p < 0.05$) en las ratas que recibieron tratamiento con ciclosporina-A 6 h después de la lesión así como en el grupo de ratas a las que se les administraron ambos fármacos. Sin embargo, tanto los animales que recibieron ambos fármacos como los que recibieron solo metilprednisolona, presentaron una gran disminución en la sobrevida. Con respecto a los animales tratados con vehículo no observó recuperación funcional. Los resultados muestran que el tratamiento con ciclosporina-A inhibe con la misma intensidad que la metilprednisolona la lipoperoxidación, además promueve una mejor recuperación motora sin los efectos letales de la metilprednisolona.

ANTECEDENTES

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

ANATOMÍA

El sistema nervioso central (SNC), está ubicado en un plano profundo del organismo, rodeado y protegido por el hueso, consiste del cerebro dentro del cráneo y la médula espinal que se extiende por el conducto vertebral, hasta aproximadamente la primera y segunda vértebras lumbares.

La columna vertebral consta de 33 vértebras unidas por ligamentos y cartilagos. Las 24 superiores están separadas una de la otra y son móviles, las nueve inferiores son fijas, cinco de ellas se fusionan formando el sacro y las últimas cuatro el cóccix. La columna vertebral normal presenta siete vértebras cervicales, doce torácicas, cinco lumbares, cinco sacras y cuatro coccígeas (Figura 1).

La médula espinal es una masa cilíndrica, alargada, de tejido nervioso que ocupa los dos tercios superiores del conducto raquídeo. Se extiende desde el borde superior de la primera vértebra cervical hasta el borde superior de la segunda vértebra lumbar. En su extremo rostral se continúa con el bulbo raquídeo (Chusid 1987).

Membranas de revestimiento

Existen tres membranas que rodean a la médula espinal: La duramadre, la aracnoides y la piamadre. La duramadre es la más externa, es una cubierta tubular fibrosa y resistente que desciende hasta la segunda vértebra sacra donde termina en forma de saco.

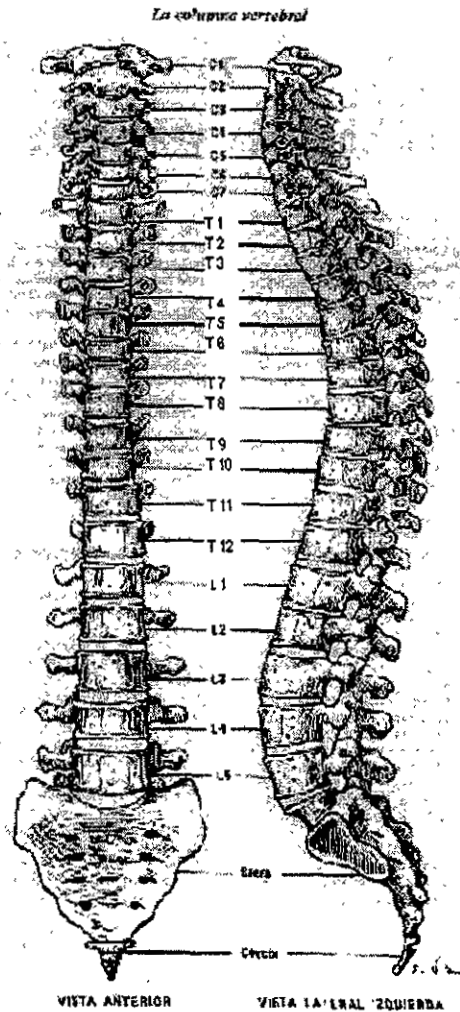


Figura 1 *Columna vertebral completa así como el número de vértebras y su posición. La columna vertebral normal presenta siete vértebras cervicales (C), doce torácicas (T), cinco lumbares (L), cinco sacras y cuatro coccígeas (modificado de Chusid 1987).*

El espacio epidural separa a la duramadre de la columna vertebral y contiene tejido areolar laxo y plexos venosos. El espacio subdural es un espacio estrecho entre la duramadre y la aracnoides subyacente.

Médula espinal

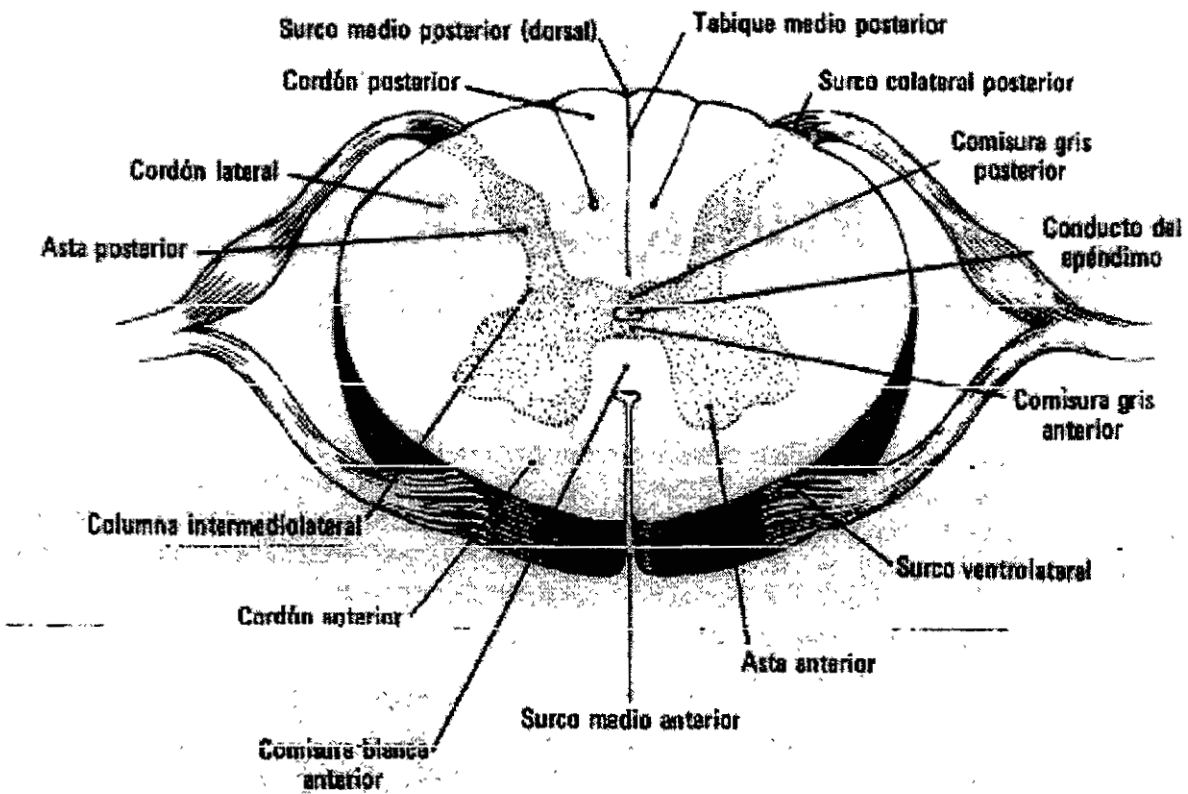


Figura 2 Anatomía de la médula espinal (Chusid 1987).

surco colateral posterior y el surco anterolateral, línea de origen de las raíces anteriores. El cordón anterior que yace entre el surco anterolateral y el surco medio anterior.

También en la médula espinal se localiza el conducto central, mismo que se extiende por toda la longitud de la médula. Esta revestido de células ependimarias, lleno

con líquido cefalorraquídeo, y se continua hacia arriba, para abrirse en la porción posterior del cuarto ventrículo, en el bulbo raquídeo.

Segmentos de la médula espinal

Los segmentos de la médula espinal se designan como cervical, dorsal, lumbar y sacro, para hacerlos corresponder con los grupos de nervios. Los segmentos individuales varían en longitud, siendo cerca de dos veces más largos en la región media dorsal que en las áreas cervical o lumbar superior. La médula espinal se agranda considerablemente en dos regiones: el ensanchamiento cervical que corresponde al área de los nervios para los miembros superiores y se extiende desde cerca del tercer segmento vertebral hasta el segundo dorsal; y el ensanchamiento lumbar que va desde cerca del nivel de la novena vértebra dorsal hasta la duodécima dorsal y se adelgaza después para formar el cono medular (*conus medullaris*). Los dos ensanchamientos de la médula corresponden al origen de los nervios para las extremidades superiores e inferiores. El ensanchamiento cervical da origen a los nervios del plexo braquial y el ensanchamiento lumbar que no es tan extenso corresponde al origen de los nervios del plexo lumbosacro (Chusid 1987).

Substancia gris

En sección transversal se ve que la médula espinal contiene una masa interna de sustancia gris en forma de H rodeada por sustancia blanca, la sustancia gris está constituida por dos mitades simétricas unidas en la línea media por una conexión transversal (comisura), de sustancia gris, a través de la cual corre un pequeño conducto central. La columna gris anterior (asta anterior) está adelante del conducto central y contiene las células que dan origen a las fibras de las raíces ventrales. La columna lateral contiene células preganglionares del sistema nervioso autónomo. La columna gris posterior

(asta posterior) es una columna larga y delgada que llega casi hasta el surco colateral posterior. Está cubierta por una masa en forma de media luna, de tejido translúcido, que contiene células nerviosas. La formación reticular es una red de prolongaciones que se extienden dentro del cordón lateral situado entre los cordones anterior y posterior. El conducto central divide la comisura transversal en las comisuras grises anterior y posterior. La forma, cantidad y aspecto de la sustancia gris varía a diferentes niveles. La mayor proporción de sustancia gris a sustancia blanca está en los abultamientos lumbar y cervical. En la región cervical la columna gris posterior es comparativamente estrecha y la columna anterior es más amplia. En la región dorsal, las columnas grises anterior y posterior son estrechas, haciéndose evidente la columna lateral. En la región lumbar, las columnas anterior y posterior son más amplias y expandidas. En el cono medular, la sustancia gris semeja dos masas ovales, una en cada mitad de la médula, conectadas por una ancha comisura gris. La sustancia gris de la médula espinal puede ser dividida en dos componentes principales: motor y receptor. La parte motora comprende a las columnas anterior y lateral y da origen a las raíces anteriores. Contiene el asta anterior con motoneuronas que inervan a la musculatura estriada voluntaria. Las células de la columna lateral dan origen a fibras preganglionares del sistema nervioso autónomo torácico y lumbosacro, las cuales abandonan la médula espinal con las raíces anteriores (figura 3).

Substancia blanca

La sustancia blanca de la médula espinal se compone de fibras nerviosas dentro de una red de neuroglia. Estas fibras son mielinizadas y no mielinizadas y sirven para enlazar entre sí a diferentes segmentos de la médula espinal y conectar a ésta con el encéfalo.

Médula espinal

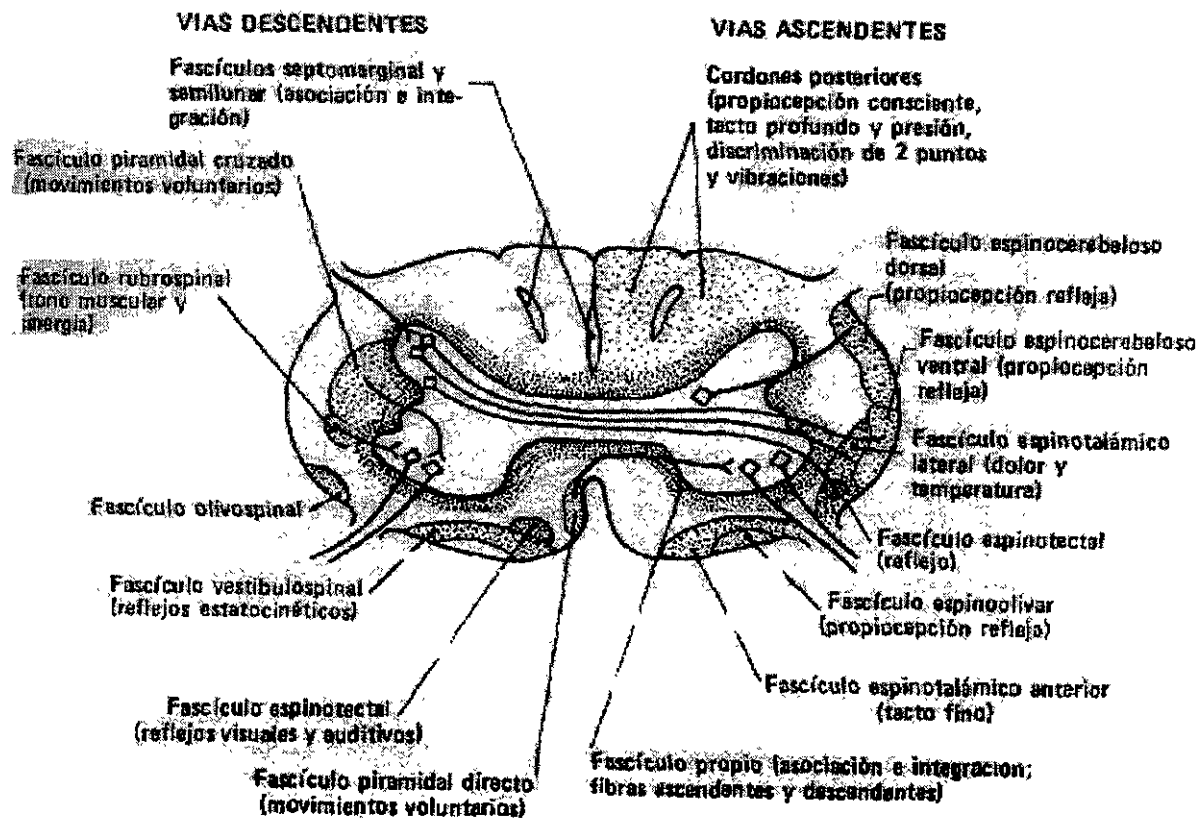


Figura 3 Representación de las vías ascendentes y descendentes de la médula espinal (Chusid 1987).

Los fascículos propios (fasciculi proprii), que se encuentran rodeando inmediatamente a las columnas grises, contienen fibras cortas ascendentes y descendentes que terminan dentro de la médula espinal. La sustancia blanca está dividida en tres cordones por las raíces posteriores y las más laterales de las raíces anteriores (Figura 3). Cordon anterior se extiende entre el surco medio anterior y el anterolateral y se divide en:

Fascículos descendentes:

Piramidal directo (movimientos voluntarios).

Vestíbulo espinal (reflejos estatocinéticos).

Tectoespinal (reflejos audiovisuales)

Reticuloespinal (tono muscular)

Fascículos ascendentes:

Espinotalámico ventral (tacto fino)

Espinooolivar (propiocepción refleja).

Cordón lateral se extiende entre los surcos anterolateral y colateral posterior:

Fascículos descendientes:

Piramidal cruzado (movimientos voluntarios)

Rubrospinal (tono muscular y sinergia)

olivospinal (reflejos)

Fascículos ascendentes:

Espinocerebelosos ventral y dorsal (propiocepción refleja)

Espinotalámico lateral (dolor y temperatura)

Espinotectal (reflejos).

Cordón posterior se extiende entre los surcos colateral posterior y medio posterior:

Fascículos descendentes:

Fascículo semilunar y fascículo septomarginal (asociación e integración).

Fascículos ascendentes:

Fascículo de Goll y fascículo de Burdach (vibración, movimiento pasivo articular y discriminación de dos puntos), (Chusid 1987).

HISTOLOGÍA

Los dos componentes principales del sistema nervioso recibieron el nombre de sustancia gris y blanca por su aspecto a simple vista, en la médula espinal la sustancia gris tiene a grandes rasgos, la forma de H cuando se observa en corte transversal. En consecuencia se ha dicho que la sustancia en cuestión tiene dos astas posteriores y dos anteriores, el cuerpo de las neuronas es el elemento que abunda en el asta anterior. La sustancia gris tiene tal color por que contiene innumerables células y poca mielina. En la médula espinal la sustancia blanca que rodea la región en forma de H de sustancia gris está compuesta de innumerables fibras nerviosas que se discurren en sentido ascendente y descendente en la médula. Su color se debe a que la mayor parte de sus fibras está cubierta de mielina que es un material graso blanco. Las fibras están organizadas en haces de los cuales cada uno contiene fibras recibidas de neuronas con función similar, de tal manera que existen haces o fascículos motores y sensitivos independientes (Ham 1985).

El SNC está constituido por dos elementos celulares diferentes, las neuronas y la glía que se forman a partir del neuroectodermo. La neurona es la unidad estructural y funcional del sistema nervioso y se origina a partir de células indiferenciadas llamados neuroblastos. La glía es la más numerosa en todas las regiones del SNC de los vertebrados, está constituida por oligodendrocito que son células responsables de la mielinización de los axones del SNC, astrocitos divididos en dos tipos de acuerdo a su morfología, el tipo 1

llamados también protoplásmicos y el tipo 2 o fibrosos (Regan 1988) y la microglia que es tercer tipo celular que encontramos en el SNC y representa un elemento no neuronal y no astrocítico que ha sido motivo de controversia: su movilidad, su polimorfismo y su sensibilidad microambiental capaz de transformar su expresión fenotípica, desafía el uso de términos convencionales para describirla (Theele y Streit 1993).

Las células de la microglia tienen las características de las células del linaje macrofágico (Frei y cols. 1987). Además del factor de necrosis tumoral (TNF), la microglia produce interleucina-1 (IL-1) y proteasas, mediante las cuales puede mediar el daño tisular y por sus propiedades fagocíticas remueve los detritos celulares. La liberación de la IL-3 derivada de los astrocitos induce la proliferación de las células de la microglia (Frei y cols. 1988).

Barrera Hematoencefálica

La barrera hematoencefálica (BHE) está constituida por las células endoteliales con uniones muy estrechas y astrocitos, sirve para aislar al cerebro de los cambios de composición de los fluidos circundantes (Brightman 1991).

En condiciones normales la BHE impide el paso de las células del sistema inmunológico (SI) al SNC, sin embargo, se ha demostrado que los linfocitos activados, independientemente de su especificidad antigénica, en condiciones fisiológicas son capaces de atravesar la BHE (Wekerle y cols. 1986), además, existen áreas periventriculares que están libres de la BHE, también en enfermedades neurológicas se puede llevar a cabo la producción de inmunoglobulinas en el SNC. (Sharief y cols. 1990).

FISIOLOGÍA

El sistema nervioso recibe estímulos, los cuales transforma en información útil como potenciales de acción.

Potencial de acción.

La conducción del impulso nervioso va acompañada de un cambio eléctrico característico llamado potencial de acción (Figura 4). El paso del impulso nervioso está asociado a una despolarización reversible transitoria de la membrana, acompañada de cambios de permeabilidad en ella. Los iones sodio entran a la fibra nerviosa durante el ascenso del potencial de acción y los de potasio salen, a través de canales sensibles al voltaje (Tabla 1). Durante la repolarización el sodio (Na^+) sale activamente y regresa el potasio (K^+) por medio de la bomba $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$ la cual bombea estos iones en relación 2:1 respectivamente, de esta manera se restablece las concentraciones originales de estos iones y por lo tanto el potencial de reposo de la membrana, (Cunningham 1995).

Tabla 1 Concentración aproximada de iones libres en axón de mamífero

Ion	Concentración extracelular (nM)	Concentración intracelular (nM)	$[\text{Ion}]_e / [\text{Ion}]_i$	Potencial de Nernst ^a (mV)
Na^+	145	12	12	+66
K^+	4	155	0.026	-97
Ca^{2+}	1.5	$<10^{-3}$	$>1,500$	>97
Cl^-	120	4^b	30^b	-90^b

^a Potencial de equilibrio calculada a 37°C de la ecuación de Nernst

^b Cálculo asumiendo un potencial de reposo de -90 mV para la membrana muscular y que los iones de Cl^- están en equilibrio

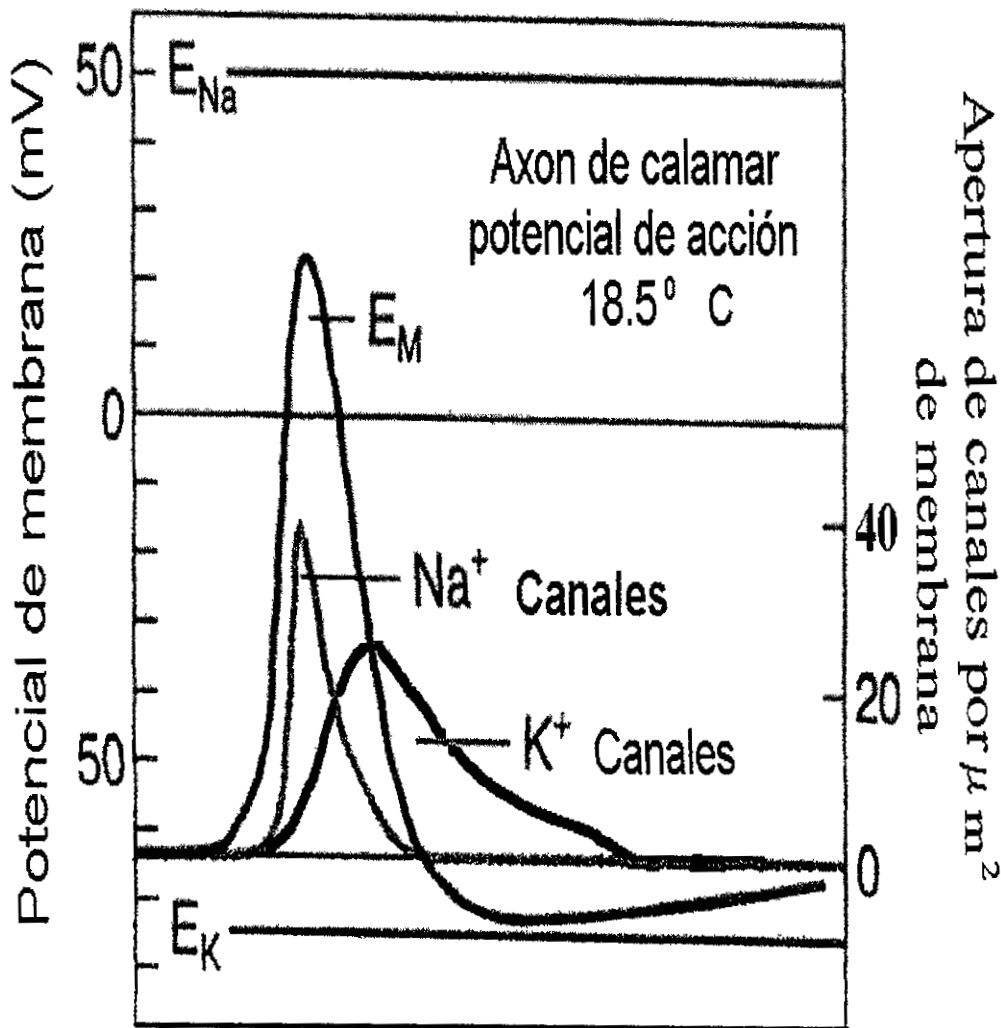


Figura. 4 Evento en la propagación del potencial de acción. Potencial de acción (E_M) y el cierre y apertura de canales de Na^+ , K^+ . El potencial de Nernst del Na^+ y del K^+ son indicados por E_{Na} y E_{K} . (Diagrama modificado de Siegel y cols. 1998).

RESPUESTA INFLAMATORIA

La inflamación es una de las reacciones del organismo cuando éste sufre invasión por agentes infecciosos, estimulación antigénica o, incluso, lesiones físicas. Tres son los principales hechos que ocurren durante la inflamación:

- a) Aumento del aporte sanguíneo a la zona afectada
- b) Incremento de la permeabilidad capilar producido por reacción de las células endoteliales y, posiblemente también por aumento del transporte vesicular a través del endotelio. Esto permite que atraviesen el endotelio moléculas de mayor tamaño de lo habitual, y los anticuerpos, el complemento y las moléculas de otros sistemas enzimáticos del plasma lleguen al lugar de la inflamación.
- c) Migración celular. Los leucocitos, al principio los neutrófilos y los macrófagos; más tarde, los linfocitos salen de los capilares a los tejidos circundantes; una vez en éstos migran hacia el lugar de la lesión, bajo los estímulos quimiotácticos (Roitt y cols. 1996).

CONTROL DE LA INFLAMACIÓN

El desarrollo de las reacciones inflamatorias está controlado por las citocinas, los productos de los sistemas enzimáticos del plasma y los mediadores vasoactivos, liberados a partir de los mastocitos, los basófilos y las plaquetas, como se muestra a continuación:

Histamina (aminas vasoactivas). Es sintetizada por los mastocitos y los basófilos, origina un aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso y provoca quimiotaxis para eosinófilos, además bloquean la función de los linfocitos T.

5-Hidroxitriptamina (5HT) Serotonina (aminas vasoactivas). Es sintetizada por las plaquetas y los mastocitos (en roedores), la serotonina promueve el aumento de la permeabilidad vascular y contracción del músculo liso

Factor activador de las plaquetas (PAF) Sintetizado por los basófilos, los neutrófilos y los macrófagos; su acción provoca la liberación de mediadores plaquetarios, aumenta la permeabilidad vascular, la contracción del músculo liso y la activación de los neutrófilos.

Factor quimiotáctico neutrofilico (NCF). Es producido por los mastocitos y ejerce acción quimiotáctica sobre los neutrófilos.

Componentes del sistema del complemento El sistema del complemento consiste de 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 (Gallin 1993).

C3a Este componente promueve la degranulación de los mastocitos y la contracción del músculo liso.

C5a Promueve la degranulación de los mastocitos, es quimiotáctico de los neutrófilos y los macrófagos, promueve la activación de los neutrófilos, tiene acción sobre la contracción del músculo liso y aumenta la permeabilidad capilar.

Bradicinina. Su origen es a partir del sistema de cinina (cininógeno) su acción origina vasodilatación, contracción del músculo liso aumento de la permeabilidad vascular y dolor.

Fibrinopéptidos y productos de degradación de la fibrina. Se originan a partir del sistema de coagulación, promueve un aumento en la permeabilidad vascular, son moléculas quimiotácticas para los neutrófilos y los macrófagos .

Eicusanoides: Prostaglandinas (PGs), Tromboxanos (TXs), Leucotrienos (LTs). Son productos del metabolismo del ácido araquidónico (AA). Los TXs (sintetizados por la ciclooxigenasa) promueven la agregación plaquetaria y son vasoconstrictores, la PGs (sintetizada por la ciclooxigenasa) disminuyen la agregación plaquetaria y son vasodilatadores (produce inflamación y edema) algunas son quimiotácticas para leucocitos por la vía que no involucra la ciclooxigenasa . Los LTs (sintetizados por la lipooxigenasa) son potentes quimiotácticos, promueven la adhesión de los neutrófilos y degranulación (Williams y Higgs 1988).

RESPUESTA INMUNE

El sistema inmunológico (SI) es el encargado de proteger al organismo de agentes infecciosos o algún tipo de daño al que se le someta. La respuesta inmune (RI) es el resultado del reconocimiento de antígenos extraños que ingresan al organismo que provocan una reacción apropiada para eliminarlos (Male y cols.1991).

La RI se ha clasificado en dos tipos que reflejan la función de dos distintas poblaciones de los linfocitos; la respuesta humoral específica mediada por anticuerpos, producto de la activación de los linfocitos B, y la respuesta celular, la cual es mediada por linfocitos T. No obstante para que un linfocito B activado realice su función se necesita de la cooperación de los linfocitos T. Así mismo, la activación de las células T requiere de la presentación de material extraño por parte de las células B o de los macrófagos.

RESPUESTA HUMORAL

La respuesta humoral está mediada por anticuerpos, de los cuales se sabe que poseen especificidad para un determinado antígeno. Los anticuerpos son sintetizados por las células plasmáticas que provienen de los linfocitos B. La activación de los linfocitos B depende de la presencia de receptores de antígeno en su membrana. Estos receptores son anticuerpos, los cuales tapizan la superficie de cada linfocito B maduro. Cuando un antígeno contacta con la célula B, sus determinantes antigénicos se unen a los anticuerpos de superficie que les son complementarios. Por ello, solo aquellos linfocito que poseen receptores afines, se diferenciarán en células plasmáticas productoras de anticuerpos con tal especificidad.

En los mamíferos existen cinco isotipos o clases de anticuerpos o inmunoglobulinas.

IgG Es la inmunoglobulina más abundante de la circulación sanguínea, comprende aproximadamente 70% del total de las inmunoglobulinas circulantes. Existen cuatro subclases designadas como IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , e IgG_4 , aunque todas presentan estructuras muy semejantes, poseen distintas actividades biológicas (Roitt y cols. 1996).

IgM Es el primer anticuerpo que aparece en la circulación sanguínea, en respuesta a una estimulación antigénica inicial. A pesar de que la producción de *IgM* no es prolongada, su participación inicial es importante ya que comparada con otras inmunoglobulinas, es un polímero que capta mayor número de antígenos y es mucho más efectivo para activar a las moléculas del complemento.

IgA. Es la inmunoglobulina más abundante en el organismo. Hay dos subclases, IgA_1 e IgA_2 , y se encuentra en dos formas, una monomérica (generalmente IgA_1) que se halla en la circulación sanguínea, y otra polimérica presente en las mucosas. La *IgA* sérica, activa a los componentes del complemento por la vía alterna (Roitt y cols. 1996).

IgD. Esta molécula prácticamente no se encuentra libre en el plasma sanguíneo, su función no ha sido plenamente identificada aunque se ha demostrado que es un receptor de antígeno en los linfocitos B maduros, por lo que se considera un marcador de la maduración para estas células. En algunos estudios se le atribuye una participación en la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos.

IgE. Se encuentran en mínima concentración en el plasma sanguíneo. Causa diversos procesos alérgicos como la fiebre del heno. En las mucosas, la IgE tiene una función importante en la respuesta inmunitaria contra los parásitos por que, activa la degranulación de las células cebadas. Estas células poseen receptores para la Fc (fracción cristalizable) de la IgE, la cual puede fijarse a la superficie celular y de esta manera interactuar con el antígeno, produciendo la liberación de sustancias vasoactivas como la histamina, la serotonina, etc., que desencadenan los síntomas de las alergias (Roitt y cols. 1996).

En términos generales, los anticuerpos son moléculas efectoras de la respuesta inmunitaria, que inhiben la adhesión de los parásitos, neutralizan toxinas y los virus, opsonisan a las partículas favoreciendo la fagocitosis, activan al sistema del complemento e inmovilizan a las bacterias. Además, el enlace de la Fc de la IgG con los monocitos, con los granulocitos o con las células asesinas naturales, (NK) y el Fab unido con células extrañas (parásitos, tejido injertado, etc.) causa la destrucción de la célula blanco, proceso denominado toxicidad celular dependiente de los anticuerpos. Del mismo modo, otros anticuerpos como el IgE, estimulan la degranulación de los eosinófilos o las células cebadas para la eliminación de los parásitos (Roitt y cols. 1996).

RESPUESTA CELULAR

Las diversas funciones de la célula T se denominan colectivamente como respuesta inmunitaria celular. Este tipo de reacción es importante en la protección contra las infecciones, en particular por los virus y los hongos, así como en la eliminación de las células tumorales. Los mecanismos mediados por los linfocitos T comprenden la inducción de la respuesta humoral, la citotoxicidad, así como los mecanismos de cooperación y supresión.

Existen dos grandes subpoblaciones de linfocitos T: aquellos linfocitos T portadores de la proteína CD4 que por su función reguladora se denominan cooperadores de la respuesta inmunitaria, y los linfocitos T portadores de la proteína CD8, que son células efectoras de la respuesta celular y que por su función se denominan citotóxicos. Tanto los linfocitos T CD4⁺ como los CD8⁺ poseen los mismos receptores para el reconocimiento del antígeno; pero la activación se inicia con la unión específica de sus receptores con un complejo formado por el antígeno y una molécula de histocompatibilidad. Los linfocitos T citotóxicos reconocen a los péptidos unidos con moléculas de la clase I, mientras que los cooperadores se activan mediante péptidos unidos con moléculas de la clase II (Roitt y cols. 1996).

Se ha descrito que la activación inicial de las células inmunitarias es mediada en gran parte por el reconocimiento de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, y se ha observado que luego de la interacción celular, se producen temporalmente distintas proteínas solubles, denominadas citocinas. Estas moléculas regulan la intensidad de la respuesta ya que inducen el crecimiento y la madurez de las células activadas, transformándolas en células efectoras de la respuesta. La presencia de receptores

para citocinas en las células activadas, se apoya en una estimulación antigénica específica; esto permite que la respuesta inmunitaria esté dada por la proliferación de determinados clones ya que sólo algunos de ellos expresan receptores para los mediadores de la respuesta.

En contraste con los anticuerpos, las citocinas no reaccionan con los antígenos que inducen su producción pero son portadoras de mensajes que han de originar una respuesta en grupos celulares distantes, por lo que han sido consideradas como las hormonas de la inmunidad (Roitt y cols. 1996).

Citocinas

Las citocinas son mediadoras de la RI e inflamación, su secreción es breve, actúan en diferentes tipos celulares, su acción frecuentemente es redundante e influyen sobre la acción de otras citocinas, se unen a receptores específicos en las células blanco, que son polipéptidos producidos principalmente por macrófagos y linfocitos.

Interleucina 1. La interleucina 1 (IL-1) es considerada como un importante mediador inflamatorio. *In vitro* la IL-1 promueve la liberación de la prostaglandina E₂ (PGE₂) de muchos tipos celulares. *In vivo* la IL-1 produce reacciones inflamatorias sistémicas tales como fiebre, reduce el hierro en plasma y el zinc, e incrementa el cobre en plasma. Localmente la IL-1 promueve la adhesión de los neutrófilos al endotelio de los vasos sanguíneos; los neutrófilos son liberados de la médula ósea como respuesta a esta citocina. Además, la IL-1 estimula la producción y la proliferación de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ e incrementa la síntesis de IL-2, IL-6 e IL-8. Los macrófagos y los queratinocitos producen grandes cantidades de interleucina 1 (IL-1) como respuesta a un estímulo infeccioso o al daño tisular e incluso su síntesis se incrementa al estar en contacto con la misma IL-1. El receptor de la IL-1 es una proteína de superficie que se expresa en fibroblastos y

macrófagos, así como en linfocitos T y B activados, su actividad es inhibida por la interleucina 10 (IL-10), por las prostaglandinas y los corticoides (Durum 1993).

Interleucina 2. Este factor por sí solo estimula el crecimiento y diferenciación *in vitro* de cultivos de los linfocitos T, por lo que se le denominó originalmente como factor de crecimiento de las células T (TCGF; del inglés: T cell grow factor). La IL-2 es producida por linfocitos T activados (cooperadores o citotóxicos), estimula la secreción de diversas linfoquinas, también tiene efecto sobre la NK, las cuales no requieren un contacto previo con el antígeno. En sinergismo con la IL-4, es factor de crecimiento y diferenciación de los linfocitos B activados. En los macrófagos induce la expresión de las moléculas de clase II del MHC. En la médula ósea, activa la generación preferencial de las células NK.

Un aspecto importante en la regulación del efecto de la IL-2 es la expresión de los receptores en la superficie celular. El receptor de la IL-2 es inducido y se expresa en los linfocitos T, las células NK, los linfocitos B, los macrófagos y las células inmaduras de la médula ósea (Roitt y cols. 1996).

Interleucina 3 Es una glicoproteína inducible que se sintetiza en las células activadas; la producen los linfocitos T CD4+, las células NK y los mastocitos. Previamente se le denominó como factor de crecimiento de las células hematopoyéticas (HCGF), ya que en la médula ósea es un factor de auto-renovación de los blastos que son el origen de nuevas células, favorece la proliferación de los monocitos y los macrófagos.

Interleucina 4 Es producida por linfocitos T y mastocitos, aunque también la IL-1 puede inducir su secreción en el estroma celular de la médula ósea. La interleucina 4 (IL-4) primero se denominó como factor 1 de crecimiento para las células B (BCGF-1), luego factor estimulador de las células B (BSF-1) ya que actúa principalmente en las células B,

también induce diferenciación en las células pre-B que expresan IgM de superficie y aumentan la expresión de moléculas de clase II del MHC en los linfocitos B. En sinergismo con la IL-3 inducen la diferenciación de los mastocitos, tiene acción en los linfocitos T, los macrófagos y los granulocitos. La IL-4 induce la expresión de la IL-2 y de su receptor de alta afinidad en los linfocitos T activados, tiene un efecto semejante al factor activador de los macrófagos (Roitt y cols. 1996.).

Interleucina 5 Es producida principalmente por los linfocitos T CD4+ por estímulos antigénicos y por los mastocitos, induce la proliferación *in vitro* de los linfocitos B activados por antígenos, incrementa la expresión del receptor de la IL-2 en los linfocitos B y en presencia de la IL-4 amplifica la síntesis de la IgE. Un efecto importante de esta interleucina es que induce la diferenciación de los eosinófilos a partir de sus precursores de la médula ósea. En los eosinófilos, incrementa la liberación del contenido granular, lo que sugiere su participación en la reacción inflamatoria. Otros efectos incluyen que, en presencia de la IL-2, favorece la proliferación de los linfocitos T CD4+, así como la diferenciación de los linfocitos CD8+y la citotoxicidad de las células NK (Roitt y cols. 1996).

Interleucina 6 Su síntesis es inducida por la IL-1, la IL-2 y el factor de necrosis tumoral (TNF) y su principal origen son los macrófagos, los linfocitos T y los mastocitos. Sin embargo, en las células no hematopoyéticas (células endoteliales, fibroblastos y queratinocitos) también puede ser inducida por otras citocinas como en el caso de los fibroblastos que la producen por efecto del interferón beta (IFN β). Los efectos de la IL-6 se asemejan a los de la IL-1 ya que es multifuncional en distintos tejidos. La IL-6 estimula la

proliferación de los linfocitos B. Esta interleucina es el principal inductor que convertirá los linfocitos B en células plasmáticas funcionalmente activas (Roitt y cols. 1996).

Interleucina 8 Es sintetizada principalmente por los monocitos, pero existen otras células que la producen como los fibroblastos, los queratinocitos y las células endoteliales en respuesta a la IL-1. La IL-8 es un quimiotáctico para los neutrófilos y en menor grado para los basófilos y los linfocitos T. En los neutrófilos induce además un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión por lo que favorece la unión de las células a las paredes endoteliales de los vasos permitiendo su migración hacia el gradiente de IL-8 (Roitt y cols. 1996).

Interleucina 10 La interleucina 10 (IL-10) es secretada por una subpoblación de los linfocitos T cooperadores que suprimen la producción de citocinas en subpoblaciones de linfocitos T que no la sintetizan. Por lo anterior, se le ha denominado factor inhibidor de la síntesis de citocinas y posiblemente constituye un factor de regulación de la respuesta inmune (Roitt y cols. 1996).

Interleucina 12. La interleucina 12 (IL-12) es producida por los monocitos-macrófagos y linfocitos B. En las células NK y los linfocitos T induce la transcripción y la secreción de citocinas, aumenta la actividad citotóxica e induce la producción del IFN γ .

Interferón gamma Originalmente fue descrito por su actividad anti-viral, es producido por los linfocitos T activados por un mitógeno, por un antígeno o por las células NK activadas, inhibe la producción de la IL-4 y neutraliza la inducción de la síntesis de anticuerpos, promueve la expresión de las moléculas de la clase II del MHC en las células que normalmente no lo presentan como son los queratinocitos, las células del tejido conectivo, las endoteliales y aún las epiteliales; induce la expresión de los receptores para la IL-2 en

fagocítica y microbicida. Una de las características de todas las células fagocíticas es que en la fase inicial del proceso de fagocitosis, captan oxígeno en forma acelerada (estallido respiratorio), produciendo gran cantidad de radicales libres (RL). El estallido respiratorio también se observa en células de la microglia del cerebro, monocitos, basófilos, fibroblastos y eosinófilos. De hecho, los monocitos muestran un estallido respiratorio más marcado pero no tan grande como el de los neutrófilos. Los monocitos contienen una enzima tipo mieloperoxidasa muy activa que desaparece conforme se diferencian los macrófagos.

La gran cantidad de radicales libres (RL) que se producen durante la respuesta inflamatoria, lleva a un estado de estrés oxidante que da como consecuencia la destrucción del tejido medular. Los RL son capaces de modificar las biomoléculas como los lípidos de la membrana (lipoperoxidación), las proteínas, los ácidos nucleicos, etc. (Zwart y cols. 1998).

BIOLOGÍA DE LOS RADICALES DEL OXÍGENO.

Los electrones de átomos y moléculas sólo pueden ocupar regiones de espacios denominadas orbitales. Cada órbita solo puede contener dos electrones como máximo.

Cuando en un orbital atómico externo hay un solo electrón, se dice que este último no está apareado, con base en esto: un radical libre es cualquier especie atómica o molecular que tenga uno o más electrones no apareados, por lo tanto un número total impar de electrones.

Los pares de electrones de cada orbital tienen un giro o rotación sobre su eje opuesto entre sí (antiparalelo). El giro electrónico es un vector que representa el campo magnético inducido por la rotación, de tal manera que un par de electrones con giro opuesto anulan recíprocamente su campo magnético.

Los radicales libres son por lo general muy reactivos y buscan con avidez completar su par electrónico. Esto puede lograrse mediante una reacción entre dos radicales, con lo cual ambos dejan de serlo, o bien sustrayendo un electrón de otra molécula, la cual se convierte entonces en un radical. Este último mecanismo puede dar lugar a reacciones en cadena, es decir la propagación del fenómeno inicial.

RADICALES DERIVADOS DEL OXÍGENO

Cuando una molécula de oxígeno acepta un electrón, se convierte en un radical con carga negativa, el anión superóxido. Este se representa con el signo negativo de la carga aniónica y un punto que indica que se trata de un radical (es decir la presencia de un electrón no apareado) O_2^- . El segundo producto de la reacción (H_2O_2), no es realmente un radical, pero su importancia radica en que por su captación de un electrón y de un protón puede dar lugar a la formación de una molécula de agua y a un radical hidroxilo OH^{\cdot} .

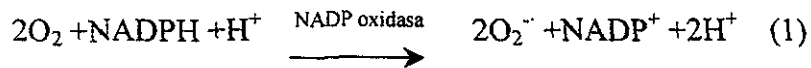
El oxígeno molecular puede absorber energía (22kcal/mol) y convertirse en una molécula sumamente reactiva: el singulete de O_2 , representado gráficamente como $^1O_2^*$

Por absorción de otras 15 kcal/mol, este singulete puede convertirse en otro representado gráficamente como $^1O_2^{**}$, cuya vida es efímera y se convierte rápidamente en el singulete $^1O_2^*$. En la formación de los singuletes no hay adición de los electrones, sino que se trata realmente de redistribución de los mismos en el último orbital.

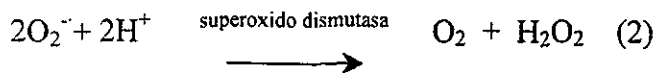
PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE RADICALES

Anión superóxido Una pequeña porción del O_2 utilizado en la respiración mitocondrial, escapa como superóxido (del 1 al 2% del O_2 consumido). Quizá la fuente más importante de producción de radicales superóxido *in vivo* sea la del estallido respiratorio de

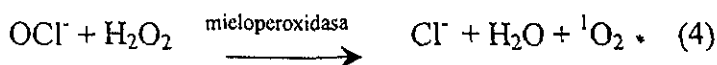
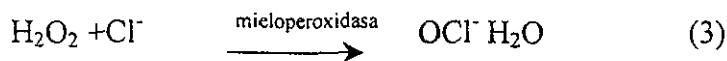
las células fagocitarias activadas por contacto con partículas extrañas. En la membrana citoplasmática de estas células se encuentra un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa que cataliza la siguiente reacción:



La presencia en el citoplasma del fagocito de la enzima superóxido dismutasa, produce la siguiente reacción:

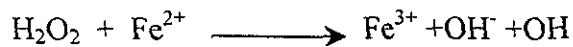


Los fagocitos contienen también una mieloperoxidasa, que utiliza el poder oxidativo del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para transformar los halógenos e hipohalógenos, según las siguientes reacciones:



Como se puede observar, en las reacciones 1 y 4 el aumento en el consumo de oxígeno en el estallido respiratorio de los fagocitos está destinada a producir una gran cantidad de metabolitos del oxígeno, como el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el singulete de oxígeno, que tienen poder bactericida, aún cuando no todos sean propiamente radicales.

Radical hidroxilo. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) formado en la reacción (2), a pesar de no ser en sí un radical, tiene una importancia vital, ya que en presencia de los metales de transición Cu^+ o Fe^{2+} da lugar a la formación del radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton.



Por otro lado, el radical anión superóxido cede uno de sus electrones para restaurar el Fe^{2+} que es necesario para la formación de radical hidroxilo, por medio de la siguiente reacción :



El conjunto de reacciones descritas, es decir, la dismutación del radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) que produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual a su vez se descompone en el radical hidroxilo (OH^\cdot) con intervención del Fe^{2+} y la regeneración de este último por medio del radical anión superóxido, constituye el ciclo de Haber-Weiss.

La coexistencia del radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) y del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en un medio biológico que tiene hierro, es muy peligrosa, ya que el radical hidroxilo (OH^\cdot) formado es un radical altamente reactivo que interacciona con casi todas las moléculas que se encuentran en el organismo, a velocidades sólo limitadas por su difusión.

Existen radicales libres (RL) que están constituidos por otros elementos químicos como son: azufre (S), nitrógeno (N), cloro (Cl), carbono (C), etc. a los cuales puede o no asociarse el oxígeno, por ejemplo SO^\cdot , NO^\cdot , CO^\cdot , etc. Algunos metales como el Fe, el Mn, el Co, el Ni y el Cu también pueden ser considerados como RL ya que contienen electrones sin aparear.

Hay varias vías en las células aeróbicas que conducen a la producción de RL del oxígeno por ejemplo, la producción en la respiración mitocondrial normal, la oxidación de las catecolaminas y la activación de los neutrófilos, entre otros (Maza y Frishman 1987).

Cuando se producen grandes cantidades de RL las enzimas antioxidantes de la célula que detienen el ataque oxidativo pueden no ser suficientes. Entre estas defensas tenemos: Las superóxido dismutasas, (convierten el anión superóxido en peróxido de hidrógeno), la catalasa (transforma al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno), la glutatión peroxidasa (con glutatión reducido (GHS) transforma los peróxidos en agua y oxígeno) (Figuras 5 y 6), la vitamina E (atrapa radicales hidroxilo), los beta carotenos (atrapadores de singulete de oxígeno), etc. Cuando los mecanismos de defensa son sobrepasados esto se traduce en un daño oxidativo para la célula originando:

- a) Destrucción de los grupos sulfhidrilo esenciales de las proteínas.
- b) Modificación de las bases nitrogenadas y ruptura de las cadenas de los ácidos nucleicos, originando un daño genético y posteriormente mutaciones.
- c) Ataque de ácidos grasos de las membranas ya que estas están constituidas principalmente de ácidos grasos poliinsaturados que son blanco preferencial de ataque por los radicales libres. Este ataque, a su vez origina alteraciones en la permeabilidad de la membrana y por lo tanto incapacidad para generar gradientes iónicos, lo que trae como consecuencia un decremento en la capacidad metabólica al no tener la célula, por un lado la capacidad para generar el ATP lo que lleva a un edema celular, además se incrementa la entrada Ca^{2+} , que a su vez activa enzimas que provocan la digestión de metaloproteínas, lo que hace que se

liberen los metales de transición, y se originen más radicales libres, llevando todo esto a la muerte celular.

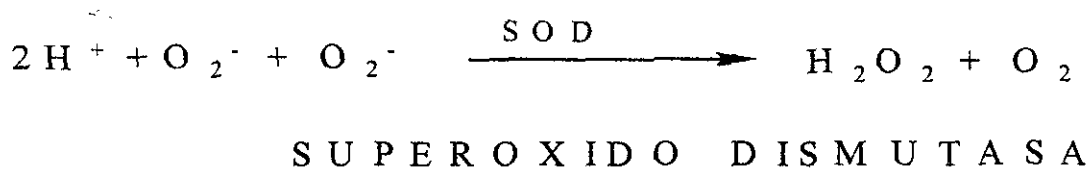


Figura 5 Actividad de dos enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, durante el estrés oxidante. O_2^- : anión superóxido, H_2O_2 : peróxido de hidrógeno.

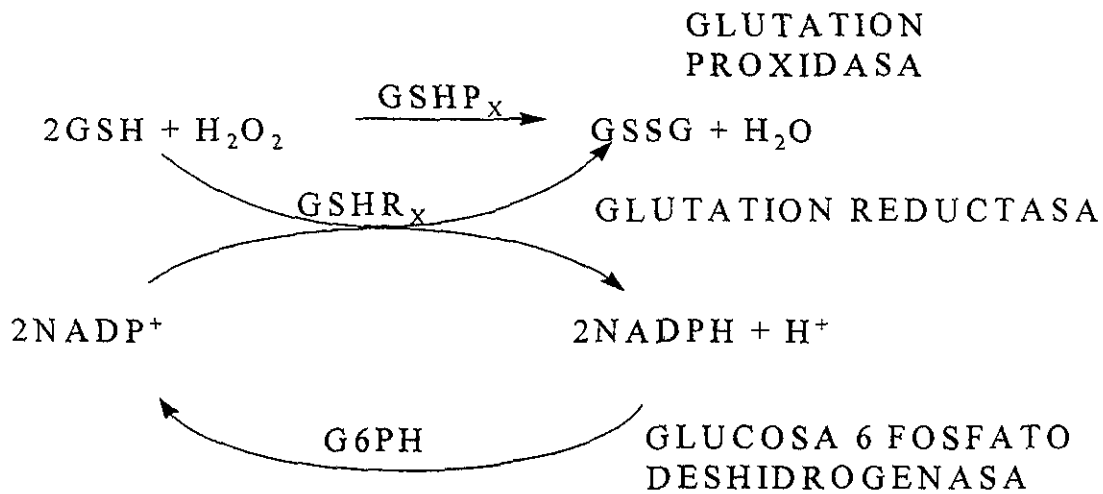


Figura 6 Mecanismo por el cual la glutationperoxidasa (GSHP_x) transforma el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno para disminuir el estrés oxidante. GSHR_x : glutation reductasa; 2GSH : glutation reducido; GSSG : glutation oxidado; $\text{NADPH} + \text{H}^+$: NADPH reducido; NADP^+ : NADP^+ oxidado; G6PH : glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

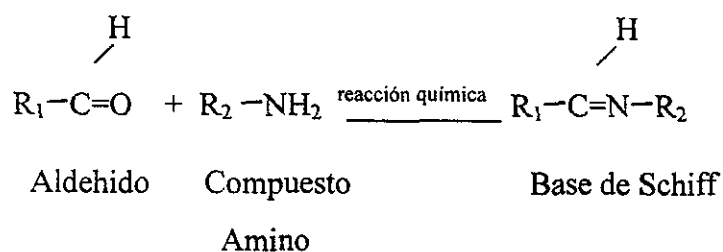
LIPOPEROXIDACIÓN

El proceso de lipoperoxidación está dividido en tres etapas: inicio, propagación y terminación (Halliwell y Gutteridge 1985). *El Inicio* de la lipoperoxidación en un ácido graso polinsaturado de la membrana es debido al ataque de una molécula lo suficientemente reactiva para abstraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno ($-\text{CH}_2-$), una vez que el hidrógeno es removido, el átomo de carbono queda con un electrón desapareado ($-\text{CH}-$). La presencia de dobles enlaces en los ácidos grasos debilita la unión C-H, y así es fácilmente removido el hidrógeno. El radical carbono tiende a estabilizarse por medio de un rearrreglo molecular para producir un dieno conjugado, el cual fácilmente reacciona con oxígeno molecular para dar un radical peroxi $\text{R}-\text{OO}\cdot$, este radical puede abstraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso, (*estado de propagación de la lipoperoxidación*) y así una vez que el proceso es iniciado tiende a continuar mediante reacciones en cadena. El radical peroxil combinado con el átomo de hidrógeno forma un hidroperóxido de lípido $\text{R}-\text{OOH}$, además también se forman peróxidos cíclicos y endoperóxidos cíclicos. Estos compuestos son moléculas moderadamente estables a temperatura fisiológica, pero en presencia de metales de transición se cataliza su descomposición. La ferritina cataliza la descomposición de los hidroperóxidos y éstos son sustrato en presencia de Fe^{2+} para la formación de más radicales como el radical $\text{R}-\text{O}\cdot$, radical alcoxil de reactividad semejante al $\text{OH}\cdot$.

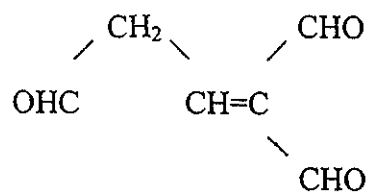
La formación del malondialdehido (MDA) (figura 7) y otros aldehidos es el resultado final de la fragmentación que sufren los peróxidos cíclicos y endoperóxidos.



Finalmente en la fase de *terminación* encontramos la formación de productos finales de la lipoperoxidación que son los aminoiminopropenos o bases de Schiff (lipofuscinas fluorescentes) también llamados productos lipídicos fluorescentes de la peroxidación, estos productos son el resultado de la reacción de compuestos carbonilo como el malonaldehido con grupos amino de las proteínas, aminoácidos libres o ácidos nucleicos.



El MDA también puede polimerizarse y formar polimalondialdehido, que es otro producto final fluorescente de la lipoperoxidación; estos productos son muy estables y no son reactivos (Figura 7).



Polimalondihaldehido

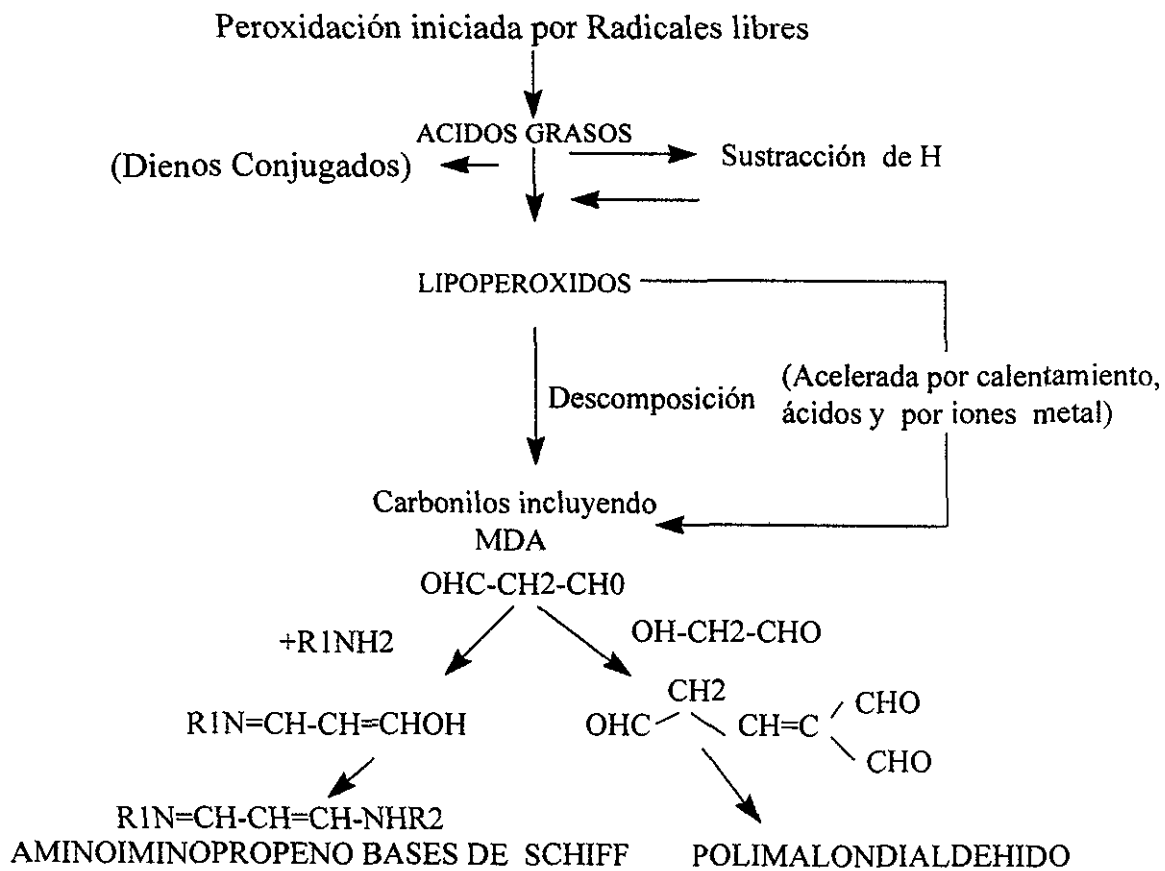


Figura 7. Proceso de lipoperoxidación. H: hidrógeno; MDA: malondialdehido, (Halliwell y Gutteridge 1985).

FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL

La lesión traumática de la médula espinal (LTME), ocasiona alteraciones estructurales y funcionales, que van desde el bloqueo transitorio de la conducción eléctrica, hasta la falta total de la misma, dependiendo del grado de lesión (Goodkin y Cambell 1979, Balentine 1983). El tratamiento, desde el punto de vista médico, tiene un elevado costo por el gasto de recursos tecnológicos y posteriormente, por las limitaciones que se generan para poder reintegrar a los pacientes a sus actividades productivas. Algunos estudios indican que la incidencia de morbi-mortalidad de este padecimiento es considerablemente elevada

(Bedbrook 1987, Stover y Fine 1987). En nuestro país se reporta en la zona metropolitana del Distrito Federal una incidencia de 12 por millón (Ibarra y cols. 1990), y en un estudio más reciente en la misma zona se reporta una incidencia de 9 por cada millón de habitantes (Grijalva y cols. 1995).

Después de producirse una lesión medular mecánica (lesión primaria) se desencadenan una serie de mecanismos autodestructivos (lesión secundaria) que originan una destrucción mayor del parénquima medular con secuelas a largo plazo (Goodki y Cambell 1979, Balentine, 1983, Lemke y cols. 1987). El primer mecanismo secundario que aparece después de la LTME es la pérdida de la regulación iónica, incrementándose la concentración de los iones de Na^+ y Ca^{2+} intracelulares y disminuyendo los iones de K^+ y magnesio (Mg); esto lleva a una despolarización de la membrana neuronal y al acarreo de moléculas de agua asociadas con los iones Na^+ y Ca^{2+} lo que produce edema (Lemke y cols. 1987, Young y Koreh 1986). El exceso de Ca^{2+} libre intracelular activa las proteasas neutras que destruyen los neurofilamentos, parte fundamental del citoesqueleto axonal, observándose en las primeras horas o días poslesión un colapso y fragmentación axonales (Siegel y cols. 1998). Además, el Ca^{2+} libre también activa proteasas y fosfolipasas que actúan sobre la mielina destruyéndola (Balentine 1988). Asimismo se observa liberación de glutamato y aspartato en grandes cantidades, como resultado de la entrada masiva de Ca^{2+} , provocando excitación intensa de las neuronas viables; este efecto tóxico se conoce como excitotoxicidad (Feden y Sinon 1988). Otro mecanismo de la lesión secundaria es la neurotoxicidad causada por el ataque de los RL a las biomoléculas del tejido nervioso (estrés oxidativo) (Zwart y cols. 1998). El SNC es particularmente sensible al ataque de los RL por varias razones. La membrana celular lipídica es rica en colesterol y ácidos grasos

poliinsaturados los cuales son blanco preferencial de los RL de oxígeno. Además el SNC es rico en hierro, y éste es el principal inductor de la producción de RL después de una lesión en el propio SNC. Asimismo el SNC tiene pocas defensas antioxidantes, lo que origina que sea aún más vulnerable (Feden 1987) (Figura 8). Cuando ocurre una LTME, los RL también atacan a otras biomoléculas como son las proteínas, el DNA y el RNA, provocando mutaciones o daños irreversibles que llevan a la muerte celular (Zwart y cols., 1998). Otra molécula que es producida por diferentes tipos celulares después de una LTME y que puede dañar el parénquima medular es el óxido nítrico (ON), (Hamada y cols. 1996a y 1996b). Cuando se activan los receptores del tipo NMDA por acción del glutamato, se abren canales de Ca^{2+} acoplados al receptor, así como canales sensibles a voltaje, aumentando la concentración de Ca^{2+} intracelular. El Ca^{2+} a su vez activa a la oxido nítrico sintasa constitutiva (ONSc), originando un incremento en síntesis de ON. El ON reacciona con el anión superóxido para formar peroxinitrito ($\text{O}_2^- + \text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^-$). A pH fisiológico el peroxinitrito reacciona con las proteínas, los fosfolípidos, etc., o bien se descompone en productos citotóxicos como ion nitronio (NO_2^+), bióxido de nitrógeno (NO_2) y radical $\cdot\text{OH}$, así que parte de la toxicidad del ON puede deberse a su interacción con O_2^- (Paker y Murphy 1994). Por otra parte, se sabe que el ON desacopla la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, produciendo RL (Siegel y cols. 1998) (Figura 8).

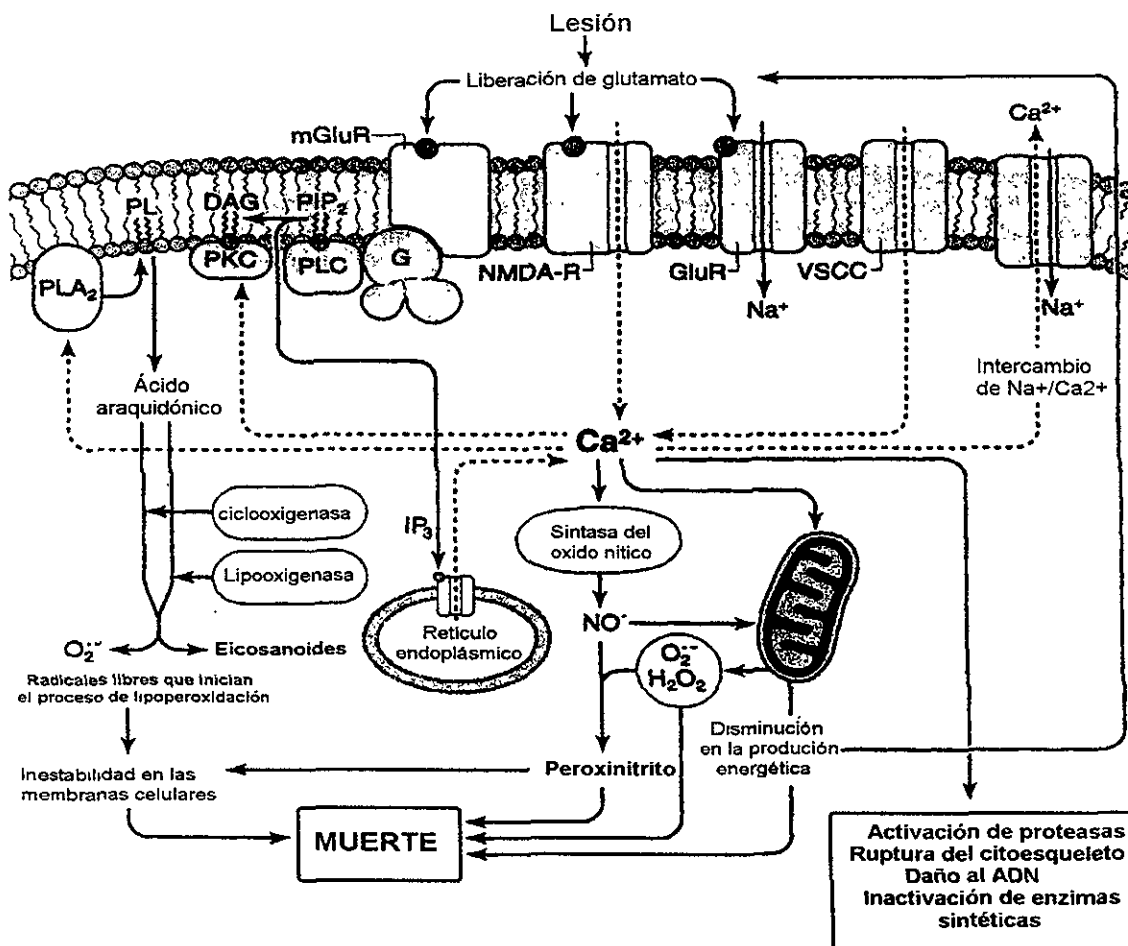


Figura 8 Vías que contribuyen a la excitotoxicidad neuronal después de una lesión. *mGluR*: receptor metabotrópico de glutamato; *NMDA-R*: receptor *N*-metil-*D*-aspartato; *AMPA/KA*: receptores de glutamato tipo *AMPA/KA*; *PL*: fosfolípidos; *PLA2*: fosfolipasa *A2*; *DAG*: diacilglicerol; *PLC*: fosfolipasa *C*; *PKC*: proteína cinasa *C*; *G*: proteína *G*, *PIP2*: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; *IP3*: inositol 1,4,5-trifosfato; *ON*: óxido nítrico; O_2^- : radical superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrógeno; *VSCC*: canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje. (Diagrama modificado de Siegel y cols. 1998).

Además el ON tiene un efecto directo sobre aquellas enzimas en cuyos centros catalíticos existe hierro/sulfuro, como son: la ribonucleótido-reductasa, en la síntesis del ADN y tres enzimas mitocondriales contenidas en el ciclo de Krebs, además de la NADPH-

ubiquinona oxido reductasa, así como la succinato-ubiquinona oxido reductasa en la cadena transportadora de electrones (Schweizer y Richter 1994). Por otro lado, el ON juega un papel importante sobre la respuesta inflamatoria, por estimulación de la ciclooxigenasa, aumentando la producción de prostaglandinas (Vladutiu, 1995).

Finalmente otro mecanismo muy importante que se origina después de una LTME y que tiene una alta participación en la generación de RL es la respuesta inflamatoria. Casi inmediatamente después del traumatismo ocurre una reacción inflamatoria que involucra la acción de mediadores químicos, la bradicidina y sus precursores (Francel 1992), las citocinas: interleucina 1, interleucina 2, interleucina 6, factor de necrosis tumoral alfa (NTF α), etc. y la participación de las células inflamatorias, lo que origina la activación de células inmunológicas residentes (astrocitos y microglía) y de las reclutadas desde la periferia: macrófagos, linfocitos, etc. (Popovich y cols. 1997).

La respuesta inmune a la lesión involucra dos etapas de infiltración celular (Popovich y cols. 1997): La primera, dominada por células polimorfonucleares (PMN) que predomina durante las primeras horas (Blight 1992). Los neutrófilos aparecen en la pared de las venas y vénulas adyacentes a la lesión, en las primeras 3 a 4 horas (Dussart y Schwab 1994, Means y Anderson 1983), siendo observados en el tejido hasta las 8 a 24 horas posteriores a la lesión (Means y Anderson 1983). La respuesta inflamatoria se ve reflejada en el aumento del número de leucocitos en el líquido cefalorraquídeo (Travlos y cols. 1994), la infiltración de células PMN en el sitio de lesión (Braund y cols. 1990; Means y Anderson 1983), el incremento en los niveles de leucotrienos (LT), principalmente LTB₄, así como en la actividad de la mieloperoxidasa (Hsu y cols. 1986). Además, en estudios experimentales se ha demostrado que entre 3 y 12 horas posteriores a la lesión, existe un

aumento significativo de la molécula de adhesión intercelular I (ICAM-I), la cual participa en la infiltración tisular de los neutrófilos (Hamada y cols 1996b).

La segunda etapa de infiltración celular se caracteriza por la presencia de macrófagos, mismos que se observan en los primeros dos días y alcanzan un pico de los 5 a 7 días poslesión (Blight 1992). A los dos días postlesión existe proliferación y reclutamiento de macrófagos y microglía, siendo mayor dentro de los 4 a 8 días (Dussart y Schwab 1994). Después de la lesión se han detectado productos de estas células (IL-1) (Wang y cols. 1997). Durante esta fase también se ha observado infiltración linfocitaria de los 3 a los 7 días poslesión (Popovich y cols. 1997)

A pesar de que se le han conferido efectos benéficos a la respuesta inflamatoria (Lotan y Schwartz 1994), después de una LTME, dicha respuesta puede ser la responsable de la necrosis del tejido lesionado y circundante (Rothwell y Relton 1993; Lotan y Schwartz, 1994; Zhang y cols. 1997), ya que se sabe que esta respuesta inflamatoria juega un papel muy importante en la generación de RL, que dañan a las células nerviosas y endoteliales

Todas estas alteraciones y fenómenos que ocurren a nivel molecular tienen relación con la degeneración gradual del tejido destruyendo el sustrato anatómico necesario para la recuperación neurológica (Ikeda y Long 1990).

Por otra parte, se sabe que después de una LTME existen alteraciones cardiovasculares, renales, respiratorias, hepáticas, etc. que provocan la muerte (Geisler y cols. 1983). En un trabajo realizado por Dinmova-Apostolova y colaboradores (Dinmova-Apostolova y cols. 1999), observaron que existe un incremento en la concentración de catecolaminas en hígado de rata después de una lesión en la médula espinal,

incrementándose, los niveles de norepinefrina, desde 1 a 24 h después de la lesión, así mismo existe un incremento en las concentraciones de dopamina (7 veces) a partir de las 4 h después del procedimiento quirúrgico.

Finalmente, se ha observado que en pacientes con LTME existe un incremento del 13 al 17% en la transaminasa pirúvica glutámica sérica y en la transaminasa oxalacética glutámica sérica (8 al 17%), además, en algunos pacientes se incrementa la concentración de fosfatasa alcalina y de bilirubina, se piensa que esta alteración se debe a un daño en el hígado como consecuencia de la lesión sin embargo esto no esta del todo claro (Bloom y Freed 1989).

NEUROPROTECCIÓN EN LA MÉDULA ESPINAL

Los trasplantes al SNC han demostrado tener un efecto neuroprotector después de una LTME al disminuir el grado de destrucción de la zona lesionada y aumentar la sobrevivencia de los animales (Guizar-Sahagún y cols. 1994).

Diferentes estudios han demostrado que la utilización de fármacos puede disminuir el grado de lesión neural (proporcionando neuroprotección) en el SNC. Se sabe por ejemplo que la administración de NG-nitro-L-arginina metilester (L-NAME) que es un inhibidor de la producción del ON durante la fase aguda de la LTME, promueve una recuperación clínica significativamente mayor en los animales que recibieron el tratamiento con respecto a los que no (Hamada y cols. 1996a).

CLENBUTEROL. Revierte la atrofia muscular después de una LTME cuando se administra a una concentración de 10mg/kg por día. El clenbuterol es un agonista del receptor β_2 adrenérgico, que al ser estimulado promueve que se expresen diversos factores

tróficos, además se ha observado que por medio de este mecanismo se promueve regeneración, y neuroprotección. (Scott y cols. 1999, Zeman y cols. 1999).

Por otra parte algunos antioxidantes pueden ayudar a disminuir el estrés oxidante originado después de una lesión como son:

ACEITE DE OLIVA. El aceite de oliva es un antioxidante natural que tiene efecto sobre el aumento de la actividad de diversas enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) y la superóxido dismutasa cobre zinc (CuZnSOD) (Pajovic y cols. 1997)

ESTEROIDE U-74006. El uso del esteroide U-74006 que es un potente antioxidante inhibe la actividad fosfolipasa protegiendo a las membranas de la lipoperoxidación y por lo tanto inhibe la liberación del ácido araquidónico (Braugher y Hall 1988). Además, se han empleado fármacos moduladores del metabolismo del ácido araquidónico como el ibuprofeno que es un inhibidor de la ciclooxigenasa o el U63447A que inhibe la actividad de la sintetasa de tromboxanos. El tratamiento con estos fármacos en modelos animales ha demostrado limitar el desarrollo de la isquemia poslesión y la recuperación neurológica (Feden y Salzman 1992).

Se han utilizado la desferroxamina y la superóxido dismutasa y ambas han mostrado ser buenas alternativas terapéuticas en modelos experimentales de lesión del SNC (Feden y Salzman 1992).

21-AMINOESTEROIDES. El tratamiento con 21-aminoesteroides, inhiben la LP ya que actúan como secuestradores de RL, especialmente del lipoperoxil e hidroxilo (Braighler y cols. 1988), además funcionan como quelantes del hierro (Hall y cols. 1992, Coates y cols. 1995). También mantienen, los niveles de vitamina E después de una lesión al SNC.

actuando sobre el núcleo hidrofóbico de las membranas celulares con un efecto estabilizador sobre estas (Hall y cols. 1992). En modelos experimentales de lesión medular se ha observado que promueven la recuperación clínica de los animales y previenen la disminución del flujo sanguíneo (Coates y cols. 1995).

METILAMINOCROMANOS. Los metilaminocromanos son fármacos desarrollados a partir de los lazaroides, a los que se reemplazó una parte de su estructura química por la estructura cíclica antioxidante de la vitamina E (por ejemplo el cromanol). Tienen acciones farmacológicas similares a los lazaroides pero en mayor potencia (cinco veces aproximadamente). Se ha demostrado un aumento en la recuperación neurológica en ratones con lesión tratados con este fármaco (Hall y cols. 1992).

PIRRILOPIRIMIDINAS. Las pirriolopirimidinas son fármacos derivados de los lazaroides que han demostrado (*in vitro*) tener una actividad 100 veces mayor como inhibidores de la LP que sus antecesores. Actúan cediendo electrones a moléculas reactivas, convirtiéndose en moléculas atrapadoras de RL (Hall y cols. 1997).

METILPREDNISOLONA. La metilprednisolona (MP) es actualmente el fármaco más utilizado después de una LTME.

Generalidades sobre la Metilprednisolona

La MP es un corticosteroide, el cual ha sido ampliamente estudiado y los resultados de la literatura indican su efecto benéfico en modelos experimentales con LTME (Hall y Braughler 1982, Young y Flamm 1988, Hall y cols. 1992).

El tratamiento con MP iniciado dentro de las primeras 8 h posteriores a una LTME y administrado a dosis altas durante 24 h, mejora la recuperación motora de los pacientes (Bracken y cols.1990).

Los glucocorticoides como la MP, son potentes agentes anti-inflamatorios. Las investigaciones indican que los glucocorticoides suprimen la inflamación vía la inhibición de la función de las células inflamatorias, incluyendo la quimiotaxis (Espersen y cols. 1989), la fagocitosis (Becker y Grasso 1985), la síntesis de mediadores inflamatorios y la liberación de enzimas lisosomales (Schleimer y cols 1989, Bartholdi y Schwab 1995).

Además, la MP, tiene la capacidad de inhibir a la fosfolipasa A₂ (Hargreaves y Costella 1990), que cataliza la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana, para dar inicio a la formación de eicosanoides sintetizados por activación de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa (Figura 9). La producción de eicosanoides exagera la respuesta inflamatoria y por lo tanto la producción de RL (Williams y Higgs 1988, Flowers 1989).

Por otro lado el uso de la MP ha demostrado tener efectos negativos, ya que su administración en altas dosis produce sangrados intestinales (Levy y cols. 1996). También puede exacerbar la necrosis neuronal postisquémica e inhibir el crecimiento axonal (Bracken y Holford 1993). Asimismo se ha propuesto que la MP puede interferir con la regeneración neuronal (Bracken y cols. 1992).

Igualmente, se sabe que el uso de corticosteroides administrados en megadosis y de forma continua provoca efectos tóxicos que en potencia ponen en peligro la vida de los pacientes (Goodman 1990). La complicación más grave en este caso es la insuficiencia suprarrenal aguda ya que existe una supresión del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal, aunque existen otras como: anomalías de líquidos y electrolitos, la hipertensión, la hiperglucemia, el incremento de la sensibilidad a infecciones, la osteoporosis, la miopatía y las alteraciones conductuales, entre otras. (Goodman 1990).

Otro fármaco que podría ser utilizado como tratamiento después de una LTME es la ciclosporina-A (CsA) que es un fármaco inmunosupresor ampliamente estudiado (Kahan 1989).

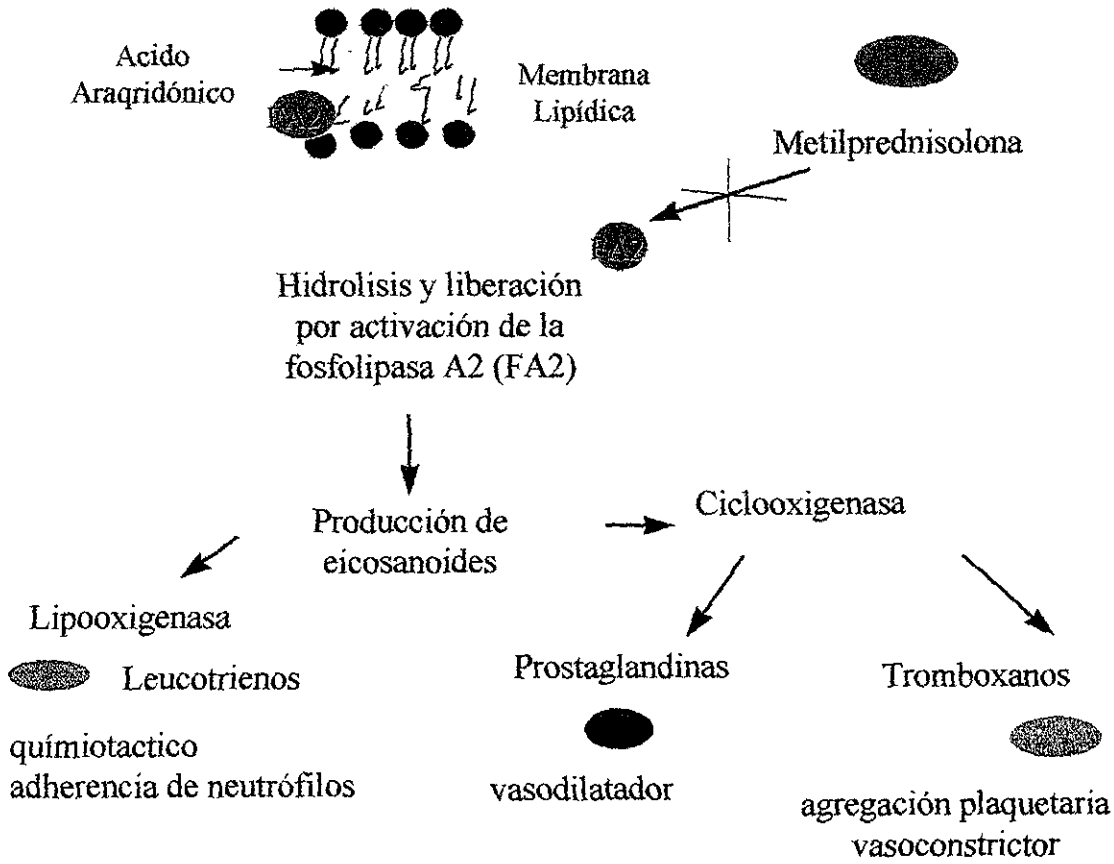


Figura 9 Mecanismo por el cual la metilprednisolona inhibe a la Fosfolipasa A2 (FA2). Por medio de este mecanismo (metabolismo del ácido araquidónico) se sintetizan eicosanoides (leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos) importantes en la exacerbación de la respuesta inflamatoria, ya que algunos de ellos son proinflamatorios.

CICLOSPORINA-A

La CsA es un fármaco lipofílico, neutro y cíclico de 11 aminoácidos y con un peso molecular de 1,202.6 Da, extraído del hongo *Tolypocladium inflatum* Gams. Su sitio inmunosupresor se localiza en los aminoácidos colocados en las posiciones 11, 1, 2 y 3.

Metabolismo

La CsA a nivel hepático es convertida por isoenzimas de la superfamilia del citocromo P-450 en metabolitos que retienen la estructura y que son de alta polaridad. La coadministración de drogas que interactúan con el sistema de citocromo P-450 pueden afectar el metabolismo de la CsA.

Absorción

La absorción de todos los fármacos depende en gran parte de sus propiedades fisico-químicas y de la vía de administración. La absorción de la CsA administrada por vía intravenosa es completa, mientras que la de la administrada por la vía oral es muy variable.

La mayor parte de la CsA en la circulación se asocia con las lipoproteínas de alta, baja y muy baja densidad (Kahan 1989) y con los quilomicrones (Ryffel 1989).

Eliminación

La CsA se elimina principalmente a través de la bilis y una pequeña porción se elimina por la vía renal.

Biodisponibilidad.

La biodisponibilidad de la CsA es muy variable, se encuentran diferencias inter-especie e incluso intra-especie en condiciones fisiológicas y más aún, en modelos experimentales con LTME se han reportado alteraciones en la farmacocinética de la CsA (Ibarra y cols. 1996). Durante la fase aguda de la lesión, la biodisponibilidad del fármaco se

ve muy disminuida cuando éste se administra por la vía oral, pero se eleva enormemente cuando la administración es por la vía intraperitoneal. Durante la fase crónica, dichas alteraciones parecen revertir y la biodisponibilidad se regulariza al administrarse el fármaco por la vía oral.

La CsA es un fármaco accesible, con un esquema de administración ya establecido para los modelos de LTME (Ibarra y cols. 1996). Actualmente la CsA ha dejado de estar en fase experimental ya que una gran cantidad de estudios clínicos (Vries y cols. 1990, Hodgkinson y cols. 1990) y experimentales (Nakayasu y cols. 1990 y Gree 1988) apoyan su eficacia terapéutica.

Por otra parte un estudio realizado en nuestro laboratorio (Ibarra y cols. 1995), demostró que las ratas con LTME severa tratadas con CsA presentaron una recuperación clínica significativamente mayor a la de ratas que no recibieron el tratamiento. La recuperación observada probablemente se debió al efecto inmunosupresor y antiinflamatorio de la CsA, pero también pudo deberse a un efecto neuroprotector ya que al inhibir a la calcineurina, la CsA inhibe la defosforilación de la ONS y con ello su actividad y por consiguiente disminuye la síntesis de ON (figura 11). Además, por el efecto que la CsA tiene al inhibir los factor nuclear NF-AT que dan inicio a la transcripción de la IL-2 y del receptor para la IL-2 se inhibe la respuesta inflamatoria pues el linfocito T no se activa (Ryffel 1989), y se dejan de producir gran parte de las citocinas proinflamatorias como IL-3 (promueve la proliferación de los monocitos y los macrófagos), IL-4 (activa a los linfocitos B y a los macrófagos), IL-5 (ejerce acción sobre la proliferación de los linfocitos B y activa a los eosinófilos), $INF\gamma$ (principal activador de los macrófagos) y $TNF\alpha$ y β (promueve la secreción de PGE_2 y al activación de los linfocitos B) (figura 10), de esta forma el CsA

disminuye la llegada de células inflamatorias al sitio de lesión. Esto es importante porque se sabe que estas células son productoras de grandes cantidades de RL. De esta manera, la CsA estaría protegiendo al tejido del daño oxidante originado por la presencia de las diversas células inflamatorias en el tejido lesionado. Finalmente también se ha propuesto que la CsA al inhibir a la calcineurina podría promover la acción del GAP43 importante en procesos de regeneración axonal (Gold y cols. 1995) (figura 11).

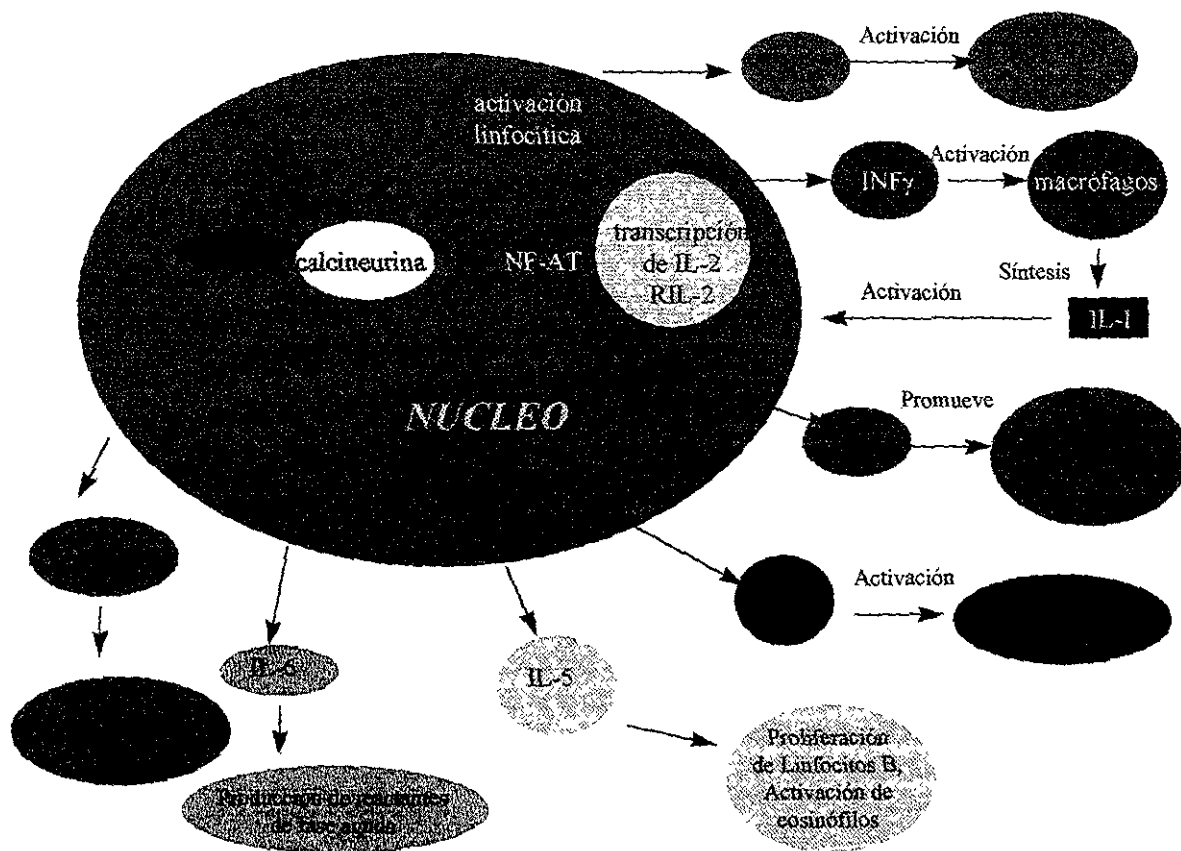


Figura 10 Efecto anti-inflamatorio de la Ciclosporina-A. El factor de transcripción NF-AT (NF-AT), la interleucina (IL), el receptor de la interleucina (RIL), el factor de necrosis tumoral ($TNF\alpha$ y β), el interferón gama ($INF\ \gamma$), la prostaglandina E_2 (PGE_2)

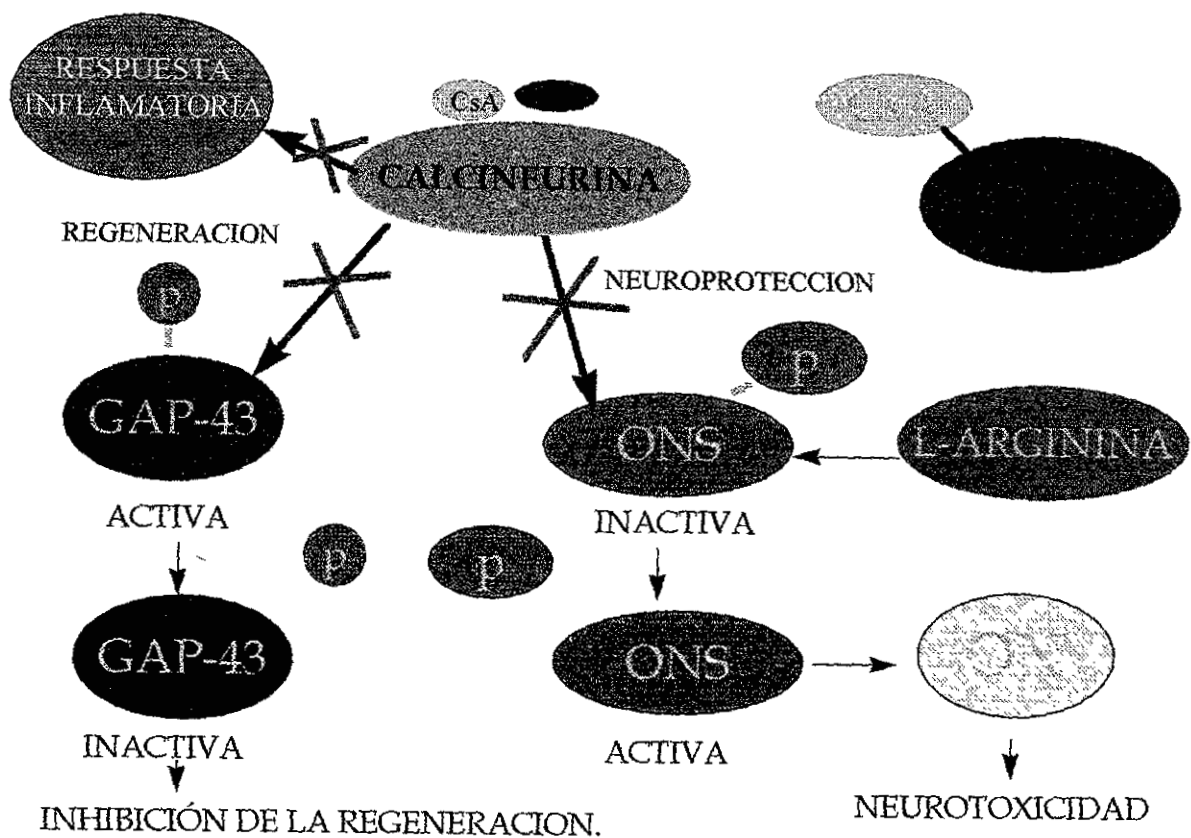


Figura 11. Mecanismo de acción de la ciclosporina-A. CsA: la ciclosporina-A; ONS: la sintasa del óxido nítrico; ON: el óxido nítrico; GAP-43: la proteína de crecimiento axonal; P: el fósforo y CF: la ciclofilina. El organo de mayor depósito de la CsA es el hígado.

En la línea de investigación sobre la neuroprotección después de una lesión en la médula espinal se desea conocer el efecto de la CsA y compararlo con el de la MP después de una LTME.

JUSTIFICACIÓN

La falta de recuperación funcional después de un daño severo al SNC es un problema que se conoce desde hace mucho tiempo. Se han utilizado muchos métodos terapéuticos que han tratado de resolver este problema, sin que hasta el momento se tengan resultados efectivos. El uso de fármacos neuroprotectores, ha proporcionado grandes ventajas, sin embargo, su uso es aún insatisfactorio. Por ejemplo, en el caso de la MP, que es el único fármaco neuroprotector utilizado en la clínica, existe todavía duda sobre su utilidad comparada con los efectos secundarios a su administración ya que es administrada a dosis muy altas (megadosis) mismas que predisponen al paciente a fuertes problemas infecciosos. Por tal razón siguen realizándose estudios con el objetivo de encontrar una mejor opción para resolver este problema. La CsA podría funcionar como un fármaco neuroprotector por su mecanismo de acción, ya que al inhibir la respuesta inflamatoria y la producción del ON, podría disminuir el estrés oxidante y por tanto la LP. Además se trata de un fármaco con un esquema de administración racional y bien estandarizado en modelos de LTME. Hasta el momento no se sabe si la CsA es capaz de disminuir o no la LP y si este efecto es igual, menor o mayor al de la MP. Por todo esto, es importante evaluar la eficacia de la CsA como agente neuroprotector, promotor de la recuperación motora y de la sobrevida en comparación con los efectos de la MP.

HIPÓTESIS

- 1.- La CsA inhibirá la LP después de una LTME.
- 2.- Dicha inhibición será igual o mayor que la originada por la MP
- 3.- La administración conjunta de ambos fármacos originará una mayor inhibición de la LP
- 4.- El efecto neuroprotector de la CsA será capaz de promover una mejor recuperación motora.
5. La CsA promoverá una igual o mayor recuperación motora en comparación con la MP
6. La combinación de ambos fármacos promoverá una mejor recuperación motora que cuando estos son administrados por separado.
7. El tratamiento con CsA promoverá una mejor sobrevida en comparación con la MP o la combinación de ambos fármacos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la ciclosporina-A como agente inhibidor de la lipoperoxidación, promotor de la recuperación motora y de una mejor sobrevida en un modelo experimental con lesión traumática de la médula espinal y compararlo con el efecto producido por la metilprednisolona.

Objetivos Particulares

1.- Evaluar la eficacia de la ciclosporina-A comparada con la de la metilprednisolona administradas por separado o en combinación sobre la inhibición de la lipoperoxidación en el tejido lesionado de animales sometidos a una lesión traumática de la médula espinal.

2.- Evaluar la eficacia de la ciclosporina-A comparada con la de la metilprednisolona administradas por separado o en combinación sobre la recuperación motora evaluada con la escala de Tarlov y el plano inclinado en animales sometidos a una lesión traumática de la médula espinal.

3.- Evaluar la eficacia de la ciclosporina-A comparada con la de la metilprednisolona administradas por separado o en combinación en la sobrevida de los animales sometidos a una lesión traumática de la médula espinal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar los estudios de LP previamente se determinó el tiempo de máxima LP después de una LTME para realizar los estudios posteriores tomando como referencia este tiempo.

DETERMINACIÓN DE LA MÁXIMA LIPOPEROXIDACIÓN DESPUÉS DE UNA LTME

Para estos experimentos se utilizaron 72 ratas de la cepa Wistar adultas hembras de 12 a 14 semanas de edad, entre 200 y 250g de peso de las cuales se distribuyeron como sigue:

GRUPO I Ratas con LTME (N=24)

GRUPO II Ratas con laminectomía y tratadas con solución salina (N=24)

GRUPO III Ratas con laminectomía y tratadas con Sulfato Ferroso (FeSO_4) (N=24).

A los animales del grupo II se les administró 1 μ l de solución salina directamente sobre la médula espinal (testigo negativo)

A las ratas del grupo III se les administró 1 μ l de FeSO_4 a una concentración de 100 μ mol/ μ l (se sabe que promueve LP (Triggs y Willmore 1984)) inyectada directamente sobre la médula espinal (testigo positivo).

Seis ratas de cada grupo fueron sacrificadas a 2, 4, 8 y 24 h después del procedimiento quirúrgico.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA CICLOSPORINA-A Y LA METILPREDNISOLONA SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN, LA RECUPERACIÓN MOTORA Y LA SOBREVIDA.

Se utilizaron un total de 166 ratas con las mismas características antes mencionadas y se formaron 21 grupos (Tabla II).

Tabla II
Diseño experimental^a

Cuantificación de lipoperoxidación ^b					Evaluación motora y sobrevida ^c				
Grupo	Procedimiento	Inicio de CsA ^d	Inicio de MP ^e	N	Grupo	Procedimiento	Inicio de CsA	Inicio de MP	N
I	Sin procedimiento Qx	No	No	6	I	Lesión	No	No	13
II	Laminectomía	No	No	6	II	Lesión +Vehículo	48 ^e	No	8
III	Laminectomía	1	No	6	III	Lesión	1	No	8
V	Lesión	No	No	6	IV	Lesión	2	No	8
VI	Lesión +Vehículo	48 ^e	No	6	V	Lesión	6	No	8
VII	Lesión	1	No	6	VI	Lesión	12	No	8
VII	Lesión	2	No	6	VII	Lesión	48 ^e	No	8
VIII	Lesión	6	No	6	VIII	Lesión	No	1	16
IX	Lesión	12	No	6	IX	Lesión	1	1	17
X	Lesión	48 ^e	No	6					
XI	Lesión	No	1	6					
XII	Lesión	1	1	6					

^a Los animales fueron distribuidos en doce grupos para cuantificar la lipoperoxidación (LP) y en nueve grupos para la evaluación motora (prueba de Tarlov) y la sobrevida. ^b La prueba se realizó 24 horas después del procedimiento quirúrgico. ^c La evaluación se realizó 5,10,15,20,25, y 30 días después del procedimiento quirúrgico, la sobrevida se analizó durante 30 días. ^d Ciclosporina-A fue administrada ip a una dosis de 2.5 mg/kg cada 12 horas, iniciandola 1, 2, 6 y 12 horas después de la lesión. En el caso de los animales estudiados para conocer la LP se administró por un periodo de 24h y en el caso de los animales utilizados para evaluar la recuperación motora y la sobrevida por un periodo de 72h. ^e CsA administrada 48h antes de la lesión. ^f Metilprednisolona administrada ip a una dosis de 30 mg/kg cada 2 horas después de la lesión.

ESQUEMA DE ADMINISTRACION

La CsA se administró cada 12 horas por la vía oral (5 mg/kg) antes del procedimiento quirúrgico y después de la LTME por la vía intraperitoneal (2.5ml/kg) durante las primeras 72 h (Ibarra y cols. 1996)

La MP, se administró cada 2 horas (con base en su vida media) (Sun y cols. 1999) por vía intraperitoneal (30mg/kg) 1 hora después de la lesión durante 24 horas

MODELO DE LESIÓN

Antes de realizar la cirugía las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico por la vía i.p. (2.1 mg/100 g de peso). En condiciones de asepsia y antisepsia, se realizó la laminectomía a nivel de la vertebra T9, exponiendo la médula espinal con la dura madre íntegra. Se colocó al animal en un equipo estereotáxico y se dejó caer un peso de 15g de una altura de 10 cm a través de un tubo guía (método de Allen modificado para ratas) (Allen 1911), se corroboró la presencia del hematoma en el área de impacto y finalmente se suturaron (Figura 12).

TECNICA PARA CUANTIFICAR LOS PRODUCTOS FINALES DE LA LIPOPEROXIDACIÓN

La cuantificación de la LP se realizó mediante la técnica descrita por Triggs y Willmore para determinar los productos finales de la LP (Triggs y Willmore 1984). Las ratas se sacrificaron y se obtuvo el segmento de tejido nervioso lesionado, posteriormente se pesó y se homogeneizó en 3 ml de solución salina (0.9% NaCl), se tomó una alícuota de 1 ml del homogenado y se le añadieron 4 ml de una mezcla cloroformo/metanol (2:1 v/v), posteriormente las muestras se dejaron reposar durante 30 minutos en hielo para permitir la

separación de la fase clorofórmica y poder leerla en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS50B a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. La sensibilidad del espectrofotómetro fue ajustado a 330 unidades de fluorescencia con una solución estándar de quinina (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), los resultados fueron expresados en unidades de fluorescencia por gramo de tejido.

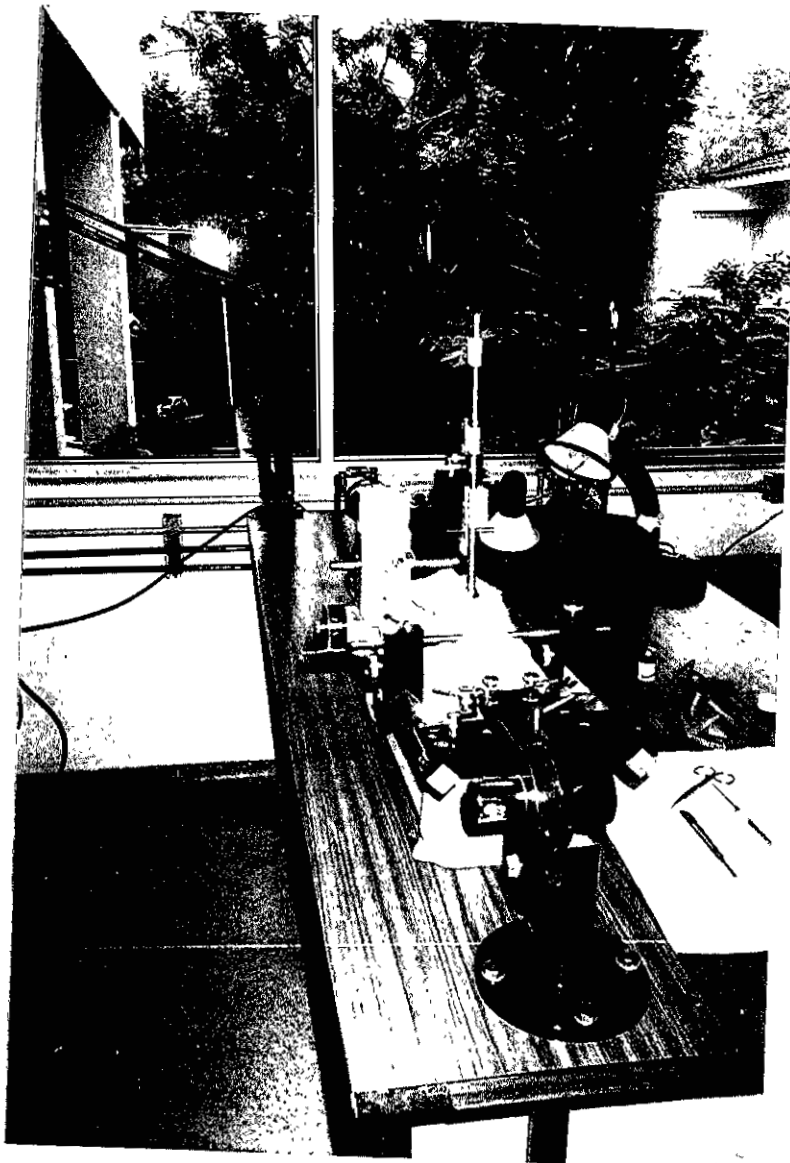


Figura 12 Técnica empleada para realizar una lesión por contusión empleando un aparato estereotáxico para ratas.

PRUEBA CLÍNICA DE EVALUACIÓN MOTORA

Prueba de deambulación libre sobre el piso

Esta prueba permite determinar, de manera gruesa, las características de la locomoción, y se evalúa mediante la escala de Tarlov modificada (Stokes y Reier 1992) que consiste de 6 grados, descritos a continuación:

Grado 0 Parálisis flácida, no se observa ningún movimiento.

Grado 1 Movimientos inconstantes de la cadera o de la rodilla, no hay movimiento del tobillo.

Grado 2 Movimiento incoordinado de las patas en tres articulaciones principales (cadera, rodilla y tobillo); las patas no sostienen el peso del tren posterior.

Grado 3 Soporta el peso del tren posterior sobre las patas, pero la marcha es incoordinada.

Grado 4 Movimiento alterno coordinado entre patas anteriores y posteriores, pérdida del control del tobillo o del pie y alteraciones en la base de soporte (pérdida del equilibrio en las vueltas rápidas).

Grado 5 Marcha de aspecto normal, no se observa pérdida del equilibrio en las vueltas rápidas y no arrastra los dedos (Figura 13).

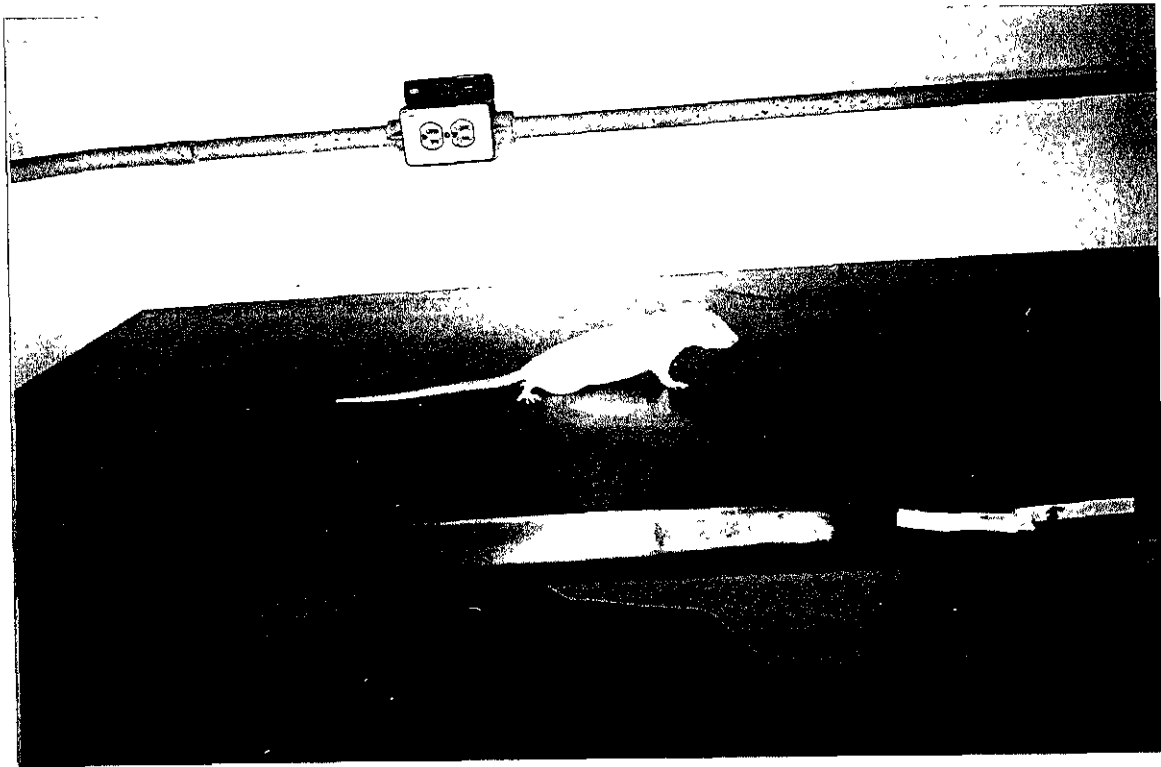


Figura 13 Pruebas de evaluación clínica empleadas para determinar el grado de recuperación motora en ratas. A) Deambulaci3n libre sobre el piso (evaluada con la escala de Tarlov).

ESTADISTICA

Los valores obtenidos para determinar el tiempo en el que se produce la máxima lipoperoxidación fueron analizados con la prueba estadística de covarianza tomando al tiempo como covariable.

El análisis estadístico de los valores determinado por análisis de varianza (ANOVA) seguida por la prueba de Tukey.

Los valores obtenidos en la evaluación clínica se analizaron con la estadística no paramétrica mediante la prueba de ANOVA de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de comparaciones múltiples U de Mann-Whitney. Las diferencias entre los grupos fueron consideradas significativas cuando el valor de la p fue <0.05 .

El análisis estadístico para determinar los valores de probabilidad estimada de sobrevida se realizó por medio de una curva de Kaplan-Meier y para determinar diferencias estadísticas en la sobrevida se utilizó la prueba de Log-rank.

La estadística se realizó utilizando el programa de computo SPSS.

CONSIDERACIONES ÉTICAS PARA EL USO DE ANIMALES EN LA EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de presente proyecto, se tomaron en cuenta los lineamientos establecidos por 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).

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO EN EL QUE SE PRODUCE LA MÁXIMA LIPOPEROXIDACIÓN.

En la figura 14 se muestra la cinética de la LP en los 3 grupos evaluados a diferentes tiempos (2, 4, 8 y 24 h después del procedimiento quirúrgico). En el grupo que únicamente fue tratado con solución salina (testigo negativo) los valores mostraron que existe una LP basal constante, misma que fue siempre menor a la presentada por el grupos de ratas lesionadas ($p < 0.05$ análisis de covarianza).

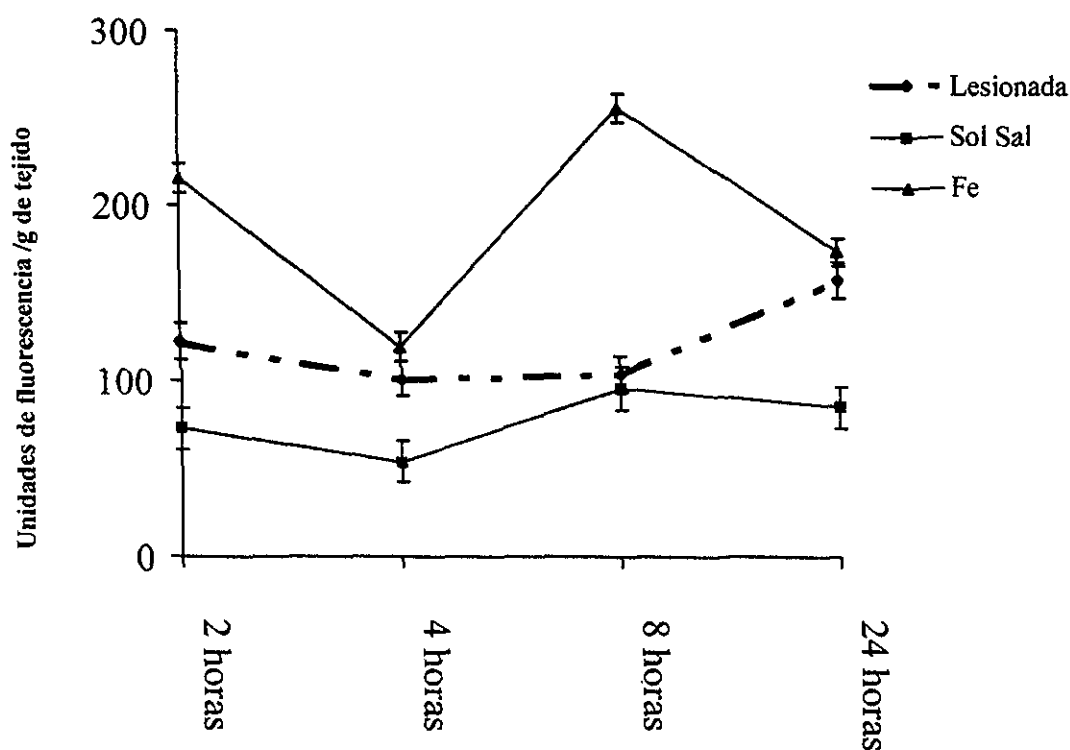
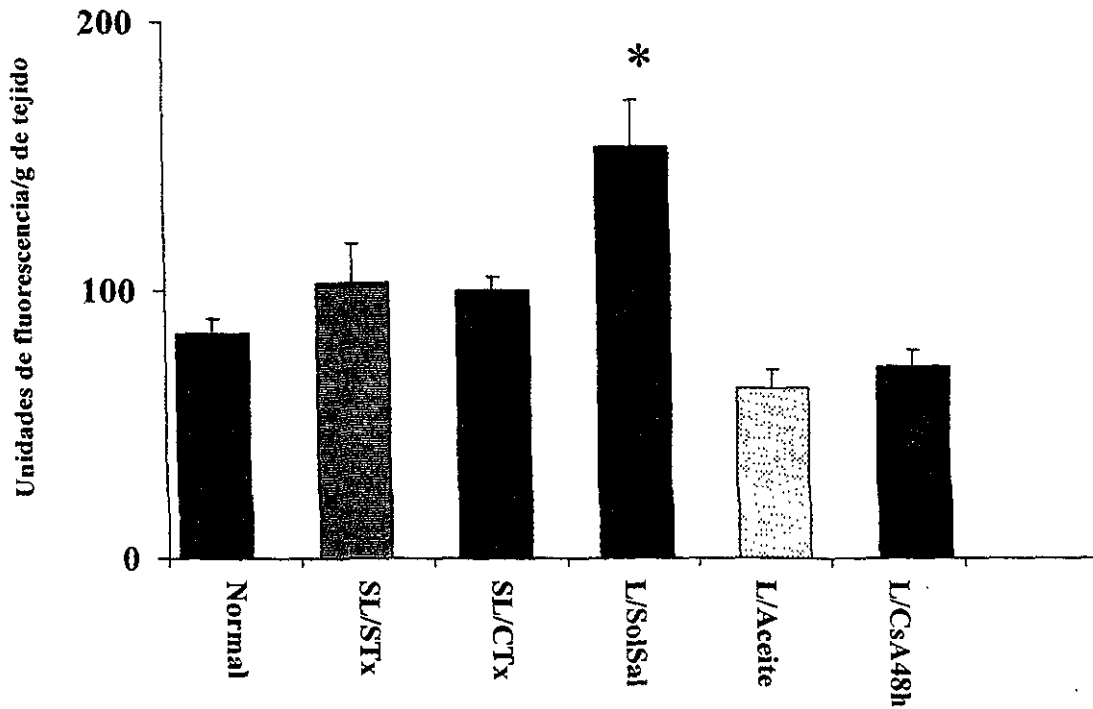


Figura 14 Determinación de la cantidad máxima de productos finales de la LP expresados en unidades de fluorescencia/g de tejido, cuantificados a 2, 4, 8 y 24 h. Lesionada: lesión por contusión severa; Sol Sal: solución salina (testigo negativo); Fe: sulfato ferroso (testigo positivo). Los resultados se expresan como la media de seis animales por tiempo y por grupo. Análisis estadístico de covarianza, tomando como covariable al tiempo ($p < 0.05$).

EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA CICLOSPORINA-A Y LA METILPREDNISOLONA SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN.

En la figura 15 se muestran los valores de LP observados en los animales tratados con CsA , vehículo de la CsA (sol. salina o aceite de oliva), así como en animales no lesionados (con y sin procedimiento quirúrgico). Como se puede observar, el tratamiento con CsA iniciado 48h antes de la lesión y el vehículo, fueron capaces de disminuir significativamente ($p < 0.05$) la LP, con respecto al grupo lesionado tratado con solución salina. Por otra parte, en el caso de las ratas laminectomizadas, se observó que existe una LP muy semejante a la que se presentó en las ratas sin procedimiento quirúrgico. Así mismo, como se muestra en la figura 16; existe un incremento estadísticamente significativo de la LP en el grupo lesionado que no recibió tratamiento con CsA, cuando este fue comparado con el resto de los grupos. En contraste, los grupos lesionados y tratados con CsA a diferentes tiempos presentaron una disminución significativa de la LP ($p < 0.05$, ANOVA de una vías seguida de la prueba de Tukey) en comparación con el grupo lesionado no tratado. Cuando la CsA fue administrada durante las primeras 6 h los valores de LP fueron muy similares ya que al compararse entre sí no se observaron diferencias significativas, sin embargo, la mayor disminución fue observada cuando la CsA se administró 1 h después de la lesión, en este caso la LP fue incluso significativamente menor ($p < 0.05$), que la observada en los animales laminectomizados (sin lesión). Por otro lado, cuando la CsA fue administrada 12 h después de la lesión, se observó un incremento en la LP que fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$), con respecto a los animales que recibieron la CsA 1 h después de la lesión.

Los valores de LP analizados en ratas lesionadas y tratadas con CsA, MP y CsA+MP se muestran en la figura 17. En este caso podemos observar que la LP fue inhibida en forma similar ($p < 0.05$) en todos los grupos tratados cuando son comparados con el grupo de ratas lesionadas no tratadas.



*Figura 15. Productos finales de la LP expresados en unidades de fluorescencia/g de tejido cuantificados 24 horas después del procedimiento quirúrgico. CsA 48h: tratamiento con ciclosporina-A 48 horas antes de la lesión; Aceite: aceite de oliva; SL: sin lesión; L: con lesión; STx: sin tratamiento con CsA; CTx: tratamiento con CsA; SolSal: solución salina. Los resultados fueron expresados en medias \pm EE. *diferente de todos los demás grupos ($p < 0.05$), ANOVA seguida por la prueba de Tukey.*

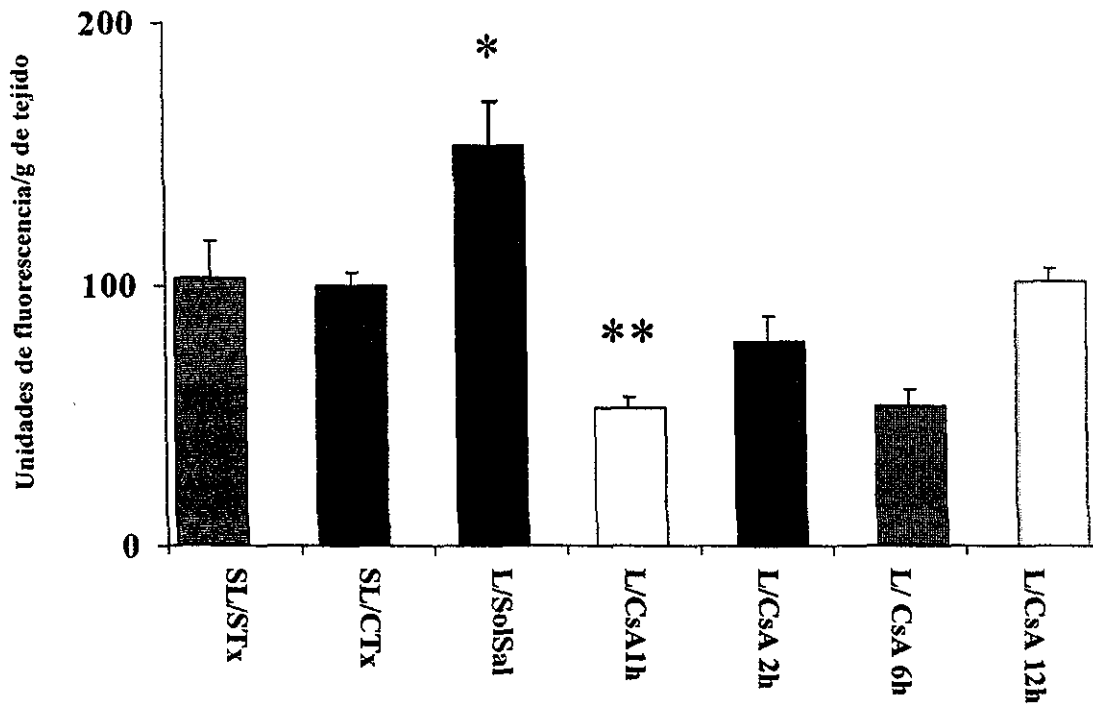
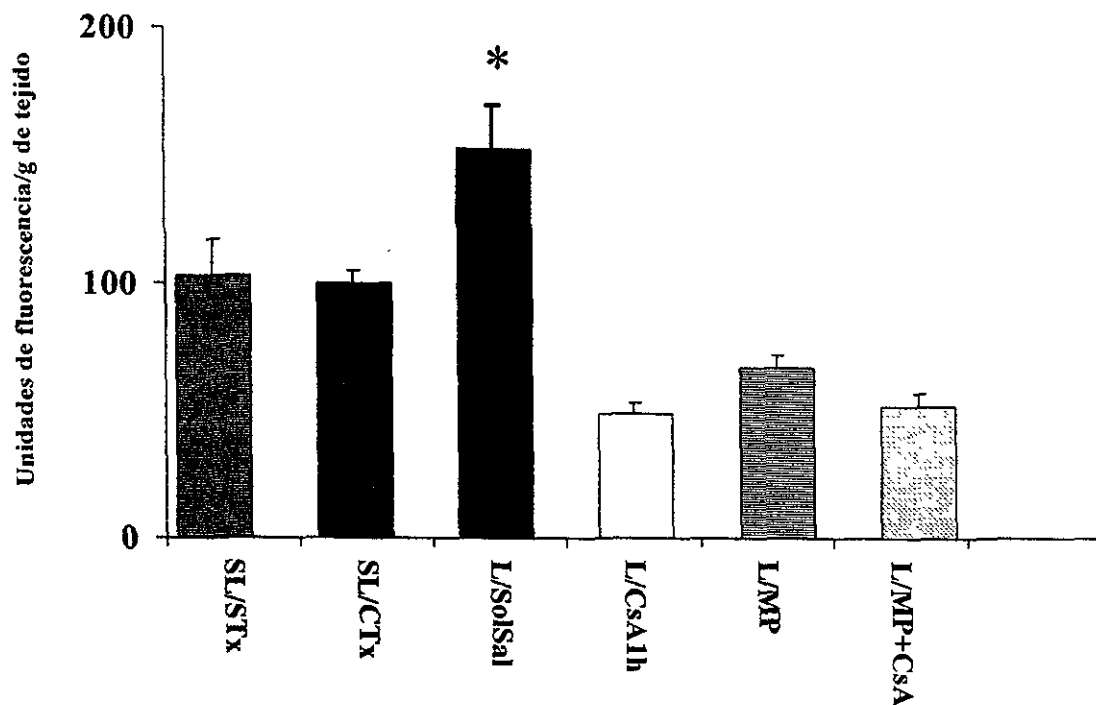


Figura 16. Productos finales de la LP expresados en unidades de fluorescencia/g de tejido, cuantificados 24 horas después del procedimiento quirúrgico. CsA: tratamiento con ciclosporina-A; SL: sin lesión; L: con lesión; STx: sin tratamiento con CsA; CTx: con tratamiento con CsA; SolSal: solución salina; CsA 1h, CsA 2h, CsA 6h y CsA 12h: administración de Ciclosporina-A 1, 2, 6 y 12 horas después de la lesión. Los resultados fueron expresados en medias \pm EE. *diferente de todos los grupos ($p < 0.05$), **diferente del grupo con lesión y tratada con CsA 12 horas después y de los grupos con laminectomía tratado o no con CsA, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.



*Figura 17. Productos finales de la LP expresados en unidades de fluorescencia/g de tejido cuantificados 24 horas después del procedimiento quirúrgico. CsA: tratamiento con ciclosporina-A; MP: metilprednisolona; CsA+MP: ambos fármacos; SL: sin lesión; L: con lesión; STx: sin tratamiento con CsA; CTx: tratamiento con CsA; SolSal: solución salina. Los resultados fueron expresados en medias \pm EE. *diferente de todos los grupos ($p < 0.05$), ANOVA seguida por prueba de Tukey.*

PRUEBAS DE EVALUACIÓN CLÍNICA

ESCALA DE TARLOV

En las figuras 18 y 19 se muestran los valores obtenidos en la escala de Tarlov, de animales lesionados y tratados con vehículo o con CsA administrada a diferentes tiempos antes y después de la lesión. Desde los primeros días del seguimiento los animales en los que se inició la CsA durante las primeras 6 h mostraron una mejor recuperación motora en comparación con los animales no tratados, sin embargo, esta diferencia fue significativa hasta el día 30 después de la lesión y solo en los animales en los que recibieron el fármaco 6 h después de la lesión ($p < 0.05$, ANOVA Kruskal-Wallis seguida por la prueba de U de Mann-Whitney).

Con respecto a los animales lesionados y tratados con CsA o MP o MP+CsA (figura 20) podemos observar que existió una mejor recuperación motora en el grupo tratado con ambos fármacos (CsA+MP) desde el día 25 ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis seguida por la prueba de U de Mann-Whitney) cuando fue comparado con el grupo testigo (lesionado y sin Tratamiento).

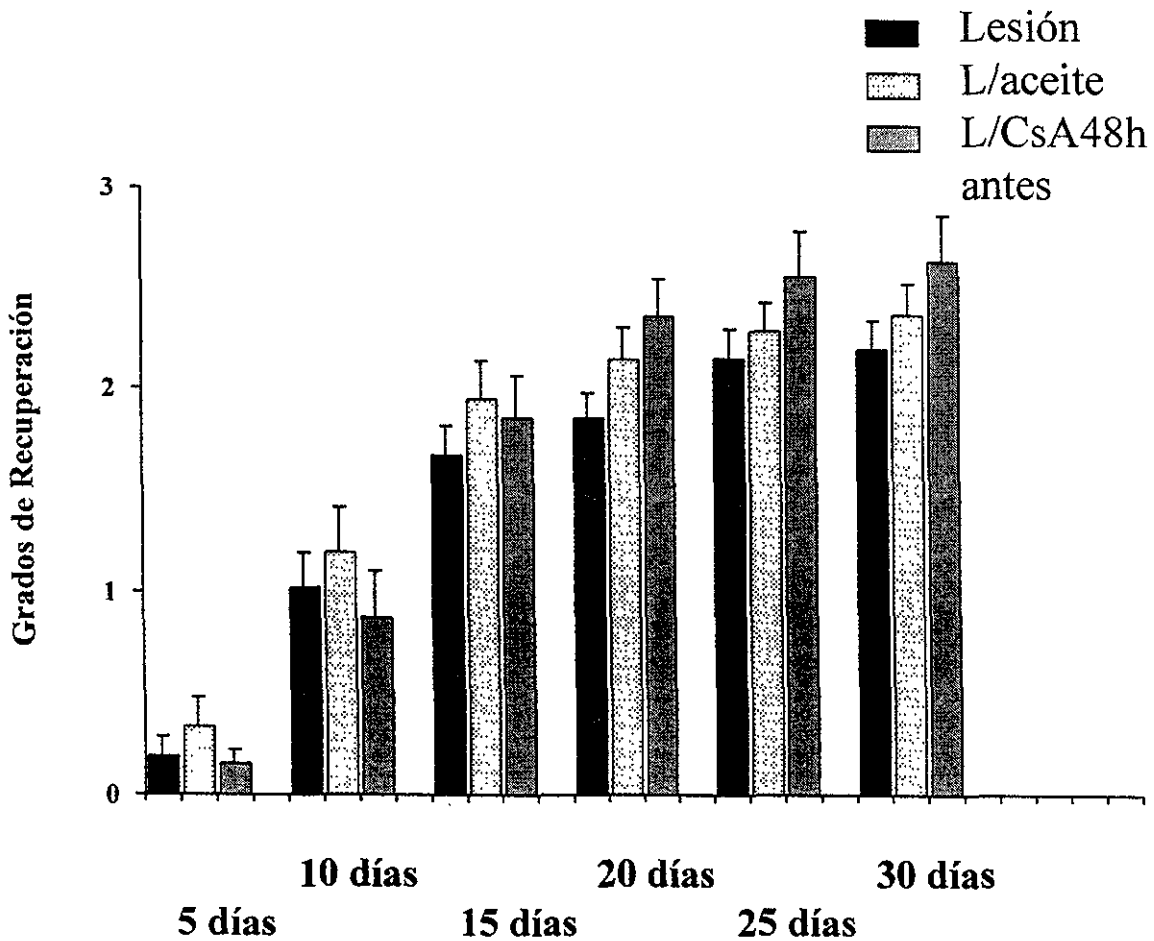


Figura 18 Recuperación motora evaluada mediante la escala de Tarlov a 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días después de la lesión. CsA48h: tratamiento con Ciclosporina-A 48 horas antes de la lesión; aceite: aceite de oliva; L: lesión. Los resultados se expresaron como medianas \pm EE y fueron analizados estadísticamente por medio de una ANOVA Kruskal-Wallis seguida por la prueba de U de Mann-Whitney.

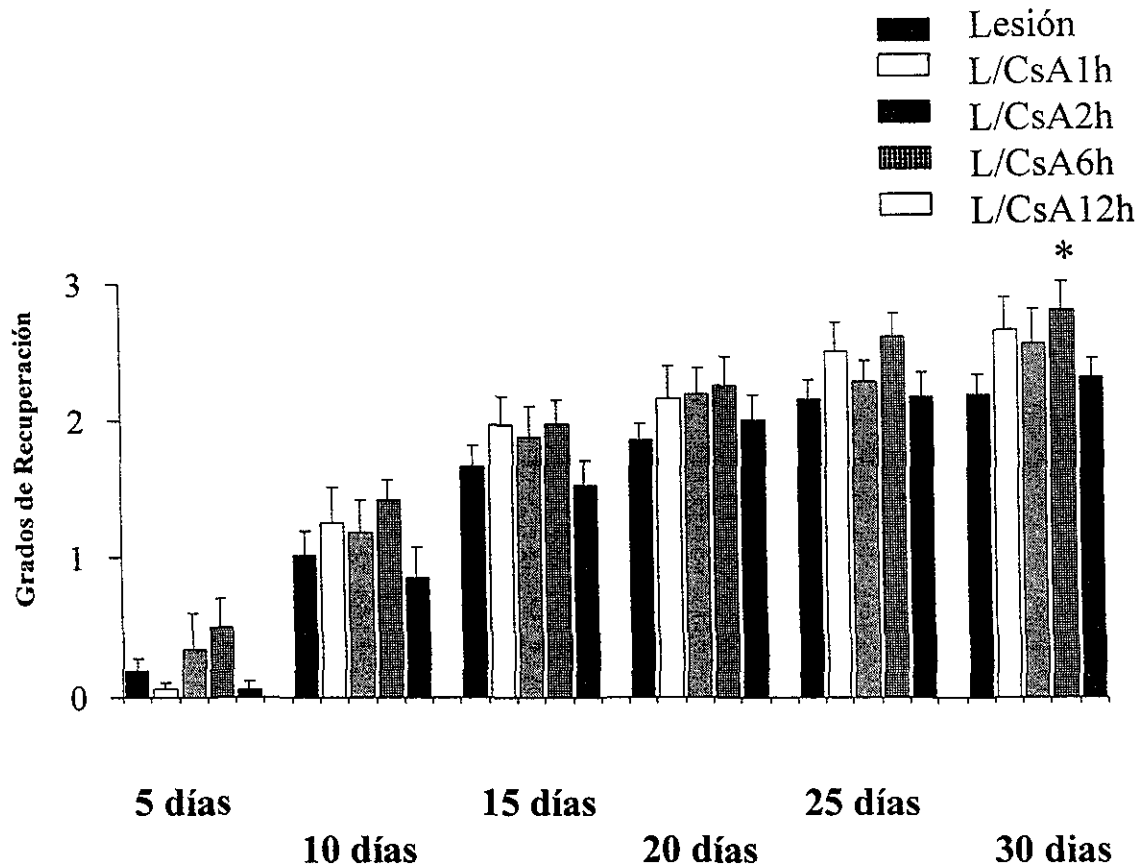
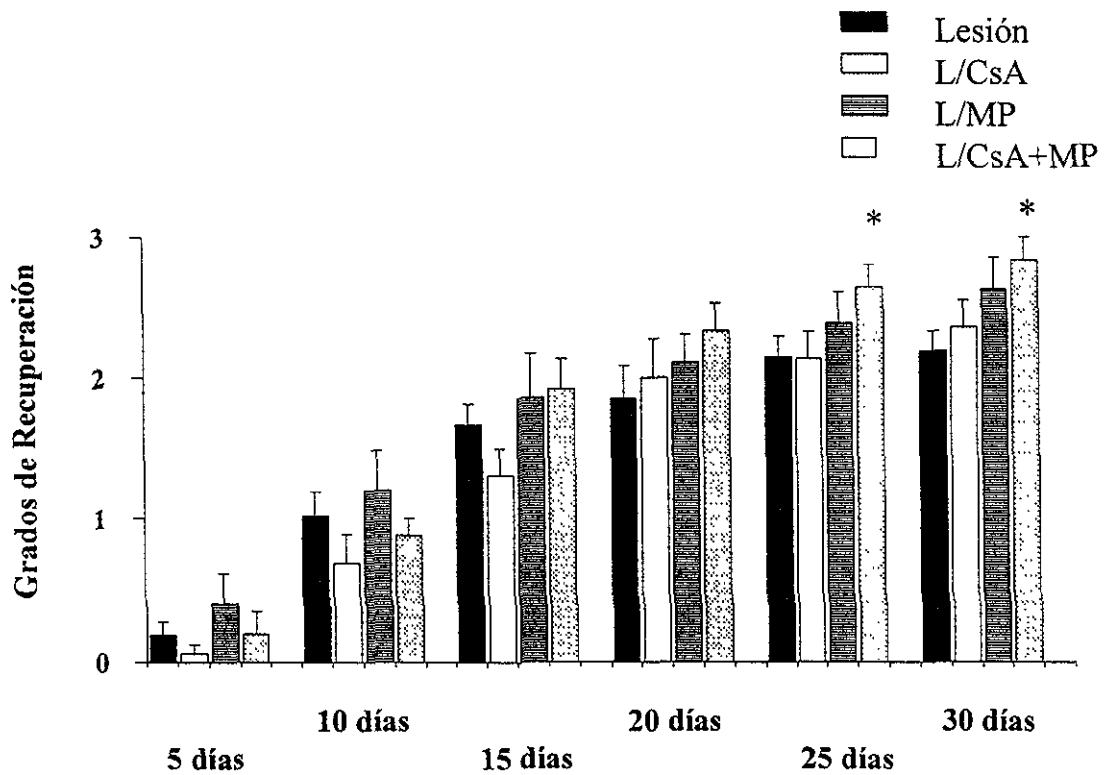


Figura 19. Recuperación motora evaluada mediante la escala de Tarlov, a 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días después de la lesión. CsA 1h, CsA 2h, CsA 6h y CsA 12h: tratamiento con ciclosporina-A administrada a 1, 2, 6 y 12 horas después de la lesión; L: lesión. Los resultados se expresaron como medianas \pm EE y fueron analizados estadísticamente por medio de una ANOVA Kruskal-Wallis seguida por la prueba de U de Mann-Whitney. Los valores se consideraron estadísticamente diferentes con una $p < 0.05$. *diferente de el grupo lesionado sin tratamiento.



*Figura 20. Recuperación motora evaluada mediante la escala de Tarlov a 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días después de la lesión. CsA: tratamiento con ciclosporina-A; MP: metilprednisolona; CsA+MP: ambos fármacos; L: lesión. Los resultados se expresaron como medianas \pm EE y fueron analizados estadísticamente por medio de una ANOVA Kruskal-Wallis seguida por la prueba de U de Mann-Whitney, Los valores se consideraron estadísticamente diferentes con una $p < 0.05$. *diferente de los grupos lesionados y tratados con CsA, MP y CsA+MP.*

SOBREVIDA

En la figura 27 podemos observar la probabilidad estimada de sobrevida (PES) en los animales sometidos a las diferentes condiciones experimentales en función de los diferentes días postlesión. Solo uno de los animales no tratados murió en la segunda semana después de la lesión (PES = 0.92). Por otra parte, ninguno de los animales tratados con CsA murió durante el seguimiento (PES = 1.0), mientras que los animales tratados con MP o CsA+MP presentaron una disminución significativa ($p < 0.05$, prueba de Log-rank.) en la sobrevida durante la primer semana después de la lesión, con respecto a los animales tratados solo con CsA ($p < 0.05$). El 31% de los animales tratados con MP murieron durante los primeros 7 días después de la lesión (PES = 0.66), mientras que el 47% de las ratas tratadas con CsA+MP murieron durante los primeros 5 días postlesión (PES 0.4).

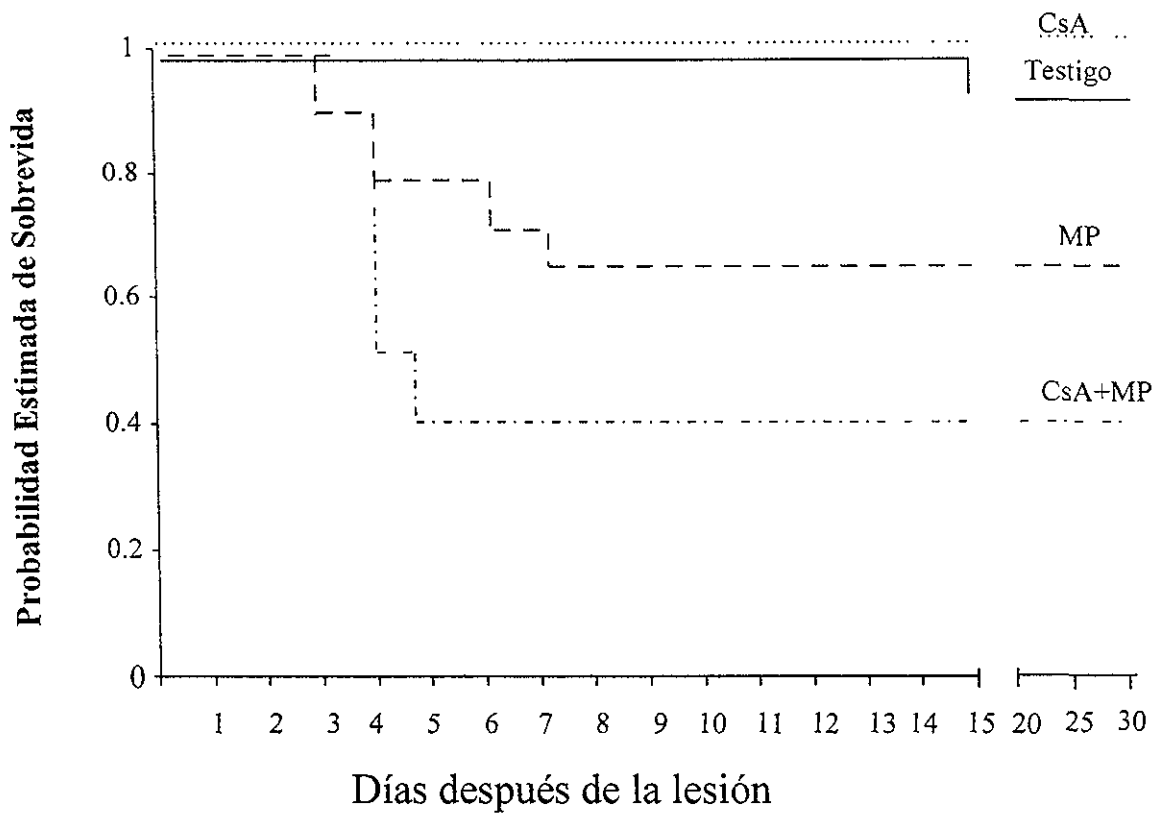


Figura 21 Probabilidad estimada de supervivencia (PES) de ratas con lesión traumática de la médula espinal, al inicio del tratamiento y hasta los 30 días después de la lesión. Línea continua: ratas tratadas con vehículo; CsA, línea punteada: ciclosporina-A; MP, línea con guiones: metilprednisolona; CsA+MP, línea con puntos y guiones: ambos fármacos. Los resultados son expresados como PES de acuerdo con el método de Kaplan-Meier en el cual las unidades representan el 100% de supervivencia.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó y se comparó la eficacia de la CsA y la MP sobre la lipoperoxidación y la recuperación motora en las ratas con LTME. Los resultados demuestran que la CsA fue capaz de disminuir la LP de una manera más eficaz cuando se administra dentro de las primeras 6 horas después de la lesión. Esto se debe, probablemente, a la participación que pudiera tener este fármaco como modulador en el fenómeno de excitotoxicidad al inhibir a diferentes enzimas que participan de manera importante en este fenómeno. La excitotoxicidad es originada por la elevada concentración de glutamato en el espacio extracelular y el subsecuente incremento en la concentración de Ca^{2+} y Na^+ en el interior de la célula. El Ca^{2+} activa a diversas enzimas entre las que podemos mencionar a la fosfolipasa A2 que libera ácido araquidónico de la membrana, el cual es importante para la síntesis de eicosanoides. Se ha sugerido que la CsA es capaz de inhibir a la Fosfolipasa A2 (Fan y Lewis 1984) y por lo tanto disminuir la respuesta inflamatoria disminuyendo con ello la producción de radicales libres. Por otra parte también se ha sugerido que la CsA tiene la capacidad de inhibir a la calmodulina (Colombani y cols. 1985) dando como resultado la probable inhibición de la fosfodiesterasa (hidroliza el GMPc) y con ello favorecer el incremento en la concentración de GMPc y por lo tanto una mayor vasodilatación misma que se traduciría en una mejor oxigenación tisular. Por otra parte, la CsA tiene también la capacidad de inhibir a la calcineurina enzima con actividad fosfatasa serina/treonina dependiente de calcio/calmodulina que aumenta la expresión de los receptores IP_3 localizados en el retículo endoplásmico, a través de los cuales se libera Ca^{2+} . La inhibición de la expresión de estos receptores, disminuiría las concentraciones del Ca^{2+} citoplásmico, disminuyendo el daño causado por la acción de este ion, (Ganazzani y

cols. 1999). La ONS es otro de los substratos de la calcineurina; este mecanismo también resulta ser importante pues se ha demostrado que el ON en altas concentraciones es una molécula citotóxica, capaz de desacoplar la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, llevando a la producción de radicales libres. EL ON reacciona con grupos hierro/azufre que forman parte de enzimas importantes en el ciclo de Krebs, disminuyendo con ello el aporte energético, estimula a la ciclooxigenasa promoviendo la síntesis de prostaglandinas (Moilanen y Vapaatalo, 1995), este mecanismo de acción modula la citotoxicidad originada por ON así como por diversas especies reactivas de oxígeno combinadas con ON como lo es el peroxinitrito ($\text{ON} + \text{O}_2^-$) molécula altamente reactiva que promueve la apertura de poros en la membrana interna mitocondrial, a través de los cuales se libera el Ca^{2+} (Packer y Murphy 1994), este proceso origina la interrupción de la función mitocondrial que contribuye a la muerte celular. En lo referente a esto, la CsA también es capaz de inhibir la apertura de estos poros confiriendo con ello protección a las mitocondrias, durante el estrés oxidativo. Las proteínas motoras del citoesqueleto son otro sustrato de la calcineurina. Después de una lesión, los neutrófilos llegan al sitio de inflamación por gradientes quimiotácticos. Los quimioatrayentes modifican las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, que son importantes para la extensión de pseudópodos y para que se inicie la motilidad. Hendey y Maxfiel, (1993) observaron que el incremento de Ca^{2+} intracelular activa a la calcineurina, que actúa sobre proteínas motoras del citoesqueleto, aumentando la motilidad de los neutrófilos, por lo que la CsA disminuye la cantidad de neutrófilos que llegan al sitio de lesión por inhibición de la motilidad, mediada a su vez por la inhibición de la calcineurina, este efecto trae como consecuencia una disminución en la producción de radicales libre (RL) (O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot , OCl^\cdot) en el sitio de

lesión y en consecuencia un menor daño. La calcineurina del mismo modo es importante para la liberación de neurotransmisores (Siegel y cols. 1998). Los neurotransmisores son empaquetados en vesículas, las cuales están rodeadas por proteínas llamadas sinapsinas que se unen a las fibras del citoesqueleto y puedan ser dirigidas a la membrana axonal, para que estas vesículas se fusionen con la membrana. Las sinapsinas deben liberarse de la vesícula por medio de una defosforilación que realiza la calcineurina. Así pues la CsA podría inhibir la liberación de neurotransmisores excitatorios y a través de este proceso, reducir la excitotoxicidad. Finalmente, Shibasaki y McKeon (Shibasaki y MacKeon, 1995) demostraron que la activación de la calcineurina inicia la cascada de acontecimientos apoptóticos. Todo lo anterior demuestra que la calcineurina juega un papel muy importante en la modulación de la muerte celular y que su inhibición por efecto de la CsA puede proteger el tejido nervioso después de una LTME.

El factor de transcripción nuclear NF κ B es otra molécula sobre la cual la CsA también podría tener indirectamente un efecto inhibitorio. Como ya se mencionó anteriormente, la CsA inhibe la función de la calmodulina (Colombani y cols. 1985), enzima importante para la activación de la proteína cinasa C (PKC), encargada de fosforilar y con ello activar a I κ B, que es una proteína que fosforilada, promueve la activación de NF κ B. Al inhibir la función de este factor, podría modularse la expresión de diversos genes. NF κ B se encuentra asociado a genes que codifican para diversas citocinas como la interleucina-1,2 y 6 y el factor de necrosis tumoral α (TNF α). La interleucina-1 promueve la expresión de la ON sintasa inducible (ONSi) (Pfeilschifter y cols. 1996) y tiene un efecto proinflamatorio, la interleucina-2 es importante en la activación del linfocito T, interleucina-6 tiene un efecto proinflamatorio y el TNF α está asociado muerte celular,

además de que activa el gen de la prostaglandina sintasa 2, promueve la expresión de moléculas de adhesión (CAM) y finalmente este factor también se encuentra asociado al gen que codifica para la ONSi (Bethea y cols. 1998). El efecto de la CsA bloqueando a NFκB a través de la calmodulina promovería neuroprotección después de una LTME.

Finalmente Sherry y col, (Sherry y cols. 1992), demostraron que la ciclofilina es una proteína con efectos proinflamatorios, cuando la CsA ingresa al citoplasma y se une a la ciclofilina este efecto proinflamatorio es inhibido.

Uno de los hallazgos interesantes que pudimos observar en este trabajo, fue que la mayor disminución de la LP se da en el grupo de ratas que recibieron tratamiento con CsA 1 h después de la lesión, lo que hace pensar que la mejor eficacia del fármaco es cuando se administra a este tiempo, pero al correlacionar estos resultados con los de recuperación motora, encontramos que en el grupo de ratas que recibió el tratamiento con CsA 6 h después de la lesión se presenta una mejor recuperación clínica, en comparación con la observada en los animales tratados 1, 2 y 12h después de la lesión, esto es importante ya que si la CsA es utilizada con fines clínicos, existe la posibilidad de que funcione de manera óptima aun cuando se administre 6 h después de la lesión, probablemente esta sea la ventana terapéutica que nos indique que los posible daños infringidos al tejido nervioso se pueden disminuir cuando la CsA se administra durante las primeras 6 h después de la lesión.

Como se mencionó anteriormente, la mejor recuperación motora se observó cuando la CsA se administró 6 h después de la lesión, lo que podría sugerir que el tratamiento con CsA no debe iniciarse muy tempranamente, ya que podrían bloquearse algunos mecanismos que favorezcan la recuperación funcional, como por ejemplo la actividad de la ONS

constitutiva, una enzima dependiente de calcio que sintetiza ON necesario para realizar algunas funciones fisiológicas importantes como son: La relajación del endotelio vascular, como resultado de del aumento de guanosin monofosfato cíclico (cGMP) en el músculo liso vascular, vía la liberación de ON promoviendo la oxigenación del tejido lesionado (Bruhwylter y cols. 1993), la inhibición de la agregación plaquetaria por un mecanismo dependiente de GMP cíclico, la inhibición de la proliferación de linfocitos, la inhibición la síntesis de citocinas como interleucina-1 e interferón gama, entre otras funciones (Moilanen y Vapaatalo 1995, Vladutiu 1995).

Por otro lado, el factor de transcripción NFκB, se encuentra asociado al gen de la enzima superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) enzima antioxidante importante en la transformación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno (Botello y Bruce 1997), que se encuentra en la matriz mitocondrial. Todas estas evidencias sugieren que la administración de la CsA no debe ser de forma inmediata, para no poner en riesgo los mecanismos neuroprotectores y antioxidantes de la respuesta fisiológica a la lesión.

Otro dato interesante fue el de la LP basal, que muestra valores que pudieran ser considerados como elevados, sin embargo se sabe que en condiciones normales. existen procesos metabólicos que llevan a la producción de gran cantidad de especies reactivas de oxígeno, por ejemplo se calcula que del oxígeno respirado del 1 al 3% es usado para formar radical superóxido (O_2^-), tanto en la cadena de transporte de electrones dentro de la mitocondria como en el reticulo endoplásmico, además parte de los radicales O_2^- se producen durante las reacciones de varias moléculas directamente con el oxígeno como la adrenalina, la dopamina, los citocromos, etc. Estas reacciones son inevitables en un organismo dependiente de oxígeno (Zwart y cols. 1998), además probablemente las

defensas antioxidantes (SOD, Catalasa y Glutación peroxidasa) no son suficientes para contrarrestar la producción de ERO y esta LP basal que se observa es parte del envejecimiento normal de la médula espinal.

Los resultados de este trabajo demostraron que la CsA disminuye la LP y que además promueve la recuperación clínica, por lo que resultó interesante compararlo con la MP ya que hoy en día es el fármaco considerado como “estándar de oro”, empleado en la clínica por su efecto neuroprotector.

Existen evidencias de que la MP disminuye la LP (Braugher y Hall 1982), reduce la permeabilidad vascular y la formación de edema después de una LTME (Xu y cols. 1992), además Hall sugirió con una sola dosis de 30mg/kg de MP puede reducir la lipoperoxidación y mejorar la actividad de la de Na⁺K⁺- ATPasa teniendo efectos benéficos, en la etapa temprana de la lesión (Hall y Braugher 1982). Pero contrario a sus efectos benéficos, se ha reportado que el tratamiento con MP lleva a un incremento de 2.6 veces en la incidencia de neumonía, (Gerndt y cols. 1997) y a la inhibición de la regeneración neural cuando es administrada como tratamiento único (Bracken y cols., 1992). Más aun, su efecto benéfico sobre la recuperación neurológica no ha sido probado (Vandertop y cols. 1998). Esto pudiera deberse a que la administración de dicho fármaco se basa en esquemas de administración con megadosis (Hall y cols. 1992), que pueden tener un fuerte efecto sobre el sistema inmune causando una importante susceptibilidad a enfermedades infecciosas y secundariamente esto llevar a la muerte (Goodman 1996). Ha sido considerado que los efectos clínicos benéficos que brinda la MP en pacientes con LTME no pueden garantizar el posible riesgo que tiene su uso (Nesathurai 1998). En contraste con lo que ocurre con la MP, el tratamiento con CsA es menos agresivo, esto

probablemente por que el esquema de administración de la CsA está bien estandarizado (Ibarra y cols. 1996), y el fármaco se administra en concentraciones que están dentro de la ventana terapéutica. Esto fue constatado en este estudio ya que ninguno de los animales que recibieron solo CsA como tratamiento murió. En cambio los animales que recibieron MP o MP+CsA presentaron una gran disminución en la sobrevida. Aunque debemos comentar que al realizar la evaluación clínica los animales que recibieron MP+CsA presentaron la mejor recuperación clínica esto pudo deberse a que de este grupo de animales fue del que menos ratas sobrevivieron y muy seguramente las que sobrevivieron son las que mejor se recuperaron, originando con esto que la evaluación fuera realizada en pocos animales y además, animales con buena recuperación. Esto no sucedió en el caso de la CsA donde la recuperación global fue obtenida de promediar todos los animales estudiados. En el caso de la MP, aunque hubo también una baja sobrevida fueron más los animales que se evaluaron para conocer la recuperación clínica en forma global. Así pues antes de considerar que la combinación de ambos fármacos es capaz de originar una mejor recuperación clínica sería importante tomar en consideración esta observación.

Estos resultados demuestran que la CsA tiene un efecto similar a de la MP sobre la LP pero sin el efecto letal de la última. Además que la CsA puede ser capaz de promover una mejor recuperación motora en comparación con los animales no tratados.

Otra ventaja que la CsA tiene sobre la MP es su amplia ventana terapéutica (6 h después de la lesión), pues en un trabajo realizado por Yoon y colaboradores (Yoon y cols. 1999) sugieren que el tratamiento con MP debe iniciarse 10 min después de la lesión para obtener los mejores beneficios neuroprotectores de éste fármaco.

También la CsA por si sola y con base en su mecanismo de acción, es probable que promueva la regeneración axonal, pues se ha propuesto que al inhibir a la calcineurina, se promueve la acción del GAP 43 (siglas en ingles proteína asociada al crecimiento 43), proteína involucrada en la regeneración (Gold y cols. 1995), por lo tanto, el tratamiento con CsA ofrece dos ventajas: a) neuroprotección y b) probablemente, regeneración axonal.

Por otro lado, pudimos observar que el grupo de ratas al que solamente se les administro el vehículo por la vía oral (aceite de oliva) 48 horas antes de la lesión, mostraba una disminución de la LP semejante a la observada en las ratas que recibieron tratamiento con CsA, esto probablemente se deba a que el aceite de oliva se ha considerado como un antioxidante natural (Pajovic y cols. 1997) que funciona como un posible modulador de la actividad de la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) y de la enzima superóxido dismutasa de cobre zinc (CuZnSOD), que se encuentran en cerebro, timo e hígado de ratas. Sin embargo la inhibición de la LP por el aceite de oliva no es suficiente para inducir una recuperación funcional.

Finalmente en este trabajo demostramos que la CsA es un fármaco con gran potencial para poder ser aplicado en pacientes con lesión de medula espinal. Los beneficios que ofrece en comparación con la MP pueden apoyar evidentemente su utilización a nivel clínico.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos de las ratas sometidas a una lesión por contusión de la médula espinal a nivel torácico bajo de intensidad severa y sometidas a un tratamiento con CsA a diferentes tiempos y en otros casos sometidas a tratamiento con MP o ambos podemos concluir que:

- a) La CsA inhibe la LP con la misma eficacia e intensidad cuando es administrada durante las primeras 6 horas después de la lesión.
- b) La inhibición de la LP es poco eficiente cuando la CsA es administrada 12 horas después de la lesión
- c) La CsA y la MP inhiben la LP con la misma eficacia cuando son administradas por separado o de manera conjunta.
- d) La administración de antioxidantes como el aceite de oliva disminuye la LP.
- e) La CsA promueve una mejor recuperación motora cuando esta es administrada 6 horas después de la lesión.
- f) La MP no promueve recuperación motora
- g) La administración conjunta de CsA y MP promueve una mejor recuperación motora.
- h) El aceite de oliva no promueven recuperación motora.
- i) La CsA es un fármaco que no tiene efectos adversos en la sobrevida de los animales.
- j) La MP es un fármaco que si tiene efectos adversos en la sobrevida de los animales.
- k) La administración conjunta de CsA y MP tiene efectos adversos en al sobrevida de los animales.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

PERSPECTIVAS

- a) Comprobar el efecto que tiene la CsA sobre la actividad del GAP-43 para demostrar si esta involucrado en procesos de regeneración.
- b) Demostrar que la CsA inhibe la actividad de la ONS.
- c) Cuantificar histológicamente el efecto neuroprotector de la CsA
- d) Determinar el efecto neuroprotector de la CsA con base en la cantidad de mielina preservada después de una LTME

REFERENCIAS

- Allen AR. Surgery of experimental lesions of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. *J. Am Med Assoc* 1911; 57:878-880.

- Balentine JD. Calcium toxicity as a factor in spinal cord injury. *Surv Synth Path res.* 1983; 2: 184-193.

- Balentine JD. Spinal cord trauma. In search of the meaning of granular axoplasm and vesicular myelin. *J Neuropath exp Neurol.* 1988; 47: 77-92.

- Bartholdi D, Schwab ME. Methylprednisolone inhibits early inflammatory processes but not ischemic cell death after experimental spinal cord lesion in rat. *Brain. Res.* 1995; 672: 177-186.

- Becker J, Grasso RJ. Suppression of phagocytosis by dexamethasone in macrophage culture: Inability of arachidonic acid, indometacin and nordihydroguaiaretic acid to reverse the inhibitory response mediated by a steroid-inducible factor. *Int. J. Immunopharmacol.* 1985; 7:839-847.

- Bedbrook GM. The development and care of spinal cord paralysis (1918-1986). *Paraplegia* 1987; 25:172-184.

- Bethea JR, Castro M, Keane RW, Lee TT, Dietrich WD, Yezierski RP. Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor- κ B activation. *J. Neurosci.* 1998; 18:3251-3260.

- Blight AR. Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury. *J. Neurotrauma.* 1992; 9 Suppl 1:S83-S91.

- Bloom KK, Freed MM. Liver enzymes abnormalities in spinal cord injury. *J. Am. Paraplegia. Soc.* 1989; 12:11-13.

- Botello S, Bruce D. NF κ B- Independent transcriptional induction of human manganous superoxide dismutase gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997; 348:289-294.

- Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leosummers L, Maroon J. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl. J Med.* 1990; 322: 1405-1411.

- Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon JC, Marshall LF, Perot PL, Piepmeier J, Sonntag VKH, Wagner FC, Wilberger JI, Winn HR, Young W. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow up data. 1992; 76:23-31.

- Bracken MB, Holford TR. Effect of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NACIS 2 J. Neurosurg. 1993; 79:500-507.

- Braighler JM, Chase R.L, Neff G.L. A new 21-aminoesteroid antioxidant Lacking glucocorticoid activity stimulates adrenocorticotropin secretion and blocks araquidonic acid release from pituitary tumor (AtT-20) cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1988; 244:423-427.

- Braighler JM, Hall DE. Correlation of methylprednisolone levels in cat spinal cord with its effects on (Na⁺ + K⁺)-ATPase, lipid peroxidation, and alpha motor neuron function. J. Neurosurg. 1982; 56:838-844.

- Braund KG, Shores A, Brawner WR. The etiology, pathology and pathophysiology of acute spinal trauma. Vet. Med. 1990; 85:684-691.

- Brightman, M. Implication of astroglia in the blood-brain barrier. En: N. J. Abbott; Glial-neuronal interaction. The New York Academy of Sciences;. 1991; pp 107-115.

- Bruhwylter J, Chleide E, Liégeois F, Carreer F. Nitric Oxide: A new messenger inthe brain. Neurosci. Biobehav.Rev. 1993, 17:373-384.

- Chusid JG .Neuroanatomía correlativa y neurología funcional. México: El manual moderno 1987; pp 580.

- Coates JR, Sorjonen DC, Simpson ST, Cox RN, Wright CJ, Hudson AA, Finn Bodner ST. Clinicopathology effect of a 21-Aminoesteroid compound (U74389G) on high dose methylprednisolone on spinal cord function after stimulated spinal cord trauma. *Vet. Surg.* 1995; 24: 128-139.

- Colombani P, Robb A, Hess A. Cyclosporin A binding to calmodulin: possible site of action on T lymphocytes. *Science.* 1985; 228:337-339.

- Cunningham J. G. *Fisiología veterinaria.* México: Interamericana. 1995; pp 345.

- Dinova-Apostolova G, Angelova A, Vaptzarova K, Catecholamine concentration in rat liver after high level transection of spinal cord. *Life Sci.* 1999; 64:2375-2381.

- Durum SK, Oppenheim JJ. Proinflammatory cytokines and immunity. *Fundamental immunology* 3th edition Reven. Press. Ltd., New York.1993 pp 801-811.

- 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.

- Espersen GT, Ernst E, Vestergaard M. Changes in PMN leukocytes migration activity and complement C3d level in RA patients with high disease activity during steroid treatment. *Scand. J. Rheumatol.* 1989; 18:51-56.

- Fan TPD, Lewis GP. Effect of cyclosporin A and inhibitors of arachidonic acid metabolism on blood flow and cyclo-oxygenase products in rat skin allografts. *Br. J. Pharmacol.* 1984; 81:361-371.

- Feden A.I. Pharmacology in spinal cord injury: a critical review of recent developments. *Clin Neuropharmacol.* 1987; 10:193-204.

- Feden A.I, Simon R.P. A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol* 1988; 23:623-626.

- Feden AI, Salzman S. Pharmacological strategies in CNS trauma. *TIPS.* 1992; 13:29-35.

- Flowers RJ. Glucocorticoids and inhibition of phospholipase A2. In: *Anti-inflammatory Steroid Action: basic and clinical aspects.* R.P. Schleimer HN, Ford-Claman y Oronsky (eds). Academic Press: New York USA. 1989, pp48-64.

- Francel PC. Bradykinin and neuronal injury. *J Neurotrauma* 1992; 9 Supl 1; S27-S45.

- Frei K, Siepl C, Groscurth P, Bodemer S, Schwerdel C, Fontana A. Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma treated microglia cells Eur J Immunol. 1987; 17:1271-1278.

- Frei K, Siepl C, Groscurth P, Bodemer S, Fontana A. Immunology of microglial cells. Ann N Y Acad Sci. 1988; 540:218-227.

- Ganazzani AA, Carafoli E, Guerni D. Calcineurin controls inositol 1,4,5-triphosphate type I receptor expression in neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. 1999; 96:5797-5801.

- Gallin JI. Inflammation. In William EP, editor. Fundamental immunology. New York: Reven Press, 1993:1015-1032.

- Geisler WO, Jousse AT, Wynne-Jones M, Breithaupt D. Survival in traumatic spinal cord injury. Paraplegia. 1983; 21:364-373.

- Gerndt SJ, Rodriguez JL, Pawlik JW, Taheri PA, Wahl WL, Micheals AJ, Papadopoulos SM. Consequences of high-dose steroid therapy for acute spinal cord injury. 1997; 42:279-284.

- Gold BG, Kato K, Storm-Dickerson T. The immunosuppressant FK506 increases the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. J. Neurosci. 1995; 15:7509-7516.

- Goodkin R, Cambell JB. Sequential pathologic changes in spinal cord injury. Arch Neurol 1979; 30: 197-201.

- Goodman GA. The pharmacological basis of the therapeutics, Mc Graw-Hill, New York: 1990; pp 1691.

- Gree CJ, Experimental transplantation and cyclosporine. Transplantation 1988; 46: 3s-10s.

Grijalva I, Guízar-Sahagún G, Hernandez JL, Rivera BE, Madrazo I. Incidence of spinal cord injury in patients of Instituto del Seguro Social of metropolitane zone of México City in 1995 Enviado a Spinal Cord.

- Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I, E Franco-Bourland R, Salgado-Ceballos H, Ibarra A, Larriva-Sahd J. Neuroprotection of completely lacerated spinal cord of adult rats by homotopic and heterotopic transplantation. Restor Neurol Neurosci 1994; 7: 61-70.

- Hall DE, Braughler JM. Glucocorticoid mechanisms in acute spinal cord injury: a review and therapeutic rationale. Surg Neurol 1982; 18:320-327.

- Hall DE, 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.

- Hall DE, Andrus PK, Smith SL Fleck TJ, Scherch HM, Lutzke BS. Pyrrolopyrimidines: novel Brain-penetrating antioxidants with neuroprotective activity in brain injury and ischemia models. *L Pharmacol Exp. Ther* 1997; 281:895-904.

- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Clendon. press. Oxford. 1985.

- Ham AW. *Tratado de histología*. México: Interamericana 1985; pp 1079.

a.- Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Tsuchiya K, Niwa M, Tsutsunishita Y, Fukuzawa K. Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord. *J Free Rad. Biol. Med*. 1996; 20:1-9.

b.- Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Nakauchi K, Niwa M, Kawai Y, et al. Involvement of an intercellular adhesion molecules, I-dependent pathway in the pathogenesis of secondary changes after spinal cord injury in rats. *J. Neurochem*. 1996; 66:1525-1531.

- Hendeby B, Maxfield FR. Regulation of neutrophil and adhesion by intracellular calcium transients. *Blood Cells*. 1993; 19:143-161.

- Hargreaves KM, Costella A. Glucocorticoids suppress levels of immunoreactive bradykinin in inflamed tissue as evaluated by micro dialysis probes. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1990; 48:168-178.

- Hodgkinson SJ, Pillard JD, McLeod JG. Cyclosporin A in the treatment of chronic demyelinating polyradiculoneuropathy. *J. Neurol Neurosurg Psych* 1990; 53: 327-330.

- Hsu CY, Halushka PV, Hogan EL, Cox RD. Increased thromboxane level in experimental spinal cord injury. *J. Neurol. Sci.* 1986; 74:289-296.

- Ibarra LG, Donati SR, Contreras RV. Lesiones traumáticas de la médula espinal. Estudio epidemiológico. *Cirugía Med. Urg.* 1990; 15:51-55.

- Ibarra A, Martinez S, Reyes J, Correa D, Guizar-Sahagun G, Kretschmen R, Grijalva I, Madrazo I. Clinical improvement of spinal cord injured rats subjected to cyclosporin-A treatment *Soc. Neurosci. Abstr.* 1995 Vol. 21, Part I, pp. 314.

- Ibarra A, Reyes J, Martinez S, Correa D, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Castañeda-Hernández G, Flores-Murrieta I, Franco-Bourland R, Madrazo I. Use of Cyclosporin-A in Experimental Spinal Cord Injury: Design of a Dosing Strategy to maintain therapeutic levels J. Neurotrauma 1996; 13: 567-570.

- Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. Neurosurgery 1990;27: 1-11.

- Kahan BD. Cyclosporine, New Eng J Med. 1989; 321:1725-1738.

- Lemke M, Demediuk P, McIntosh TK, Vink R, Faden AI. Alterations in tissue Mg⁺⁺. Na⁺ and spinal cord edema following impact trauma in rats Bioch Cioph Res Com 1987; 147:1170-1175.

- Levy ML, Gams W, Wijesinghe HS, SooHoo WE, Adkins RH, Stillerman CB. Use of methylprednisolone as an adjunct in the management of patients with penetrating spinal cord injury: outcome analysis. Neurosurgery 1996; 39:1141-1149.

- Ley General de Salud. Título Séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. Editorial Porrúa, 6ª de, México, D.F. 1990; pp 430-431.

- Lotan M, Schwartz M. Crosstalk between immune system and the nervous system in response to injury: implication for regeneration. *FASEB J.* 1994; 8:1026-1033.

- Male D, Champion B, Cooke A, Owen M. *Advanced immunology*. 2th edition; New York 1991 pp1.1-18.8.

- Maza SR, Frishman WH. Therapeutic options to minimize free radical damage and thrombogenicity in ischemic/reperfused myocardium. *Am Heart J* 1987; 114:1206-1215.

- Means DE, Anderson DK. Neuronophagia by leucocytes in experimental spinal cord injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1983; 42:707-719.

- Moilanen E, Vapaatalo H. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann. Med.* 1995; 27:359-367.

- Nakayasu H, Ota K, Tanaka H, Iric H, Taka HK. Suppression of actively induced and passively transferred experimental allergic neuritis by cyclosporin A. *J. Neuro. Immunol.* 1990; 26:219-227.

- Nesathurai S. Steroids and spinal cord injury: revisiting the NASCIS 2 and NASCIS 3 trials. *J. Trauma.* 1998; 45:1088-1093.

- Packer MA, Murphy MP. Peroxynitrite cause calcium efflux from mitochondria which is prevented by Cyclosporin A. FEBS Letters. 1994; 345:237-240.

- Pajovic BS, Kasapovic J, Martinovic J. Superoxide dismutase activities in different tissues of female rats treated with olive oil. Physiol. Res. 1997; 46:381-384.

- Pfeilschifter J, Eberhardt W, Hummel R, Kunz D, Mühl H, Nitsch D, Püss C, Walker G. Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase-potencial for a novel class of anti-inflammatory agents. Cell. Biol. Inter. 1996; 20:51-58.

- Popovich PG, Weip P, Stokes BT. Cellular inflammatory response after spinal cor injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. J. Comp. Neurol. 1997; 377:443-464.

- Regan, C. Neuronal and glial markers of the central nervous system *Experientia* 1988; 695-697

- Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. Development of the immune system. 4th edition, Mosby de; New York 1996; pp13.1-13.7.

- Rothwell NJ, Relton JK. Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the CNS. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1993; 17:217-227.

- Ryffel B. Pharmacology of Cyclosporine VI. Cellular activation regulation of intracellular events by cyclosporine. *Pharmacol Rev.* 1989; 41:404-416.

- Sayers ST, Lucero Y, Mrkvicka R, Chhangani V, Khan T. Clenbuterol reverse muscle atrophy after spinal cord injury. *American Paraplegia Soc. Abstr.* pag. 65 1999.

- Schweizer M y Richter C. Nitric Oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 204:169-175.

- Sharief M, Keir G, Thompson E. Intrathecal synthesis of IgM in neurological diseases a comparison between detection of oligoclonal bands and quantitative estimation. *J Neurol Sci.* 1990; 96:131-142.

- Sherry B, Yarlett N, Strupp A, Cerami A. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:3511-3515.

- Shibasaki F, McKeon. Calcineurin functions in Ca^{2+} -activated cell death in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* 1995; 131:735-743.

- Schleimer RP, Freeland HS, Peters SP. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and

formation leukotriene B₄ by purified human neutrophils. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989; 229:237-243.

- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. *Basic neurochemistry molecular, cellular and medical aspects.* 6^a edition, Lippincott Raven; New York 1998; pp 1104.

- Stokes BT, Reier PJ. Fetal grafts alter chronic behavioral outcome after contusion damage to the adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 1992; 116:1-12.

- Stover SL, Fine PR. The epidemiology and economics of spinal cord injury. *Paraplegia* 1987; 25: 225-228.

Sun Y, McKay LI, DuBois DC, Jusko WJ, Almon RR. Pharmacokinetic/pharmacodynamic models for corticosteroid receptor down-regulation and glutamine synthetase induction in rat skeletal muscle by a receptor/gene-mediated mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 288:720-728.

- Theele D, Streit W A. Chronicle of microglia ontogeny. *Glia.* 1993; 7: 5-8.

- Travlos A, Anthon HO, Wing DC. Cerebrospinal fluid cell count following spinal cord injury. *Arch Phys Med. Rehabil.* 1994; 75:293-296.

- Triggs WJ, Willmore LJ. In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe⁺⁺ injection. *J. Neurochem* 1984; 42: 976-978.

- Vandertop WP, Noterman NC, Algra A. Methylprednisolone in traumatic spinal cord injuries: not proven to be beneficial to the patient at present time. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 1998; 9:1061-1064.

- Vladutiu AO. Short analytical review Role nitric oxide in autoimmunity. *Clin. Immunol. Immunopath.* 1995; 76:1-11.

- Vries J, Baarsma GS, Zaal MJW, Boen-Tan TN, Rothova A, Buitenhuis HJ, Schweitzer CMC, de Keizer RJW, Kijlstra A. Cyclosporin in the treatment of severe chronic idiopathic uveitis, *Br J Ophthalmol* 1990; 74: 344-349.

- Wang CX, Olschwaka JA, Wrathall JR. Increase of interleukin-1 Beta mRNA and protein in the spinal cord experimental traumatic in the rat. *Bain. Res* 1997; 759:190-196.

- Wekerle H, Linington C, Lassmann H, Meyermann R. Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci* 1986; 9:271-277.

- Williams KI, Higgs GA. Eicosanoids and inflammation. *J. Pathol.* 1988; 156:101-110.

- Xu J, Qu ZX, Hogan EL, Perot PI. Protective effect of Methylprednisolone on vascular injury in rat spinal cord injury. *J. Neurotrauma*. 1992; 9:245-253.

- Yoon DH, Kim YS, Young W. Therapeutic time window for methylprednisolone in spinal cord injured rat. *Yonsei. Med. J.* 1999; 40:313-20.

- Young W, Koreh I. Potassium and calcium changes in injured spinal cords. *Brain. Res.* 1986; 365:42-53.

- Young G, Flamm E. Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potential, and extracellular calcium in experimental spinal injury. *J Neurosurg.* 1988; 57:667-673.

Zeman RJ, Feng Y, Peng H, Etlinger JD. Clenbuterol, a β_2 - Adrenoceptor agonist, improves locomotor and histological outcomes after spinal cord contusion in rats. *Exp. Neurol.* 1999; 159:267-73.

- 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.

Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats

Araceli Diaz-Ruiz^{a,b,c}, Camilo Rios^c, Ivonne Duarte^{a,b}, Dolores Correa^d,
Gabriel Guizar-Sahagun^{a,b}, Israel Grijalva^{a,b}, Antonio Ibarra^{a,b,*}

^aUnidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, H.E., C.M.N. Siglo XXI, IMSS, Mexico, Mexico

^bLaboratorio de Neuroinmunología, Centro de Investigación del Proyecto Camina, Mexico, A.C. Mexico

^cDepartamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez, Mexico, Mexico

^dDepartamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA, Mexico, Mexico

Received 4 February 1999; received in revised form 3 March 1999; accepted 10 March 1999

Abstract

Besides its immunosuppressive/anti-inflammatory activity, cyclosporin-A (CsA) may protect damaged tissues from lipid peroxidation (LP) by free radicals. To determine the effect of CsA on LP spinal cord (SC) injury, Wistar rats were treated with either vehicle or CsA (2.5 mg/kg per 12 h i.p.) 1, 2, 6 or 12 h after SC trauma by T8-T9 spinal cord contusion, analyzing LP 24 h after injury at the lesion site by the lipid fluorescent products formation method. CsA significantly diminished LP to levels below control values after contusion ($P < 0.05$). The greater inhibition was observed when CsA was given during the first 6 h after injury, furthermore, animals showed a significant clinical improvement. Results show that CsA may be beneficial to injured tissue by inhibiting the levels of LP. © 1999 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cyclosporin-A; Free-radicals; Inflammatory response; Lipid peroxidation; Neuroprotection; Spinal cord injury

After mechanical injury to the spinal cord (SC), the primary lesion is extended as a result of a series of auto-destructive mechanisms, which conform the secondary lesion. The latter originate a gradual degeneration of SC parenchyma leading to chronic neurodegeneration [2]. One of the major secondary mechanisms after traumatic injury, is the free radicals' attack to the cellular membrane [9], a damaging mechanism altering all the cellular components including unsaturated fatty acids by the process of lipid peroxidation (LP) [19]. To prevent this deleterious process, cells are endowed with defense systems including some specific enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx) and catalase. The central nervous system (CNS) is especially sensitive to free radicals damage due to its high metabolic rate, high levels of polyunsaturated lipids and its relatively low level of protective systems [11]. Furthermore, the activity of antioxidant enzymes in the CNS is low as compared with other tissues [1]. Thus, the reactive oxygen species generated after CNS injury, may extensively damage this tissue.

After SC lesion, free radicals are partially generated by the pronounced cellular inflammatory reaction observed in the injured area after trauma [9]. These inflammatory cells release, among other substances, reactive nitrogen and oxygen intermediates [15].

However, cyclosporin-A (CsA) is a cyclic undecapeptide immunosuppressant agent that inhibits T helper lymphocyte proliferation and, hence, depresses the cellular and humoral immune responses [4]. It may be used to inhibit the inflammatory reaction and thus to diminish the free radicals' overproduction and secondarily the LP. Therefore, in this work we evaluated the effect of CsA on both LP and clinical improvement of animals after SC trauma in rats.

Animals were manipulated according to the ethical principles of our Institution and NIH standards.

For LP studies, 48 adult female Wistar rats weighing 220–250 g were allocated in eight groups of six animals each. After pentobarbital anesthesia (50 mg/kg i.p.), five groups were submitted to a severe SC contusion according with the weight drop method described by Allen and modified for rats, as follows: each animal was submitted to a one-level laminectomy (T9), exposing the dorsal aspect of the SC. Under stereotaxic control, a 15 g stainless-steel cylinder

* Corresponding author. Fax: +52-5-573-5545.

E-mail address: antonio65@yahoo.com (A. Ibarra)

Table 1
Summary of experimental design^a

Lipid peroxidation assay ^b			Clinical evaluation ^c		
Group	Procedure	Start of CsA ^d	Group	Procedure	Start of CsA ^d
I	Sham-lesion	No	I	SC injury	No
II	Sham-lesion	1	II	SC injury	1
III	Sham-lesion + FS	No	III	SC injury	2
IV	SC injury	No	IV	SC injury	6
V	SC injury	1	V	SC injury	12
VI	SC injury	2			
VII	SC injury	6			
VIII	SC injury	12			

^a Animals were allocated into eight groups of six rats each for lipid peroxidation (LP) analysis and into five groups of eight rats each for clinical recovery evaluation. CsA was given i.p. as a dose of 2.5 mg/kg per 12 h, 1 day only for LP analysis and 3 days for clinical evaluation. ^b Assessed 24 h after procedure, ^c evaluated at 1, 5, 10, 20 and 30 days after injury, ^d hours after procedure. CsA, Cyclosporin-A; FS Iron (II) sulfate (100 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$); SC, spinal cord.

with a flat tip of 2 mm diameter was dropped from a height of 10 cm, through a guide tube onto the exposed dura mater [17]. This method has been reported to produce a controlled lesion in several reports [6–8]. The remaining three groups were submitted to laminectomy only (sham-lesioned groups). Four SC injured groups and one sham-lesioned group received i.p. injections of 2.5 mg/kg per 12 h CsA (Sandimmune™, Sandoz, Basel, Switzerland) at different times after injury [12]. One SC injured and one sham-lesioned group received only the CsA vehicle (isotonic

phosphate buffer, pH 7.4). Finally, in order to assess the quality of the results of LP, the remaining sham-injury group was injected with Iron (II) sulfate solution, a well-known lipid peroxidant [16]. In this case, the injection was performed by means of a microsyringe under stereotaxic control at the T9 level of the SC. The experimental design is summarized in Table 1.

In order to evaluate LP, animals from all groups were killed by decapitation 24 h after SC lesion. One centimeter of SC from the site of the lesion or laminectomy was dissected from every rat to measure lipid-soluble fluorescent products (LFP), an index of LP, according to the technique described by Triggs and Willmore, 1984, as modified by Santamaria [16] in each SC fragment. Briefly, the SC fragments were homogenized in 3 ml of saline solution (0.9% NaCl). One milliliter aliquots of the homogenate were added to 4 ml of a chloroform-methanol mixture (2:1, v/v). After stirring, the mixture was ice-cool for 30 min to allow phase separation and the fluorescence of the chloroform layer was measured in a Perkin-Elmer LS50B Luminescence spectrophotometer at 370 nm of excitation and 430 nm of emission wavelengths. The sensitivity of the spectrophotometer was adjusted to 150 fluorescence units with a quinine standard solution (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Results were expressed as fluorescence units per gram of tissue. Statistical significance of the differences in LP among treatment groups was determined by analysis of variance followed by the Tukey's test for multiple comparisons, using the SPSS software.

To assess the motor function of rats after trauma, 40 SC injured rats from the treatment groups already described (Table 1) were scored 1, 5, 10, 20 and 30 days after injury by a modified Tarlov's scale [18] as follows: 0, no movements in hindlimbs; 1, perceptible movements of joints; 2, good movement of joints but inability to stand; 3, active support with uncoordinated gait; 4, coordination of the fore- and hindlimbs during gait with lack of control of the ankle or foot and alterations in the base of support; 5,

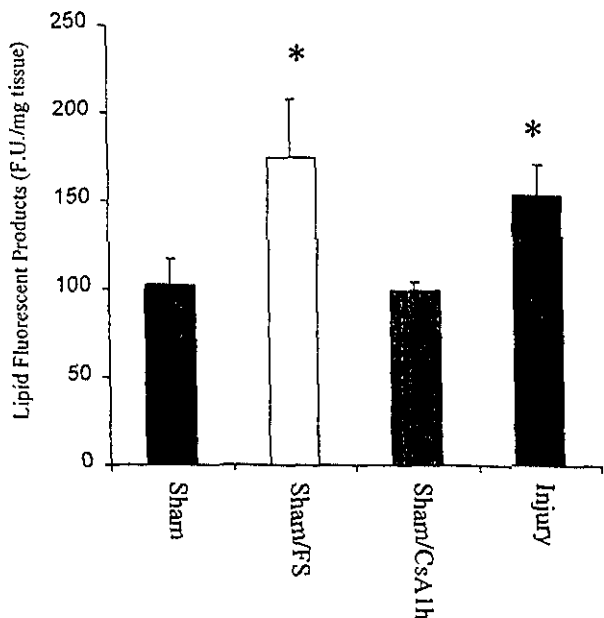


Fig. 1. Lipid peroxidation in rat spinal cord (SC) 24 h after laminectomy (sham), laminectomy plus Ferrous sulfate injection (100 nmol/ μl) (FS) (sham/FS), laminectomy plus Cyclosporin-A (2.5 mg/kg per 12 h) (CsA) treated 1 h after laminectomy (sham/CsA 1 h) or SC injury (injury). The results are expressed as means \pm SE of six animals per group * $P < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's test, as compared with sham group.

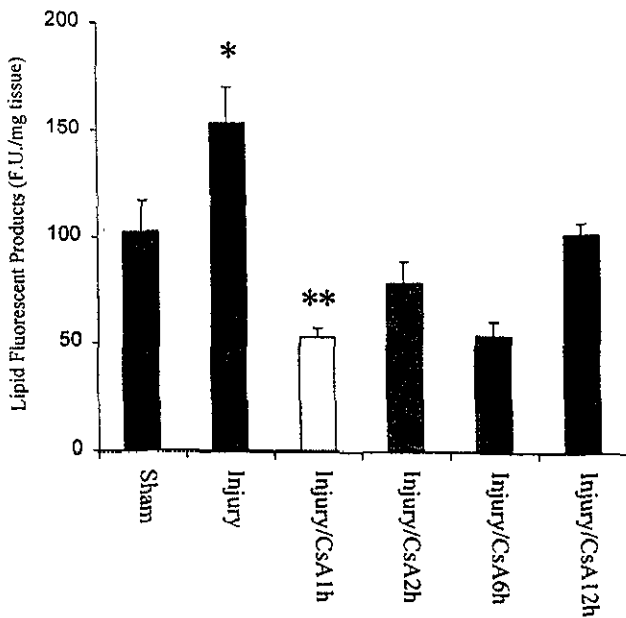


Fig. 2. Lipid peroxidation in rat spinal cord (SC) 24 h after laminectomy (sham), SC injury untreated (injury) or treated with Cyclosporin-A (injury/CsA) 1, 2, 6 or 12 h after lesion. The results are expressed as means \pm SE of six animals per group, *different from all other groups ($P < 0.05$), **different from sham and injury plus Cyclosporin-A 12 h ($P < 0.05$), ANOVA followed by Tukey's test.

complete recovery. In this case, CsA treatment was administered only for the first 3 days after injury (every 12 h),

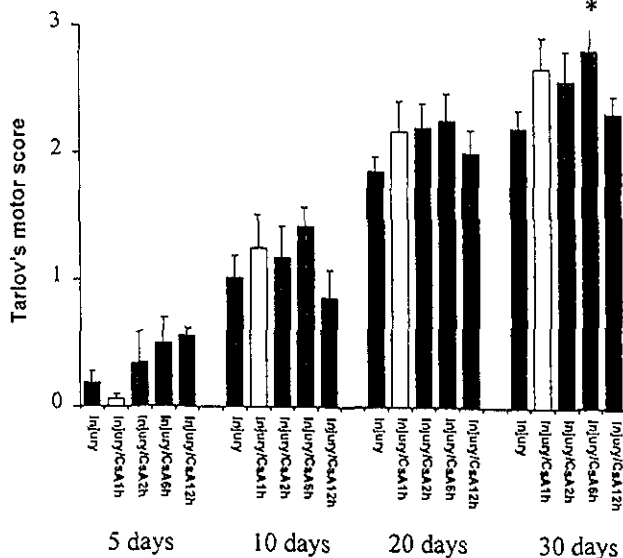


Fig. 3. Tarlov's scale score of spinal cord injured rats non-treated (injury) or treated with cyclosporin-A (injury/CsA) administered at 1, 2, 6 or 12 h after injury. The results are expressed as means \pm SE of eight animals per group. Data were analyzed by the Kruskal-Wallis ANOVA followed by the Mann-Whitney U test and considered significant when $P < 0.05$. *Different from injury without treatment.

because we evaluated the effect of CsA on the acute phase of the lesion. The data were statistically analyzed by the Kruskal-Wallis ANOVA followed by the Mann-Whitney U test and the difference was considered significant when $P < 0.05$.

Lipid peroxidation was first assessed in the sham-lesioned rats injected with FS. In this case, II sulphate increased LP by 43% ($P < 0.05$), as compared with control values (sham-lesion group) (Fig. 1). However, SC injury produced a statistically non-significant difference on LP as compared with FS ($P = 0.2$) (Fig. 1), but a significant increase of 33% ($P < 0.05$) in relation to sham-lesioned animals. The value of LP was not modified in the sham lesion group when animals were treated with CsA (Fig. 1). Fig. 2 shows that animals treated with CsA presented a significant decrease of 66% in LP as compared with the one observed in non-treated SC injured animals ($P < 0.05$). Results showed that the greatest inhibition occurred when the drug was given 1 h after injury. In this case, LP was 49% lower than the values observed in control groups (sham-lesioned animals) ($P < 0.05$), although it was not different from the 2 and 6 h groups. When CsA was given 12 h after injury, LP values showed a significant increase of 48% as compared with the group receiving CsA 1 h after lesion ($P < 0.05$), and the values were similar to those observed in sham-lesioned animals.

The motor function scale was the same for all groups at day 1 after injury (Tarlov's scale, 0), indicating the same degree of lesion after trauma among the treatment. Fig. 3 shows the effect of CsA on the recovery of motor function of animals after lesion. All CsA-treated groups, showed a better clinical improvement when compared with non-treated animals as early as 5 days after lesion, although the significant difference was observed only when CsA was started 6 h after injury ($P = 0.02$, Mann-Whitney U test) and the motor function evaluated after 30 days of recovery (Fig. 3).

The inhibition of SC injury-induced LP seems to be important to diminish neural tissue damage as free radicals overproduction and consequent lipid peroxidation is related to neural death. This is supported by the beneficial effects produced by antioxidant treatment after neural lesion [9]. To this regard, the present work provides evidence on the inhibitory effect of CsA upon LP, in spite of the drug being given 12 h after SC injury. Although at this time LP was not inhibited to the same extent as when the drug was administered during the first 6 h after lesion, it allowed to reach LP levels similar to those of the non-damaged tissue.

LP is recognized as one of the main pathophysiological mechanism involved in secondary damage after a SC injury. In fact, most treatment approaches of neuroprotection after SC injury are intended to counteract early LP, which can result in functional improvement [10]. Our results show for first time that early administration of CsA is not only able to diminish significantly the production of LP in injured SC, but also to improve functional outcome.

Interestingly, previous works have described that the chronic administration of CsA to avoid rejection of kidney and liver transplantation, can induce increased LP damage to several structures, including kidney [3]. In contrast, acute administration of CsA is able to diminish ischemia-reperfusion injury of liver, probably as a result of CsA inhibition of neutrophils infiltration into tissue, which results in a significantly diminished LP [20]. Based on this previous findings, the inhibition of LP after SC injury observed in the present study, could be attributed to a decline of inflammatory cells into the lesioned area, particularly to neutrophils which usually reach the injury area very early, about 1 h after lesion [15]. CsA could also reduce LP by directly inhibiting the production of nitric oxide (NO), precursor of peroxynitrite [13] a highly reactive oxygen species, which has been involved in secondary damage after SC injury [8]. In fact, CsA cooperates to inhibit calcineurin, a calcium-dependent phosphoserine/phosphothreonine protein phosphatase which in turn activates NO synthase activity for NO production [5].

The improved motor function observed after administration of CsA, could be the result of a better SC tissue preservation as a result of the LP inhibition. Even though the significant recovery of animals was observed only when CsA was started 6 h after injury, it is noteworthy that all groups treated with CsA showed a better performance along the days of evaluation, related to the effect of the drug on LP, shortly after lesion. Alternatively, the better functional outcome in CsA-treated rats, could come from an enhanced axonal regeneration, which has been previously suggested for the drug [14]. The main conclusion of the present work is that CsA could act as a neuroprotector after SC injury by inhibiting LP, and improving motor outcome.

- [1] Aspberg, A. and Totmar, O., Oxidative stress decreases antioxidant enzyme activities in reaggregation cultures of brain cells. *Free Radical Biol. Med.*, 17 (1994) 511–516.
- [2] Balentine, J.D. and Paris, D., Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab. Invest.*, 39 (1978) 236–253.
- [3] Bartram, L. and Kasiske, M.D., Cyclosporine and lipid peroxidation. *Am. J. Kidney Dis.*, 31 (1998) 149–154.
- [4] Borel, J., Mechanism of action of cyclosporin-A and rationale for its use in nephrotic syndrome. *Clin. Nephrol.*, 35 (1991) 23–30.
- [5] Dawson, T.M. and Snyder, S.H., Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.*, 14 (1995) 5147–5159.
- [6] Grijalva, I., Guízar-Sahagún, G., Madrazo, I., Franco-Bourland, R., Salgado-Ceballos, H., Ibarra, A. and Espitia, L., Neuroprotection by methylprednisolone for mechanical manipulation of contused spinal cord areas in rats. *Neurodegeneration*, 3 (1994) 159–162.
- [7] Guízar-Sahagún, G., Grijalva, I., Madrazo, I., Franco-Bourland, R., Salgado, H., Ibarra, A., Oliva, E. and Zepeda, A., Development of post-traumatic cysts in the spinal cord contusion. *Surg. Neurol.*, 41 (1994) 149–241.
- [8] Guízar-Sahagún, G., Garcia-López, P., Espitia, A.L., Grijalva, I., Franco-Bourland, R. and Madrazo, I., Transitory expression of NADPH diaphorase (NOS) in axonal swellings after spinal cord injury. *NeuroReport*, 9 (1998) 2899–2902.
- [9] Hall, D.E. and Braughler, J.M., Central nervous system trauma and stroke. II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radical Biol. Med.*, 6 (1989) 303–307.
- [10] Hall, D.E., The role of oxygen radicals in traumatic injury: clinical implications. *J. Emerg. Med.*, 11 (1993) 31–36.
- [11] Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci.*, 8 (1985) 22–26.
- [12] Ibarra, A., Reyes, J., Martínez, S., Correa, D., Guízar-Sahagún, G., Grijalva, I., Castañeda-Hernández, G., Flores-Murrieta, F.J., Franco-Bourland, R. and Madrazo, I., Use of cyclosporin-A in experimental spinal cord injury: design of a dosing strategy to maintain therapeutic levels. *J. Neurotrauma*, 13 (1996) 569–572.
- [13] Paker, M.A. and Murphy, M.P., Peroxynitrite causes calcium efflux from mitochondria which is prevented by Cyclosporin A. *FEBS Lett.*, 345 (1994) 237–240.
- [14] Palladini, G., Caronti, B., Pozzessere, G., Teichner, A., Buttarelli, F.R., Morselli, E., Valle, E., Venturini, G., Fortuna, A. and Pontieri, F.L., Treatment with cyclosporin-A promotes axonal regeneration in rats submitted to transverse section of the spinal cord. II. Recovery of function. *J. Brain Res.*, 37 (1996) 145–153.
- [15] Popovich, P.G., Wei, P. and Stokes, B.T., Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J. Comp. Neurol.*, 377 (1997) 443–464.
- [16] Santamaria, A. and Ríos, C., MK an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci. Lett.*, 159 (1993) 51–54.
- [17] Stellato, C., De Pauli, A., Ciccarelli, A., Cirillo, R., Patella, V., Casolaro, V. and Marone, G., Anti-inflammatory effect of cyclosporin-A on human skin mast cells. *J. Invest. Dermatol.*, 98 (1992) 800–804.
- [18] Stokes, B.T. and Reier, P.J., Fetal grafts alter chronic behavioural outcome after contusion damage to the adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.*, 116 (1992) 1–12.
- [19] Sun, Y., Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radical Biol. Med.*, 8 (1990) 583–599.
- [20] Suzuki, S., Toledo-Pereyra, L.H., Rodriguez, F.J. and Cejalvo, D., Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and Cyclosporine. *Transplantation*, 55 (1993) 1265–1272.