



01074  
38

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS UTILIZANDO  
DONADORES DE ÓXIDO NÍTRICO Y  
ANTIOXIDANTES EN RATAS CON LESIÓN  
MEDULAR EXPERIMENTAL**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**EDUARDO CARLOS SANTOSCOY MEJÍA**

**TUTOR  
DR. GABRIEL GUÍZAR SAHAGÚN**

**COMITÉ TUTORAL  
DRA. REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND  
DR. GUSTAVO ADOLFO GARCÍA SÁNCHEZ**

**1**

**MÉXICO, D.F.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**  
2003



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.

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

# **PAGINACIÓN DISCONTINUA**

# COMITÉ TUTORAL

la Dirección General de Bibliotecas • • •  
: difundir en formato electrónico e impres  
enido de mi trabajo recepciona  
NOMBRE: EDUARDO CARLOS  
SANCHEZ GARCIA  
C.A.: 31-117011-3  
C.A.:

## **Dr. Gabriel Guízar Sahagún**

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Proyecto Camina, México, D. F.

## **Dra. Rebecca E. Franco y Bourland**

Centro Nacional de Rehabilitación, Departamento de Bioquímica, México, D. F.

## **Dr. Gustavo Adolfo García Sánchez**

Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# **JURADO**

## **Dra. Rebecca E. Franco y Bourland**

Centro Nacional de Rehabilitación, Departamento de Bioquímica, México  
D. F.

## **Dr. Gustavo Adolfo García Sánchez**

Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies,  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

## **Dr. Gabriel Guízar Sahagún**

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de  
Especialidades, C M N Siglo XXI, IMSS, Proyecto Camina, México D. F.

## **Dra. Socorro Lara Díaz**

Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies,  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

## **Dr. Camilo Ríos Castañeda**

Departamento de Neuroquímica, INNN, México D. F.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología,  
registro 30658, y por el Proyecto Camina A. C.

Para realizar este trabajo y obtener el grado de Maestro en Ciencias de la  
Producción y de la Salud Animal estuve becado por el Consejo Nacional De  
Ciencia y Tecnología, Registro # 138257

II

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Dedico esta tesis**

**a mi hija Naixe**

**a mi hijo Balam**

**a mi esposa Lourdes**

**a mi madre Sonia**

**a mis amigos**

**a todos los egresados del Hospital Veterinario UNAM**

**a todos los que han compartido su conocimiento conmigo**

**y en especial a la Dra. Socorro Lara Díaz**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco infinitamente al Dr. Gabriel Guízar por su disposición incondicional a compartir sus conocimientos, por su asesoría e invaluable aportaciones en mi formación.

A los miembros del Comité Tutoral por sus consejos y aportaciones para la realización de este trabajo

A los miembros del Jurado por sus comentarios para lograr la versión final de esta tesis

A las personas que laboran en el Proyecto Camina por sus enseñanzas y apoyo.

A los investigadores del Laboratorio de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, por sus consejos y asesoría.

A la Dra. Guadalupe Bravo y a Guillermo por sus enseñanzas y apoyo en la realización de este trabajo

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, registro 30658, y por el Proyecto Camina A. C.

Para realizar este trabajo y obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal estuve becado por el Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología, Registro # 138257

## INDICE GENERAL

Introducción	1
Consideraciones Anatómicas	3
Meninges	4
Médula Espinal	4
Tractos Ascendentes	5
Tractos Descendentes	5
Irrigación de la médula espinal	6
Fisiopatología de la lesión traumática de la médula espinal	7
Alteración en el flujo sanguíneo	8
Fase de excitotoxicidad	12
Fase de estrés oxidativo	19
Justificación	26
Objetivo General	26
Objetivos Particulares	26
Hipótesis	26
Material y Métodos	27
Diseño del experimento	27
Características de los fármacos empleados	27

v

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Conformación de grupos	29
Determinación de efectos hemodinámicos de donadores de ON	29
Determinación de lipoperoxidación	29
Dosificación, vía e intervalos de dosificación	30
Anestesia y procedimientos quirúrgicos	31
Influencia de donadores/precursores de ON sobre PAM Y FC	35
Determinación de productos de Lipoperoxidación	36
Análisis estadístico	43
Consideraciones éticas y legales	43
Resultados	44
Alteraciones en la Hemodinámica	44
Lipoperoxidación	46
Discusión	50
Conclusiones	57
Referencias	58

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1- Formación de Radicales de Oxígeno	21
Figura 2- Reacción de Fenton	22
Figura 3- Reacción de Haber-Weiss	23
Figura 4- Laminectomía	32
Figura 5- Equipo de estereotaxia	32
Figura 6- Cilindro de acero inoxidable	33
Figura 7- Lesión medular	33
Figura 8- Determinación PAM y FC	34
Figura 9- Transductor de presión	35
Figura 10- Polígrafo	35
Figura 11- Bomba de infusión	37
Figura 12- Aplicación intraperitoneal	37
Figura 13- Perfusión intracardiaca	38
Figura 14- Toma de espécimen	39
Figura 15- Retiro de meninges	39
Figura 16- Pesaje de especímenes	39
Figura 17- Homogenización	40
Figura 18- Homogenización	40
Figura 19- Incubación en frío	40

Figura 20- Separación de fases	40
Figura 21- Retiro de capa de cloroformo	41
Figura 22- Aclaración con metanol	41
Figura 23- Espectrofotómetro	42
Figura 24- Medición de fluorescencia	42
Figura 25A Efecto de ON en Presión Arterial Media	45
Figura 25B Efecto de ON en Frecuencia Cardíaca	45
Figura 26 Efecto de antioxidantes y ON en lipoperoxidación	47
Figura 27 Efecto de donadores/precursores de ON en lipoperoxidación	49
Tabla I – Diseño del experimento	30

## RESUMEN

El presente trabajo probó el efecto de donadores / precursores de óxido nítrico (ON), en la hemodinámica de ratas con contusión medular y solos o combinados con antioxidantes (AOX) en la lipoperoxidación (LP) de la médula espinal (ME). El precursor fue el Dinitrato de isosorbide (ISO) y el donador la L-arginina (ARG). Los AOX: la MnTBAP, mimético de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el gama-glutamilcisteina etil ester (GSHE). En el análisis de la hemodinámica, la ARG (300 mg/kg/ml) y el ISO (5, 10  $\mu\text{g/kg/min}$ ) provocaron cambios menores a 5% en la presión arterial media, y el ISO (50  $\mu\text{g/kg/min.}$ ) su caída ( $p < 0.05$ ). La frecuencia cardíaca disminuyó ( $p < 0.05$ ) con el ISO (10 y 50  $\mu\text{g/kg/min}$ ). Para determinar la LP: en ratas Long-Evans, bajo anestesia, se traumatizó la ME en T5-T6. Los grupos se trataron como sigue: 1) ISO (10  $\mu\text{g/kg/por minuto}$ ); 2) ARG (300mg/kg/23hrs); 3) SOD (12 mg/kg); 4) CAT 27000 (U/kg); 5) GSHE (12 mg/kg); 6) AOX (SOD + CAT + GSHE); 7) ISO + AOX; 8) ARG + AOX; 9) Metilprednisolona (MP) 30mg/kg; 10) lesión sin tratamiento (LES) y 11) laminectomía sin lesión y sin tratamiento (SL). A las 24 horas se tomaron y procesaron muestras de ME afectada. Los resultados demostraron incremento de la LP en los grupos ISO y ARG, sin existir diferencia con el grupo LES. Cuando se añadieron los AOX, la LP se redujo ( $p < 0.05$ ), aunque en el grupo ARG/AOX se mantuvo ( $p < 0.05$ ), comparándolo con el grupo AOX y SL. La administración endovenosa de ISO y de ARG no alteró la hemodinámica significativamente y es posible emplear ON suplementario, favoreciendo la irrigación en el sitio de lesión medular postraumatismo, sin embargo su administración se debe realizar en conjunto con AOX como los probados aquí, para prevenir mayor daño oxidativo.

## LIPID PEROXIDATION IN INJURED SPINAL CORD OF RATS AFTER EXOGENOUS NITRIC OXIDE AND ANTIOXIDANTS

### ABSTRACT

To determine the extent to which exogenous nitric oxide (NO) might affect hemodynamics and/or increase oxidative damage after acute spinal cord (SC) injury, rats were submitted to SC contusion, and given a NO donor or precursor Isosorbide dinitrate (10 µg/kg/min) or L-arginine (300 mg/kg/23h) increased slightly lipid peroxidation (LP) measured at the site of injury at levels above those observed in non-treated injured rats 24 h post-injury, without affecting hemodynamic parameters importantly. Under these conditions LP was inhibited using a cocktail of antioxidants (superoxide dismutase mimetic, catalase and glutathione). In conclusion, low concentrations of exogenous NO do not affect hemodynamics of SC-contused rats, and their effect on SC LP is effectively blocked by administering antioxidants.

**Key words:** spinal cord injury, NO donors, oxidative damage, MnTBAP, catalase, glutathione, arterial pressure, heart rate.

x

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Lipid peroxidation by nitric oxide supplements after spinal cord injury: effect of antioxidants in rats

Carlos Santoscoy<sup>a,b</sup>, Camilo Ríos<sup>c</sup>, Rebecca E. Franco-Bourland<sup>d</sup>, Enrique Hong<sup>e</sup>,  
Guadalupe Bravo<sup>e</sup>, Guillermo Rojas<sup>e</sup>, Gabriel Guízar-Sahagún<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Research Unit for Neurological Diseases, IMSS, Tlalpan 4430, Mexico City 14050, Mexico

<sup>b</sup>Proyecto Carmina A.C., Mexico City, Mexico

<sup>c</sup>Department of Neurochemistry, INNN, Mexico City, Mexico

<sup>d</sup>Department of Biochemistry, CNR, Mexico City, Mexico

<sup>e</sup>Department of Pharmacobiology, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

Received 5 February 2002; received in revised form 14 June 2002; accepted 14 June 2002

### Abstract

To determine the extent to which exogenous nitric oxide (NO) might affect hemodynamics and/or increase oxidative damage after acute spinal cord (SC) injury, rats were submitted to SC contusion, and given a NO donor or NO precursor. Intravenous isosorbide dinitrate (10 µg/kg per min) or L-arginine (300 mg/kg per 23 h) showed a tendency to increase lipid peroxidation (LP), although without reaching significance compared to non-treated injured rats 24 h post-injury, and without affecting mean arterial pressure and heart rate importantly. LP due to injury and exogenous NO was significantly inhibited by the co-administration of a cocktail of antioxidants (12 mg/kg superoxide dismutase mimetic, 27 000 U/kg catalase, and 12 mg/kg glutathione), but less effectively for the injury-L-arginine condition. These results demonstrate that in order to further test the potential neuroprotective effect of NO enhancing reagents after SC injury, antioxidants must be included in the treatment scheme. © 2002 Published by Elsevier Science Ireland Ltd.

**Keywords:** Spinal cord injury; Nitric oxide donors; Oxidative damage; Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin chloride; Catalase; Glutathione; Arterial pressure; Heart rate

Aside from its well-known action as a neurotoxin, nitric oxide (NO) has also been described as a neuroprotectant. It appears that this duality depends on the concentration of NO, its source, redox state, and its concurrence with other molecules [9,12,19]. Oxygen/nitrogen radical-mediated oxidation is a major mechanism of post-traumatic neurodegeneration. Immediately following spinal cord (SC) injury, an oxidative process begins with the rise of superoxide anions [12], hydrogen peroxide [11], and NO [10] that involves oxidative damage to important cellular components including proteins, nucleic acids, and lipids [8]. The destructive potential of these free radicals is further enhanced by the fact that increases in endogenous antioxidants, occur late after SC injury, if at all. For example, the activity of catalase and the levels of glutathione increase 24

h post-injury, while endogenous superoxide dismutase (SOD) enzymic activity remains unchanged [2].

NO produced by NO donors, such as isosorbide dinitrate (ISDN) or the NO precursor (L-arginine) has been shown to be a neuroprotectant as it improves blood flow to injured neural tissue and thereby reduces the risk of ischemia [4,15,18], and diminishes excitotoxicity by inactivating *N*-methyl-D-aspartate receptors via protein nitrosylation [9]. Before testing their protective role in rats after SC injury, in the present study we determined the extent to which ISDN and L-arginine might affect hemodynamics and/or increase oxidative damage (measured as lipid peroxidation, LP) at the site of SC injury, and the effectiveness of a cocktail of antioxidants to block injury and NO induced oxidation.

The Animal Care and Use Committee of our Institution approved this study, and animals were handled in compliance with the ethical guidelines of our Institution which are similar to NIH standards. Adult male Long Evans rats weighing 250–300 g were housed in a temperature-regu-

\* Corresponding author. Tel.: +52-55-5573-0029; fax: 52-55-5573-5545.

E-mail address: gulzarq@prodigy.net.mx (G. Guízar-Sahagún).

lated animal facility and kept on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. For the surgical procedures and sacrifice, animals were anesthetized with a mixture of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (9 mg/kg) i.m.

While in the prone position a laminectomy was performed aseptically at T5–T6 to expose the dorsal aspect of the SC. Then, with the rats placed in a stereotactic device, a contusion was produced by dropping on the exposed dura, a stainless steel rod with a flat tip of 1.7 mm in diameter, weighing 15 g, from a height of 6 cm through a guide tube. The injury was produced with an intensity of 90 g/cm.

The influence of ISDN and L-arginine on mean arterial blood pressure (MABP) and heart rate (HR) of SC-injured rats was determined using five experimental groups of rats ( $n = 4$ ). For MABP recordings, the left femoral artery was dissected, catheterized and connected to a pressure transducer (P231D, Gould Statham, CA, USA) linked to a polygraph (Grass Instruments, Quincy, MA, USA). HR was determined electronically from the upstroke of the arterial pulse pressure using a Grass model 7P4F tachograph. Body temperature was kept at 37°C. MABP and HR were allowed to stabilize for 30 min before laminectomy, and then SC injury was performed. ISDN, L-arginine or vehicle (saline solution) infusions were given i.v., beginning 30 min after injury and lasting 60 min. ISDN, was given at a dose of 5, 10 and 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per min; L-arginine was given i.v. continuously as a single dose of 100 mg/kg in the course of 20 min, followed by the vehicle for another 40 min. All rats received the same volume of fluids. MABP and HR were continuously monitored from the moment of SC injury and for the length of the infusion period, after which rats were sacrificed with an overdose of the anesthetic. Differences ( $\Delta$ ) between the basal recordings taken at the start of the infusion of the NO enhancing reagents (30 min after injury) and the recordings taken every 10 min for 60 min, were assessed using the Repeated Measures analysis of variance (ANCOVA) test followed by the Dunnett test comparing the experimental versus the control groups.

LP was measured in SC specimens obtained from the site of lesion of groups of SC-injured rats ( $n = 6$ ) subjected to various experimental conditions: treatment with antioxidants [catalase from *Aspergillus niger*, glutathione-monoethyl ester reduced form (GSHE), or the SOD mimetic, Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin chloride (MnTBAP)] given alone or all three mixed (MIX), as well as treatment with ISDN or L-arginine given alone or combined with MIX; sham-injured rats (laminectomized only) and SC-injured rats without treatment or treated with methylprednisolone (MP, the standard treatment for SC injury) were the controls (details in Table 1). The concentrations of ISDN and L-arginine were chosen so as not to affect cardiovascular parameters of the SC-injured rats importantly. Reagents and fluids were administered i.v. (using a KD Scientific 100 syringe pump) or i.p. Reagents were solubilized in 1.2 ml of a saline solution for bolus administration given 30 min after SC injury in the course of 40 min, and in 10 ml of a 5% glucose/saline solution administered continuously over the period of 23 h post-injury. At the end of the administration of the reagents, animals were perfused transcardially with a cold saline solution, and 1 cm-long SC specimens from the site of injury were removed, freed of meninges, weighed, and processed for LP measurements, according to Triggs and Willmore [17], with minor modifications. Briefly, tissues were homogenized in 3 ml of a cold saline solution. One ml of the homogenate was then mixed with 4 ml of a 2:1 v/v mixture of chloroform-methanol and vortexed for 1 min. The mixture was then placed on ice for 30 min to allow the phases to separate. The upper phase was discarded and 2 ml of the chloroform layer were cleared by adding 0.2 ml of methanol and used for fluorescence measurements using a Perkin-Elmer LS50B luminescence spectrophotometer at 370 nm (excitation) and 430 nm (emission). Fluorescence was expressed as fluorescence units per gram tissue. Duplicate samples were run for each SC specimen. At the start of each run, the sensitivity of the spectrophotometer was tested

Table 1  
Doses and schedules of drug administration for the lipid peroxidation study\*

Group	Total dose	Bolus i.v.	Infusion i.v.	Bolus i.p.
INJ/ISDN	13.8 mg/kg	SS	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per min/23 h	
INJ/L-arginine	300 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg per 23 h	
INJ/MnTBAP	12 mg/kg	3 mg/kg	9 mg/kg per 23 h	
INJ/Catalase	27 000 U/kg	9000 U/kg	SSG	9000 U/kg 4 and 20 h post-injury
INJ/GSHE	12 mg/kg	4 mg/kg	8 mg/kg per 23 h	
INJ/MIX	As noted above			
INJ/ISDN + MIX	As noted above			
INJ/L-arginine + MIX	As noted above			
INJ/MP	154.2 mg/kg	30 mg/kg	5.4 mg/kg per h/23 h	
INJ		SS	SSG	
Sham-injured		SS	SSG	

\* INJ, spinal cord injury; ISDN, isosorbide dinitrate; MnTBAP, superoxide dismutase mimetic; GSHE, glutathione ester; MIX, combination of MnTBAP, catalase and GSHE; MP, methylprednisolone; SS, saline solution; and SSG, SS + 5% glucose.

XII

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

using a freshly prepared quinine standard solution (1  $\mu\text{g/ml}$ ) exhibiting a fluorescence of approximately 330 units. LP data were analyzed using the one-way ANOVA followed by Bonferroni's test comparing all groups among each other. The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

Before injury, all rats exhibited a constant MABP of  $86.5 \pm 1.41$  standard error mmHg, and a HR of  $196.8 \pm 3.93$  beats/min. For the first 20 min after injury, rats showed significant changes in both parameters, as previously described [3], but returned to basal values 30 min post-injury (MABP  $84.1 \pm 2.11$ , and for HR  $183 \pm 4.92$ ). Compared to these values,  $\Delta$  variations of MABP and HR were recorded for rats given L-arginine (100 mg/kg) or ISDN (5, 10 or 50  $\mu\text{g/kg}$  per min), and are plotted in Figs. 1A,B, respectively. L-arginine and the two lower doses of ISDN resulted in changes in MABP that were

not greater than 4 mmHg (less than 5%), while the highest dose produced a fall of approximately 11 mmHg ( $P < 0.005$ ). ISDN at doses of 10 or 50  $\mu\text{g/kg}$  per min produced a drop in HR of approximately 10 beats/min (not greater than 6%) which was, however, significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ).

LP values from non-treated SC-injured rats were compared to those from sham-injured rats, and from rats given antioxidants alone or combined, as well as to those from rats treated with MP. The greatest level of LP was observed in the specimens from the non-treated injured rats (Fig. 2). Comparable levels of LP were seen in the specimens from the sham-injured group and the rats given catalase, GSHE, and MIX. Although not statistically significant, SC specimens from rats treated with MP and MnTBAP showed slightly higher LP values than the specimens from the sham-injured group. LP values from the sham-injured group and from all other treated rats were significantly different ( $P < 0.05$ ) from the non-treated SC-injured group (Fig. 2).

As shown in Fig. 3, ISDN and L-arginine treated rats after SC injury had a tendency to show increased LP levels as compared to the non-treated injured animals, although without reaching significance. MIX given together with ISDN and L-arginine reduced LP levels significantly ( $P < 0.05$ ), although the levels of LP in the L-arginine/MIX treated rats remained significantly higher ( $P < 0.05$ ) than those observed in the sham-injured and MIX-treated groups.

Despite recent therapeutic advances, there is still no effective treatment to prevent secondary autodestructive processes that occur after a traumatic injury to the SC, such as glutamate excitotoxicity, calcium overload, oxidative stress, and ischemia, all of which are mechanisms that

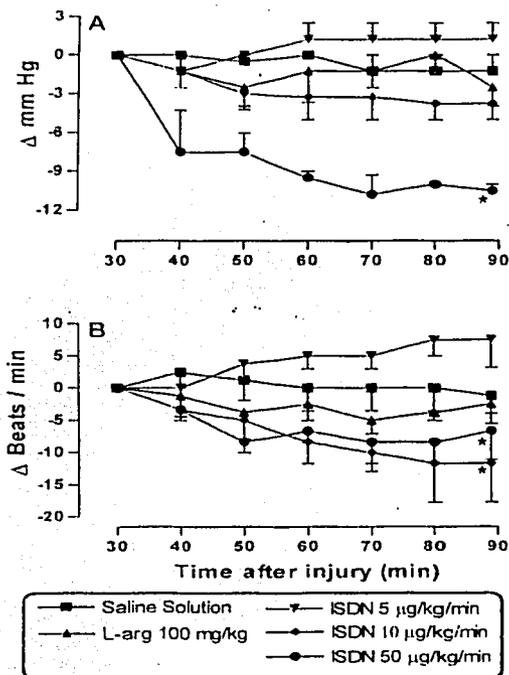


Fig. 1. Hemodynamic changes in rats after SC contusion and treatment with NO enhancing reagents. Differences ( $\Delta$ ) for mean arterial blood pressure (A); and heart rate (B) were plotted every 10 min with respect to the basal recordings taken 30 min post-injury, at the beginning of the administration of isosorbide dinitrate (ISDN) and L-arginine (L-arg). Data are expressed as the mean  $\pm$  SE. Statistical significance (\*,  $P < 0.05$ ).

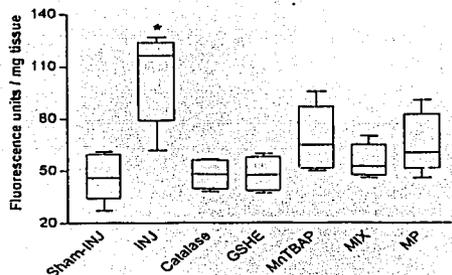


Fig. 2. Lipid peroxidation in injured SC tissue: effect of antioxidants alone or combined. Sham-injured (sham-INJ), non-treated injured (INJ), injured plus catalase, glutathione (GSHE), superoxide dismutase mimetic (MnTBAP), antioxidant cocktail (MIX), and methylprednisolone (MP). INJ was significantly different from all other groups (\*,  $P < 0.05$ ). Boxes represent the distribution of the data extending from the 25th to the 75th percentiles; the line is drawn at the median; whiskers represent the highest and lowest values.

XIII

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

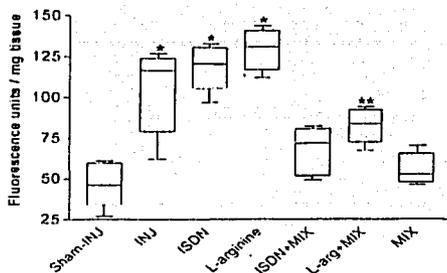


Fig. 3. Lipid peroxidation in injured SC tissue: effect of NO enhancing reagents and antioxidants. Sham-injured (sham-INJ), non-treated injured (INJ), injured plus isosorbide dinitrate (ISDN), L-arginine, ISDN + antioxidant cocktail, (ISDN + MIX), L-arginine + MIX, and MIX. Statistical significance (\*,  $P < 0.05$ ) for INJ, ISDN, and L-arginine as compared to the other four groups. For L-arginine + MIX significance (\*\*,  $P < 0.05$ ) compared with Sham-INJ and MIX.

have been related to neuronal dysfunction and death [1]. Among the various drugs that appear to have a neuroprotective effect is an unlikely candidate, namely NO. Despite the fact that NO is known more for its neurotoxicity in the oxidized environment of the injured SC by forming peroxynitrite [10], a powerful oxidant, and considering the attempts that have been made to block NO production on the grounds of its toxicity [6], NO has also been recognized as a potential neuroprotectant in the damaged central nervous system. NO enhancing reagents have been shown to lead to functional improvement in models of cerebral ischemia [15,18] and cortical trauma [4]. It has been postulated that the beneficial effect(s) of NO might be attributed to its capacity to improve microvascular blood flow [4,18], its ability to protect against cellular damage by reactive oxygen species [19], to block excitotoxicity [9,15], and inhibit apoptosis [13].

To our knowledge, NO has not been tested as a neuroprotectant after SC injury. With this aim in mind we evaluated the oxidative potential of doses of NO supplements that might afford neuroprotection, and determined the antioxidant conditions needed to counteract the toxic reactive species they form. With the purpose of increasing systemic NO in rats with contused SC, we treated them either with the NO-precursor (L-arginine) or a NO-donor (ISDN). Taking into account its effect as a powerful vasodilator [14], doses of the NO enhancing reagents used were chosen so as to produce a rise in NO that would not alter MABP or HR of the SC damaged animals importantly (Figs. 1A,B, respectively). Under these conditions, the extent of the oxidative damage produced by NO enhancing reagents above that produced by the contusion itself was blocked effectively by the administration of MIX. Even though catalase and GSHE alone were equally effective compared to MIX in

reducing LP after SC injury, MIX was chosen to ensure the inhibition of the most relevant pathways of reactive oxygen/nitrogen species production, and thereby to reduce maximally the potential risk for increased oxidative damage in the presence of NO enhancing reagents.

The three antioxidants alone or combined, tested here to inhibit LP, were as good if not better than MP, the standard treatment for acute SC injury. In fact, similar antioxidants have been used successfully in the treatment of other models of SC lesion [5,7,16]. It is clear that controlling oxidative damage is a major concern after trauma to the SC.

In conclusion, the absence of important hemodynamic changes in rats with SC injury given NO enhancing reagents, and the effectiveness of the antioxidant conditions we have described herein, to block the oxidative damage produced by the injury per se, as well as by the treatment with exogenous NO, enabling us now to test the neuroprotective effect of NO after trauma to the SC, under conditions of controlled LP.

This work was supported by CONACYT, grant # 30658-M. C. S. was a recipient of a CONACYT postgraduate fellowship # 138257.

- Amar, A.P. and Levy, M.L., Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury, *Neurosurgery*, 44 (1999) 1027–1039.
- Azbill, R.D., Mu, X., Bruce-Keller, A.J., Mattson, M.P. and Springer, J.E., Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury, *Brain Res.*, 765 (1997) 283–290.
- Bravo, G., Rojas-Martinez, R., Larios, F., Hong, E., Castañeda-Hernandez, G., Rojas, G. and Guizar-Sahagun, G., Mechanisms involved in the cardiovascular alterations immediately after spinal cord injury, *Life Sci.*, 68 (2001) 1527–1534.
- Cherian, L., Chacko, G., Goodman, J.C. and Robertson, C.S., Cerebral hemodynamic effects of phenylephrine and L-arginine after cortical impact injury, *Crit. Care Med.*, 27 (1999) 2512–2517.
- Chikawa, T., Ikata, T., Katoh, S., Hamada, Y., Kogure, K. and Fukuzawa, K., Preventive effects of locithinized superoxide dismutase and methylprednisolone on spinal cord injury in rats: transcriptional regulation of inflammatory and neurotrophic genes, *J. Neurotrauma*, 18 (2001) 93–103.
- Hamada, Y., Ikata, T., Katoh, S., Tsuchiya, K., Niwa, M., Tsutsumishita, Y. and Fukuzawa, K., Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord, *Free Radic. Biol. Med.*, 20 (1996) 1–9.
- Kamencic, H., Griebel, R.W., Lyon, A.W., Paterson, P.G. and Juurlink, B.H., Promoting glutathione synthesis after spinal cord trauma decreases secondary damage and promotes retention of function, *FASEB J.*, 15 (2001) 243–250.
- Leski, M.L., Bao, F., Wu, L., Qian, H., Sun, D. and Liu, D., Protein and DNA oxidation in spinal injury: neurofilaments—an oxidation target, *Free Radic. Biol. Med.*, 30 (2001) 613–624.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Sucher, N.J. and Chen, H.S., Neuroprotective versus neurodestructive effects of NO-related species, *Biofactors*, 8 (1998) 33–40.
- Liu, D., Ling, X., Wen, J. and Liu, J., The role of reactive nitrogen species in secondary spinal cord injury: formation

XIV

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- of nitric oxide, peroxynitrite, and nitrated protein, *J. Neurochem.*, 75 (2000) 2144–2154.
- [11] Liu, D., Liu, J. and Wen, J., Elevation of hydrogen peroxide after spinal cord injury detected by using the Fenton reaction, *Free Radic. Biol. Med.*, 27 (1999) 478–482.
- [12] Liu, D., Sybert, T.E., Qian, H. and Liu, J., Superoxide production after spinal injury detected by microperfusion of cytochrome c, *Free Radic. Biol. Med.*, 25 (1998) 298–304.
- [13] Liu, L. and Stamler, J.S., NO: an inhibitor of cell death, *Cell Death Differ.*, 6 (1999) 937–942.
- [14] Rakhit, R.D. and Marbor, M.S., Nitric oxide: an emerging role in cardioprotection? *Heart*, 86 (2001) 368–372.
- [15] Ramos-Zuniga, R., Volazquez-Santana, H., Mercado-Pimentel, R. and Cerda-Camacho, F., Neuroprotection in selective focal ischemia in rats by nitrates, an alternative redox manipulation on nitric oxide: experimental model, *Minim. Invasive Neurosurg.*, 41 (1998) 152–160.
- [16] Regan, R.F. and Guo, Y., Toxic effect of hemoglobin on spinal cord neurons in culture, *J. Neurotrauma*, 15 (1998) 645–653.
- [17] Triggs, W.J. and Willmore, L.J., In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe<sup>2+</sup> injection, *J. Neurochem.*, 42 (1984) 976–980.
- [18] Verrecchia, C., Buisson, A., Lakhmeche, N., Plotkine, M. and Boulu, R.G., Nitric oxide and cerebral ischemia, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 738 (1994) 341–347.
- [19] Wink, D.A., Cook, J.A., Pacelli, R., Liebmann, J., Krishna, M.C. and Mitchell, J.B., Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species, *Toxicol. Lett.*, 82–83 (1995) 221–226.

XV

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INTRODUCCION

El traumatismo a la médula espinal (ME) produce daño primario al tejido nervioso y a los vasos sanguíneos, el cual es inmediato e irreversible.<sup>1</sup> A partir de este momento ocurren eventos que son el resultado de mecanismos autodestructivos que conforman lo que se conoce como lesión secundaria y que puede convertir a una lesión originalmente incompleta en una lesión completa. Las secuelas resultantes son severas y en muchas ocasiones, permanentes. La semiología asociada a la pérdida de la funcionalidad de la ME se manifiesta a partir del sitio de lesión hacia la parte distal del cuerpo del individuo afectado e incluye: paresia o parálisis, pérdida de la sensibilidad y alteraciones en múltiples funciones que dependen del sistema nervioso autónomo.

Las repercusiones que la lesión a la ME ocasiona en el ámbito personal, familiar, social y laboral son devastadoras, aún más si se toman en cuenta que la población más afectada es la de individuos jóvenes en plena etapa formativa o productiva. En los Estados Unidos de América se sabe que la incidencia de la lesión traumática de la ME es de 13 a 33 individuos afectados por millón de habitantes por año; si se toma en cuenta que la esperanza de vida se ha incrementado, es razonable un incremento en la prevalencia y se espera que ésta sea de 11 a 70 individuos afectados por cada 100,000 personas.<sup>2</sup>

En México no se cuenta con estudios al respecto, sin embargo, basados en las cifras publicadas en los Estados Unidos y tomando en cuenta a una población de 100 millones de habitantes, se calcula una incidencia entre 1300 y 3300 de nuevos casos por año.

También en los Estados Unidos de América se estimó que el costo de por vida para una persona representativa con paraplejía completa, iniciada a la edad de 33 años es de \$500,000 dólares por concepto de hospitalizaciones, modificaciones a la casa, medicamentos, aditamentos para suplir limitaciones y costo de otros servicios incluyendo ayudantes, mientras que para una persona con cuadriplejía iniciada a la edad de 27 años es de 1 millón de dólares<sup>3</sup>

A pesar de los avances terapéuticos en el tratamiento del traumatismo agudo de la ME, aún no existe uno realmente efectivo, por lo que esta patología sigue siendo un problema de salud con costos emocionales y económicos inaceptablemente altos.

En la mayoría de los casos de traumatismo a la ME, el tratamiento a instituir es controversial, siendo hasta ahora la piedra angular, el empleo del succinato sódico de metil prednisolona (MP).<sup>4</sup> Actualmente, una línea de investigación, está enfocada al desarrollo de medidas neuroprotectoras para disminuir el proceso de lesión secundaria, con el objeto de obtener una mejor evolución funcional después de lesiones traumáticas del SNC. Hasta el momento se ha considerado a la MP como el estándar clínico de terapia para este tipo de lesión, sobre la base de su efecto antioxidante, capaz de inhibir parcialmente la lipoperoxidación (LP) secundaria a neurotrauma. Sin embargo se ha considerado que el beneficio clínico de la MP en sujetos con traumatismo medular agudo puede no justificar los riesgos involucrados en su uso, ya que deprime la respuesta inmune, incrementa la incidencia y gravedad de infecciones y aumenta el riesgo de otras complicaciones (retardo en la cicatrización, neumonía, sangrado gastrointestinal, necrosis avascular de la cabeza del fémur, mayor tiempo de estadía intra hospitalaria, etc., lo que repercute en mayor costo de hospitalización y en algunos casos pone en peligro la vida.<sup>5</sup> Adicionalmente se ha encontrado que el tratamiento con megadosis de MP en ratas sometidas a contusión medular, bloquea parcialmente los mecanismos endógenos de reparación, incluyendo la plasticidad postraumática. Por lo anterior la búsqueda de fármacos alternativos que brinden los beneficios de la MP pero sin los efectos adversos ya señalados, representa una amplia área de investigación.

Se ha demostrado que el empleo de agentes que inhiban o modulen la LP, favorece la recuperación funcional nerviosa en modelos de daño al SNC.<sup>6</sup> La observación de que la LP contribuye a la muerte celular indica que el estrés oxidativo debe de ser un objetivo para la intervención farmacológica en el intento de bloquear las fases secundarias de la neurodegeneración y así reducir el déficit

neurrológico secundario al traumatismo medular.<sup>7</sup> Al minimizar el estrés oxidativo se disminuye la respuesta inflamatoria ya que el estrés activa gran cantidad de mecanismos pro inflamatorios. Por lo que la administración de antioxidantes (AOX) como la super óxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y el gama-glutamilcisteína etil ester (GSHE) al disminuir la oxidación favorecen la preservación de tejido. Esto último es de valor particular en el SNC ya que presenta bajas concentraciones de CAT y glutatión (GLU),<sup>8</sup> y aún más, por que la respuesta natural en la formación de estos AOX se ve hasta las 24 horas, mientras que la síntesis de radicales se incrementa en los primeros momentos postraumatismo.<sup>9</sup>

El objetivo del presente trabajo es probar el impacto de donadores / precursores del óxido nítrico (ON) y de algunos AOX solos o combinados en el control de la LP en un modelo experimental de ME traumatizada en ratas. Aunque no existe información del uso de los donadores / precursores de ON como neuroprotectores en traumatismo a la ME, su empleo puede ser benéfico en razón de su capacidad vasodilatadora que en consecuencia mejore el flujo sanguíneo en las zonas de isquemia postraumática<sup>10, 11</sup> además de la posibilidad de disminuir la fase de excitotoxicidad al inactivar a los receptores NMDA por medio de la nitrosilación de las proteínas. El riesgo de emplear donadores / precursores de ON solos en la ME traumatizada radica en el posible incremento del daño ocasionado por el estrés oxidativo. Por lo anterior en este trabajo se probó el impacto en la LP de los donadores / precursores de ON solos o combinados con diferentes AOX en razón de su posible capacidad de modificar positivamente el proceso de LP.

Debido a la capacidad de los donadores / precursores de ON de alterar los parámetros cardiovasculares, se realizó una serie de trabajos preliminares para evaluar su efecto dependiente de la dosis en la PAM y en la FC en ratas sometidas a traumatismo de la ME.

### **CONSIDERACIONES ANATOMICAS**

La ME es la continuación del bulbo raquídeo, se encuentra dentro del canal vertebral, con gran espacio en la columna cervical y ligeramente más ajustada en

la zona toracolumbar. Se extiende desde el límite caudal del tallo cerebral (en el foramen mágnum) hasta su terminación caudal en el *conus medullaris*.<sup>12, 13, 14, 15, 16</sup>

### **Meninges**

Las meninges rodean al SNC, de la más externa a la más interna son la duramadre, la aracnoides y la piamadre; tienen tres funciones principales: protección, soporte y nutrición. La duramadre es un tejido fibroso separado del periostio y compuesto en su mayor parte por fibras de colágena. Caudalmente la dura rodea íntimamente al *filum terminale*.<sup>12, 13</sup> Internamente a la duramadre y unida a ella, se encuentra la aracnoides constituida por finas fibras de colágena y fibras elásticas colocadas alternadamente. El espacio virtual entre las dos membranas recibe el nombre de espacio subdural; el término de aracnoides hace referencia al aspecto de tela de araña de la estructura trabecular que une a la aracnoides con la meninge más interna, la piamadre.<sup>14</sup> Entre la piamadre y la aracnoides existe el espacio subaracnoideo, el cual contiene al fluido cerebroespinal. La piamadre constituida por de fibras de colágena, recubre y se adhiere íntimamente a la médula espinal y raíces nerviosas.<sup>12, 13, 14</sup>

### **Médula espinal**

La ME está compuesta por la materia gris central y la materia blanca periférica, su relación es aproximadamente de 5:1 similar a la que se presenta en el cerebro. En un corte transversal la materia gris formada por neuronas, fibras no mielinizadas, neuroglia y capilares característicamente tiene forma de "mariposa" o de H, observando esto, se pueden determinar las astas dorsales (sensorias), las astas ventrales (motoras) y la delgada parte media que rodea al canal central.

La materia blanca rodea por completo a la materia gris y es blanca debido a que tiene predominantemente fibras mielinizadas.<sup>4, 13, 14, 16</sup>

La ME no es uniformemente cilíndrica en toda su longitud, ya que se ensancha en las intumescencias cervical y lumbar. En estos segmentos las astas ventrales de la materia gris contienen los cuerpos de las neuronas motoras bajas (NMB), dando

origen al plexo braquial y al plexo lumbosacro.<sup>12, 13</sup> Estos ensanchamientos no son obvios y la ME apenas incrementa su tamaño en 2 mm en cada intumescencia.<sup>13</sup> Los axones de las NMB salen de la médula a través de las raíces ventrales para formar los nervios espinales y terminar en sus blancos musculares. Las neuronas motoras altas (NMA) tienen sus cuerpos neuronales en el cerebro, sus axones forman los tractos medulares descendentes.<sup>17</sup>

### **Tractos ascendentes**

La información sensoria es llevada desde la periferia al SNC a través de los axones sensorios. Los cuerpos celulares de estos se encuentran en el ganglio espinal. Sus proyecciones ascienden por la ME hasta el cerebro, estas fibras son grandes y altamente mielinizadas. La información de los miembros pélvicos se transmite por medio del fascículo gracilis y la de los miembros torácicos por el fascículo cuneatus. Estas fibras proyectan ipsilateralmente desde el núcleo cuneato y gracilis en el tallo cerebral antes de que las vías crucen la línea media hacia el cerebro contra lateral anterior. La información viaja a través de los tractos espinocerebelares ventral y dorsal desde los miembros pélvicos y por los tractos cuneocerebelar y espinocerebelar ventral desde los miembros torácicos.<sup>13, 14, 15, 16</sup>

La sensación de dolor superficial se transmite por medio de fibras mielinizadas. La sensación de dolor profundo se transmite por fibras no mielínicas. Los dos tipos de fibras cruzan y recruzan la línea media en un arreglo multisináptico a todo lo largo de la ME, dando por lo tanto un patrón difuso bilateral de fibras dolorosas ascendentes para cada miembro.<sup>12, 13 15</sup> La información proveniente de la vejiga urinaria se transmite al cerebro por medio del tracto espinotalámico.<sup>14, 15, 16</sup>

### **Tractos descendentes**

La función de los músculos flexores es facilitada por los tractos rubroespinal y corticoespinal, las fibras de éste último se inician en la corteza cerebral y la mayoría de ellas decusan en la unión espino medular, descendiendo por el tracto corticoespinal lateral del funículo lateral. Las fibras que no decusan descienden por

el tracto corticoespinal ventral que esta en el funículo ventral. Las fibras del rubroespinal se originan en el núcleo rojo del tallo cerebral, cruzan la línea media y descienden por el tracto rubroespinal del funículo lateral. El tracto vestibuloespinal lo mismo que el reticuloespinal influyen en la función de los músculos extensores. Las fibras del vestibuloespinal se originan en el núcleo vestibular ipsilateral. Estos tractos facilitan a los músculos extensores e inhiben a los músculos flexores en el lado ipsilateral, teniendo el efecto contrario en los músculos del miembro contralateral.<sup>12, 15</sup>

La interferencia con esta vía se observa en lesiones severas de la ME torácica manifestándose con parálisis espástica de los miembros torácicos.<sup>12, 15, 16</sup>

### **Irrigación de la médula espinal**

El suplemento arterial de la columna vertebral es segmental, con las ramas espinales entrando al canal vertebral a través del foramen intervertebral en asociación con el nervio espinal, dando origen a una arteria radicular que se subdivide en una rama dorsal y una ventral.<sup>12, 14, 15, 16</sup> Dos arterias dorso laterales espinales corren a lo largo de la superficie dorsal en forma tortuosa, pudiendo no ser reconocibles como una entidad diferente de las arterias radiculares. La arteria espinal ventral corre a lo largo de la fisura ventral, y con gran cantidad de anastomosis se conecta con las arterias principales.<sup>12, 14, 16</sup>

La distribución de la irrigación no es simétrica, la sustancia de la ME se suple por varias arterias que penetran su superficie. Las arterias verticales se originan de la arteria ventral y pasan dorsalmente a través de la fisura ventral irrigando a la mayor parte de la materia gris y alguna porción de la blanca. Las arterias radiales pasan hacia el centro de la ME a partir de las arterias de la superficie, irrigando a la mayor parte de la materia blanca y porciones menores de la gris.

El drenaje venoso esta arreglado en un patrón radial en un sistema hacia la superficie de la ME y se comunica con el plexo venoso vertebral interno, que comprende dos venas sin válvulas en el piso del canal vertebral. Los senos convergen a la mitad del cuerpo vertebral (en ocasiones se unen) y toman una

dirección divergente sobre el disco intervertebral. El plexo venoso drena por las foráminas intervertebrales hacia las venas vertebrales.<sup>12</sup>

## **FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL**

Está bien establecido que el traumatismo a la ME ocasiona deficiencias neurológicas a través de mecanismos directos e indirectos.<sup>4, 12, 13</sup> Los efectos directos se deben al daño traumático sobre el tejido nervioso en la materia gris y la materia blanca. En el caso de desplazamiento vertebral, se presenta daño a los tejidos por desgarre o aplastamiento y desde un inicio se pierden las características estructurales y funcionales. A estos efectos también se les conoce como inmediatos y no son susceptibles de tratamiento.<sup>4, 13, 16, 17</sup> Un aspecto crítico de esta lesión es que sin importar la severidad de la misma siempre queda un remanente viable de tejido y de axones.<sup>18, 19</sup>

Esta porción de tejido remanente viable, está íntimamente relacionada con la capacidad del individuo para recuperarse, por lo que es blanco fundamental de los tratamientos neuroprotectores, que tienen como objetivo el mantener la mayor cantidad de axones y de mielina intacta y así incrementar la posibilidad de recuperación.<sup>18, 20, 21</sup>

Los efectos indirectos en su mayoría se desarrollan en minutos, horas o días postraumatismo, dando como resultado daño retardado a la ME.<sup>1</sup> Estos efectos se originan de factores endógenos liberados en respuesta al traumatismo, favorecen la disminución de la irrigación y alteran el metabolismo del tejido dañado. Se liberan por la compresión de las vías neurales ya que dependiendo de la severidad del daño, se activa una serie de eventos progresivos autodestructivos que ocasionan diferentes grados de necrosis tisular.<sup>1, 4, 12, 13</sup> Datos recientemente obtenidos demuestran que en adición a la necrosis neuronal ocasionada en forma directa por la lesión secundaria, se producen daños en el DNA celular que favorece la apoptosis, extendiendo así el daño a semanas posteriores al traumatismo.<sup>22, 23, 24</sup>

Para facilitar su comprensión, los eventos secundarios se pueden dividir en tres etapas, más no por esta división se indica que sean independientes o que al terminar una se inicie la siguiente, por el contrario cada una contribuye a incrementar la gravedad de la otra, de tal forma que el efecto es el de una espiral ascendente.<sup>25, 26</sup> Las etapas son: fase isquémica, fase de excitotoxicidad y fase de oxidación.

### **Alteraciones en el flujo sanguíneo**

La respuesta más dramática posterior al traumatismo es la isquemia, particularmente en la materia gris, donde se observa una caída importante del flujo sanguíneo, principalmente en las primeras 2 horas posteriores al impacto. Los cambios del flujo son menos dramáticos en la materia blanca, donde se observa su disminución dentro de la primera hora, para recuperarse en las siguientes 6 horas e incluso incrementarse a las 24 horas. Esto contrasta con el flujo sanguíneo en la materia gris, que se mantiene deprimido durante todo este tiempo.<sup>27</sup> Se sugiere que la materia gris es más vulnerable al daño debido a que su demanda metabólica es alta y a que existe una severa disminución del flujo sanguíneo medular, lo que crea un balance negativo,<sup>28</sup> por lo tanto en la mayoría de los casos la necrosis traumática es más severa en la materia gris. Es frecuente la preservación de las porciones lateral, anterior y posterior de la materia blanca.<sup>19</sup> Bajo circunstancias normales el flujo sanguíneo medular responde en forma primaria a la presión de CO<sub>2</sub> arterial, sin embargo existe evidencia que sustenta la presencia de un sistema de autorregulación del flujo sanguíneo similar al existente en el cerebro. En los vasos traumatizados del segmento medular afectado, la respuesta a la hipercapnea y a la hipoxia se pierde y se ha demostrado que posteriores a esta pérdida de autorregulación, los cambios en el flujo sanguíneo medular son paralelos a los cambios observados en la presión arterial sistémica.<sup>27, 29, 30</sup> La preservación de la autorregulación medular depende aparentemente de la preservación de los receptores alfa-adrenérgicos.<sup>27</sup> Sin embargo, está demostrado que el inducir hipertensión sistémica no incrementa el flujo sanguíneo medular en

el foco del traumatismo, pero si causa hiperemia en las zonas adyacentes lo que incrementa el peligro de hemorragia y edema.<sup>29</sup> La isquemia de la ME en respuesta al traumatismo es un fenómeno localizado en el sitio del daño espinal y directamente relacionado con la fuerza ejercida sobre la médula. El hecho de existir diferencias en el flujo sanguíneo del epicentro con respecto de tejido espinal a pocos milímetros indica que los cambios en el flujo sanguíneo medular se deben a la elaboración de mediadores locales, en su mayor parte no relacionados con las alteraciones concomitantes en la presión arterial sistémica. Sin embargo la isquemia esta directamente relacionada con la magnitud de la fuerza que le dio origen y está determinado que contusiones moderadas dan como resultado hiperemia inicial, seguida de un retorno al flujo medular normal.<sup>31</sup> Inmediatamente después del traumatismo medular se observa una caída abrupta de la FC y de la PAM, para en los siguientes 10 minutos incrementarse y posteriormente declinar, ambas, en forma persistente. Esto se debe a que una lesión en SNC en el ámbito medular alto produce alteraciones en la liberación de acetil colina en el atrio<sup>32</sup> e isquemia en el miocardio.<sup>28</sup> El efecto de esta alteración se manifiesta como disminución de la PAM y por ende del flujo sanguíneo medular.<sup>28</sup> Los principales efectos de una presión arterial alterada son reacciones ortostáticas y respuestas hipertensivas a estímulos viscerales.<sup>32</sup>

Existen investigaciones que señalan que la vasculatura de la ME se ve más dañada en la porción craneal en comparación con la caudal al epicentro del traumatismo. Esto trae como consecuencia que el segmento medular más afectado en lo referente a la recuperación del flujo sanguíneo sea el craneal.<sup>33</sup>

La reducción en el flujo sanguíneo medular puede ser consecuencia de otros factores:

- 1) A coagulación intravascular por la presencia de fibrina o trombina plaquetaria. El daño mecánico directo provoca espasmo vascular local con estásis de los factores mencionados.

- 2) Obstrucción por procesos endoteliales, que incluyen pequeñas rupturas en las paredes capilares, vacuolización y edema de las mismas. También se presenta adherencia y agregación plaquetaria.
- 3) Cierre del sistema capilar por edema vaso génico secundario al incremento en la presión del fluido intersticial. El incremento en la permeabilidad es más obvio en la parte central y disminuye hacia la periferia del segmento medular afectado.
- 4) Vaso espasmo inducido por agentes vaso activos<sup>28</sup>

Aparte del traumatismo, la causa de la reducción en el flujo sanguíneo del área afectada de la ME, implica a aminas vasoactivas, prostaglandinas, eicosanoides, neuropéptidos, aminoácidos excitatorios, opioides endógenos, radicales de oxígeno y alteración en el balance de ON (vasodilatador) y endotelina (vasoconstrictor).<sup>34, 35, 36</sup>

Se cree que la acción de los opioides endógenos (beta endorfina y dinorfina) que se liberan después de un traumatismo a la ME, incrementa la isquemia al provocar hipotensión sistémica;<sup>36, 37</sup> al igual que la disminución de la actividad simpática y predominio de la actividad parasimpática.<sup>34</sup> El  $Ca^{2+}$  también tiene efecto en mantener el flujo sanguíneo deprimido ya que su incremento intracelular ocasiona espasmo del músculo liso y favorece la formación de prostaglandina F<sub>2</sub> alfa y tromboxano A<sub>2</sub>.<sup>28</sup> En este caso la fosfolipasa A<sub>2</sub> se activa al haber daño directo de las membranas citoplasmáticas durante el traumatismo y al ingresar  $Ca^{2+}$  al citosol, desencadena la cascada del ácido araquidónico con sus dos vías (ciclooxigenasa y lipooxigenasa) produciéndose la prostaglandina y el tromboxano ya mencionados, además prostaciclina y leucotrienos que en conjunto provocan edema y vasoconstricción.<sup>37</sup>

A pesar de la investigación exhaustiva que se ha hecho del evento, los mecanismos responsables de la iniciación y propagación del daño secundario aún se mantienen en el grado de hipótesis.<sup>4, 36</sup> Evidencia reciente indica que el iniciador

del evento autodestructivo es la deformación mecánica de cualquier tipo (impacto o compresión) en donde los sitios de afectación primaria son las membranas celulares y subcelulares de la glía, de las neuronas y de las células endoteliales vasculares.<sup>4, 28</sup>

Los cambios patológicos que ocurren en la ME traumatizada debido a la isquemia, además de la disminución de la tensión de oxígeno y por ende acidosis láctica son: petequias que progresan a necrosis hemorrágica, la LP, la hidroxilación lipídica con la subsiguiente formación de prostaglandinas y leucotrienos (eicosanoides), la pérdida de iones de  $\text{Ca}^+$  del espacio extracelular y de iones  $\text{K}^+$  del espacio intracelular,<sup>4, 19, 28</sup> finalmente la inflamación y neuronofagia por polimorfo nucleares.<sup>4</sup> Estos cambios se deben principalmente a la liberación de sustancias vasoactivas y a la generación de radicales libres que se producen en mayor cantidad mientras más dure la isquemia.<sup>4</sup> Además se ha determinado que la acidosis desencadenada por el fenómeno isquémico favorece la muerte neuronal por mecanismos como: disminución de la capacidad antioxidante del glutatión, permitiendo así que el peróxido de hidrógeno incremente su toxicidad y acelerando la producción de hidroxilo a través de la reacción de Fenton, al incrementarse los niveles de hierro libres dentro de la célula.<sup>38</sup>

La secuencia de la alteración patológica posterior al traumatismo de la ME ha sido estudiada por gran cantidad de investigadores; dentro de los cinco minutos iniciales las vénulas postcapilares se congestionan, esto es seguido por la apertura de las uniones endoteliales aquí y en el ámbito de los capilares, dando como resultado la diapédesis de glóbulos rojos y la extravasación de proteínas y electrolitos a través de la vasculatura dañada.<sup>4</sup> Como consecuencia de estos cambios y en respuesta al evento traumático, las células de la sustancia gris y muchos axones de la sustancia blanca pierden el control de la regulación iónica y osmótica. Debido a esto se inicia un intenso movimiento iónico determinado por gradientes de concentración y de carga con las alteraciones de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y

$K^+$ , al verse alterado este gradiente iónico, la conducción de impulsos nerviosos cesa rápidamente y se favorece la formación de edema.<sup>35, 36</sup>

### **Fase de excitotoxicidad**

La hemorragia originada de la ruptura de vasos, la isquemia y el edema, ocasiona que los nutrientes y el oxígeno no lleguen normalmente a las células y debido a esto, se produzca su muerte. Mientras tanto los vasos, las células dañadas y los axones liberan sustancias que afectan a las células vecinas intactas. Un componente de este proceso, que dispara fenómenos altamente destructivos es conocido como excitotoxicidad. Esta fase de la lesión secundaria está mediada por aminoácidos que actúan como neurotransmisores.<sup>39</sup> Los aminoácidos excitatorios como el ácido glutámico, el aspártico y el quinolínico, contribuyen al daño neuronal secundario.<sup>6, 28, 35</sup> Estos aminoácidos tienen amplia distribución en el SN y en condiciones normales se encuentran almacenados en las neuronas para ser utilizados como neurotransmisores;<sup>40</sup> al ser liberados en grandes cantidades durante el traumatismo espinal provocan daño en minutos, horas o días.<sup>41, 42, 43</sup> El efecto tóxico de los aminoácidos mencionados se conoce como excitotoxicidad.<sup>35,</sup>  
39

Debido a que el  $Ca^{2+}$  alterado en su concentración regula mucho de los procesos que determinan la citodestrucción, es conveniente enfatizar su función en las células nerviosas. El  $Ca^{2+}$  actúa como un segundo mensajero intracelular que regula una gran cantidad de funciones, debido a esto las neuronas deben mantener un control estrecho del  $Ca^{2+}$  para que las mínimas variaciones en su concentración deriven en una respuesta fisiológica adecuada. La entrada de  $Ca^{2+}$  ocurre a través de canales iónicos que se clasifican de acuerdo a su selectividad específica para cierto tipo de iones ( $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ , o  $Cl^-$ ) y por sus mecanismos de acción; algunos canales son sensibles al voltaje de la membrana, mientras que otros lo son a ligandos específicos. Los canales sensibles a ligandos que permiten

la entrada de calcio, incluyen a los canales NMDA, y a los AMPA/kainato.<sup>44, 45</sup> Los receptores NMDA son de vital importancia en el fenómeno de excitotoxicidad ya que actúan en forma activa e importante en la muerte neuronal dependiente de las alteraciones del  $\text{Ca}^{2+}$ . En forma normal cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  entra a la célula, es neutralizado por proteínas citoplasmáticas como la calmodulina, la calbindina y la parvalbúmina. Aproximadamente el 95-99% del  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a la célula es neutralizado de ésta forma.<sup>46, 47</sup> El mecanismo de acción de estas proteínas neutralizadoras del  $\text{Ca}^{2+}$  está poco entendido; sin embargo actúan de tal manera que mantienen al  $\text{Ca}^{2+}$  en áreas específicas dentro de la célula, disipando así los gradientes altos. Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  excede la capacidad neutralizadora, este puede ser secuestrado en el interior de organelos, como el retículo endoplásmico liso, las mitocondrias o las vesículas sinápticas.<sup>48, 49</sup> Estos organelos pueden almacenar grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  bajo una gran variedad de condiciones, empleando la transportación activa y pasiva, sin embargo este mecanismo de neutralización es incapaz de modular cambios rápidos en el gradiente del  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>50</sup> Debido a que existe un gran gradiente extracelular-intracelular, y una fuerza eléctrica que impulsa al  $\text{Ca}^{2+}$  positivamente cargado hacia la parte interna de la membrana negativamente cargada, la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula, es un evento dependiente de energía. Las neuronas tienen por lo menos dos mecanismos de extrusión del  $\text{Ca}^{2+}$ , una bomba dependiente del adenosin trifosfato (ATP) y un mecanismo de intercambio  $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ .<sup>45, 51, 52</sup> Se gasta una molécula de ATP por cada ión de  $\text{Ca}^{2+}$  expulsado del interior de la célula.<sup>45</sup> Las concentraciones subcelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la neurona pueden diferir y están determinadas por su tipo, vía de entrada, proteínas neutralizadoras, mecanismos de almacenaje y por la forma en la que el  $\text{Ca}^{2+}$  es expulsado de la célula.<sup>46, 53, 54</sup> Los cinco mecanismos anteriores controlan la difusión del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y está aceptado que en las situaciones en las que la neurona experimenta incrementos incontrolados de  $\text{Ca}^{2+}$  se produce la

muerte celular. El hecho de que el  $\text{Ca}^{2+}$  dispare mecanismos de neurotoxicidad y cuales son estos mecanismos, se mantiene en controversia.

Existe evidencia que indica que en el SN de los mamíferos, la sobresaturación de  $\text{Ca}^{2+}$  celular está íntimamente relacionada con la muerte neuronal secundaria a un evento traumático/isquémico.<sup>55</sup> Diferentes estudios en animales también apoyan la asociación entre el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y el daño al tejido nervioso. Después de traumatizar la ME de ratas, se observa una disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular,<sup>56, 57</sup> en otras investigaciones se apreció una acumulación significativa del ión en la materia blanca axonal, posiblemente como consecuencia de la anoxia/isquemia de la materia blanca.<sup>58, 59</sup> A pesar de estudios como los mencionados, los mecanismos bajo los cuales el  $\text{Ca}^{2+}$  dispara la muerte celular están poco definidos debido a que virtualmente todos los procesos celulares dependientes del  $\text{Ca}^{2+}$  están implicados en algún momento. Por ejemplo, la acción neurotóxica de la sobresaturación del  $\text{Ca}^{2+}$  se ha descrito por la sobre estimulación de enzimas como las fosfolipasas, plasmalogenasa, calpains, y otras proteasas, proteína cinasa, guanilato ciclasa, sintasa del ON, calcineurina y endonucleasas. Probablemente la sobre estimulación de estas enzimas de origen a subproductos de reacciones tóxicas como los radicales libres, a alteraciones letales en el cito esqueleto o a la activación de señales a nivel del DNA que provoquen la muerte celular.<sup>60, 61</sup>

La acción del glutamato es de vital importancia en el evento de la citotoxicidad. El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante y actúa sobre una gran cantidad de receptores de membrana.<sup>62, 63</sup> Basados en estudios farmacológicos, electrofisiológicos y bioquímicos los receptores de glutamato se clasifican como ionotrópicos y metabotrópicos.<sup>62, 64, 65</sup> Los ionotrópicos se subdividen en receptores NMDA y receptores AMPA/kainato de acuerdo a su agonista. Estos receptores son permeables a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , la permeabilidad varía de acuerdo al tipo de receptor. Recientemente se han hecho descubrimientos que demuestran la existencia de

muchos subtipos en cada familia de receptores. La consecuencia funcional de esta diversidad no está completamente entendida y se mantiene bajo investigación.<sup>65</sup>

El papel del glutamato como neurotóxico se determinó antes de observar que la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular era crítica para desarrollar la neurotoxicidad. Sobre la base de esto se acuñó el término de excitotoxicidad, en donde se indicaba que en los procesos donde existía liberación excesiva de aminoácidos excitatorios se producía neurotoxicidad.<sup>63, 66</sup> Posteriormente se descubrió que no eran necesarias grandes cantidades de aminoácidos para producir la neurotoxicidad y que es el  $\text{Ca}^{2+}$  el componente predominante en este fenómeno.<sup>63, 67</sup>

La falla en la energía celular a partir del traumatismo o de un fenómeno de hipoxia/isquemia tiene como resultado la sobresaturación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través de mecanismos que incluyen al incremento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , disminución en la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  y alteraciones en la neutralización y almacenaje del mismo.<sup>40</sup>

La isquemia disminuye el ATP disponible, lo que ocasiona la reducción de los potenciales de membrana (despolarización), lo que favorece la liberación de glutamato en grandes cantidades. La liberación incontrolada de glutamato resulta en una espiral viciosa, donde el glutamato extracelular activa a los receptores de glutamato que a su vez favorecen mayor liberación del mismo.<sup>69</sup> El glutamato actúa sobre receptores NMDA provocando la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y salida de  $\text{K}^+$ , lo que incrementa la despolarización de membranas celulares con activación secundaria de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y activando segundos mensajeros que liberan más  $\text{Ca}^{2+}$  de almacenes intracelulares, por medio de mecanismos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y de cafeína. El exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  actúa transformando la enzima Xantina deshidrogenasa a Xantina oxidasa, lo que favorece la producción de oxirradicales y activa las isoformas de la sintasa del ON (SON) dependientes del  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>5, 68</sup> La despolarización de la membrana mediada por el glutamato permite la entrada de  $\text{Na}^+$ , lo que activa a la bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa, lo que finalmente deprime el ATP

intracelular.<sup>69</sup> El ácido quinolínico es una neurotoxina endógena derivada del triptofano con acción mediada por la excesiva activación de receptores glutamérgicos NMDA y puede producirse en las células inflamatorias infiltradas en la zona de lesión.<sup>35, 36</sup> La neurotoxicidad del ácido quinolínico provoca aumento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma, disminuye el ATP y GABA, aumentando la LP y daño oxidativo. La LP resultante es consecuencia de la combinación del ácido quinolínico con el hierro.<sup>28, 41</sup> Durante el curso de la toxicidad mediada por el glutamato, el  $\text{Ca}^{2+}$  se acumula en grandes cantidades dentro de las neuronas, esta acumulación es paralela a los cambios histopatológicos tanto en tiempo como en curso, iniciando con la infiltración del  $\text{Ca}^{2+}$  en el aparato de Golgi (edema), a continuación se afecta el núcleo (desarticulación de la cromatina), posteriormente algunas mitocondrias (edema) y finalmente el citoplasma. A partir de este momento el evento progresa rápidamente a necrosis de la neurona,<sup>40</sup> por mecanismos de lesión que incluyen: fosforilación oxidativa incompleta por inhibición de las funciones mitocondriales, depleción de ATP por activación de ATPasa, activación de proteasas, endonucleasa y fosfolipasas con el consiguiente catabolismo de proteínas y lípidos estructurales. La inhibición del metabolismo celular provoca daño irreversible y muerte celular a través de la degradación de ADN y ARN.<sup>70, 71</sup> Las proteasas neutras activadas por el  $\text{Ca}^{2+}$ , producen proteo lisis masiva de los neurofilamentos, ocasionando la pérdida de soporte estructural, colapso progresivo y fragmentación del axón. Esto ocurre en las primeras horas o días posteriores al traumatismo. Los neurofilamentos constituyen la parte fundamental del cito esqueleto axonal ya que mantienen el calibre y la longitud del axón y participan en el transporte rápido.<sup>43</sup> Las proteasas y fosfolipasas activadas también actúan sobre los componentes de la mielina y pueden en el mismo lapso producir desmielinización completa en el área lesionada. El incremento en la concentración de los aminoácidos ocasionado por el traumatismo en el ámbito de la ME, declina paulatinamente a mayor distancia del epicentro, hasta no detectarse a 5 mm de distancia.<sup>72</sup>

La disminución intracelular del  $Mg^{+}$  iónico es directamente proporcional a la severidad de la lesión y la disminución en su concentración altera actividades enzimáticas, disminuye la producción de energía y la síntesis de proteínas, además de incrementar la permeabilidad de la membrana celular. La concentración elevada de  $K^{+}$  en el espacio extracelular altera la conducción nerviosa y contribuye a la destrucción neuronal favoreciendo la liberación excesiva de aminoácidos excitatorios.<sup>71</sup>

Aunque el ON es un candidato para ocasionar muerte neuronal no excitotóxica, esta íntimamente relacionado con esta fase del daño secundario, ya que su activación en cantidades patológicas esta relacionada con el flujo de  $Ca^{2+}$  al interior de la célula.<sup>1</sup> El ON es un radical diatómico libre en forma de gas que actúa como neurotransmisor y vasodilatador,<sup>73, 74, 75</sup> también esta involucrado en procesos infecciosos ya que habilita a los macrófagos para destruir bacterias, hongos y células tumorales.<sup>76</sup> El ON tiene una gran variedad de funciones en diferentes tejidos que incluye al endotelio vascular, a las células inmunes, neuronas, músculo liso y músculo cardíaco.<sup>77</sup> La regulación biosintética es más importante para el ON que para otros neurotransmisores ya que a diferencia de ellos, el ON no se almacena en vesículas y solo se sintetiza de acuerdo a la demanda. Además no puede ser inactivado por mecanismos regulatorios convencionales después de su liberación.<sup>76</sup> Se genera por la excitación de receptores NMDA por el glutamato que promueve la entrada de  $Ca^{2+}$  que se une a la calmodulina y activa a la enzima SON. Este proceso se efectúa en cuestión de segundos.<sup>74, 76</sup> Su liberación se lleva a cabo por difusión. La SON es una de las enzimas más reguladas en bioeconomía y esta presente sólo en un porcentaje de neuronas denominadas diaforasa que son relativamente resistentes a los procesos de oxidación. Para producir el ON, la SON oxida al grupo guanidina de la L-arginina, lo que origina al ON y en forma paralela a la L-citrulina. Actualmente se conocen tres isoformas de SON: la SON constitutiva (SONn, SON1) que puede ser neuronal, (en algunas neuronas) y la endotelial (SONe, SON3) que se encuentra

en células endoteliales), y la SON inducible (SONi, SON2) que esta en macrófagos, astrocitos y células endoteliales.<sup>76, 78, 79</sup> La actividad de la SON constitutiva es  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente, mientras que la inducible es  $\text{Ca}^{2+}$  independiente. Es necesario hacer notar que el ON producido por SONn y SONi ha demostrado en estudios *in vitro* y *in vivo* provocar daño celular, mientras que el ON producido por la SONE por su acción vasodilatadora tiene efectos neuroprotectores.<sup>80</sup> Aunque el ON participa en la transmisión sináptica normal, cuando el glutamato actúa sobre los receptores NMDA en respuesta a isquemia, está involucrado en la formación de oxiradicales, estrés oxidativo, procesos de apoptosis y es capaz de potencializar el daño oxidativo mediado por el ácido quinolínico.<sup>42, 81</sup>

El ON afecta a la proteína-quinasa, a la fosfodiesterasa, la ADP ribosilciclase y ciclooxigenasas; su acción neurotóxica no es producida directamente por la molécula de ON ya que esta reacciona con el radical súper óxido formando peroxinitrito, un potente oxidante con potencial citotóxico *per se* que forma residuos nitritotirosina que son más tóxicos;<sup>82, 83, 84, 85</sup> y que actúan directamente oxidando a los grupos sulfhidrilo, a los lípidos, DNA y proteínas.<sup>86</sup> La extensión de la reacción que da origen al peroxinitrito puede ser moderada por la presencia de quelantes endógenos de radicales libres como la SOD, la cual compite con el ON por los radicales súper óxido. De hecho el ON es la única molécula biológica producida en cantidades suficientes para competir con la SOD por el súper óxido.<sup>87</sup> El ON también se une a la ferritina liberando hierro que entra a la reacción de Haber-Weiss para formar radicales hidroxilo y reaccionar así con metales y producir el ión nitronium que es altamente tóxico. El ON exhibe su neurotoxicidad a través de la transmisión sináptica con la participación directa en la enzima guanidil ciclase.<sup>92, 82,</sup>

<sup>83</sup> La producción de ON se incrementa rápidamente después de que ha iniciado la isquemia focal y se mantiene así por más de 60 minutos, alcanzando su máximo a las 24-48 horas. Se ha observado que la potencialización del ON no solo es en la fase temprana de la isquemia severa, sino también en la isquemia moderada y aún en la oligoemia. Dado que el ON regula el flujo sanguíneo del SNC bajo condiciones fisiológicas, su respuesta en la etapa temprana de la isquemia debe

obedecer a una respuesta protectora para incrementar el flujo sanguíneo.<sup>85</sup> El ON puede favorecer el flujo sanguíneo a través de inhibir la agregación y la adhesión plaquetaria.<sup>76</sup> En algunos trabajos se atribuye al ON efecto neuroprotector al disminuir la excitotoxicidad por medio de la nitrosilación de las proteínas de los receptores NMDA, disminuyendo así la entrada de calcio al interior de la célula.<sup>89, 90</sup> Otras investigaciones han permitido determinar efectos retardados de la neurotoxicidad mediada por los receptores NMDA, en donde el ON juega un papel importante dependiendo de la SON que le dé origen. Así el ON formado por la SON constitutiva (neuronal), tiene efecto protector contra el daño celular resultado de la isquemia-reperfusión posterior a traumatismo de la médula espinal, incluso aparentemente inhibiendo la apoptosis,<sup>91</sup> mientras que el ON originado por la SON inducible (macrófagos) tiene efecto neurotóxico principalmente en la fase subaguda del traumatismo.<sup>70</sup> En otras publicaciones se menciona que la toxicidad del ON esta relacionada íntimamente con la presencia del súper óxido, y que dicha toxicidad puede dar como resultado necrosis neuronal o un estímulo apoptótico.<sup>88</sup> Se sugiere que el ON generado por SON inducible, principalmente por macrófagos y/o células peri vasculares, tiene un papel significativo en la eliminación de células dañadas de la zona afectada, al estimular la apoptosis de las mismas.<sup>80, 92</sup>

### **Fase de estrés oxidativo**

En forma casi simultanea a la excitotoxicidad se produce una abundante producción de radicales libres en la zona de lesión, originados inicialmente por la respiración mitocondrial y durante la reperfusión, espontánea o inducida ya que ésta provee  $O^2$  como sustrato para una gran cantidad de reacciones oxidativas enzimáticas.<sup>80</sup> El SNC es particularmente susceptible al daño inducido por radicales libres por varias razones: Los lípidos de membrana son ricos en colesterol y ácidos grasos poli-insaturados, que son blanco de compuestos activos de  $O^2$ .<sup>36</sup> La presencia de gran cantidad de hierro en el tejido nervioso y su liberación a través de la hemorragia que se desarrolla durante el evento traumático

tiene varias implicaciones: A través de la reacción Haber-Weiss se transforman radicales súper óxido ( $\cdot\text{O}^{2-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a radicales de hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) que son mucho más dañinos. La unión del  $\cdot\text{O}^{2-}$  con la dopamina determina la apoptosis del tejido nervioso y cuando se une con el ON fomenta la LP mediada por radicales, además de incrementar la neurotoxicidad del ácido quinolínico.<sup>28, 35, 36</sup> El ácido ascórbico se encuentra en altas concentraciones tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris. Cuando se presenta solo y en altas concentraciones cumple una función antioxidante, mientras que en presencia del hierro y del cobre liberados por la extravasación de sangre después del traumatismo, el ácido ascórbico se convierte en un potente oxidante y produce grandes cantidades de radicales libres.<sup>93</sup> Las neuronas contienen gran número de lisosomas, cuyas membranas son dañadas por los radicales libres, dando por resultado la liberación de enzimas hidrolíticas dentro del citoplasma de las propias neuronas.<sup>94</sup>

La isquemia focal medular produce los cambios que se han mencionado con anterioridad, la reoxigenación que se da en la reperfusión espontánea o trombótica, provee  $\text{O}^2$  como sustrato de numerosas oxidaciones enzimáticas en el citosol, en organelos subcelulares y en mitocondrias. Se conoce que muchas enzimas prooxidantes y antioxidantes participan en el estrés oxidativo inducido por el traumatismo al SNC. Con base en sus productos oxidantes, las enzimas prooxidantes se pueden clasificar en tres clases: (1) SON; (2) cicloxigenasas, xantina deshidrogenasa, xantina oxidasa y NADPH oxidasa; y (3) mieloperoxidasa y monoamino oxidasa.<sup>80</sup> Actualmente se sabe que la oxidación no solo afecta a los lípidos estructurales, también las proteínas y el DNA se ven afectados por las especies reactivas de oxígeno.<sup>80, 95, 96</sup>

Los oxiradicales por definición contienen un electrón impar asociado a un átomo de oxígeno. Su formación conforma una interrelación entre cada uno de ellos, el  $\cdot\text{O}^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el  $\cdot\text{OH}$  (**Figura 1**) son señalados como la principal causa de la LP de la ME en la isquemia-reperfusión, sin embargo también se pueden incluir otros como:

Radicales peroxil ( $\text{RO}_2^\cdot$ ), radicales libres de lípidos polinsaturados ( $\text{RO}^\cdot$ ), hidroperóxidos lipídicos ( $\text{RO}_2\text{H}$ ), radicales alcoxil ( $^\cdot\text{OR}$ ) y los singuletes de oxígeno ( $^1\text{O}_2$ ).

Aunque no se le reconoce normalmente como tal, el  $\text{O}^2$  molecular es en sí un radical, o mejor dicho un diradical, ya que contiene dos electrones impares, separados en un orbital electrónico ( $^\cdot\text{O}-\text{O}^\cdot$ ) con dirección similar. Por lo tanto el  $\text{O}^2$  es un agente oxidante. Cuando el  $\text{O}^2$  acepta un electrón se convierte en el radical  $^\cdot\text{O}^{2-}$ .<sup>97, 98</sup> El  $^\cdot\text{O}^{2-}$  se forma principalmente en la mitocondria durante la respiración, aproximadamente el 3% del  $\text{O}^2$  consumido es parcialmente reducido a  $^\cdot\text{O}^{2-}$ ; Otra fuente de  $^\cdot\text{O}^{2-}$  es el metabolismo del ácido araquidónico por la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa en presencia de NADH o NADPH; también la producción de oxidasas en leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y B-linfocitos. Otras formas de producción incluyen a la auto-oxidación de la cistina y de las catecolaminas.<sup>69, 97</sup>

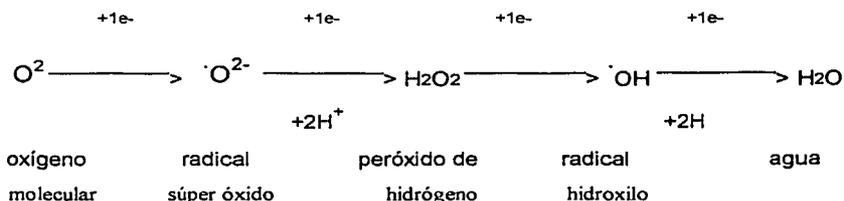


Figura 1.- Reducción secuencial del oxígeno molecular por medio de la transferencia de un electrón.

Aunque es un antioxidante débil el  $^\cdot\text{O}^{2-}$  reacciona con los tioles y des-esterifica a los lípidos de la membrana, permitiendo la liberación de ácido araquidónico y así iniciar una cascada metabólica de araquidonato para formar finalmente más  $^\cdot\text{O}^{2-}$

Este puede interactuar con el ON y dar origen a un radical mucho más fuerte, el peroxinitrito.<sup>69, 99</sup> El  $\cdot\text{O}^{2-}$  puede dismutarse, formando  $\text{H}_2\text{O}_2$  y oxígeno singlete. El  $\text{O}^{2-}$  puede liberar el hierro que está almacenado en la neurona al reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  (almacenado) a  $\text{Fe}^{2+}$ . Normalmente el hierro libre es secuestrado rápidamente por la ferritina, pero en un medio ácido, el  $\cdot\text{O}^{2-}$ , al protonarse se convierte en el radical peroxil que puede reducir a la ferritina unida a  $\text{Fe}^{3+}$  y liberar  $\text{Fe}^{2+}$ .<sup>38, 69, 97</sup>

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es el resultado de la transferencia de 2 electrones al oxígeno y es una especie no radical, sin embargo se le considera como tal por que su química y su patología como radical existe, ya que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una agente oxidante y aún más, da origen otros oxiradicales.<sup>97, 98, 100</sup> La mayor fuente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es la dismutación del  $\cdot\text{O}^{2-}$ , sin embargo también se puede originar a partir de los peroxisomas y organelos que contengan oxidoreductasas, incluyendo a la D-aminoácido oxidasa y oxidasa de la acetilCoA. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es relativamente no reactivo y puede difundir cierta distancia antes de interactuar con otro compuesto, sin embargo en la presencia de elementos de transición como el  $\text{Fe}^{2+}$  o el  $\text{Cu}^+$  y por medio de la reacción de Fenton puede convertirse en el  $\cdot\text{OH}$ , que es el oxidante más potente formado por los sistemas biológicos.<sup>72, 96, 97, 101</sup>

El OH se origina cuando el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se reduce por la transferencia de un electrón a un metal reducido como puede ser el  $\text{Fe}^{2+}$  o el  $\text{Cu}^+$ . Esto es lo que se describe como la ecuación de Fenton. (Figura 2)

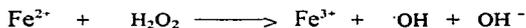
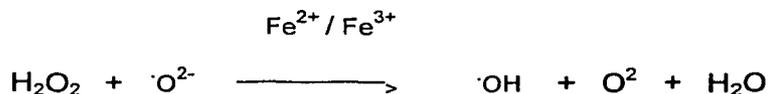


Figura 2.- Reacción de Fenton

En la mayoría de los tejidos, la poca concentración de estos metales limita la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  y por lo tanto la producción de  $\cdot\text{OH}$  esta controlada. Sin embargo el tejido nervioso es rico en  $\text{Fe}^{2+}$  y más aún la alta disponibilidad debido

a la hemorragia permite gran formación de  $\cdot\text{OH}$ . Por otro lado los agentes tisulares reducidos pueden reciclar el  $\text{Fe}^{2+}$  a partir de su estado férrico y convertirlo en ferroso y así incrementar la formación de  $\cdot\text{OH}$ . El ascorbato juega un papel de suma importancia en esta etapa al transferir electrones al centro férrico dando como resultado la formación de un nuevo oxiradical llamado radical monodihidroascorbil ( $\cdot\text{AH}$ ). Para cerrar el círculo, donde el  $\cdot\text{O}^{2-}$  favorece la formación de  $\cdot\text{OH}$  se produce una reacción de dos pasos llamada reacción de Haber-Weiss, en donde el  $\text{OH}$  se produce de forma tradicional por la reacción de Fenton, pero el  $\text{Fe}^{2+}$  es reducido por el  $\cdot\text{O}^{2-}$ . En esta secuencia el reciclamiento del metal mantiene una cadena de auto-catalización.<sup>69, 97, 98</sup> (Fig. 3)



### Figura 3. Reacción de Haber-Weiss

La activación de neutrófilos y macrófagos produce gran cantidad de especies reactivas de  $\text{O}^2$  y así contribuyen al estrés oxidativo. Los neutrófilos se localizan en forma predominante en las regiones necróticas de la médula afectada, alcanzando su mayor concentración a las 24 horas del traumatismo, su mayor actividad en cuanto a localización esta establecida a 4 mm craneal y caudal al epicentro del traumatismo. Los macrófagos tienen su mayor número a las 48 horas, encontrándose predominantemente en la materia gris y en el funículo dorsal de la materia blanca. El número de macrófagos declina paulatinamente hasta 6 mm craneal y caudal al foco del daño medular. Se ha encontrado que el número de macrófagos presente está íntimamente relacionado con la cantidad de tejido dañado.<sup>38</sup>

La acidosis que se presenta en forma secundaria al proceso isquémico incrementa en forma importante la toxicidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que provoca muerte neuronal. Esta toxicidad esta mediada principalmente por la inactivación del GLU por el pH ácido, que en conjunto con un mayor sustrato de Fe<sup>2</sup> favorece y acelera la producción de ·OH a través de la reacción de Fenton.<sup>38</sup>

Tanto en lesiones medulares como cerebrales se ha demostrado incremento en la producción de malondialdehído (producto dela LP). En ambas lesiones se ha demostrado oxidación del colesterol extraíble y consumo de los principales antioxidantes (ácido ascórbico y alfa tocoferol) así como inhibición de la actividad de la ATPasa sodio-potasio dependiente, siendo ésta una de las manifestaciones de la LP.<sup>35</sup>

La LP se ha definido como el deterioro oxidativo de los lípidos poliinsaturados de las membranas celulares, a consecuencia de la producción de oxiradicales durante la isquemia-reperfusión. Debido a que el tejido nervioso es rico en ácidos grasos poliinsaturados es muy susceptible a la LP. Los oxiradicales extraen átomos de hidrógeno de los ácidos grasos produciendo radicales alquil-lipídicos que reaccionan en cadena con las moléculas de fosfolípidos adyacentes, formando radicales peroxil lipídicos, radicales alcocil lipídicos e hidroxiperoxidasas lipídicas. Estos provocan una mala alineación de las cadenas de fosfolípidos con pérdida de la integridad de la membrana celular y alteración en los gradientes iónicos de membrana, con activación de sistemas enzimáticos dependientes de Ca<sup>2+</sup>, mayor producción de oxiradicales, ON, etc.<sup>4, 35, 94</sup>

Después de los primeros treinta minutos aparecen hemorragias microscópicas en la materia gris que coalescen en las horas siguientes (necrosis hemorrágica). La vacuolización se desarrolla dentro de las células endoteliales y es indicativa de un profundo daño isquémico e hipóxico, lo que desencadena la necrosis coagulativa de la población neuronal. La materia blanca adyacente se ve relativamente menos afectada, sin embargo se observa edema y retracción periaxonal. Estos eventos

pueden llevar a la autodisolución de la ME en las siguientes 24 horas, aún sin la presencia de compresión<sup>4, 35, 94</sup>

Un hallazgo especial del daño medular es la mielomalacia hemorrágica progresiva, esta patología ocurre posterior al traumatismo y parece ser una progresión de la necrosis hemorrágica central y el edema hacia áreas de la ME no incluidas en la zona del traumatismo.<sup>4, 41</sup>

En contraste con la compresión aguda, la presentación crónica afecta más severamente a la sustancia blanca. La hemorragia y el edema no son significativos en este tipo de compresión. Las lesiones características son: degeneración de la mielina, áreas focales de malasia, vacuolización y pérdida de la sustancia blanca axonal.<sup>4, 28</sup>

Los organismos vivos han desarrollado una gran cantidad de mecanismos para protegerse de la acción de los oxidantes, ya que esta agresión es constante. Entre los sistemas enzimáticos encontramos dos formas de SOD, la de cobre-zinc que se localiza en el citosol y la de manganeso que se ubica en la mitocondria, así como una isoforma extracelular. Esta enzima juega un papel muy importante al dismutar al  $\cdot O^{2-}$  y convertirlo en  $H_2O_2$  y  $H_2O$ . Las enzimas glutatión peroxidasa y la reductasa, participan al eliminar al  $H_2O_2$ , al igual que la CAT; sin embargo la actividad de estas enzimas es limitada en parte por su localización en organelos subcelulares, y a su respuesta tardía (CAT y GLU) o nulo incremento (SOD). No se conoce enzima alguna que elimine al  $\cdot OH$ .<sup>97</sup>

## **JUSTIFICACIÓN**

A pesar de los avances en el tratamiento del traumatismo agudo de la ME sus secuelas se mantienen como un problema por resolver, por lo que este trabajo pretende ser punto de partida para una nueva propuesta terapéutica.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del aporte extrínseco de ON en variables cardiovasculares y su acción solo o en combinación con AOX en la LP de la ME sometida a traumatismo.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1.-Evaluar el efecto del ISO y de la ARG sobre la PAM y la FC en ratas sometidas a traumatismo de la ME.
- 2- Evaluar el efecto del ISO y de la ARG, solos o combinados con diferentes AOX sobre la LP, en ME sometida a traumatismo.
- 3.- Evaluar el efecto de diferentes AOX sobre la LP, en ME sometida a traumatismo.

## **HIPOTESIS**

- 1.- La administración de diferentes dosis de ISO y ARG producirán baja en la FC y en la PAM en ratas sometidas a traumatismo de la ME.
- 2.- La administración de ISO y de la ARG incrementará el estrés oxidativo y en consecuencia un aumento de la LP, en la ME sometida a traumatismo.
- 3.- La administración de ISO y ARG en combinación con AOX (SOD, CAT y GSHE) dará como resultado una disminución moderada en el estrés oxidativo y por lo tanto menor LP en la ME sometida a traumatismo.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Diseño experimental**

Se emplearon ratas Long-Evans, machos, de 14 a 16 semanas de edad, mantenidas a temperatura regulada, con libre acceso a agua y alimento; expuestas a un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad, con peso de 250 a 300 g, sanas y sin haber sido sometidas a ningún procedimiento experimental previo. Los animales que se lesionaron, se sometieron a contusión de la ME en la región torácica media (T5-T6), los testigos sin lesión se sometieron únicamente a laminectomía en la misma región. La asignación de los animales para cada grupo se hizo de manera aleatoria.

Inicialmente se determinó la influencia del ISO y de la ARG sobre la PAM y la FC, en ratas sometidas a contusión de la ME. Posteriormente se evaluó el impacto de los donadores / precursores del ON mencionados, así como diversos AOX, solos, combinados, o en conjunto con el ON, sobre la LP posterior a contusión medular.

### **Características de los fármacos empleados**

El donador de ON que se probó fue el ISO, que es un nitrato orgánico éster estable en SS, ampliamente empleado en el tratamiento de alteraciones vasculares. Para liberar el ON el ISO debe de ser metabolizado en hígado.<sup>102</sup> El metabolismo requiere de la reducción del nitrato orgánico seguido de su conversión a nitrosol, esta última ocurre por medio de una variedad de procesos que incluyen la reacción con dihidroflavina y NADH.<sup>103</sup> Se empleó una dosis de ISDN de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}/23 \text{ h}$ , la cual disminuye en aproximadamente en 5% la presión arterial en ratas con lesión medular. El precursor de ON investigado fue la L-arginina, que es un aminoácido que actúa como sustrato de todas las isoformas de la SON conocidas, que es la única enzima que cataliza la oxidación de la L-arginina a ON y L-citrulina.<sup>104</sup> La L-arginina se administro a una dosis total de 100 mg/kg que produce su efecto farmacológico sin disminuir la presión arterial.<sup>105</sup>

Para evitar que el ON (tanto el endógeno, como el producido por el donador o precursor) reaccione con el  $O^{2-}$  y formen  $ONOO^-$ , se empleó el [Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin Chloride] (MnTBAP), un compuesto con actividad similar a la enzima SOD, que administrado parenteralmente reduce la formación de  $ONOO^-$  y entre otras cosas, previene el daño al DNA, la disminución en la respiración mitocondrial y la disminución en los niveles celulares de  $NAD^+$ .<sup>106</sup> Para eliminar el  $H_2O_2$ , se usó la enzima CAT, obtenida de *Aspergillus niger*, por ser una enzima extremadamente estable y de larga duración.<sup>107</sup> Para favorecer la conversión de un ambiente oxidado a reducido se empleó un precursor de la biosíntesis de glutatión reducido (GSH), el gama-glutamilcisteína etil ester, (GSHE), que se transporta al interior de las células incluso más fácilmente que el GSH mismo. Dentro de la célula el GSHE, libera GSH en forma intacta y directa al citosol, al sufrir hidrólisis por las esterasas intracelulares.<sup>108, 109</sup> Además el GSHE es transportado de forma efectiva hacia el líquido cerebroespinal.<sup>110</sup>

Todos los compuestos se obtuvieron de Sigma Chem. Co, exceptuando el MnTBAP de Cayman y la MP de Pharmacia Upjon.

## **CONFORMACIÓN DE GRUPOS**

### **Determinación de efecto sobre las variables cardiacas de los donadores/precursores de ON**

Se forman los siguientes grupos de estudio con n = 3:

#### **Grupos experimentales:**

- 1- ISO 5 µg/kg/min
- 2- ISO 10 µg/kg/min
- 3- ISO 50 µg/kg/min
- 4- ARG 100 mg/kg/ durante 20 min

#### **Grupo testigo:**

- 5- solución salina

### **Determinación de Lipoperoxidación**

Se forman los siguientes grupos de estudio con n = 6:

- 1- lesión + ISO + AOX
- 2- lesión + ARG + AOX
- 3- lesión + ISO
- 4- lesión + ARG
- 5- lesión + SOD
- 6- lesión + CAT
- 7- lesión + GSHE
- 8- lesión + AOX
- 9- lesión sin tratamiento
- 10- lesión + MP (testigo del tratamiento estándar)
- 11- laminectomía, sin lesión, sin tratamiento (testigo normal)

## DOSIFICACIÓN, VÍA E INTERVALOS DE ADMINISTRACIÓN

**Tabla 1. Diseño Experimental para el Estudio de Lipoperoxidación**

Grupo	Abreviación	Dosis total	Bolo e.v.	Infusión e.v.	Ip*
1	ISO	10 µg/k/23h	SS	10µg/k/min 23h	
2	ARG	300 mg/KG	100 mg/k	200 mg/k	
3	SOD	12 mg/k	3 mg/k	9 mg/k	
4	CAT	27,000 U/k	9000 U/k		2 X 9,000 U/k
5	GSHE	12 mg/k	4 mg/k	8mg/k	
6	AOX	SOD + CAT + GSHE como lo anterior	como anterior		
7	ISO/AOX	ISO +SOD +CAT+ GSHE como lo anterior			
8	ARG/AOX	ARG+ SOD+ CAT+ GSHE como lo anterior			
9	MP		30 mg/k	5.4 mg/k/23h	
10	LES		SS	SM	
11	S/L		SS	SM	

Abreviaciones: LES (solo lesión); S/L (sin lesión); SS (solución salina); SM (solución mixta)

\* Intraperitoneal

Para la administración intraperitoneal y bolo endovenoso, los fármacos se reconstituyeron con solución salina fisiológica. Para la infusión continua se aforaron a 10 ml con solución mixta (solución salina y solución glucosada al 5 %)

## **Anestesia y procedimiento quirúrgico**

Para el procedimiento quirúrgico y sacrificio, las ratas se anestesiaron de acuerdo a su peso vía intramuscular, con una mezcla de ketamina (50 mg/kg) y xilasina (9 mg/kg).

Para producir la lesión, se realizó una laminectomía mediante técnica estéril, a nivel T5 - T6 hasta exponer la porción dorsal de la ME manteniendo las meninges intactas. **(figura 4)** Posteriormente la rata se colocó en un equipo de estereotaxia **(figura 5)** y a través de un tubo guía, se dejó caer sobre la ME, un cilindro de acero inoxidable de 15 g, con punta roma de 1.7 mm de diámetro y 1 cm de largo **(figura 6)** de una altura de 6 cm, lo que produjo una lesión con una intensidad de 70 g/cm.<sup>93, 111, 112.</sup> **(figura 7)**

La incisión quirúrgica se suturó por planos. Para la administración de líquidos y fármacos, se cateterizaron una o ambas venas femorales, a través de una disección quirúrgica en la parte proximal media de la zona femoral. Durante las siguientes 24 horas las ratas se mantuvieron dentro de un cilindro de restricción de movimiento a temperatura controlada y se evacuó la vejiga cada 12 horas.

Para determinar la PAM y la FC, se cateterizo la arteria femoral izquierda, conectándose a un transductor de presión. **(figura 8)** Al final de cada procedimiento se suturó la herida quirúrgica en forma convencional.



Figura 4.-Laminectomía a nivel T5 - T6 para exponer la porción dorsal de la ME manteniendo las meninges intactas.



Figura 5.- Rata colocada en un equipo de estereotaxia preparada para el traumatismo medular.



Figura 6.- Cilindro de acero inoxidable de 15 g, con punta roma de 1.7 mm de diámetro y 1 cm. de largo, con el que se produce el traumatismo medular.



Figura 7.- Lesión medular con una intensidad de 70 g/cm., observe el hematoma y la pérdida de las características de la duramadre.



Figura 8.-Para determinar la PAM y la FC, se cateterizo la arteria femoral izquierda de la rata y se conecto a un transductor de presión

## **Influencia de los donadores / precursores de ON sobre la PAM y FC**

La PAM se evaluó por medio de un transductor de presión (Grass FT .03C), conectado a un polígrafo Grass modelo 7D. La FC se derivó electrónicamente a partir del llenado del pulso arterial, por medio de un tacógrafo Grass modelo 7P4F. (figuras 9 y 10)



Figuras 9 y 10.- La PAM se evaluó por medio de un transductor de presión conectado a un polígrafo. La FC se derivó electrónicamente a partir del llenado del pulso arterial, por medio de un tacógrafo.

La temperatura corporal se mantuvo a 37°C. La laminectomía se realizó de la manera descrita anteriormente. La PAM y la FC se estabilizaron y se registraron 30 min. antes y después de la lesión medular. La infusión de los fármacos a investigar se inició a los 30 min. después de provocar el traumatismo medular, por

el método antes descrito. La PAM y la FC se observaron y registraron durante 90 min. Finalmente las ratas se eutanaciaron por sobredosis de anestésico.

Los fármacos investigados fueron: el ISO (5,10 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}.$ ), la ARG (100  $\text{mg}/\text{kg}$  durante 20 min) y vehículo (solución salina). En todos los casos se administró la misma cantidad de líquidos.

### **Determinación de productos de lipoperoxidación**

Los fluidos y los fármacos se administraron, por medio de una bomba de infusión, 20 min. después de la laminectomía (**figura 11**) o de la lesión, a través de la(s) vena(s) cateterizada(s). En algunos casos también se empleó la vía intraperitoneal. (**figura 12**) La infusión se inició con un bolo (1,200  $\mu\text{l}$ ) de solución mixta (sol. fisiológica + sol. glucosada al 5%) durante 40 min., en la que se disolvieron los compuestos correspondientes, o simplemente se infundió como vehículo cuando así correspondía.

Para la infusión de 10 ml de la mezcla de la solución glucosada y fármacos en las siguientes 23 horas la bomba de infusión se programó a una velocidad de .41 ml/h, iniciando inmediatamente después del bolo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

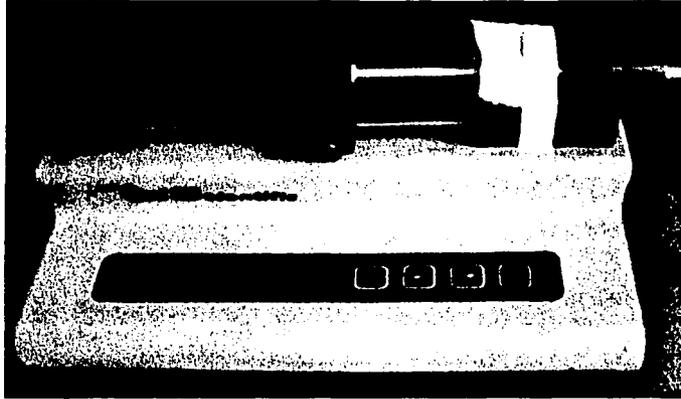


Figura 11.- Los fluidos y los fármacos se administraron, por medio de una bomba de infusión.



Figura 12.-En algunos casos se empleó la vía intraperitoneal.

Las ratas se anestesiaron con éter y perfundieron con solución salina fría, en forma transcardiaca (**figura 13**) 24 h después de la lesión, para eliminar la mayor cantidad posible de sangre de la muestra.



Figura 13.- Las ratas se anestesiaron con éter y perfundieron en forma transcardiaca con solución salina fría.

Posteriormente se amplió la laminectomía para permitir la extracción de un fragmento de 1 cm de longitud de ME con la zona de lesión en el centro. (**figura 14**) Las meninges fueron cuidadosamente retiradas y los especímenes fueron pesados. (**figuras 15 y 16**) El fragmento de ME se homogenizó en 3 ml de solución salina fisiológica (0,9% NaCl) fría, usando un homogenizador de mano (Thomas Scientific®, 3431D). (**figuras 17 y 18**)



Figura 14.- La laminectomía se amplió para permitir la extracción de un fragmento de ME con la zona de lesión en el centro, observe el hematoma.



Figuras 15 y 16.- Las meninges fueron cuidadosamente retiradas y los especímenes fueron pesados.

Se hicieron alícuotas de 1 ml a las que se les agregó 4 ml de una mezcla de cloroformo y metanol (2:1 v/v). La mezcla se agitó en un agitador magnético, se enfrió en hielo durante 30 min. para separar las fases y se retiró el sobrenadante.

(Figuras 17, 18, 19 y 20)



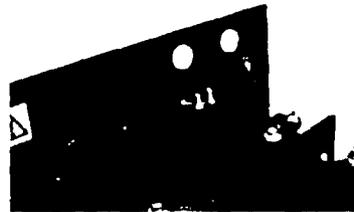
Figuras 17, 18, 19 y 20.- La muestra se homogenizó y se mezcló con la solución cloroformo y metanol (2:1 v/v). Se enfrió en hielo durante 30 min. para separar las fases.

Se tomaron 2 ml de la capa del cloroformo y se aclaró con 0.2 ml de metanol. Las muestras se realizaron por duplicado. (Figuras 21 y 22)



Figuras 21 y 22.- Se tomaron 2 ml de la capa del cloroformo y se aclaró con 0.2 ml de metanol. Las muestras se realizaron por duplicado.

Se determinaron los productos fluorescentes de lípidos solubles como índice de lipoperoxidación de acuerdo a la técnica descrita por Triggs y Wimore en 1984 y modificada por Santamaría.<sup>113</sup> La fluorescencia se midió en un espectrofotómetro luminiscente (Perkin-Elmer LS50B) con longitud de onda de 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. **(Figuras 23 y 24)**



Figuras 23 y 24.- La fluorescencia se midió en un espectrofotómetro Perkin-Elmer LS50B con longitud de onda de 370 nm de excitación y 430 nm de emisión.

La sensibilidad del espectrofotómetro se probó a con una solución estándar de quinina (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) con un valor de 330 unidades de fluorescencia Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia por gramo de tejido.

Se mantuvo una solución stock de .68 ml de ácido sulfúrico, en la cual se aforaba en 100 ml 1  $\mu\text{l}$  de la solución de quinina

### **Análisis Estadístico**

La influencia del ISO y de la ARG sobre la PAM y la FC, en ratas con traumatismo medular agudo se evaluó de acuerdo a la variación de deltas ( $\Delta$ ) de los datos obtenidos a los 30 a lo 90 min. después del traumatismo. Las diferencias se comprobaron por medio de la prueba de Mediciones Repetidas ANOVA seguida de una prueba de Dunnett, para comparar los grupos experimentales vs. el grupo control. Para el análisis estadístico de la LP, se usó el programa de computo SigmaStat for Windows, Ver. 1.0, Copyright 1992-1994 Jandel Co. con una prueba de análisis de varianza [ANOVA] de una vía, seguida de una prueba de Bonferroni para identificar las diferencias entre las medias de los grupos. Una p igual o menor a 0.05 se consideró significativa.

### **CONSIDERACIONES ÉTICAS Y LEGALES**

Para la realización de este estudio se tomaron en cuenta los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigaciones Para la Salud (Título Séptimo: de la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación) <sup>114</sup>

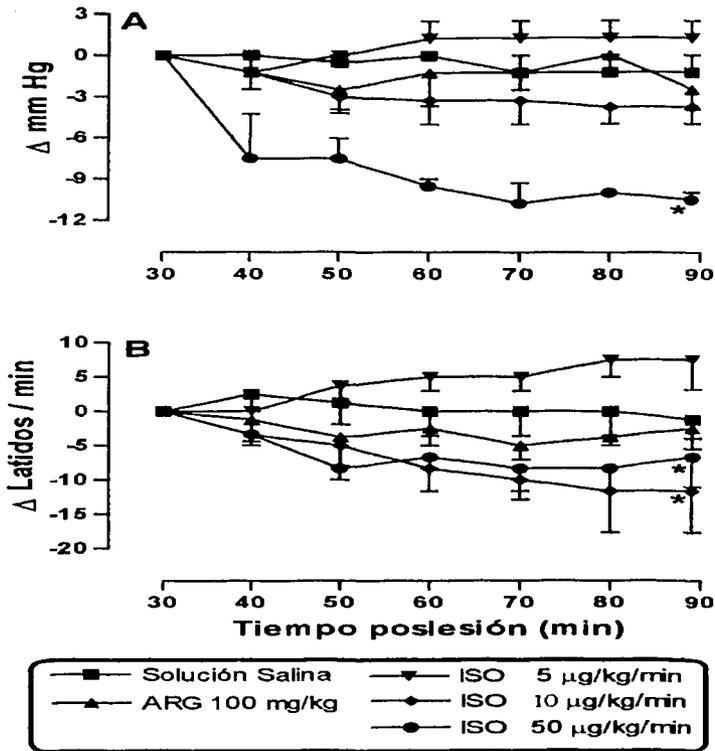
## RESULTADOS

### Cambios en la PAM y FC bajo el efecto de ISDN y L-arginina

Antes del traumatismo a la ME las ratas mostraron una PAM constante  $86.5 \pm 5.8$  (DE) mm Hg, y una FC de  $196.8 \pm 16.2$  (DE) latidos/min. Después del traumatismo las ratas mostraron cambios significativos en ambos parámetros en los 20 min. siguientes, como fue descrito previamente por Bravo et al,<sup>34</sup> y fueron: para PAM de  $84.1 \pm 8.7$  (DE), y para FC de  $183 \pm 20.27$  (DE), y retornaron a los valores basales a los 30 min. postraumatismo. Para comparar con estos valores, las variaciones ( $\Delta$ ) de la PAM y la FC se registraron en ratas a las que se les administró ARG (100mg/Kg) o ISO (5,10 y 50 $\mu$ g/kg/min).

La ARG y las dosis menores de ISO provocaron cambios en la PAM no mayores de 4 mmHg (menos del 5%), mientras que la dosis mayor de ISO produjo una caída de la PAM de 11 mmHg ( $p < 0.05$ ). Con respecto a los cambios en la FC las ratas tratadas con 10 o 50  $\mu$ g/kg/min de ISO mostraron una disminución de alrededor de 18 latidos/min ( $p < 0.05$ ); Todos los otros animales mostraron variaciones no mayores de 10 latidos/min.

Los valores relativos a las variaciones ( $\Delta$ ) de PAM y FC obtenidos en las ratas que recibieron la ARG (100 mg/kg/ml) o ISO (5, 10 ó 50  $\mu$ g/kg/min) están registradas en las (**Figuras 25A y 25B**), respectivamente.



Figuras 25A y 25B.- Hemodinámica en ratas después de la contusión medular y tratamiento con precursores del ON.

La diferencia con respecto a los registros basales a los 30 min postraumatismo ( $\Delta$ ) para la presión arterial media (A) y la frecuencia cardíaca (B) fueron registrados desde el inicio de la administración del dinitrato de isosorbide (ISO) y de la L-arginina (ARG). Los datos expresados como la media +/- de la Desviación Estándar demuestran una diferencia estadística (\*,  $p < 0.05$ )

## Lipoperoxidación

Los AOX que se probaron en este trabajo de investigación demostraron ser efectivos en la disminución de la LP posterior a traumatismo de la ME. Los grupos tratados con CAT, GSHE y mezclados, fueron los más efectivos, manteniendo niveles de LP similares a los obtenidos en el grupo S/L. La LP en los grupos tratados con MP o SOD fue ligeramente mayor que en el grupo S/L aunque sin significancia estadística. El grupo S/L y todos los tratados con AOX solos o combinados, así como el que recibió a la MP fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) al grupo LES. (Figura 26)

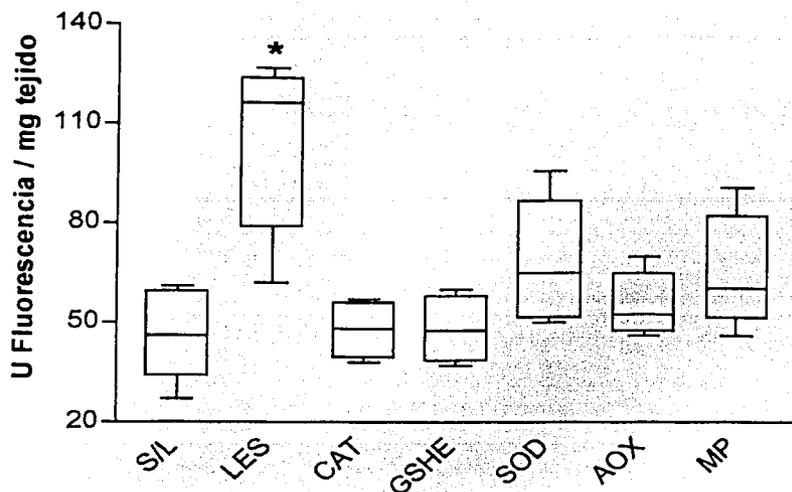


Figura 26.- Lipoperoxidación bajo el empleo de antioxidantes solos o combinados En los grupos sin lesión (LES), lesionadas sin tratamiento (LES), lesionadas más catalasa (CAT), glutatión (GSHE), superóxido dismutasa (SOD), mezcla de antioxidantes (AOX) y metilprednisolona (MP), se apreció que el grupo de LES fue diferente con una significancia de (\*,  $p < 0.05$ )

Los niveles más altos de LP se encontraron en los grupos tratados con ARG e ISO, aunque no alcanzaron diferencia estadísticamente significativa con respecto con el grupo LES. La adición de la combinación de antioxidantes a los donadores / precursores de ON, disminuyó significativamente el proceso de LP ( $p < 0.05$ ) si se compara con los grupos LES, ARG, ISO, sin embargo la LP en el grupo de ARG/AOX se mantuvo significativamente alta ( $p < 0.05$ ) en relación con el grupo S/L y con los diferentes grupos de antioxidantes y con el de MP. No se obtuvo diferencia estadística entre los grupos de ARG/AOX e ISO/AOX. **(Figura 27)**

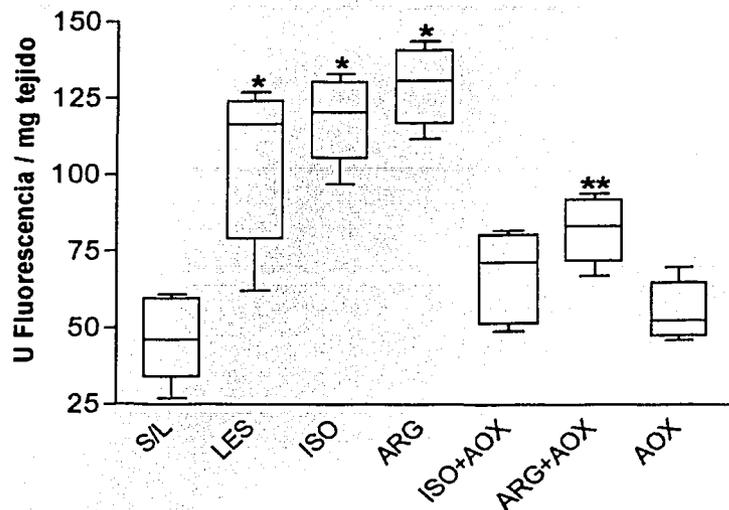


Figura 27.- Lipoperoxidación bajo la administración de precursores de ON solos o combinados con antioxidantes

En los grupos sin lesión (S/L), lesión sin tratamiento (LES), lesionadas y tratadas con dinitrato de sisosorbide (ISO), L- arginina (ARG), ISO + antioxidantes (AOX), ARG + AOX y AOX se observa un diferencia con una significancia estadística de ( $*p \leq 0.05$ ) para S/L, ISO y ARG en comparación con los otros grupos. Para el grupo de ARG + AOX una significancia de ( $*p \leq 0.05$ ) comparado con S/L y AOX

## Discusión

En 1995 se estimaba en los Estados Unidos de América que la incidencia del traumatismo a la ME en humanos era de 30-70 casos por millón de habitantes.<sup>115</sup>

Considerando los devastadores efectos en el individuo afectado y su alto costo socioeconómico, esta es un área fértil para la búsqueda de un tratamiento que reduzca las consecuencias de la lesión medular.<sup>26</sup>

Actualmente no existe tratamiento para el daño primario, pero es posible prevenir o moderar el daño ocasionado por los eventos bioquímicos que se presentan durante el daño secundario. En el presente se ha incrementado el conocimiento de sus mecanismos y se considera que la LP es una de las causas principales muerte celular en los eventos que suceden al traumatismo de la ME.<sup>116</sup>

La disponibilidad de un tratamiento neuroprotector ha permitido darle un giro al cuidado del traumatismo medular agudo. Antes de 1990, las personas con daño medular "completo", superaban en número a las personas con daño medular menor o "incompleto" con una relación de 6:4. Sin embargo para el año 1995, esta relación se había invertido.<sup>117</sup> Es probable que este cambio se deba a que los servicios de emergencia son mejores y más rápidos, pero se debe, sin duda a la mejoría en los fármacos empleados en el tratamiento, por agentes que bloquean o moderan la LP secundaria al traumatismo de la ME.<sup>6</sup>

Actualmente un candidato que se muestra como una promesa en el tratamiento del daño secundario a la ME es el ON, que se identificó inicialmente como un factor relajante derivado del endotelio vascular y <sup>69</sup> ahora se sabe que actúa como

neurotransmisor.<sup>73, 74, 75</sup> El ON se ha investigado principalmente por su efecto neurotóxico en el medio oxidado postraumático, a través de su reacción con el anión  $\cdot\text{O}^{2-}$ , y formar el poderoso oxidante peroxinitrito,<sup>118</sup> de tal manera que se han hecho gran cantidad de estudios para bloquear a la SON y reducir así la producción de ON.<sup>76</sup> La extensión de la reacción que da origen al peroxinitrito puede ser moderada por la presencia de quelantes endógenos de radicales libres como la SOD, la cual compite con el ON por los radicales  $\cdot\text{O}^{2-}$ .<sup>87</sup>

Actualmente se reconoce al ON como un potencial neuroprotector en el daño al tejido nervioso traumatizado, siendo así, se ha empleado en modelos de isquemia cerebral donde se ha encontrado mejoría funcional.<sup>10, 11</sup> Se menciona que los efectos benéficos del ON podrían atribuirse a su efecto vasodilatador,<sup>10</sup> a su posible acción bloqueadora contra el daño celular ocasionado por las especies reactivas del  $\text{O}_2$ ,<sup>119</sup> al bloquear la excitotoxicidad,<sup>84</sup> e inhibir la apoptosis.<sup>91</sup>

El ON producido por SONn y SONi ha demostrado en estudios *in vitro* y *in vivo* provocar daño celular, mientras que el ON producido por la SONE por su acción vasodilatadora tiene efectos neuroprotectores.<sup>80</sup>

La disminución del flujo sanguíneo medular ocurre después del traumatismo a la ME y su restauración es una meta terapéutica importante, ya que la isquemia juega un papel primordial en el daño secundario. Está demostrado que el vaso espasmo, la adherencia plaquetaria, la agregación plaquetaria intra vascular y la oclusión micro vascular están presentes durante este evento.<sup>6</sup> Dado que el ON regula el flujo sanguíneo del SNC bajo condiciones fisiológicas, su respuesta en la etapa

temprana de la isquemia obedece a una respuesta para incrementar el flujo sanguíneo,<sup>85, 88</sup> e inhibir la agregación y la adhesión plaquetaria.<sup>76</sup> Por lo anterior se puede determinar que la administración temprana de donadores de ON posteriores al traumatismo de ME puede mejorar las condiciones de hipoxia aguda y moderar el efecto de la reperfusión. Sin embargo la acción del ON en el daño neuronal isquémico a sido controversial debido a su doble acción como vasodilatador y como radical libre.<sup>120</sup>

Actualmente se ha determinado que el ON puede tener acción neuroprotectora, esta se atribuye a su capacidad de regular la actividad de los receptores sensibles a NMDA, mediante la reacción del grupo ON con sulfhidrilos del aminoácido cisteína, reacción conocida como S-nitrosilación. La subsiguiente disminución en la actividad de este canal iónico / receptor, evita la entrada excesiva del ión  $\text{Ca}^{2+}$ , contrarrestando así la acción excitotóxica del glutamato.<sup>89, 99</sup> El estado de óxido-reducción del ON es muy importante para determinar sus reacciones químicas. En el caso de equivalentes de  $\text{ON}^+$  (ON reducido), la reacción más frecuente es la S-nitrosilación y por tanto se produce neuroprotección, mientras que los equivalentes de  $\text{ON}^-$  (ON oxidado) son más susceptibles de formar peroxinitrito y por tanto funcionar como neurotóxicos.<sup>89</sup> La neuroprotección mediada por ON no solo se explica por la inactivación de receptores sensibles a NMDA, también está involucrada la síntesis de GMP cíclico inducida por el ON, como se demostró en estudios de neuronas sometidas a estrés oxidativo.<sup>59</sup> El ON producido por la SONE por su acción vasodilatadora tiene efectos neuroprotectores.<sup>80</sup> Así el ON formado por la SON constitutiva (neuronal), tiene efecto protector contra el daño celular

resultado de la isquemia-reperusión posterior a traumatismo de la ME, incluso aparentemente inhibiendo la apoptosis.<sup>91</sup>

Se han publicado diferentes investigaciones donde se ha demostrado el efecto neuroprotector o neurotóxico del ON utilizando diferentes donadores de dicha molécula. La mayor parte de ellos se han efectuado *in vitro* aunque ya hay publicaciones de estudios *in vivo*. En cultivo de neuronas corticales sometidas a excitotoxicidad, se determinó el efecto neuroprotector de diferentes donadores de ON, observándose disminución de la lesión neuronal, de manera concentración-dependiente. Igualmente se identificó reducción en la captación intracelular de  $Ca^{2+}$  a través de receptores sensibles a NMDA estimulados.<sup>121</sup> En otros estudios utilizando cultivo de células sometidas a estrés oxidativo, varios donadores de ON incluyendo glutatión S-nitroso (GSNO), Papa/NO, Dea/NO, SNAP, nitroglicerina y ON disuelto en solución de Ringer, tiene un efecto neuroprotector, mientras que el SIN-1 y el nitro prusiato de sodio (NPS) favorecen la citotoxicidad. Se sugiere que la protección esta determinada no solo por el tipo de donador empleado sino también por el flujo constante de ON.<sup>94, 99, 122</sup>

En los estudios *in vivo*, se reporta que el ON disuelto en solución de Ringer protege neuronas de la sustancia nigra contra lesión oxidativa.<sup>99</sup> La inyección intra vítea de NPS protege a las neuronas de la retina sometida a isquemia.<sup>123</sup> Después de isquemia experimental en hipocampo, la administración sistémica de ISO tiene efecto neuroprotector.<sup>59</sup>

Los estudios sobre la acción del ON se efectuaron en neuronas corticales y de la retina, a nuestro conocimiento el ON no ha sido probado como neuroprotector

posterior al traumatismo en la ME. Con esto en mente, en el presente trabajo se determinó el potencial oxidativo del ON a niveles que tuviesen la posibilidad de actuar como neuroprotectores en ME traumatizada. Para tal motivo se buscó incrementar los niveles de ON en ratas sometidas a traumatismo medular, al ser tratadas con un precursor de ON (ARG) y un donador de ON (ISO).

Tomando en cuenta su poderosa acción vasodilatadora, la concentración de los agentes precursores/donadores de ON a administrar se seleccionó al encontrar las dosis que incrementara los niveles de ON sin alterar mayormente la PAM y la FC en ratas sometidas a contusión medular. En este estudio preliminar se encontraron resultados similares a los publicados con anterioridad<sup>34</sup> en las alteraciones provocadas en la PAM y la FC en ratas sometidas a contusión medular, tratadas con SS. Como se esperaba al reconocer su acción vasodilatadora, la mayor disminución de la PAM y la FC se observó en el grupo que recibió la dosis mayor de ISO (50 µg/kg/min), por lo que se determinó emplear las dosis menores de ARG (100 mg/kg) y de ISO (10 µg/kg/min) ya que alteraron la hemodinámica en forma poco significativa.

Con base en lo anterior, se estableció el potencial oxidativo del ON a las dosis señaladas y se comparó con la oxidación producida por el traumatismo en sí, observando que no existe diferencia significativa en el incremento producido con la administración de los precursores/donadores de ON. Posiblemente esta capacidad de oxidación del ON se deba a que al actuar como vasodilatador permitió un mayor aporte de O<sub>2</sub>, favoreciendo el síndrome de reperfusión.

Para determinar la efectividad de diferentes AOX (CAT, GLU, ISO) para contrarrestar el daño oxidativo producido por el incremento de los niveles de ON en la ME traumatizada, se probaron en forma única, mezclados o añadidos al ON en el tratamiento administrado a ratas sometidas a contusión medular. Estos AOX se seleccionaron con el objetivo de inhibir de forma relevante las principales vías de formación de radicales de  $O_2$ , y asegurar un estado reducido en el medio para disminuir al máximo el potencial oxidativo del ON.

La administración exógena de quelantes de oxiradicales es crítica debido a que la formación de ROS se incrementa significativamente en la primera hora y hasta las 24 horas postraumatismo; mientras que la actividad enzimática de la SOD se mantiene sin cambios durante todo el tiempo, y a que la actividad de la CAT y del GLU se incrementa hasta 24 horas postraumatismo. Lo anterior indica que la función mitocondrial, los ROS y la LP ocurren en forma temprana postraumatismo, mientras que la activación compensatoria de las moléculas encargadas de neutralizar a los ROS ocurre tardíamente.<sup>124</sup>

Los resultados obtenidos en el presente trabajo establecen que la administración de antioxidantes exógenos mezclados (AOX) resulta efectiva en el control de la LP. La CAT y el GSHE en forma individual mostraron la misma efectividad que los AOX, mientras que la SOD mostró un ligero incremento en la LP aunque no de forma significativa, esto se puede explicar por el comportamiento de la enzima ya que los niveles de  $\cdot O^2$ , posterior al traumatismo de la ME se incrementan a más del doble y se mantienen así por más de 10 horas.<sup>118</sup> En este caso el  $O^2$  mantiene al hierro en estado ferroso lo que favorece la formación de hidroxilo, sin

embargo la SOD mantiene los niveles de hidroxilo en el rango menor al convertir el  $\cdot\text{O}^{2-}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e inhibir en cierta medida la formación de peroxinitrito.<sup>84, 118</sup> Sin embargo la actividad de la SOD debe de ser interpretada con precaución ya que se puede favorecer la síntesis de peróxido de hidrógeno:



Siendo así que la acumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  afecta el balance oxidativo<sup>125</sup> e incrementa la LP. Es importante además mantener bajos los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ya que puede interactuar con el hipoclorito y oxidarse produciendo singuletes de  $\text{O}_2$ .<sup>69</sup> El  $\text{H}_2\text{O}_2$  producto de la dismutación se reduce a  $\text{H}_2\text{O}$  por la CAT y el GLU.<sup>97</sup> De lo anterior se desprende que en la administración de los AOX es necesario mantener el equilibrio en las enzimas antioxidantes. Los tres AOX solos o combinados, probados en este trabajo mostraron tener la misma eficacia, sino es que mejor que la MP en el bloqueo de la LP, lo que concuerda con trabajos en los que fueron empleados exitosamente en modelos de lesión a la médula espinal, tanto *in vivo* como *in vitro*.<sup>9, 126</sup>

Los resultados obtenidos en este estudio permiten establecer que el control de la LP es de vital importancia en el control del daño secundario en la ME traumatizada. Los AOX empleados pueden ser un buen sustituto para la MP, considerando los efectos negativos que se presentan con el empleo de este esteroide.

## Conclusión

La administración endovenosa de ISO (10 µg/kg/min) y de ARG (bolo de 100 mg/kg) en ratas con lesión medular aguda, no produce alteraciones hemodinámicas significativas. La LP de las muestras provenientes de ratas a las que se administró donadores/precursores de ON fue mayor significativamente comparándolas con muestras provenientes de ratas hemilaminectomizadas sin contusión. Al administrarse AOX (SOD, CAT, GSHE) en forma conjunta con ISO o ARG en ratas sometidas a contusión medular, la LP disminuyó en ambos grupos significativamente, a valores en los que el ISO no es diferente del grupo hemilaminectomizado, pero si menor que el que recibió ARG y en ambos la LP es menor en comparación con los grupos que no recibieron AOX.

Para el presente estudio es claro que el efecto neuroprotector del ON al favorecer la irrigación de la ME traumatizada debe de ser acompañado por la administración de AOX en forma conjunta con los donadores/precursores del ON, con la finalidad de reducir el riesgo de un daño oxidativo mayor y así favorecer los potenciales efectos benéficos del ON como neuroprotector.

Los resultados encontrados en este trabajo, posibilitan que en un futuro sea posible probar el efecto neuroprotector del ON bajo condiciones antioxidantes que bloqueen efectivamente el daño oxidativo producido después de la lesión medular y su tratamiento con agentes que aumenten los niveles de ON.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Referencias

1. -Gimenez M, Privat A. Biological interventions for spinal cord injury. *Curr Op in Neuroi* 1998; 11: 647-654.
- 2.-Blumer CE, Quine S. Prevalence of spinal cord injury: an international comparison. *Neuroepid* 1995; 14: 258-263.
- 3.-Harvey C, Wilson SE, et al. New estimates of the direct costs of traumatic spinal cord injuries: results of a nationwide survey. *Paraplegia* 1992; 30: 834-850.
- 4.-Le couteur R, Child, G. *Diseases of the Spinal Cord*. Adelaide, Australia: Gilles Plaine College of TAFE, 1991.
- 5.-Nesathurai S. Steroids and spinal cord injury: revisiting the NASCIS 2 and NASCIS 3 trials. *J Trauma* 1998; 45: 1088-1093.
- 6.-Bozbuga M, Izgi N, Canbolat A. The effects of chronic alpha-tocopherol administration on lipid peroxidation in an experimental model of acute spinal cord injury. *Neurosurg Rev* 1998; 21: 36-42.
- 7.-Mu X, Azbill RD and Springer JE. Riluzole and methylprednisolone combined treatment improves functional recovery in traumatic spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2000; 29 (17): 773-780.
- 8.-Lucas JH, Wheeler DG, Emery DG, Mallery SR. The endogenous antioxidant glutathione as a factor in the survival of physically injured mammalian spinal cord neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 10: 937-954.
- 9.-Kamencic H, Griebel RW, Lyon AW, Paterson PG, Juurlink HJ. Promoting glutathione synthesis after spinal cord trauma decreases secondary damage and promotes retention of function. *The FASEB J* 2001;15: 243- 250.
- 10.-Verrecchia C, Buisson A, Lakhmeche N, Plotkine M, Boulu RG. Nitric Oxide and cerebral ischemia. In: Chiueh CH, Gilbert DL, Colton CA editors. *The Neurobiology of NO<sup>·</sup> and ·OH*. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 341-347.
- 11.-Ramos-Zúñiga R, Velásquez-Santana H, et al. Neuroprotection in selective focal ischemia in rats by nitrates, an alternative redox manipulation on nitric oxide: experimental model. *Minim Invasive Neurosurg* 1998; 41:152-60

- 12.-Wheeler JS, Sharp NJ. Small Animal Spinal Disorders. Diagnosis and surgery. London, England: Mosby-Wolfe, 1997.
- 13.-Jenkins TW. Functional Mammalian Neuroanatomy. Philadelphia, USA: Lea & Febiger; 1978.
- 14.-Gil VA: Neurología veterinaria en el perro y en el gato. 1ª ed. Barcelona, España: Pulso ediciones s.a., 1998.
- 15.-Redding RW. Anatomy and physiology in Canine neurology. In: Hoerlein BF editor. *Diagnosis and treatment. Third edition Philadelphia, USA: W.B. Saunders Co., 1978.*
- 16.-Jeffery ND. Handbook of small animal spinal surgery. London, England: W.B. Saunders Co., 1995.
- 17.-Morgan JP, Bailey CS. Exercises in veterinary radiology. Spinal diseases. First edition. Napa CA, USA: Venture Press, 2000.
- 18.-Hall ED. Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: how do we build on past succes. *J Spinal Cord Med* 200; 124: 142-146.
- 19.-Kakulas BA: Pathology of spinal injuries. *Cent Nerv Syst Trauma* 1984; 1(2): 117-129.
- 20.-Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Histological and locomotor studies of graded spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol* 1996; 139: 224-256.
- 21.-Bresnahan JC, Beattie MS, Todd FD III, Noyes DH. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. *Exp Neurol* 1987; 126: 61-75.
- 22.-Johnson EM, Greenlund LJ, Akins PT, et al. Neuronal apoptosis: current understanding of molecular mechanisms and potential role in schemic brain injury. *J Neurotrauma* 1995; 12: 843-852.
- 23.-Liu XZ, Xu XM, Hu R, et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 1997; 17: 5395-5406.
- 24.-Beattie MS, Shuman SL, Bresnahan JC. Apoptosis and spinal cord injury. *Neuroscientist* 1998; 4: 163-171.

- 25.-Nockels R, Young W. Pharmacologic strategies in the treatment of experimental spinal cord injury. *J Neurotrauma*, Suppl 1992; 1: 211-217.
- 26.-Kochanowsky J, Malara A, Chudzik W, et al. Pathophysiology and treatment of spinal cord injuries. *Neurol Neurochir Pol* 1999; 32 Suppl 6:91-97.
- 27.-Braund KG. Acute spinal cord traumatic compression. In: Borjab MJ editor. *Pathophysiology in Small Animal Surgery*. Philadelphia, USA: Lea and Febiger, 1981: 105-155.
- 28.-Shores A. Spinal Trauma (Pathophysiology and Management of Traumatic Spinal Injuries) *Diseases of the Spine*. *Vet Clin of North Am* 1992; 22 (4): 859-888.
- 29.-Guha A, Tator CH, Rochon J. Spinal cord blood flow and systemic blood pressure after experimental spinal cord injury in rats. *Stroke* 1989; 20(3): 372-377.
- 30.-Wallace MC, Tator CH. Spinal cord blood flow measured with microspheres following spinal cord injury in the rat. *Can J Neurol Sci* 1986; 13(2): 91-96.
- 31.-Hall ED, Wolf DL. Post-traumatic spinal cord ischemia: relationship to injury severity and physiological parameters. *Cent Nerv Syst Trauma* 1987; 4(1): 15-25.
- 32.-Larios F, Bravo G, Rojas-Martínez R, Castañeda-Hernández G, Hong E, Guisar-Sahagún G. Early Cardiovascular Alterations Following Experimental Cord Injury. *Proc West Pharmacol Soc* 1998; 41: 117-119.
- 33.-Kawata K, Morimoto T, Ohashi T, Tsujimoto S, Hoshida T, Tsunoda T, et al. Experimental study of acute spinal cord injury: a study of spinal blood flow. *No Shinkei Geka* 1993; 21(3): 239-245.
- 34.-Bravo G, Rojas-Martínez R, Larios F, Hong E, Castañeda-Hernández G, Rojas G, et al. *Life Sci* 2001; 68: 1527-1534.
- 35.-Kanellopoulos GK, Kato H, Hsu CY, Kouchoukos NT. Spinal Cord Ischemic Injury (Development of a New Model in the Rat). *Stroke* 1997; 28 (12): 2532-2538.
- 36.-Lei B, Adachi N, Nagaro T, Arai T. Nitric Oxide production in the Cal field in the Gerbil Hippocampus After Transient Fore Brain Ischemia. *Stroke* 1999; 30: 669-677.

- 37.-Gúfzar G. Evaluación morfofuncional del implante de nervio periférico y metilprednisolona después de contusión medular en ratas. (tesis doctoral). México D. F. Universidad Nacional Autónoma de México, 1996.
- 38.-Ying W, Han SH, Miller JW, Swanson RA. Acidosis potentiates oxidative neuronal death by multiple mechanisms. *J Neurochem* 1999; 73: 1549-1556.
- 39.-McDonald JW. Repairing the damaged spinal cord. *Sci. Am.* 1999; 55-63.
- 40.-Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative diseases. *TIPS* 1991; 54-61.
- 41.-Li G, Faroque M, Holtz A, Olsson Y. Apoptosis of oligodendrocytes occurs for long distances away from the primary injury after compression trauma to rat spinal cord. *Acta Neuropathol. (Berl)* 1999; 98(5): 473-480.
- 42.-Brown S, Hall E. Role of Oxygen - derived free radicals in the pathogenesis of Shock and Trauma, with Focus on Central Nervous System Injuries. *JAVMA* 1992; 200 (12): 1849-1858
- 43.-Santamaría del A, Ríos-Castañeda C. El papel del óxido nítrico en el daño oxidativo inducido por el ácido quinolínico en sinaptosomas de cerebro en rata. *Arch Neurocién* 1998; 3(2): 71-75.
- 44.-Nooney JM, Lambert RC, Feltz A Identifying neuronal non-L  $Ca^{2+}$  channels- more than stamp collecting. *TIPS* 1997; 18: 363-371.
- 45.-Miller RJ. Neuronal  $Ca^{2+}$  getting it up and keeping it up. *TINS* 1992; 15: 317-319.
- 46.-Neher E, Augustine GJ. Calcium gradients and buffers on bovine chromaffin cells. *J Physiol* 1992; 450: 273-301.
- 47.-Zhou Z, Neher E. Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 1992; 469: 245-273.
- 48.-Blaustein MP. Calcium transport and buffering in neurons. *TINS* 1988; 11: 438-443.
- 49.-Clapham DE. Calcium Signaling. *Cell* 1995; 80: 259-268.

- 50.-Werth JL, Thayer SA. Mitochondrial buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 1994; 14: 348-356.
- 51.-Carafoli E: The  $\text{Ca}^{2+}$  pump of the plasma membrane. *J Biol Chem* 1992; 267: 2115-2118.
- 52.-Lwe VL, Tsien RY, Miner C. Physiological ( $\text{Ca}^{2+}$ ) level and pump-leak turnover in intact red cells measured using a incorporated Ca chelator. *Nature* 1982; 298: 478-481.
- 53.-Nowycky MC, Pinter MJ. Time courses of calcium and calcium - bound buffers following calcium influx in a model of cell. *Biophys J* 1993; 64: 77-91.
- 54.-Kasai H, Peterson OH. Spatial dynamics of second messengers: IP3 and cAMP as long-range and associative messengers. *TINS* 1994; 17: 95-101.
- 55.-Schlaepfer WW, Bunge RP. Effects of calcium ion concentration on the degeneration of amputated axons in tissue culture. *L Cell Biol* 1973; 59: 456-470.
- 56.-Young W, Yen V, Bligh A. Extracellular calcium activity in experimental spinal cord contusion. *Brain Res* 1982; 253: 115-123.
- 57.-Stokes BT, Fox P, Halliden G. Extracellular calcium activity in the injured spinal cord. *Exp Neurol* 1983; 80: 561-572.
- 58.-Stys PK, Ransom BR, Waxman SG, Davis PK. Role of extracellular calcium in anoxic injury of mammalian central white matter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4213-4216.
- 59.-Tator CH. Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effects. *Neurochirurgie* 1991; 37: 291-302.
- 60.-Farooqui AA, Pascoe GA, Reed DJ. Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res Rev* 1991; 16: 171-191.
- 61.-Tominaga T, Kure S, Yoshimoto T. Temporal profile of DNA degradation in injured rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993; 13 (suppl 1), S460.
- 62.-Pin JP, Duvoisin R. Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 1995; 34: 1-26.

- 63.-Nicoletti F, Bruno V, Copani A, et al. Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders?. Trends Neurosci 1996; 19: 267-271.
- 64.-Krnjevic K. Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. Physiol Res 1974; 54: 418-540.
- 65.-Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors regulates calcium mobilization in hippocampal neurons. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 85: 8737-8741.
- 66.-Olney JW, Price MT, Samson L, Labruyere J. The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. Neurosci Lett 1986; 65: 65-71.
- 67.-Randall RD, Thayer SA. Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons. J Neurosci 1992; 12: 1882-1895.
- 68.-Pin JP, Duvoisin R. Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. Neuropharmacology 1995; 34(1): 1-26.
- 69.-Juurink BJ, Paterson PG: Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: Suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. J Spinal Cord Med 1998; 21:309-334.
- 70.-Hamada Y, Ikata T, et al. Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord. Free Radic Biol Med 1996; 20: 1-9.
- 71.-Guízar-Sahagún G, García-López P, et al. Transitory expression of NADPH diaphorase (NOS) in axonal swellings after spinal cord injury. Neuroreport; 1998; 9: 2899-2902.
- 72.-McAdoo DJ, Xu GY, Robak G, Hughes MG. Changes in amino acid concentrations over time and space around an impact injury and their diffusion through the rat spinal cord. Exp Neurol 1999; 159 (2): 538- 544.
- 73.-Moncada S, Palmer MJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. Pharmacol Rev 1992; 13(2): 109-142.
- 74.-Snyder SH, Brecht DS. Biological roles of Nitric Oxide. Sci. Am. 1992; 5: 68-77.

- 75.-Herce-Pagliai C, Kotecha S, Shuker DE. Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review. *Nitric Oxide* 1998;2(5):324-36.
- 76.-Bredt DS, Snyder SH. Nitric Oxide. A physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 175-195.
- 77.-Madison D. Pass the Nitric Oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4329-4331.
- 78.-Sandau KB, Brune B. Molecular actions of nitric oxide in mesangial cells. *Histol Histopathol* 2000; 15(4): 1151-1158.
- 79.-Escobales N, Rivera-Correa M, Altieri PI, Rodríguez JF. Relationship between NO synthesis, arginina transport, and intracellular arginina levels in vascular smooth muscle cells. *Amino Acids* 2000; 19(2): 451-468.
- 80.-Chan PH. Reactive Oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21:2-14.
- 81.-Dawson VL. Nitric oxide: role in neurotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22(4):305-308.
- 82.-Xu M, Ng YK, Leong SK. Neuroprotective and neurodestructive functions of nitric oxide after spinal cord hemisection. *Exp Neurol* 2000; 161(2):472-480.
- 83.-Dawson VL, Dawson TM: Nitric oxide in neuronal degeneration. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 211(1): 33-40.
- 84.-Lipton SA, Singel DJ, Stamler JS. Neuroprotective effects of nitric oxide and redox congeners. In: Chiueh CC, Gilbert DL, Colton CA, editors. *The Neurobiology of NO<sup>•</sup> and OH<sup>•</sup>*. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738(17): 382-387.
- 85.-Eliasson MJ, Huang Z, Ferrante RJ, et al. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J Neurosci* 1999; 19: 5910-5918.
- 86.-Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, et al. A redox-base mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993; 364: 626-631.

- 87.-Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271 (5Pt 1): C1424-1437.
- 88.-Sato S, Tominaga T, Ohnishi T, Ohnishi T. Role of nitric oxide in brain ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738(17): 369-381.
- 89.-Lipton SA, Rayudu PV, et al. Redox modulation of the NMDA receptor by NO-related species. *Prog Brain Res* 1998; 118:73-82.
- 90.-Chiueh CC. Neurobiology on NO<sup>•</sup> and OH<sup>•</sup> Basic research and clinical relevance. In : Chiueh CC, Gilbert DL, Colton CA editors. *Ann N Y Acad Sci* 1994 ; 738 : 279 –281.
- 91.-Liu D, Liu J, Wen J. Elevation of hydrogen peroxide after spinal cord injury detected by using the Fenton reaction. *Free Rad Biol and Med* 1999; 21 (3): 478-482.
- 92.-Satake K, Matsuyama Y, Kamiya M, Kawakami H, Iwata H Adachi K, et al. Nitric oxide via macrophage iNOS induces apoptosis following traumatic spinal cord injury. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 28, 85(1-2): 114-122.
- 93.-Guízar-Sahagún G, García-López P, et al. Histochemical evidence of the increased expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent diaphorase in neurons of the myenteric plexus after acute spinal cord injury in adult rats. *Neurosci Lett* 1996; 206: 185-188
- 94.-Wink DA, Cook JA, et al. The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch Biochem Biophys* 1996; 331: 241-248.
- 95.-Lesky ML, Bao F, Wu L, et al. Protein and DNA oxidation in spinal injury: neurofilaments - an oxidation target. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 613-624.
- 96.-Yu TW, Anderson D. Reactive oxygen species-induced damage and its modifications: A chemical modification. *Mut Res* 1997; 379: 201-210.
- 97.-Cohen G. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxiradicales and regulation of antioxidant defenses. In: Chiueh CC, Gilbert DL, Colton CA editors. *The Neurobiology of NO<sup>•</sup> and OH<sup>•</sup>*. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738(17): 8-14.

- 98.-Gilbert DL. Keeping reactive oxygen species (ROS) in the proper place. In: Chiueh CC, Gilbert DL, Colton CA editors. The Neurobiology of NO and OH. Ann N Y Acad Sci 1994; 738(17): 1-7.
- 99.-Mohanakumar K, Steinbusch H. Hydroxyl radicals and nitric oxide in neurotoxicity and neuroprotection. J Chem Neuroanat 1998; 4:125-127.
- 100.-Carney JM, Smith CD, Carney AM, Butterfield DA. Aging and oxygen-induced modifications in brain biochemistry and behavior. In: Chiueh CC, Gilbert DL, Colton CA editors. The Neurobiology of NO and OH. Ann N Y Acad Sci 1994; 738 (17): 44-53.
- 101.-de Castro Jr. R, Alcock NW, McAdoo DJ. Sampling of low molecular weight iron by microdialysis following spinal cord injury. J Neurosci Res 1999; 57: 735-739.
- 102.-Fujii S, Suzuki Y, Yoshimura T, Kamada H. In vivo three-dimensional EPR imaging of nitric oxide production from isosorbide dinitrate in mice. Am J Physiol 1998; 274(5 Pt 1): G857-G862.
- 103.-Wong PS, Fukuto JM. Reaction of organic nitrate esters and S-nitrosothiols with reduced flavins: a possible mechanism of bioactivation. Drug Metab Dispos 1999; 27(4): 502-509.
- 104.-Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. Cell Mol Life Sci 1999; 55(8-9):1015-1028.
- 105.-Angele MK, Smail N, et al. L-arginine restores the depressed cardiac output and regional perfusion after trauma-hemorrhage. Surgery 1998; 124:394-401.
- 106.-Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, et al. Beneficial effects of Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP), a superoxide dismutase mimetic, in zymosan-induced shock. Br J Pharmacol 1999; 128(6): 1241-1251.
- 107.-Lardinois OM, Mestdagh MM, Rouxhet PG. Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. Biochim Biophys Acta 1996; Jul 18, 1295(2): 222-238.

- 108.-Grattagliano I, Wieland P, Schranz C, Lauterburg BH. Disposition of glutathione monoethyl ester in the rat: glutathione ester is a slow release form of extracellular glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272(2): 484-488.
- 109.-Hoshida S, Kuzuya T, et al. gamma-Glutamylcysteine ethyl ester for myocardial protection in dogs during ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1391-1397.
- 110.-Anderson ME, Underwood M, Bridges RJ, Meister A. Glutathione metabolism at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *FASEB J* 1989; 3(13): 2527-2531.
- 111.-Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and Biochemistry of 4-hidroxyronenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med* 1991; 11: 81-128.
- 112.-Guízar-Sahagún G, Castañeda-Hernández G, et al. Pathophysiological mechanisms involved in systemic and metabolic alterations secondary to spinal cord injury. *Proc West Pharmacol Soc* 1998; 41: 237-240.
- 113.-Diaz A, Rios C, Duarte I, Correa D, Guizar G, Grijalva I, et al. Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett* 1999; 266: 61-64.
- 114.-Ley General de Salud. Título Séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. Editorial Porrúa, sexta edición, México D.F. 1990; 430 -431.
- 115.-Kraus J, Silberman T, McArthur D. Epidemiology of spinal cord injury. In: Sonntag V, Menezes A. *Principles of Spinal Surgery*. New York : McGraw-Hill, 1995 : 41- 58.
- 116.-Reier P, Anderson D, Young W, et al. Workshop on intraspinal transplantation and clinical application. *J Neurotrauma* 1994 ; 11 : 369-377.
- 117.-Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, et al. A randomized controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. *N Engl J Med* 1990; 322: 1405– 461.

- 118.-Liu D, Ling X, Wen J, Liu J. The role of reactive nitrogen species in secondary spinal cord injury: formation of nitric oxide, peroxyxynitrite, and nitrated protein. *J Neurochem* 2000; 75(5): 2144-2154.
- 119.-Wink DA, Cook JA, Pacelli R, Liebmann J, Krishna MC, Mitchell JB. Nitric Oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. *Toxic Lett* 1995; 82-82: 221-226.
- 120.-Chan PH, Epstein CJ, Kinouchi H, Kamii H, Imaizumi S, Yang G, et al. SOS-1 Transgenic mice as a model for studies of neuroprotection in stroke and brain trauma. In: Chiueh CH, Gilbert DL, Colton CA editors. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 93-101
- 121.-Vidwans A, Kim S, et al. Analysis of the neuroprotective effects of various nitric oxide donor compounds in murine mixed cortical cell culture. *J Neurochem* 1999; 72: 1843-1852.
- 122.-Rauhala P, Lin AM, et al. Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. *FASEB J* 1998; 12: 165-173.
- 123.-N, Tsuyama Y, et al. Protective effect of nitric oxide on ischemic retina. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 1997; 101: 639-643
- 124.-Moussa BY, Lena L , Riederer P. Oxygen free radicals and neurodegeneration in Parkinson's Disease. A role for Nitric Oxide. In: Chiueh CC, Gilbert DL, Colton CA editors. *The Neurobiology of NO and OH*. *Ann N Y Acad Sci*, 1994; 738: 64-68.
- 125.-Poirier J, Dea D, Baccichet A and Thiffault C. Superoxide Dismutase Expression in Parkinson's disease. In: Chiueh CC, Gilbert DL, Colton CA editors. *The Neurobiology of NO and OH*. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 116-120.
- 126.-Chikawa T, Ikata T, Katoh S, Hamada Y, Kogure K, Fukusawa K. Preventive effects of lecithinized super oxide dismutase and methylprednisolone on spinal cord injury in rats: transcriptional regulation of inflammatory and neurotrophic genes. *J Neurotrauma* 2001; 18 (1): 93 - 103.