



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

EFEECTO DE CCICLOSPORINA-A SOBRE LA
REGENERACIÓN NEURAL Y LA EXPRESIÓN
DE GAP-43 EN RATAS CON LESIÓN
DE MEDULA ESPINAL.

T E S I S

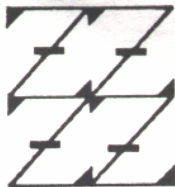
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

DANTE CARLOS PINEDA CISNEROS

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN

DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS

ASESOR DE TESIS: M en F. LETICIA CRUZ ANTONIO

MEXICO, D. F.

2005



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.

El presente trabajo se realizó en:

Laboratorio de Neuroinmunología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Laboratorio de Neuroinmunología del Centro de Investigación Proyecto CAMINA A.C.

Laboratorio de Bacteriología Experimental, 8º Piso, Instituto Nacional de Pediatría.

JURADO:

Q.F.B. ARACELI GARCÍA DEL VALLE

M. en F. LETICIA CRUZ ANTONIO

M.C. MAURILIO FLORES PIMENTEL

Q.F.B. FRANCISCO JAVIER PARADA GARCÍA

DR. JOSÉ JUAN ANTONIO IBARRA ÁRIAS

AGRADECIMIENTOS

A *Dios*, por haberme permitido disfrutar de este logro en mi vida.

Al *Dr. Juan Antonio Ibarra*, por haber depositado su confianza en mí para la realización del presente trabajo, y por haberme permitido formar parte de su equipo de investigación.

A la *M. en F. Leticia Cruz Antonio*, por su inmensa comprensión y su gran disposición.

A la *Dra. Ma. Dolores Correa Beltrán*, por sus consejos y puntos de vista certeros, y por haberme permitido convivir con su equipo de investigación.

A la *M. en C. Elvia Cobayase Urutia*, por su gran amistad y su apoyo incondicional.

A la *Q.F.B. Alma D. Jiménez González*, por su gran disposición y amistad.

Al *Dr. Gabriel Guízar Sahagún* y su equipo de trabajo que conforman Proyecto CAMINA: MVZ Angelina Martínez, M. en F. Leticia Cruz, Srita. Laura Baldwin, Sr. Fidel, Sra. Mary y, al Sr. Guillermo e hijos por su ayuda y gran disposición.

DEDICATORIA

A mis grandes amigos y maestros de toda la vida: Carlos y Magdalena, mis padres.

Quiero que sepan que no ha sido en vano su sacrificio y esfuerzo. Los quiero mucho.

A mis pequeños Carlitos, las personitas más nobles y tiernas de mi vida.

Por su comprensión y paciencia. Ustedes son la fuente de esperanza y amor en mi vida

A mi hermana Margarita Marisol, ejemplo de tenacidad y perseverancia.

Por su comprensión y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A Beatriz Morán, mi amiga incondicional y comprensiva esposa.

Por su entera confianza, apoyo e incomparable perseverancia.

A mis tíos Remedios, Tino, Amelia, Lucy y Eduardo, y mi primo Hazael.

Por su ayuda incondicional y gran comprensión.

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES	
GENERALIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO	
ANATOMÍA DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO (SNP).	7
ANATOMÍA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC).	9
HISTOLOGÍA DEL SNC.	13
FISIOLOGÍA DEL SNC.	14
GENERALIDADES DE LA LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL (LME)	
DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA.	15
FISIOPATOLOGÍA DE LME.	16
REGENERACIÓN.	18
CICLOSPORINA-A	
GENERALIDADES.	22
ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FARMACODINÁMICAS.	22
PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS DE CsA.	23
EFICACIA TERAPÉUTICA Y EFECTOS ADVERSOS.	24
CICLOSPORINA-A Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.	24
PROTEÍNA ASOCIADA AL CRECIMIENTO (GAP-43)	
GENERALIDADES	27
ESTRUCTURA MOLECULAR Y EXPRESIÓN.	27
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y SÍNTESIS DE GAP-43.	28
PROPIEDADES BIOQUÍMICAS.	29
JUSTIFICACIÓN.....	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS.....	32
MATERIAL Y METODOS	
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
DEFINICIÓN DE VARIABLES	34
PROCEDIMIENTOS GENERALES.....	34
DISEÑO ESTADÍSTICO.....	41
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	41
RESULTADOS	
HISTOQUÍMICA DE TEJIDO MEDULAR.	42
INMUNOELECTROTRANSFENCIA DE TEJIDO MEDULAR.....	44
INMUNOFLUORESCENCIA DEL TEJIDO MEDULAR.	45
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES.....	55
PERSPECTIVAS	55
APENDICES	
APÉNDICE A	56
APÉNDICE B.....	59

APÉNDICE C.....	61
APÉNDICE D	64
GLOSARIO	71
REFERENCIAS.....	73

RESUMEN

La lesión de la médula espinal (LME) ocasiona alteraciones estructurales y funcionales que oscilan desde el bloqueo transitorio de la conducción, hasta la sección medular completa. El resultado del trauma a la médula espinal, es en primera instancia, físico, el cuál es seguido por una serie de daños que inician a los pocos minutos y continúan días o años después. Esta lesión secundaria provoca cambios fisiopatológicos en la médula espinal, que destruyen importantemente el tejido medular. Es por ello que, además de buscar estrategias de neuroprotección, se busquen estrategias que promuevan la regeneración neural.

El fenómeno de regeneración, puede ser modulado por factores o sustancias del microambiente (hipótesis neurotrófica), entre ellas, GAP-43 (del inglés growth associated protein 43). Esta molécula es clave en la regulación del crecimiento y plasticidad axonal, así como prevención de apoptosis. Algunos fármacos han sido utilizados para promover la regeneración. Entre ellos podemos mencionar al clenbuterol, el macrólido FK-506, y ciclosporina A (CsA). Este último es un fármaco inmunosupresor lipofílico, cuyo modo de acción es a través de complejos con inmunofilinas. El complejo ciclosporina A- inmunofilina bloquea la acción de una enzima, calcineurina, por consiguiente inhibe: la activación de factores de transcripción de citocinas, óxido nítrico sintasa, migración de neutrófilos y defosforilación de GAP-43, entre otras. Considerando lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el efecto de CsA sobre el proceso de regeneración, así como en la expresión de GAP-43. Para tal efecto, se utilizaron ratas Sprague Dawley, las cuales se dividieron en cuatro grupos: (1) ratas con LME y CsA, (2) ratas con LME y vehículo, (3) ratas con laminectomía y CsA y (4) ratas con laminectomía y vehículo. Se obtuvo el tejido medular de los animales de cada grupo experimental y se sometieron a histoquímica, para determinar la densidad de axones que atraviesa el sitio de lesión, inmunofluorescencia, para determinar la localización de GAP-43 en dicho tejido e inmunoelectrotransferencia (IET), para semicuantificar dicha molécula en los cuatro grupos experimentales. De los resultados obtenidos,

demostramos que posterior a una LME, existe un ligero aumento de GAP-43 a nivel del funículo dorsal (tracto grácil) y del funículo dorsolateral, en la sustancia blanca, y en los segmentos laminares I, VII y X, de la sustancia gris del tejido medular. Dicho aumento es independiente de CsA. Por otra parte no se obtuvo diferencia significativa en la densidad de las bandas obtenidas por IET entre los grupos experimentales. Respecto a histoquímica, se observó recrecimiento axonal, pero no alcanzan a conectarse con el muñón opuesto. En conclusión, podemos decir que CsA no ejerce efecto alguno en la expresión de la neuroproteína GAP-43 y que la administración prolongada de este fármaco favorece la regeneración axonal pero no funcional en este modelo de LME.

INTRODUCCIÓN

Una LME suele producirse por fuerzas mecánicas (caídas, disparos de pistola, accidente automovilístico, accidente peatonal, entre las más comunes) que fractura o disloca la columna vertebral, los huesos que protegen a la médula espinal se rompen y ocasionan presión mecánica o sección completa (en casos graves) al tejido medular. La LME provocada inicialmente por el traumatismo, desencadena un segundo conjunto de procesos de destrucción (excitotoxicidad, inflamación, acumulación de radicales libres, apoptosis, isquemia) que aumenta el daño al tejido medular y ocurre de manera longitudinal desde la materia gris y propagándose hacia la materia blanca (Lu, et al. 2000, McDonald 1999). Se han evaluado varios medicamentos que limiten el daño al tejido medular. Entre ellos esta la metilprednisolona (Lu, et al. 2000), que es un poderoso modulador de lesión secundaria, el gangliosido GM1 (Dumont, et al. 2001), ciclosporina A (CsA; Ibarra et al., 1999) y la dinorfina (Amar y Levy 1999), por mencionar algunos. Otras estrategias evaluadas han sido remplazar las células dañadas por medio de trasplantes de tejido de sistema nervioso central fetal, implantes de células gliales o células de Schwann para establecer conexiones axonales adecuadas (Tuszynski et al., 1999). Una estrategia terapéutica sugiere no solo reducir la expansión de la lesión secundaria sino también repara el daño. Un componente clave de esa reparación es estimular la regeneración de axones dañados, esto es, inducir su elongación y la reconexión con células blanco apropiadas. En este proceso están involucradas sustancias denominadas factores tróficos (factor neurotrófico de crecimiento, NGF; neurotrofina - 3, NT-3, entre otros) y proteínas relacionadas con el crecimiento axónico (GAP-43, tubulina, CAP-23, entre otras).

Como consecuencia de los procesos primarios y secundarios de una LME provoca que un individuo quede parapléjico o cuadripléjico, dependiendo del sitio de lesión en la columna vertebral. Este tipo de lesiones repercute en el paciente y su núcleo familiar psicológica y socialmente, en especial en la esfera reproductiva y en

instituciones de salud, por las implicaciones de recursos tecnológicos, médicos y paramédicos con sus repercusiones económicas.

El promedio de hospitalización por lesiones medulares agudas en E.U.A. entre la población civil es de 40 por 1,000.000 de habitantes por año (Taoka y Okajima, 1998) y el promedio de decesos por año es aproximado al 11% (DeVivo et al., 1999). Cuando todas las formas de tratamiento y todos los niveles de lesión se consideran, menos del 2% de pacientes con lesión inicialmente completa, llegan a caminar otra vez (Marino et al., 1999). En nuestro país no contamos con algún estudio epidemiológico en donde se describa la incidencia, mortalidad, evolución postraumática y costo de la atención médica de este tipo de lesiones.

Las complicaciones originadas por una LME elevan el costo del tratamiento y la mortalidad. Existen complicaciones del tracto genitourinario, complicaciones respiratorias (particularmente neumonía y embolismo pulmonar), septicemia, suicidio, enfermedades cardiacas (De Vivo et al., 1999).

En el presente trabajo evaluaremos el efecto de un agente inmunosupresor CsA sobre la expresión de GAP-43 y la regeneración del sistema nervioso central.

ANTECEDENTES

GENERALIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO.

El sistema nervioso (SN) permite que el organismo reaccione a los constantes cambios del medio interno y externo. Controla e integra las distintas actividades del cuerpo, como la circulación y la respiración. Aunque es una estructura continua (Figura 1), se divide en:

- Sistema Nervioso Central (SNC) que comprende el encéfalo y la médula espinal.
- Sistema Nervioso Periférico (SNP) que comprenden los 12 pares de nervios craneales y los 31 pares de nervios espinales, incluyendo sus ramificaciones (Williams, 1998).

ANATOMÍA DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO (SNP).

El SNP se continúa, desde el punto de vista anatómico y funcional, con el SNC. Sus fibras aferentes o sensitivas llevan los impulsos nerviosos al SNC desde los órganos sensoriales y desde los receptores sensitivos de las regiones del cuerpo. Las fibras eferentes o motoras transportan los impulsos nerviosos desde el SNC hasta los órganos efectores (Martini y Bartholomeu, 1999). Se divide en:

- **Sistema Nervioso Somático (SNS)** que comprende los cuerpos neuronales concentrados en grupos dentro del cerebro y médula espinal, y los axones mielinizados que salen del SNC y se dirigen, sin hacer sinapsis, a las células del músculo esquelético. El sistema sensitivo somático transmite la sensibilidad táctil dolorosa, térmica y postural de los receptores sensitivos. El sistema motor somático facilita los movimientos voluntarios y reflejos con la contracción de los músculos esqueléticos. Su neurotransmisor es acetilcolina (Martini y Bartholomew, 1999).
- **Sistema Nervioso Autónomo (SNA)** tiene un componente central y otro periférico. Las fibras eferentes viscerales se acompañan de fibras aferentes

viscerales (Moore y Dalley, 2002). Sus fibras inervan el músculo liso, cardíaco y glándulas. El SNA se divide en:

- *Sistema nervioso simpático o torácicolumbar* que incluye los cuerpos neuronales ubicados en la columna gris de la médula espinal (segmentos espinales torácicos hasta los dos o tres segmentos lumbares), los axones presinápticos que emergen a través de las raíces espinales ventrales, los cuerpos neuronales situados en los ganglios paravertebrales (truncos simpáticos) o en los ganglios prevertebrales (ubicados en los plexos donde hacen sinapsis las fibras presinápticas) y las fibras postsinápticas que pueden regresar a la médula espinal, inervar vísceras o vasos sanguíneos.
- *Sistema nervioso parasimpático sacro craneal* que comprende los cuerpos neuronales ubicados en la sustancia gris del tallo encefálico y de los segmentos sacros de la médula espinal (S2 a S4), las fibras presinápticas (que abandonan el SNC por medio de los nervios craneales III, VII, IX y X, por las raíces ventrales de los nervios espinales S2 a S4 y los nervios esplancnicos pélvicos), los cuerpos celulares postsinápticos (donde las fibras presinápticas hacen sinapsis) que se encuentran de manera solitaria dentro o sobre la pared de los órganos efectores (ganglios intrínsecos o entéricos).

Aunque las dos divisiones del sistema nervioso autónomo salen a diferentes niveles, el corazón, las glándulas y el músculo liso son inervados por fibras simpáticas y fibras parasimpáticas (inervación dual). Tanto en la división simpática y parasimpática, el neurotransmisor presináptico es acetilcolina, así también en las fibras parasimpáticas postsinápticas. En cambio, las fibras postsinápticas simpáticas son adrenérgicas.

El sistema simpático es catabólico y permite al organismo afrontar el estrés. El sistema parasimpático es un sistema homeostático o anabólico que fomenta procesos ordenados y tranquilos, del tipo de los que permite al cuerpo alimentarse y asimilar (Williams, 1998, Moore y Dalley 2002).

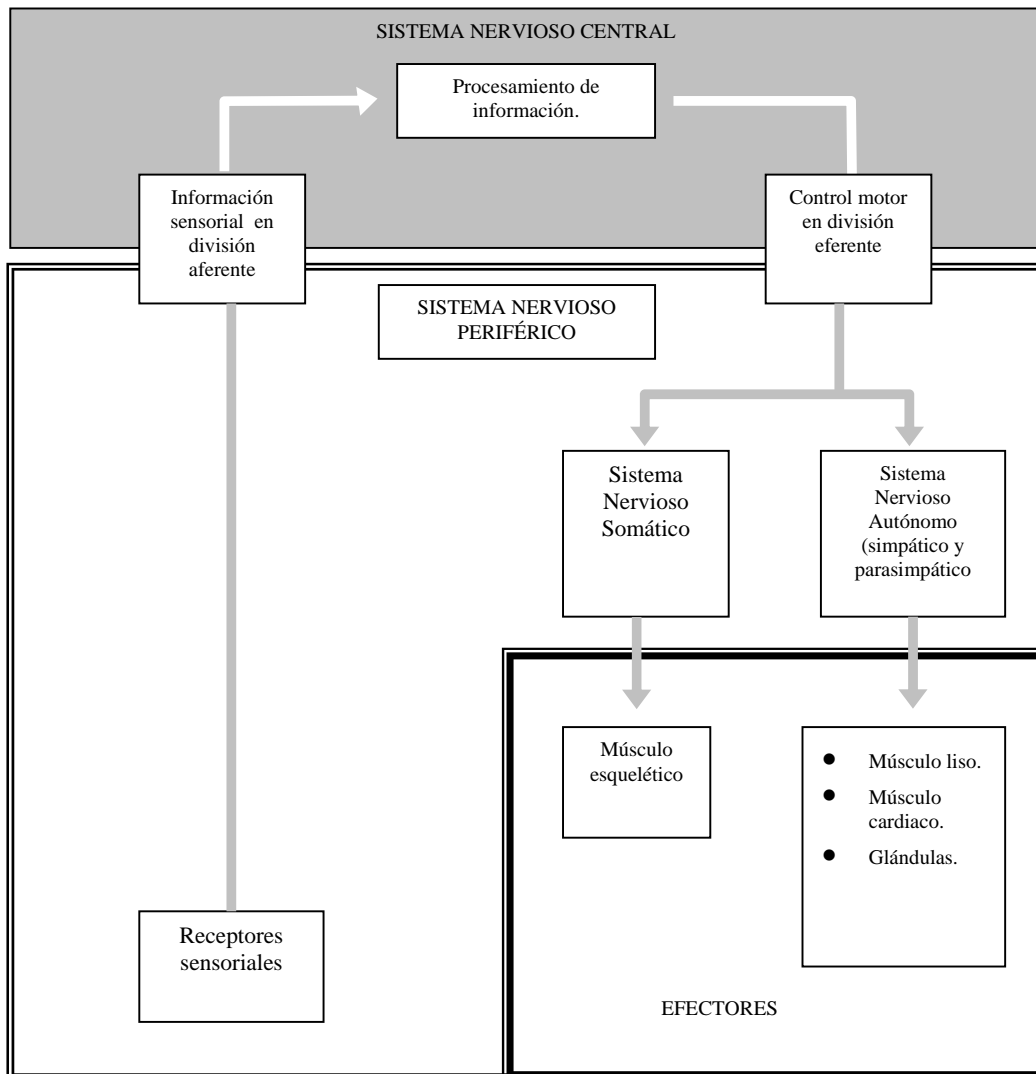


Figura 1.- Organización del Sistema Nervioso (Moore y Dalley, 2002).

ANATOMÍA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC).

La importancia del SNC reside en las redes complejas de neuronas en las que se originan los patrones apropiados de las respuestas a los estímulos del medio externo e interno. Se divide en encéfalo y médula espinal.

- **El encéfalo.-** En orden ascendente desde la médula espinal, se divide en: *rombencéfalo* o *encéfalo posterior* (comprende el mielencéfalo o bulbo raquídeo, el metencéfalo o protuberancia anular y el cerebelo), el *mesencéfalo* o *encéfalo medio*,

y el *prosencefalo* o *encefalo anterior* (que incluye el *diencéfalo* y el *telencéfalo*). *El bulbo raquídeo* es la continuación de la médula espinal. Contienen centros reguladores de la respiración, frecuencia cardiaca y actividades vasomotoras (centros vitales). Reflejos como la tos, el vómito, el estornudo y la deglución están mediadas por esta estructura. *El puente* contiene vías de conducción entre la médula y los centros encefálicos altos. Conecta las dos mitades del cerebelo. Además de ser una vía de conducción, también ayuda a regular la respiración. *El cerebelo* se encuentra en la parte posteroinferior de la cavidad craneana. Aquí se encuentran los centros reflejos para la regulación del tono muscular, el equilibrio y la postura. *El mesencéfalo* conecta el metencéfalo con el prosencefalo. Se extiende desde el puente hasta la superficie inferior del cerebro. Los centros reflejos del mesencéfalo incluye el de rectificación (mantiene recta la cabeza), postural (posición de la cabeza respecto al tronco) y visuales auditivos (hacen voltear la cabeza donde se origina un ruido fuerte). *El diencéfalo* se encuentra por arriba del mesencéfalo y está cubierta por los hemisferios cerebrales. Comprende las siguientes estructuras: epítalamo, tálamo, hipotálamo y subtálamo. Su función se asocia con el sistema motor mayor, actividades sensitivas, sirve en la integración de la conducta emocional. *El cerebro* esta compuesto tanto de la corteza cerebral (materia gris) como de los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo (materia blanca separada por la fisura longitudinal). Cada hemisferio con su respectiva corteza, se subdivide en cuatro lóbulos (frontal, parietal, temporal y occipital) delimitados por el surco central o cisura de Rolando y el surco lateral o cisura Silvio. En el cerebro se realizan la identificación discriminatoria e integración de información sensitiva de la memoria, razonamiento, empleo del lenguaje, comportamiento emocional e iniciación del movimiento (Burke, 1990; Williams, 1998, Jacob et al., 1982).

La médula espinal (ME) es la porción del SNC rodeada y protegida por la columna vertebral. Es una parte alargada y aproximadamente cilíndrica que ocupa los dos tercios superiores del conducto raquídeo. Se extiende desde el

borde superior del atlas hasta el nivel de la segunda vértebra lumbar, donde termina como el cono medular. Tiene dos engrosamientos, cervical y lumbosacro, que corresponde a las regiones que inervan las extremidades superiores e inferiores, respectivamente. La ME se fija al cóccix por medio del filum terminale y a la duramadre por los ligamentos dentados. Está compuesta de 31 segmentos definidos por 31 pares de nervios raquídeos y esta rodeada por 3 capas meníngeas: pía, aracnoides y dura. En la superficie externa pueden observarse diversos surcos: el *surco medio anterior* y el *tabique medio posterior* (que separa casi completamente la médula en dos partes, derecha e izquierda, y están unidas por la comisura blanca y comisura gris donde se ubica el conducto central), el *septum* paramedio ubicado a cada lado del surco medio posterior. Al hacer un corte transversal de la ME se distinguen dos áreas: *sustancia gris* que es una mezcla compleja de neuronas (multipolares y generalmente Golgi tipo I y II), neuritas, neuroglia y vasos sanguíneos; se divide en cuernos o astas (dorsal o posterior, lateral y ventral o anterior), y a la vez éstas estructuras están divididas en núcleos o láminas (basándose en el tamaño, la forma, las características citológicas y la densidad neuronal en las diferentes regiones; Figura 2); la *sustancia blanca* contiene fibras nerviosas, neuroglia y vasos sanguíneos, rodea la sustancia gris y debe su color a la presencia de un gran número de fibras nerviosas mielínicas. Los sitios de entrada y salida de las fibras de la raíz dorsal (surcos dorsolaterales y ventrolaterales), la dividen en funículos (dorsal o posterior, lateral y ventral o anterior). Cada uno de estos funículos contiene uno o más tractos o fascículos. Un tracto se compone de fibras nerviosas aferentes y eferentes (Figura 3). La ME funciona para conducir mensajes que van al cerebro y los que provienen de él hacia su periferia (Afifi y Bergman, 1999; López, 2000).

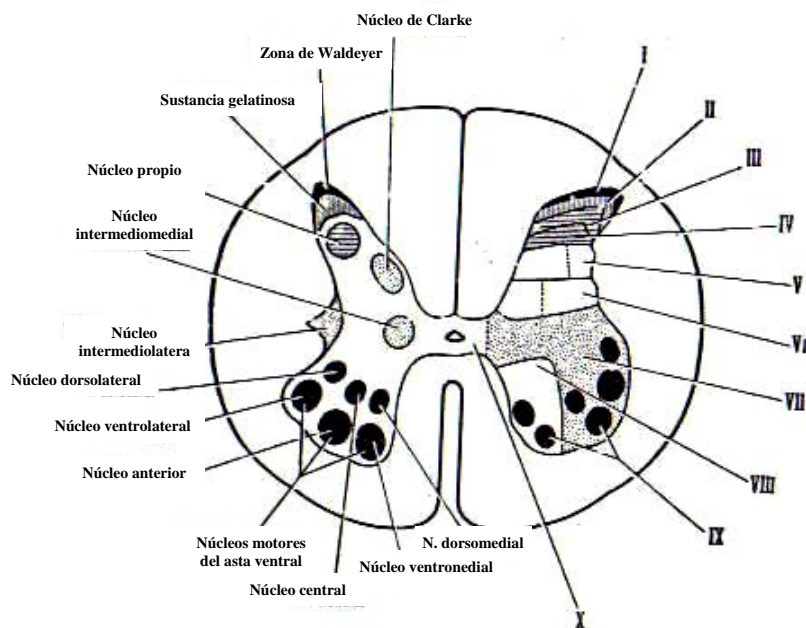


FIGURA 2.- Esquema clásico (izquierda) y esquema de Rexed (derecha) de la sustancia gris de la ME (López, 2000).

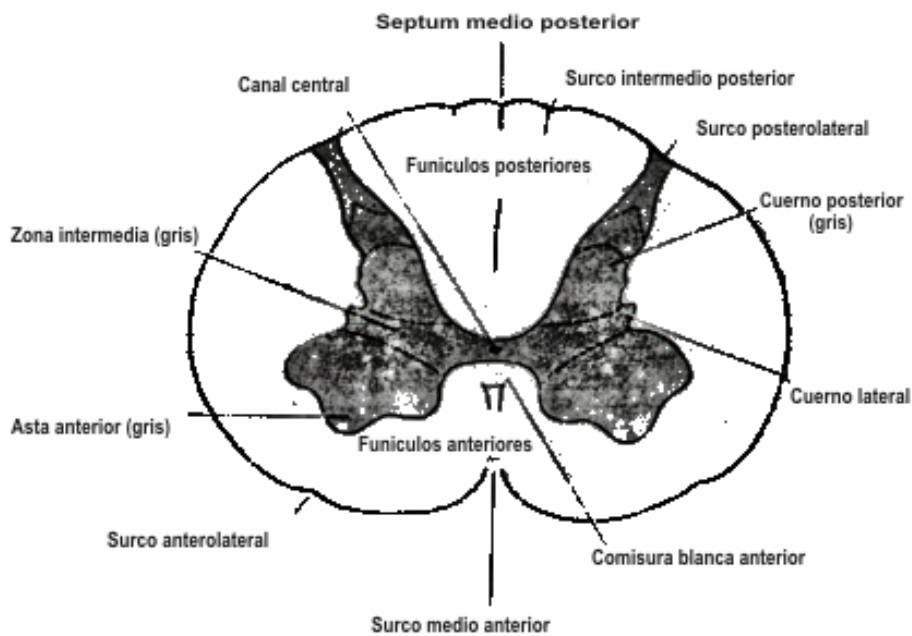


FIGURA 3.- Estructura externa de ME (Noback, 1986).

HISTOLOGÍA DEL SNC.

El sistema nervioso es un tejido altamente especializado. Básicamente se compone de neuronas y células de sostén o glía (figura 4).

La **neurona**, de acuerdo a la doctrina neuronal, es la unidad genética, anatómica, funcional y trófica del sistema nervioso. Se constituye por un cuerpo o soma, y prolongaciones (axón y dendritas). El soma varía tanto de forma como de dimensiones y contiene los organelos como: cuerpos de Nissl o retículo endoplásmico rugoso, retículo endoplásmico liso, aparato de Golgi, mitocondrias, lisosomas, pigmentos, neurofibrillas, núcleo y nucleolo. Las dendritas, lugar donde la neurona recibe información, son prolongaciones citoplásmicas que contienen numerosas espinas donde se establecen contactos sináptico. El axón se origina a partir del soma, recorre un trayecto variable, emite colaterales y termina en arborizaciones. A través de los axones se puede realizar tanto transporte axonal (o flujo axoplásmico) de moléculas o estructuras complejas, así como la transmisión de los potenciales de acción. La velocidad de conducción de estos potenciales depende del tipo de axón (mielínico o amielínico), así como del calibre del axón, entre otros factores (Williams, 1998).

La **glía o células de sostén**, son células nerviosas que no participan en forma directa en la excitación, inhibición y propagación del impulso nervioso. Los *astrocitos* tienen forma de estrella con varias prolongaciones. Se distinguen dos tipos: *astrocitos fibrosos* encontrados en la sustancia blanca que se relacionan con la transferencia de metabolitos y con la reparación del tejido dañado (cicatrización). Los *astrocitos protoplásmicos* se encuentran por lo regular en la sustancia gris y pueden servir como intermediarios metabólicos de las células nerviosas. Los *oligodendrocitos* son células pequeñas que tienen ramas más cortas. En la sustancia blanca se han relacionado en la mielinización y en la sustancia gris se encuentran estrechamente relacionado con las neuronas igual que los astrocitos protoplásmicos. Las *células ependimarias* se alinean en el conducto central de la ME y se relacionan con la formación de líquido cefalorraquídeo. La *microglia* se

encuentra en la sustancia gris y blanca. Son equivalentes a macrófagos, pueden participar en la protección del tejido nervioso contra virus, microorganismos, formación de tumores y en lesiones del SNC (Williams, 1998; Bergman et al., 1997).

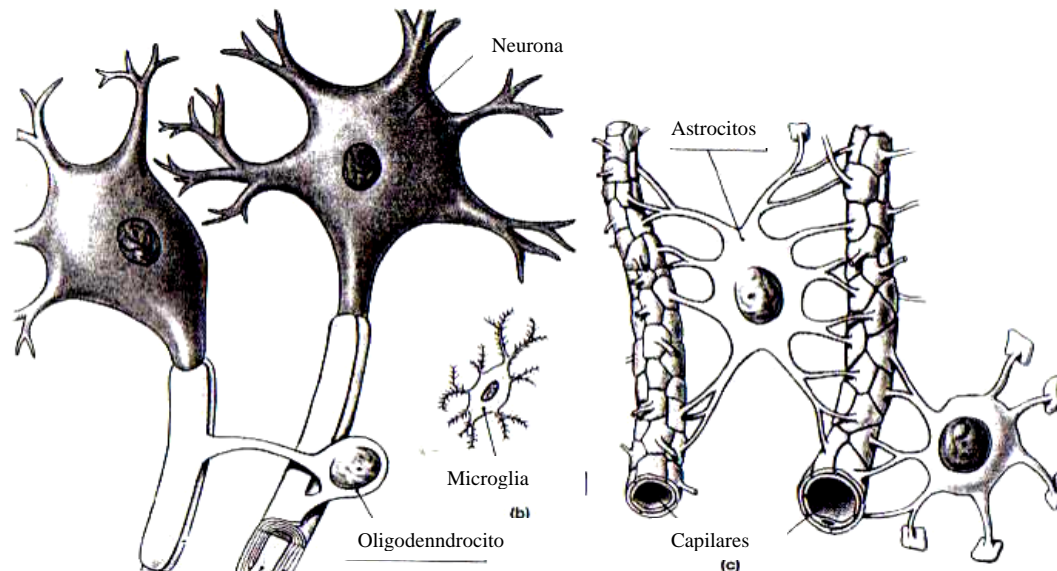


FIGURA 4. Neurona y células gliales (Martini, 1999).

FISIOLOGÍA DEL SNC.

La función de la neurona consiste en conducir señales de una parte del cuerpo a otra mediante fenómenos eléctricos y químicos.

Potencial de acción.

La diferencia de concentración de iones intracelular y extracelular, provoca que las neuronas posean un potencial (potencial de membrana, -70 mV). Si la membrana de una neurona se hace más permeable al ión sodio y el potencial varía de -70 mV a +40 mV, ha ocurrido una despolarización, inmediatamente disminuye la permeabilidad al ión sodio y aumenta la del ión potasio, dando como consecuencia la variación de potencial hasta -75 mV (hiperpolarización). Todo el proceso tiene una duración de 5mseg. Este mecanismo descrito se conoce como el potencial de acción. Posterior a éste, existe un intervalo durante el cual no se puede generar otro potencial de acción, denominado periodo refractario. Las neuronas utilizan este

mecanismo para recibir, conducir y transmitir información a través de su superficie (Bergman et al., 1997; Kiernan, 2000).

Sinapsis.

La información es transferida de una neurona a otra, o entre las neuronas y los receptores o células efectoras, en regiones especializadas de contacto celular llamadas *sinapsis*. Existen dos tipos: *sinapsis eléctricas*, en las cuales las membranas de las células adyacentes están fusionadas, no contienen vesículas sinápticas. La transmisión en estas uniones es por despolarización electrotónica. Este tipo de sinapsis no es común en el sistema nervioso de los mamíferos. La *sinapsis química* se compone de una membrana presináptica, un espacio sináptico y una membrana postsináptica. Cuando un potencial de acción llega a una terminal axónica, la membrana de esta terminal se despolariza. Los iones calcio entran en la terminal y promueven la fusión de vesículas sinápticas en la membrana presináptica. El neurotransmisor de la vesícula se libera por exocitosis al espacio sináptico y se une a receptores de la membrana postsináptica. La permeabilidad iónica de la membrana postsináptica se incrementa, lo que conduce a: despolarización de la membrana y la generación de un potencial de acción en la neurona blanco (como ocurre en las sinapsis excitatorias), o hiperpolarización de la membrana, reduciendo su excitabilidad (sinapsis inhibitoria; Bergman, 1997; Ciba, 1987).

GENERALIDADES DE LA LME.

DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA.

La LME es un daño ocasionado al tejido medular que compromete sus funciones principales (motor, sensorial, autónomo y reflejo). Clínicamente, el resultado de una LME completa (pérdida total de la función motora y sensorial) o incompleta (afección de alguna función motora y/o sensorial), es paraplegía o tetraplegía. La paraplegía es la pérdida de acción voluntaria de ambas piernas y parte baja del tronco, se ocasiona por una lesión medular a nivel torácico, lumbar y sacra. La tetraplejía o cuadriplejía es la pérdida del control voluntario de extremidades

inferiores y superiores, se ocasiona por una lesión medular a nivel cervical (Kiernan, 2000; Schwab, 2002). Las consecuencias de este tipo de lesiones persisten por toda la vida del paciente y tiene profundo efecto en el mismo y su núcleo familiar psicológica y socialmente, en especial en la esfera reproductiva. En las instituciones de salud, el impacto económico es elevado por las implicaciones de recursos tecnológicos, médicos y paramédicos (Schwab, 2002).

Se ha estimado que la incidencia es aproximadamente 40 casos por 1, 000,000 de habitantes por año en E.U.A. (Taoka y Okajima, 1998; pagina web3). El promedio de edad en pacientes con LME es de 31.7 años, con mayor frecuencia entre 15 y 25 años de edad y predominio en el sexo masculino (relación 4:1, hombre: mujer). Las causas de LME son accidentes automovilísticos y actos de violencia, principalmente. Existe una tendencia que el paciente quede tetraplégico (lesión completa, 21%; lesión incompleta, 30%) que parapléjico (lesión completa, 26%; lesión incompleta, 23%). El costo durante la vida promedio del paciente es de 500,000 a 2 billones de dólares, dependiendo de la extensión y localización de la lesión. El costo directo total de cuidados a individuos con LME excede de los 7 billones de dólares por año en E.U.A. (pagina web3; McDonald y Sadowsky, 2002). El promedio de decesos por año es aproximado al 11%(DeVivo et al., 1999). Cuando todas las formas de tratamiento y todos los niveles de lesión se consideran, menos del 2% de pacientes con lesión inicialmente completa, llegan a caminar otra vez (Marino et al., 1999).

Las complicaciones originadas por una LME elevan el costo del tratamiento y la mortalidad. Existen complicaciones del tracto genitourinario, complicaciones respiratorias (particularmente neumonía y embolismo pulmonar), septicemia, suicidio, enfermedades cardiacas (De Vivo et al., 1999; pagina web3).

FISIOPATOLOGÍA DE LME.

La fisiopatología de la LME comprende tanto lesión primaria como lesión secundaria.

La *lesión primaria* es el trauma físico que provoca compresión, laceración o sección al tejido medular, rompiendo membranas de células neuronales y glias, vasos sanguíneos y se dañan axones (Lu et al., 2000; McDonald y Sadowsky, 2002). Posterior al trauma mecánico, se inicia una serie de procesos complejos denominados mecanismos de *lesión secundaria* que aumenta el daño al tejido medular conforme transcurre el tiempo. El daño al tejido vascular medular compromete el flujo sanguíneo, provocando *isquemia*, y *shock neurogénico* (caracterizado por bradicardia e hipotensión con resistencia periférica y capacidad cardíaca disminuida). Los sistemas autorreguladores del flujo sanguíneo cesan y el shock neurogénico desencadena una *hipotensión sistémica*, que empeora el proceso de isquemia (Tator, 1998; Amar y Levy, 1999; McDonald y Sadowsky, 2002).

Durante la isquemia se producen *radicales libres* derivados del oxígeno, que contribuyen al *estrés oxidativo* y que por diferentes mecanismos aumenta el daño al tejido medular (Amar y Levy, 1999; Liu et al., 2001).

La *alteración en el equilibrio iónico* celular provoca cambios en la polarización de la membrana que promueve excesiva liberación de aminoácidos excitatorios (AAE), como glutamato y aspartato (Agrawal y Fehlings, 1996) y promueve la acumulación de Na^+ y Ca^{2+} intracelular, provocando *peroxidación lipídica*, agregación plaquetaria, vasoconstricción y respuesta inflamatoria. Este proceso provocado por la liberación excesiva de AAE se denomina *excitotoxicidad* (Yanase et al., 1995; página web3; Lu et al., 2000) y puede prolongarse por la activación de receptores opioides μ , δ y κ (Olsson et al., 1995).

Por otra parte, el trauma al tejido medular puede averiar la barrera hematoencefálica y provoca la invasión de neutrófilos y macrófagos, así como la activación de la microglia residente. Éste grupo de células produce factor de necrosis tumoral α (TNF- α), enzimas líticas y radicales libres que dañan la glia, neuronas y vasos sanguíneos (Taoka y Okajima, 1998; Liu et al., 2001; Schwab y Bartholdi, 1996).

Por último, se ha documentado una forma más activa de muerte celular, denominada apoptosis, la cual puede desencadenarse por sustancias producidas (TNF- α , NO, óxido nítrico, liberación de citocromo c) por alguno o varios de los mecanismos descritos anteriormente (Sakurai et al., 1998; Eldadah y Faden, 2000, Lu et al., 2000, McDonald y Sadowsky, 2002).

Todos estos mecanismos destruyen sustancialmente el tejido medular. La reparación de la ME dañada es una tarea compleja que requiere de terapia de múltiples fases. Se han establecido tres conceptos de tratamiento de LME, neuroprotección, rehabilitación y neuroregeneración, cuya finalidad es proporcionar una mejor calidad de vida al paciente. A continuación se desarrolla el concepto de neuroregeneración, para establecer las bases por las cuales CsA puede ser neuroregenerador.

REGENERACIÓN.

Es importante enfatizar que el daño a los axones causa el mayor de los problemas asociados con LME, incluyendo pérdida del control motor y sensorial.

Brevemente, a los pocos días de la lesión primaria, las neuronas inmersas dentro de la ME, sufren un proceso paulatino de degeneración, el cual se puede dividir en las siguientes etapas: 1) el cuerpo celular sufre cromatolisis, 2) la porción de la fibra proximal a la lesión sufre degeneración primaria, y 3) la porción de la fibra distal a la lesión sufre degeneración secundaria o Walleriana (Murray y Kiernan, 1986; Noback y Demares, 1986; Ramon y Cajal, 1928). Posteriormente se lleva a cabo un proceso de organización y crecimiento, denominado "regeneración".

Se ha establecido que el SNC posterior a una lesión, puede regenerar, modificando tanto los factores *intrínsecos*, como *extrínsecos* (Raymond y Tuszinsky, 1999).

Entre los factores que se han modificado, con la finalidad de aumentar la regeneración, se encuentran 1) factores neurotróficos que aumenten la sobrevivencia celular, 2) reducción y compensación de desmielinización, 3) la neutralización de sustancias inhibitorias y 4) remplazamiento de células muertas.

La aplicación exógena de BDNF o NT4/5 (del inglés brain-derived neurotrophic factor y neurotrophin 4/5, respectivamente) 7 días después de la lesión del SNC, proporcionó a las neuronas soporte trófico y estimuló la expresión de BDNF (Kobayashi, 1998; Novikova et al., 2000). Así también, la aplicación local de NT-3 (Neurotrophin-3) promovió el crecimiento y regeneración a gran distancia de un tracto de fibras de la ME lesionada (Horner y Gage, 2000). Oudega y colaboradores demostraron que NGF (factor de crecimiento nervioso), promueve la regeneración de axones sensoriales lesionados situados en la ME de ratas adultas (Oudeja y Hagg, 1996 y 1999).

Por otra parte, la identificación de moléculas que inhiben la regeneración en el SNC adulto ha permitido la creación de agentes dirigidos contra esas sustancias. La inhibición de Nogo, un componente de la mielina, con un anticuerpo monoclonal denominado IN-1, produce una gran cantidad de fibras en regeneración y significativamente aumenta la recuperación funcional (Pagina web2; Brosamle et al., 2000; Weibel et al., 1994; Huang, 1999). Qiu por otra parte, demostró que aumentando los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos (cAMP), favorece el crecimiento de neuritas neutralizando MAG (del inglés myelin associated glycoprotein), el segundo agente inhibidor de regeneración proveniente de mielina (Qiu et al., 2002; pagina Web2). Bradbury y cols. promovieron sustancialmente el crecimiento axonal y la recuperación funcional en ratas con LME, aplicando condroitinasa bacteriana en el sitio de lesión (Bradbury et al., 2002). Se ha observado que el comienzo de la diferenciación de oligodendrocitos y la formación de mielina coincide con la disminución del proceso regenerativo (Schwab y Bartholdi, 1996), demostrado por Sávio y colaboradores que en 1990, lograron un crecimiento axonal de 4.5-6 mm por abajo del sitio de la lesión al eliminar a los oligodendrocitos de la zona de lesión. Recientemente se ha postulado a Bromuro de Etidio como una alternativa para eliminar la formación de la cicatriz glial, así como un derivado de colesterol, 7 β -hidroxicolesteril- oleato

para reducir hipertrofia o el uso de vectores para reducir la hiperplasia (Giménez y Ribotta et al., 2002).

Otro intento para reparar la médula espinal lesionada, ha sido el uso de trasplantes de células, tejido neural y material inerte al sitio de lesión, cuya finalidad es modificar los fenómenos de regeneración. Se han realizado trasplantes de segmento de nervio periférico (Bunge, 2001), tejido fetal homotópico (Gelderd et al., 1990) y heterotópico (Stokes y Reier, 1992), motoneuronas (Demierre et al., 1990), células gliales (células del epéndimo y astrocitos; Ramón-Cueto et al., 2000), neuronas (Bjorklund et al., 1987; Demierre et al., 1990), guía y soporte trófico para el crecimiento y conectividad axonal (Bjorklund et al., 1987), entre otros.

Recientemente, Bunge y colaboradores transplantaron células de Schwann en una matriz artificial en ME con sección completa, demostrando crecimiento axónico (Bunge et al., 1995), y cuando se suplementó con factores neurotróficos, se observó restauración parcial de la función motora (Xu et al., 1999). Otros estudios han mostrado que el trasplante de células envueltas olfatorias es capaz de soportar la regeneración de axones a través de la región transplantada y que este crecimiento está asociado con recuperación electrofisiológica y funcional (Ramón-Cueto et al., 2000; Lu et al., 2002).

Por otra parte, el tejido de SNC fetal puede favorecer la regeneración por diferentes mecanismos. Coumans y colaboradores, así como Bregman, demostraron que el trasplante de tejido fetal de ME y aplicación de factores neurotróficos (BDNF y NT-3) hasta después de 2 semanas, incrementa sustancialmente la cantidad de axones en regeneración y la recuperación de la función motora (Coumans et al., 2001; Bregman et al., 2002). La tendencia al uso de trasplante de tejido fetal de SNC no solo será como un soporte, sino será una fuente que proporcione nuevas neuronas.

Una interesante alternativa para inducir regeneración, la proporcionan tanto células no neuronales y neuronales modificadas genéticamente, como las "stem cells". Blesch usó fibroblastos modificados genéticamente para expresar NGF

dependiente de tetraciclina y observó crecimiento axonal, pero no se asoció a una recuperación funcional (Blesch et al., 2001). Grill y colaboradores, por otra parte, transplantando células genéticamente modificadas para secretar NT-3, no solo observaron crecimiento axónico, sino que además se obtuvo recuperación de la función motora (Grill et al., 1997).

Las "células stem" son la tendencia actual de reparación de ME lesionada mediante trasplantes. McDonald y colaboradores trataron células stem embrionarias de ratón con ácido retinoico, para restringir su diferenciación hacia la línea celular neural. Dichas células fueron transplantadas en la ME lesionada y observaron que las ratas lesionadas mostraban un aumento en la recuperación motora comparado con el grupo sham (McDonald et al., 1999 y 2002). El uso de una clona de célula stem neural de ratón acoplado a un polímero sintético biodegradable en un modelo de hemisección, también resultó en aumento de recuperación funcional, probablemente atribuido a la reducción de los efectos de la cicatriz glial de las células transplantadas. (Teng et al., 2002).

Una serie de métodos para aumentar la regeneración están en evaluación clínica, entre los que se incluyen, transferencia de tendones (McDonald y Sadowsky, 2002), estimulación eléctrica funcional (Shen y Wang, 1999). Algunos fármacos también han sido utilizados para promover la regeneración. Entre ellos podemos mencionar al clenbuterol que es un agonista de los receptores β_2 adrenérgicos. Este fármaco al estimular dichos receptores, promueve la expresión de diversos factores tróficos y con ello la regeneración (Zeman et al., 1999). El macrólido FK-506, es un inmunosupresor que ha demostrado promover la regeneración axonal (Madsen et al., 1998). Por otra parte, la ciclosporina A es otro inmunosupresor que por su mecanismo de acción, podría ser capaz de promover la regeneración después de una LME.

CICLOSPORINA-A

GENERALIDADES.

El descubrimiento de la Ciclosporina-A (CsA) revolucionó la terapia en el trasplante de órganos sólidos, ya que es una alternativa a fármacos inmunodepresores citotóxicos. El uso de este inmunosupresor en varias enfermedades demuestra su potencial para contrarrestar la alteración en el sistema inmune, mejorando las condiciones tanto de animales como de pacientes a nivel experimental. Actualmente CsA se usa ampliamente en investigación básica (Guo et al, 2001).

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FARMACODINÁMICAS.

CsA es un fármaco compuesto de 11 aminoácidos, es cíclico y de carácter lipofílico, de carga neta neutra, con un peso molecular de 1,200 D. Este inmunosupresor es producido y aislado del hongo Tolypocladium inflatum Gams (Kahan, 1989; Borel et al., 1996). Previos estudios han revelado que CsA bloquea la activación de células T, y que en parte es, por la inhibición de transcripción de linfocinas, particularmente interleucina-2 (IL-2), principal factor de crecimiento de células T (Borel et al., 1996; Dunn et al., 2001; Hutchinson et al., 1998).

El mecanismo actual de inmunosupresión por CsA (Figura 5) sugiere que, una vez que los antígenos extraños expuestos en la superficie de células presentadoras de antígenos activan los receptores de células T, inicia una vía que produce un aumento de $[Ca^{2+}]_i$. El incremento de Ca^{2+} modifica la subunidad reguladora B de Calcineurina (fosfatasa treonina/serina dependiente de calcio y calmodulina, CaN) y hace que Calmodulina (CaM), se una al sitio catalítico A de CaN, activando esta última y realizando su función: defosforila el componente citoplásmico del factor de transcripción nuclear de las células T (NF-ATc), permitiendo que pueda trasladarse al núcleo, donde se unirá al componente nuclear del NF-AT y promoverá la transcripción del gen de la Interleucina-2 (IL-2) y de su receptor (Borel et al., 1996; Halloran et al., 1999).

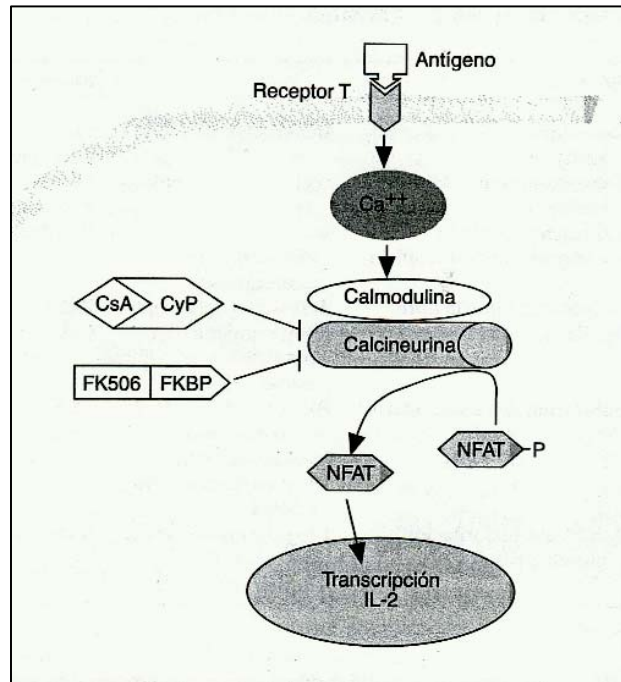


FIGURA 5.- Mecanismo inmunosupresor de CsA (Guo et al, 2001).

Cuando se administra CsA, este fármaco cruza la membrana celular de la célula T por afinidad, se une principalmente a ciclofilina A (CyPA), una inmunofilina con actividad isomerasa, formando el complejo CsA-CyPA. Este complejo se une al sitio catalítico A de CaN, resultando en la inhibición no competitiva de la fosfatasa y evitando la defosforilación del NF-ATc (Erlanger, 1992; Zav'yalov et al., 1995; Borel et al., 1996; Halloran y Batiuk, 1997; Abbas, et al., 2000).

PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS DE CsA.

Posterior a una dosis oral, la *absorción* de CsA se realiza en la parte superior del tracto gastrointestinal (GI), sin absorción aparente del colon. Posterior a la absorción o administración intravenosa, sufre una *distribución* extensa en tejidos y líquidos corporales (volumen de distribución de 3-5L/Kg.). La mayoría de CsA circulante se une a proteínas plasmáticas, especialmente a lipoproteínas. Su distribución en sangre total es dependiente de dosis, con 33-47% de CsA permaneciendo en plasma, 4-9% en linfocitos, 4-12% en granulocitos y 41 a 58% en

eritrocitos. El *metabolismo* de CsA se lleva a cabo por el sistema enzimático hepático citocromo P (CYP4503A) y, en menor grado, en el tracto GI y riñón. Su biotransformación comprende hidroxilación y desmetilación, manteniendo la estructura cíclica. La *eliminación* se lleva a cabo por bilis y solo el 6% de cada dosis es excretada por orina (Dunn et al., 2001; Kahan, 1989; Faulds et al., 1993).

EFICACIA TERAPÉUTICA Y EFECTOS ADVERSOS.

CsA ha mostrado efectividad en un amplio rango de enfermedades como soriasis, mejora de síntomas en cuadros asmático, inhibe la resistencia celular a medicamentos anticancerígenos, inhibe la replicación del virus de VIH-1, actividad antifúngica, antiparasitaria, mejora el padecimiento de varias enfermedades como miastenia gravis, cirrosis biliar, entre otras (Borel et al., 1996; Faulds et al., 1993).

El primer efecto adverso limitante de dosis de CsA es *nefrotoxicidad*, el cual se presenta como una disminución reversible de la tasa de filtración glomerular. Por otra parte, se ha documentado *hipertensión* en más del 50% en pacientes con trasplante renal y *síntomas neurológicos* que incluye dolor de cabeza, temblor, parestesia y convulsiones. Otros efectos adversos asociados con CsA incluye la disfunción hepática relacionada con la dosis (principalmente coléctasis), hiperkalemia, hiperuricemia, hiperlipidemia, hirsutismo, hiperplasia gingival, intolerancia a la glucosa y alteraciones a nivel GI. Recientemente, se han reportado proceso de leucoencefalopatía, en pacientes con terapia de CsA (Borel et al., 1996; Dunn et al., 2001; Dawson, 1996).

CICLOSPORINA-A Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

El efecto neuroprotector de CsA en el SNC se ha establecido en diferentes estudios experimentales. El mecanismo para ejercer neuroprotección es similar al mecanismo inmunosupresor. El complejo CsA-CyPA inhibe CaN, en presencia de un incremento de $[Ca^{2+}]_i$. Esta acción disminuye la reacción inflamatoria en el sitio de lesión por el mecanismo descrito anteriormente (Sherry et al., 1992; Hendey and Maxfield, 1993), reduce la lipoperoxidación y activación de apoptosis acompañada

de cierta recuperación clínica (Díaz-Ruíz et al., 1999 y 2000; Guo et al., 2001; Wang et al., 1999). Así también CsA inhibe la muerte celular bloqueando la transición de permeabilidad mitocondrial y manteniendo la homeostasis energética, pero dicho efecto no se refleja en la recuperación motora y es dependiente de dosis (Okonkwo et al., 1999; Sullivan et al., 2000; Dumont et al., 2001).

Por otra parte, la propuesta que CsA tenga un efecto neuroregenerador en el SNC es apoyado por varios hallazgos. En 1993, Teichner et al., demostró que el tratamiento con CsA, a 15 días, era capaz de promover regeneración axonal en la ME dañada, aunque no se acompañó con signos de recuperación funcional (Teichner et al., 1993). Posteriormente este mismo grupo de investigadores demostraron que el tratamiento con CsA, a animales con sección completa, durante 30 días, al mismo tiempo que reducía la reacción auto inmune contra componentes del SNC de axones, se observaba una recuperación parcial de la función motora (Palladini et al., 1996). En otro estudio, CsA ha sido capaz de estimular la expresión de BDNF después de un proceso de isquemia en el SNC, y este poderoso factor neurotrófico puede estimular la regeneración del tejido nervioso (Miyata et al., 2001). Un estudio interesante realizado por Sugawara y cols., demostró que la administración de CsA y FK506 durante 30 días, en un modelo de sección de raíz dorsal, promovía la regeneración de axones de raíz dorsal en la médula espinal (Sugawara et al., 1999). El efecto neuroregenerador de FK506 ha sido evidente en diversos estudio y ha involucrado a una fosfoproteína, GAP-43, como una molécula importante en la elongación de los conos axonales (Gold et al., 1995; Madsen et al., 1998; Guo et al., 2001). Es importante señalar que la acción neurotrófica que presenta FK506, es debida a su ligando intracelular, las inmunofilias (FKBP12, particularmente), las cuáles se presentan en mayor cantidad en el sistema nervioso central que en el sistema inmune.

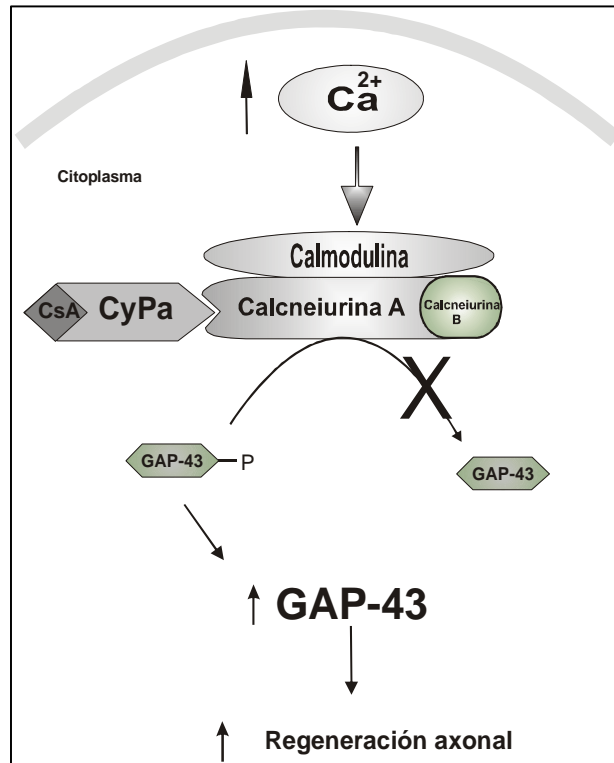


FIGURA 6.- Mecanismo regenerador propuesto para CsA (Udina y Navarro, 2002).

Considerando lo anterior, se propone que CsA pueda tener el mismo efecto neuroregenerador, es decir, que CsA se una a CyPA y el complejo resultante ejerza el efecto neurotrófico por dos mecanismos: 1) al igual que FK506, aumente la expresión de GAP-43, y 2) que el complejo CsA-CyPA se una a CaN, inhibiéndola, y evitando que defosforile a GAP-43, manteniendo un estado activo propicio para la regeneración axonal (Figura 6).

PROTEÍNA ASOCIADA AL CRECIMIENTO (GAP-43).

GENERALIDADES

GAP-43, inicialmente, fue hallada como una fosfoproteína sináptica en experimentos en busca de proteínas blanco reguladas por calcio y varios péptidos, y la denominaron B-50. Posteriormente, se encontró que esta proteína esta involucrada en procesos como regeneración axonal (GAP-43; GAP-48), componentes de los conos de crecimiento (pp46), plasticidad sináptica (F1) y unida a calmodulina (P-57 o neuromodulina). Experimentos de clonación molecular demostraron que esas proteínas aisladas eran la misma molécula. Se piensa que es la molécula clave en la regulación del crecimiento axonal (Skene, 1989; Strittmater et al., 1991; 1992) y es esencial para la prevención de apoptosis posterior la axotomía. En diferentes modelos de LME se ha reportado elevación significativa en los niveles de GAP-43 y de su ácido ribonucleico mensajero (ARNm), a partir del primer día y hasta cuatro semanas poslesión en diferentes poblaciones neuronales localizadas en torno a la zona de lesión (Curtis et al., 1993; Alonso et al., 1995).

ESTRUCTURA MOLECULAR Y EXPRESIÓN.

El gene que codifica la molécula de GAP-43 comparte por lo menos 50kb en el cromosoma 3 del humano y en el cromosoma 16 del ratón. Existen dos promotores de transcripción P1 y P2, pero se ha demostrado que el promotor P2 es el más activo *in vivo*, y el ARNm que origina contiene tres exones (exón: región del ADN capaz de traducirse a proteína) ampliamente separados cuya combinación de los mismos es aproximadamente 1.5 kb de longitud (Benowitz and Routtenberg, 1997). El primer exón contiene la región 5-UTR (región de reconocimiento) y codifica para los primeros 10 aminoácidos, el cual comprende el dominio de unión a la membrana y el dominio activador de G_o y $G_{i\alpha 1}$ (Arni et al, 1998). El segundo exón comprende la mayor codificación de la proteína e incluye la región de unión a CaM y el sitio de fosforilación por proteína cinasa C (PKC). El tercer exón codifica

el extremo carboxilo terminal de la proteína que contiene una secuencia afín que probablemente interacciona con componentes del citoesqueleto (Coggins and Zwiers, 1991; Karns et al., 1987). En diferentes especies, el ARNm se traduce en una proteína de 198 a 238 aminoácidos de longitud. En la rata, la proteína se compone de 226 aminoácidos, de los cuales el 25% son aminoácidos “ácidos” (25%) y alanina (17%), pero con pocos residuos hidrofóbicos (Coggins y Zwiers, 1997). Esta proteína es estable al calor y tiene un peso molecular verdadero de 23.6 kDa, pero en electroforesis de proteínas tiene un peso molecular aparente de 40 - 60 kDa, dependiendo de la composición del gel (Coggins y Zwiers, 1991). Dicho comportamiento es resultado de varios factores como: la forma de la proteína, pobre unión a dodecil sulfato de sodio (SDS), polimerización de la proteína o posible formación de un tetramero, y modificaciones posterior a su síntesis (Alonso et al., 1995).

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y SÍNTESIS DE GAP-43.

La expresión del gene de GAP-43 es restringida a células nerviosas, y es regulada por glucocorticoides, estrógenos y andrógenos. En recientes investigaciones se ha descubierto el regulador del gen de GAP-43. Este regulador, denominado E-box 1 es un miembro de la familia de los factores de transcripción perteneciente. Se encuentran 7 reguladores adyacentes al promotor de GAP-43, y solo uno, E1, se ve favorecido para ejercer la regulación. Las proteínas de unión ME1a y E12 se unen a E1 como un homodímero y reprimen la actividad de P2, con lo que se demuestra el control negativo por medio de proteínas de unión a E-box (Benowitz y Routtenberg, 1997).

La regulación pos- transcripcional involucra la estabilidad de mRNA. El factor de crecimiento nervioso (NGF) incrementa dos o tres veces la vida media de ARNm de GAP-43. Dicho mecanismo involucra la unión de tres proteínas en la región 3-UTR de dicho ARNm mediada por un mecanismo dependiente de PKC (Perrone-Bizzozero et al, 1993).

Una vez favorecida la transcripción de GAP-43 la síntesis se lleva a cabo en el cuerpo celular de la neurona. Recién sintetizada, se asocia en un compartimiento membranoso y llega al aparato de Golgi, ahí se empaqueta en vesículas y es transportada hacia las terminales presinápticas a una velocidad de 400 mm/día (Verkade et al, 1996).

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS.

Las modificaciones pos-traslacionales que sufre GAP-43, hacen que sea una molécula clave y reguladora en varios mecanismos de señalización en los conos de crecimiento. Para llevar a cabo tales funciones, posee algunas características en su estructura:

- GAP-43 se une intracelularmente, y de manera reversible, a la membrana citoplásmica a través de su región N-terminal. La interacción involucra la esterificación de los residuos aminoácidos Cisteína 3 y Cisteína 4 (Cys3 y Cys4) con el ácido palmítico de la membrana celular (Arni et al., 1998).
- A nivel de citoesqueleto, se ha demostrado cierta asociación de GAP-43 con la proteína F-actina a través de una región no conocida en el extremo C-terminal, y se ha sugerido cierta influencia de GAP-43 en el crecimiento de las terminales presinápticas (Caroni, 2001; Laux et al, 2000).
- Aunque la mayor cantidad de la proteína se encuentra unida a la membrana y al citoesqueleto (Qin et al, 1997), existe una pequeña cantidad libre en el citoplasma. Esta forma soluble, indiscutiblemente, es la que presenta mayor actividad. Para tal efecto, GAP-43 sufre fosforilación por la enzima PKC siendo el residuo Ser41 el sitio de mayor importancia biológica (dominio efector, DE). Se ha demostrado *in vitro* que GAP-43 puede ser fosforilada por la enzima caseína cinasa II (CKII) en el aminoácido S192 y S193 y en menor grado en los sitios T88, T89 y T95. El proceso de fosforilación se incrementa por la $[Ca^{++}]$ i, diacilglicerol y análogos, fosfatidilserina, esteroides de forbol y ácido araquidónico. GAP-43 fosforilada en el ED o la incorporación de aminoácidos de carga negativa en el mismo, altera la

interacción con fosfoinosítidos, afectando el crecimiento y direccionamiento axonal (Benowitz et al., 1987; Dent y Meiri, 1998).

- De manera inversa y bajo ciertos estímulos, GAP-43 fosforilada es sustrato de fosfatasa independientes de Ca^{2+} que están asociadas con la membrana (tipo 1 y 2A), y por CaN, una fosfatasa dependiente de CaM y Ca^{2+} .
- El proceso de defosforilación favorece la interacción con CaM, con alta afinidad a baja $[\text{Ca}^{2+}]$. CaM se une a GAP-43 en un dominio el cual comienza en isoleucina y glicina antes de Ser41 y se extiende aproximadamente 10 aminoácidos hacia el extremo C-terminal (Neve et al, 1998). Dicha unión se altera por fosforilación de GAP-43 o por aumento de $[\text{Ca}^{2+}]$. Varios investigadores han propuesto que GAP-43 "secuestra" a CaM en sitios cercanos a las membranas de las terminales nerviosas, y liberarlas como respuesta a segundos mensajero que resulta en la fosforilación de GAP-43 (Tejero-Diez et al, 2000).
- Adicionalmente, la porción N-terminal de esta proteína, estimula el intercambio GTP/GDP en la subunidad α de las proteínas de unión a GTP, G_o y $G_i\alpha_1$. Los primeros 10 aminoácidos de GAP-43 activan G_o y $G_i\alpha_1$ estimulando la unión de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ a G_o y así disparando el sistema de segundo mensajero intracelular (Tejero-Diez et al, 2000; Aarts et al, 1998).
- Recientemente, se ha demostrado que GAP-43 sufre ribosilación-ADP en los aminoácidos 3 y 4 (C3 y C4), y probablemente en menor grado en 211 o 225 (R211 o H225). Se piensa que dicho proceso regula la transducción de señalización donde participa la proteína G (Coggins et al 1993).

JUSTIFICACIÓN.

Considerando la interacción entre Ciclosporina A (CsA) y Calcineurina (CaN), se propuso que CsA sea capaz de promover al mismo tiempo neuroprotección y regeneración neural en modelos de lesión de médula espinal. Algunos estudios anteriores demostraron el efecto regenerador de la CsA sobre el tejido medular 30 días después de la lesión (Palladini et al., 1996); sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado el efecto regenerador de este inmunosupresor a largo plazo. Ya que el beneficio de proveer por mayor tiempo las condiciones favorables para la regeneración neural podrían brindar una mejor perspectiva de recuperación neurológica en el individuo lesionado. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de CsA sobre la regeneración axonal 90 días después de una LME, así como el efecto de dicho fármaco sobre la expresión de GAP-43 como marcador de regeneración neural.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. ¿La CsA promueve el crecimiento axonal en la zona de lesión de animales sometidos a un tratamiento a largo plazo?
2. ¿La CsA incrementa la expresión de GAP-43 después de una LME?

HIPÓTESIS

1. La CsA administrada a largo plazo promoverá una mejor regeneración axonal, en la zona de lesión después de una LME.
2. La CsA incrementará la expresión de GAP-43 después de una LME.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto de CsA administrada a largo plazo sobre la regeneración de la médula espinal sometida a una sección completa.

Objetivos Particulares

1. Evaluar el efecto de CsA sobre la densidad de axones que crucen el área de lesión de la médula espinal.
2. Evaluar el efecto de CsA sobre la cantidad relativa de GAP-43 en la médula espinal sometida a sección completa.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

En la investigación realizada se utilizó un total de 44 ratas adultas de la cepa Sprague Dawley, entre 200 y 250g de peso, las cuáles se dividieron para realizar 3 experimentos de acuerdo a los siguientes esquemas:

	EXPERIMENTO I		
GRUPO EXPERIMENTAL	CANTIDAD DE ANIMALES	TIEMPO DE EVALUACIÓN	MÉTODO O TÉCNICA
Grupo I (lesión +CsA)	10	90 días	Densidad de axones que atraviesen el sitio de lesión y lleguen al muñon distal.
Grupo II (lesión + Vehículo)	10	90 días	

TABLA 1.- Distribución de animales por grupo y duración del experimento I.

	EXPERIMENTO II		
GRUPO EXPERIMENTAL	CANTIDAD DE ANIMALES	TIEMPO DE EVALUACIÓN	MÉTODO O TÉCNICA
Grupo I (lesión +CsA)	3	10 días	Cantidad relativa de GAP-43 por inmunoelectrotransferencia (IET).
Grupo II (lesión + Vehículo)	3	10 días	
Grupo III (laminectomía +CsA)	3	10 días	
Grupo IV (laminectomía +Vehículo)	3	10 días	

TABLA 2.- Distribución de animales por grupo y duración del experimento II.

	EXPERIMENTO III		
GRUPO EXPERIMENTAL	CANTIDAD DE ANIMALES	TIEMPO DE EVALUACIÓN	MÉTODO O TÉCNICA
Grupo I (lesión +CsA)	3	10 días	Localización de GAP-43 en la zona de lesión.
Grupo II (lesión + Vehículo)	3	10 días	
Grupo III (laminectomía +CsA)	3	10 días	
Grupo IV (laminectomía +Vehículo)	3	10 días	

TABLA 3.- Distribución de animales por grupo y duración del experimento III.

DEFINICIÓN DE VARIABLES

Variables independientes

Lesión de médula espinal (LME): Daño ocasionado por el corte total transversal de la médula espinal realizado por tijeras de microcirugía, dando como consecuencia que el animal quede parapléjico.

Administración de CsA: Aplicación de CsA, poslesión, de acuerdo a la siguiente estrategia de administración (Ibarra et al, 1996): 2.5 mg/Kg. de peso del animal cada 12 horas durante las 72 horas posteriores a la lesión, por vía intraperitoneal (ip). Cumplido el tiempo antes mencionado, se administrará por vía oral (vo) 5 mg/Kg. de peso del animal cada 12 horas, hasta el término de 90 días.

Variables dependientes

Presencia de axones: Número de axones por área en un corte longitudinal que crucen el sitio de lesión.

Densidad relativa de GAP 43 en inmunoelectrotransferencia. Densidad de la banda obtenida cuantificada mediante densitometría.

PROCEDIMIENTOS GENERALES

Lesión de médula espinal.

Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (77.5 mg/Kg.) y clorhidrato de xilacina (12.5 mg/Kg.), se realizó tricotomía entre la región torácica y lumbar y posteriormente asepsia y antisepsia de dicha región.

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron con material e instrumental quirúrgico estériles. Se realizó una incisión sagital en piel, seguida de disección de los músculos paravertebrales de las apófisis espinosas y separación del periostio de las láminas vertebrales. Al completar lo anterior se extirparon dos apófisis espinosas (T8 y T9). Finalmente se realizó la laminectomía de un solo nivel (T9) lo que permitió una visualización completa de la médula espinal. Al concluir el

proceso anterior, si el animal correspondía al grupo de laminectomía, el siguiente paso fue suturar en dos planos la incisión con dermalon cinco ceros; si el animal correspondía al grupo de lesión, mediante ganchos de microcirugía se hizo pasar una sutura dermalon 6 ceros por debajo de la médula espinal, posteriormente se realizó la sección con tijeras de microcirugía (quedando separados dos muñones (proximal, el extremo mas cercano al encéfalo y distal, el extremo mas lejano al encéfalo). Seguido de este paso se jaló la sutura, corroborando la sección completa. Posterior a ello, la incisión quirúrgica se suturó en dos planos con dermalón cinco ceros. Finalmente, las ratas fueron introducidas en una unidad de cuidados intensivos para animales pequeños con temperatura controlada de 25°C.

Cuidados postoperatorios.

Todos los animales recibieron el mismo tipo de alimentación y cuidados generales, colocándose en jaulas individuales con aserrín estéril. El intestino y la vejiga neurogénicos se manejaron por vaciamiento manual 2 veces por día mientras fue necesario.

Sacrificio y obtención de tejido medular.

Al completarse los diez y noventa días poslesión, los animales fueron anestesiados; 5 minutos antes de su sacrificio se les aplicó una dosis intraperitoneal de 1000 UI de heparina. Posteriormente se les practicó una toracotomía amplia, canulándose la aorta a través del ventrículo izquierdo. A través de una bomba peristáltica (Masterflex; Cole-Parmer Inst. Co. Chicago Il), a los animales de los experimentos I y III se perfundieron 100 mL de solución salina isotónica seguido de 400 mL de paraformaldehído frío al 4%. A los animales del experimento II sólo se perfundieron 100 mL de solución salina isotónica. Al final del procedimiento se extrajo 1.0 cm de la ME, con la zona de lesión en el centro de dicho fragmento.

Histoquímica de tejido medular (Método de Siever Munger; Heffess y Mullick, 1992).

Preparación del tejido medular.

El tejido medular obtenido de los animales destinados al experimento I permanecieron en el mismo fijador un día más. Posteriormente fueron deshidratadas gradualmente en alcohol (alcohol etílico al 50%, 70%, 80%, 95% y alcohol absoluto), hasta llegar a dos baños de xilol para aclarar el tejido (con duración de 30 minutos cada baño). El extremo proximal se marcó con tinta china y se envolvió en papel poroso (cebolla) debidamente identificado. Se embebió en parafina a 60°C dentro de la estufa durante 2 horas y posteriormente se incluyó en un molde metálico; se colocó el cartucho - plástico de sujeción y se dejó enfriar a 4°C. Luego se colocó el bloque de parafina en la platina del criostato y se realizaron cortes secuenciales longitudinales de 7 μ de espesor hasta el epéndimo. Una vez llegado a éste, se recogieron los cortes y se montaron sobre laminillas de vidrio previamente tratadas con solución de poli-L-lisina y se almacenaron a temperatura ambiente hasta el momento que se procesaron.

Tinción de Plata (Método de Sevier- Munger para tejido neural, Heffess y Mullick, 1992)

1. Las laminillas y la solución de AgNO_3 al 20% se colocaron en la estufa a 56°C durante 20 minutos.
2. Posteriormente se hidrató el tejido pasándolo sucesivamente en xilol, diluciones graduales de alcohol (100%, 95%, 80%, 70% y 50%) hasta agua destilada.
3. Se colocaron las laminillas en la solución de AgNO_3 al 20% por un periodo de 15 minutos.
4. Se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en un vaso de Coplin, el cual contenía solución de AgNO_3 amoniacal.
5. Las láminas se dejaron entre 5 y 30 minutos en movimiento hasta que se desarrolló un color café dorado el cuál se determinó, sin lavar, por medio del microscopio.

6. Corroborada la intensidad de la reacción, se enjuagaron las laminas 3 veces en agua destilada y se sumergieron en sol. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 5% por 2 minutos.
7. Por último, se lavaron con agua destilada, se deshidrato nuevamente el tejido y se montó en medio resinoso.
8. Las laminillas procesadas se observaron y analizaron bajo microscopía óptica a un aumento de 4X y 10X, de manera aleatoria.
9. Las observaciones bajo microscopio se fotografiaron para su posterior análisis y determinación de densidad de axones.

Inmunofluorescencia.

Preparación del tejido medular.

El tejido medular de todos los grupos experimentales y de los controles destinado a este experimento (III), permaneció un día más en el fijador. Posteriormente se retiraron las meninges, se colocaron en una solución de sacarosa al 30%, y permanecieron por lo menos seis días. En el momento de su proceso, se cortó 1 cm de tejido medular, conteniendo el sitio de lesión en el centro, se separó la parte proximal de la distal exactamente en el sitio de lesión y por este extremo se colocaron en una plancha de criostato a $-25\text{ }^\circ\text{C}$. Se cubrieron con Tissue Teck y una vez congelado el tejido se realizaron cortes de $20\mu\text{m}$. Se eliminaron los primeros 50 cortes y se recogieron cortes secuenciales en laminillas previamente tratadas con solución de gelatina al 0.5%. Los cortes por congelación se mantuvieron a 4°C hasta el momento que se procesaron.

Técnica de Inmunofluorescencia.

1. Se preparó anticuerpo anti-GAP-43 $\text{IgG}_{2\text{ak}}$ de ratón (Zymed, CA) a una concentración de $2.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ en solución de bloqueo.
2. Se colocaron las laminillas de cada grupo experimental, debidamente identificadas, así como laminillas de tejido de cerebro de neonato (como control positivo) en cámara húmeda y se adicionó el anticuerpo anti-GAP-43. Se realizó un control negativo colocando a las laminillas de cada grupo experimental,

solución de bloqueo o un anticuerpo anti-cisticerco IgG a la misma dilución. Se incubaron durante 1 hora en agitación suave.

3. Se preparó el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra contra IgG de ratón acoplada a FITC (del inglés fluorescein isothiocyanate; Zymed, CA) a una dilución 1:100 con solución de bloqueo. Se mantuvo a 4-6 °C.
4. Culminado el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se eliminó por decantación éste y las laminillas se enjuagaron con PBS-Tween 20 al 0.05%, pH 7.2 (buffer de lavado). Se lavaron 3 veces con el mismo buffer, cada 5 minutos en agitación.
5. Se eliminó el exceso de líquido a las laminillas y se aplicó el anticuerpo secundario. Se incubó durante una hora en cámara húmeda y en agitación suave. En todo momento se protegieron de la luz.
6. Posteriormente se realizó el enjuagado y lavado ya descrito.
7. Nuevamente se eliminó el exceso de líquido y se aplicó una solución de Yoduro de Propidio 1:500 (para teñir el núcleo de rojo y visualizar su localización), permaneciendo ésta durante 5 minutos.
8. Pasado ese tiempo se enjuagó con el buffer de lavado y se cubrieron las laminillas con medio de montaje (Vecta Shield) y se sellaron.
9. Las laminillas permanecieron a 4-8°C y protegidas de la luz hasta su observación.
10. Posteriormente se observaron todas las laminillas por microscopia confocal. Se obtuvieron imágenes de los diferentes grupos experimentales y se guardaron en disco compacto para su posterior análisis.

Inmunoelectrotransferencia.

Preparación de la muestra.

Inmediatamente de obtener 1 cm de la médula espinal, teniendo como centro el sitio de lesión, se retiraron las meninges y se registro su peso. Para obtener el tejido control destinado para este procedimiento, se decapitó una rata neonato de 7 días y

se extrajo una porción del cerebelo. Posteriormente, por cada μg de peso de tejido medular o cerebral, se adicionó 10 μL de buffer de lisis y se sonicaron las muestras, manteniendo éstas sumergidas en hielo durante el proceso, hasta formar una suspensión homogénea. Se centrifugaron a 14,000 r.p.m. durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y por cada μg de peso inicial de tejido se adicionó un μL de SDS al 10% y 9 μL de buffer de lisis. Se homogenizaron las muestras y se colocaron en un baño de agua a 96°C durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 r.p.m. durante 5 minutos y se separó el sobrenadante del sedimento. Al sobrenadante se cuantificó proteínas por el método de Bradford (MR). En tubos Eppendorf se colocó el volumen necesario para obtener 50 mg de muestra y se mezcló con el mismo volumen de buffer de digestión, en condiciones reductoras. Se hirvieron las muestras 2- 5 minutos.

Electroforesis de proteínas (Laemmli, 1970).

1. Se ensamblaron las placas de vidrio para preparar el gel separador de poliacrilamida/bisacrilamida al 12% y el gel concentrador al 5%, suficiente para 10 carriles.
2. Una vez polimerizado el gel, se ensambló la cámara, se llenó con buffer de corrida y se aplicó todo el volumen de las muestras previamente tratadas, considerando que se parten de 50 mg de proteína. En cada gel se colocó un estándar de peso molecular y un control positivo (cerebro de neonato de rata, misma cantidad de proteína) para GAP-43.
3. Se conectó la cámara a la fuente de poder y se ajustó la corriente a 200 volts constantes. La electroforesis se detuvo hasta que el frente iónico estuvo a medio centímetro del final de la placa.

Electrotransferencia (Towbin et al, 1979).

1. Una vez terminada la electroforesis, el gel, fibras Scotch, papeles filtro y la membrana de nitrocelulosa (NC) se colocan en buffer de transferencia antes de realizar el proceso. Este proceso se realizó usando guantes de látex.

2. Se colocó correctamente el sistema (fibra Scotch-papel filtro-gel-membrana de NC-papel filtro-fibra Scotch) en el cassette para electrotransferencia y éste se insertó en el contenedor.
3. Se llenó el tanque del sistema con buffer de transferencia y se colocó el contenedor y un anticongelante. Se tapó el sistema y se conectaron los electrodos correctamente a la fuente de poder. Se transfirió durante una hora a 100 volts.
4. Terminado el tiempo se tomó la membrana de NC, se cortó el carril correspondiente a los marcadores de peso molecular y se sumergió en una solución Amido - Black, para corroborar el proceso de electrotransferencia. La membrana de NC con muestras se coloca en solución de bloqueo y se incuba durante toda la noche.

Inmunodetección.

1. Antes de comenzar el proceso, se preparó una solución de anticuerpo de ratón anti-GAP43 (1 µg/mL) en solución de bloqueo.
2. Transcurridas 10 horas como mínimo, se eliminó la solución de bloqueo y se enjuagó 3 veces y se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 al 0.05%, 5 minutos cada uno en agitación continua.
3. Se eliminó el exceso de líquido y se adicionó la solución del anticuerpo anti - GAP-43. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente en agitación continua.
4. Posteriormente se eliminó la solución por decantación, se enjuagó 3 veces con PBS-Tween 20 al 0.05% y se lavó con la misma 7 veces, 10 minutos cada uno en agitación continua.
5. Durante el tiempo de lavado se preparó la solución de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón - peroxidasa (Santa Cruz, CA) a una dilución 1:200 en solución PBS - Tween 20 al 0.05%. Previo a su uso se mantuvo a 4 - 6 °C.
6. Se eliminó el exceso de solución y se adicionó la solución de anticuerpo secundario. Se incubó 90 minutos a temperatura ambiente en agitación continúa.

7. Terminado el tiempo, se lavó la membrana como se describió en 4. Se eliminó el exceso de líquido y se adicionó la solución reveladora. Posteriormente, se adicionó 20 μ L de peróxido de hidrógeno y se agitó suavemente hasta que se observaron bandas. La reacción se detuvo con agua destilada y se dejó secar.
8. Una vez secas las membranas, se determinó el peso molecular aparente de las bandas obtenidas tanto de muestras como del control. Por último se determinó la densidad relativa de las bandas por medio de un analizador de imágenes mediante el software Total Lab Control Center versión 1.0, tomando como referencia la densidad en píxeles (un píxel es uno de miles de puntos que forman una imagen generada por un equipo) de la banda producida por 50 mg de proteína proveniente de tejido rico en GAP-43 (control positivo).

DISEÑO ESTADÍSTICO.

Para el análisis de los resultados cuantitativos se realizó estadística descriptiva, se calcularon promedios o medianas según fue el caso. Los resultados se sometieron a un examen de normalidad que determinó el tipo de prueba a utilizar, si la distribución de los valores presentó una distribución normal se utilizó ANOVA; en caso contrario si la distribución no fue normal se utilizó una prueba no paramétrica (Kruskal Wallis). Todos los procedimientos de análisis estadístico se resolvieron a través del paquete estadístico computarizado Prisma GraphPad versión 3.03.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente trabajo tomó en cuenta para su ejecución, los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación de Salud (título Séptimo: De la Investigación que incluye la utilización de animales de experimentación) publicado en 1987, y la resolución sobre el uso de animales en investigación, pruebas y educación adoptadas por la Asociación Americana para los Avances de la Ciencia (1990).

RESULTADOS

Histoquímica de tejido medular.

Al realizar el análisis de los cortes histológicos, en ninguno de los casos se observó que los axones atravesaran el sitio de lesión y se proyectaran hacia el muñón caudal. Sin embargo, un número significativamente mayor ($p= 0.025$) de animales tratados con CsA presentaron axones que se proyectan a partir del muñón proximal hacia el caudal (el 70% de los animales tratados, Figura 7).

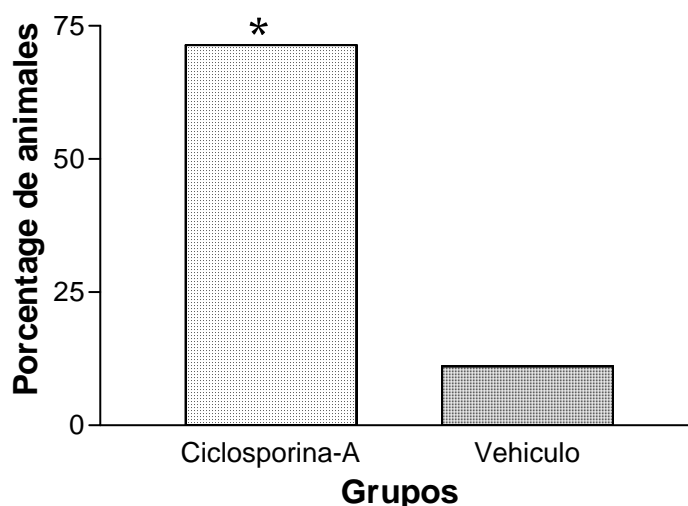


FIGURA 7.- Porcentaje de ratas que presentaron crecimiento axonal a partir del muñón proximal pero sin atravesar el sitio de lesión. * $p= 0.025$

Sin embargo, en todos los casos al llegar al centro de la lesión los axones se desvían hacia el canal ependimario como se puede observar en la figura 8c. Por otra parte, también se pudo observar que en algunos casos, parte de los axones que regeneraron provenían de raíces nerviosas y se introducían prácticamente hacia el centro de la lesión (Figura 8a). En lo referente a los animales no tratados, pudimos observar re-crecimiento real de axones en un porcentaje muy bajo (10%), y en aquellos en los que lo hubo, éstos presentaban también una importante desviación hacia el centro de la lesión (Figura 8d). A pesar que no se realizó algún estudio

morfométrico para evaluar objetivamente la preservación del tejido neural, el estudio histológico nos permitió observar también que el tejido nervioso de los animales tratados con CsA presentó una menor destrucción en comparación con los animales tratados con el vehículo (Figura 8b).

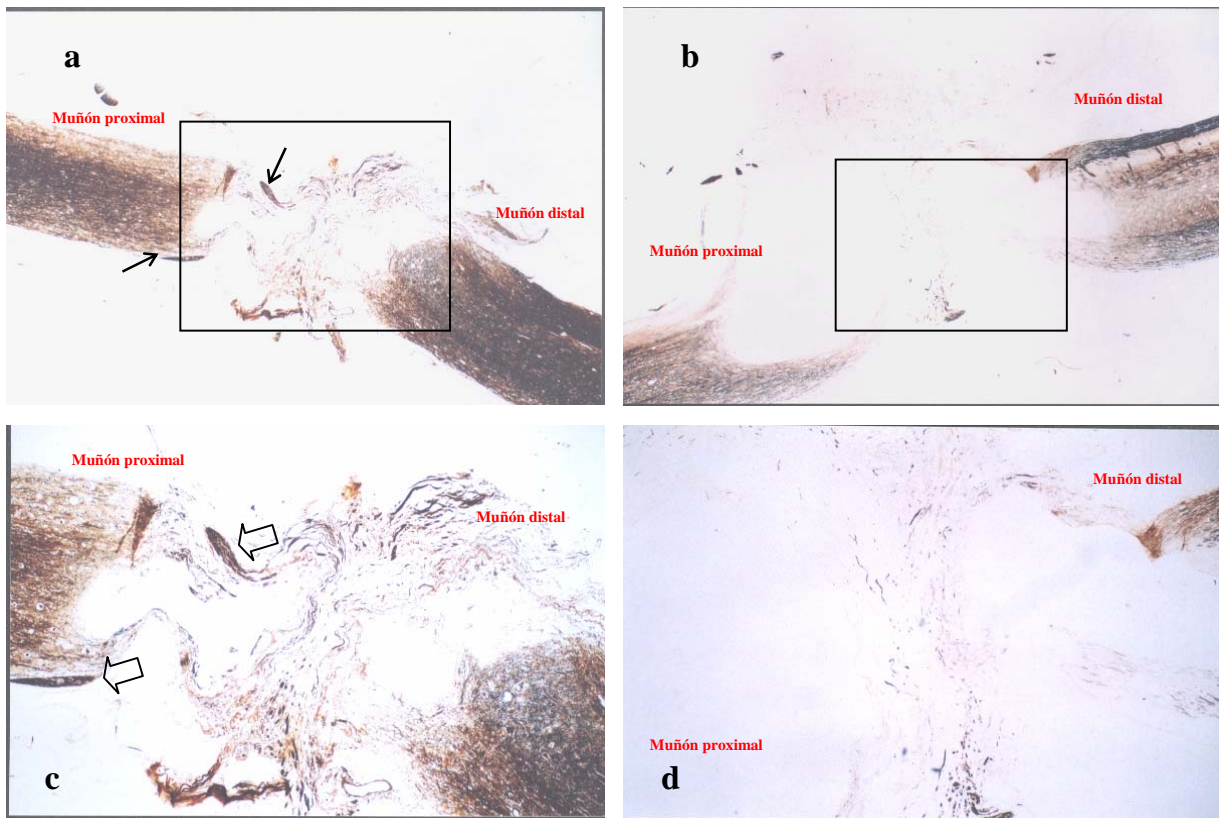


FIGURA 8.- Cortes longitudinales de medula espinal sometida a sección completa procesada con tinción de plata. a) y c) Corte histológico representativo del centro de lesión de médula espinal, de un animal tratado con CsA, (4X, y 10X respectivamente). Las flechas indican fibras provenientes de raíz dorsal y la cabeza de flecha axones provenientes del muñón. b) y d) Corte histológico representativo del centro de lesión de medula espinal de un animal que recibió vehículo (4X, y 10X respectivamente).

Al realizar un acercamiento en el sitio de la lesión se pudo observar fragmentos de tejido nervioso (en el grupo no tratado (Figura 9d).

Inmunoelectrotransfencia de tejido medular.

En la figura 9 podemos observar la cantidad relativa de GAP-43, determinada en pixeles, que se expresó en la zona lesionada de la médula espinal. La figura muestra una mayor expresión de dicha molécula en los animales tratados con CsA, demostrado por la mayor cantidad de pixeles (903 ± 57), en comparación con los no tratados (664 ± 186), sin embargo, dicha diferencia no alcanzó la significancia estadística ($p= 0.14$). En la figura 10 podemos observar una fotografía representativa de las bandas reactivas para GAP-43 en ambos grupos estudiados con un control positivo correspondiente a cerebro de rata neonato (cuyo PMA es 50kDa, Gamby et al. 1996).

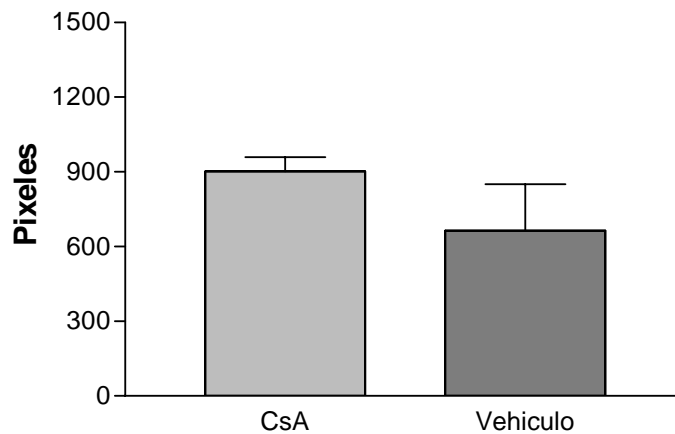


FIGURA 9. Gráfica del análisis densitométrico de las bandas reactivas a GAP-43 en los grupos con LME.

	CsA	V	CN
PMa	50 kDa	50 kDa	50 kDa
Densidad relativa	50 kDa	50 kDa	50 kDa

FIGURA 10. Inmunodetección, en nitrocelulosa, de GAP-43 en tejido medular de los grupos experimentales. CsA, ciclosporina-A; V, Vehículo; CN, cerebro de neonato (control positivo).

Immunofluorescencia del tejido medular.

Mediante inmunofluorescencia se identificaron los sitios en los que se estaba expresando la molécula GAP-43 tanto en la porción proximal como en la caudal del epicentro de la lesión y en las porciones correspondientes de animales sin lesión tratadas o no con CsA. En la figura 11 se muestran los testigos negativos: en A el testigo sin el anticuerpo primario y en B un testigo con un anticuerpo primario irrelevante (anti-cisticercos isotipo IgG) para el anticuerpo secundario (anti-IgG2a). Como se puede observar no existió fluorescencia detectable en ninguno de los casos.

En las figuras 11c y 11d se presentan los cortes de la parte proximal de los animales sin lesión medular. En la materia gris, existe cierta inmunoreacción a GAP-43 (IR-GAP-43) en la región laminar X (alrededor del canal ependimario) y en la lamina superficial (o capa de Waldeyer). Así también se pudo observar IR-GAP-43 en ciertas regiones de las láminas VIII y IX (núcleos motores). La inmunofluorescencia que se presentó en la sustancia blanca de dichas figuras, solo se observó en el área del haz dorsolateral (fascículo de Lissauer). Por otra parte, las figuras 11e y 11f (animales lesionados, tratados con vehículo y CsA, respectivamente) mostraron una distribución más homogénea de fluorescencia en el área delimitada por la sustancia gris, aumentando en la región X, disminuyendo ligeramente en la lámina

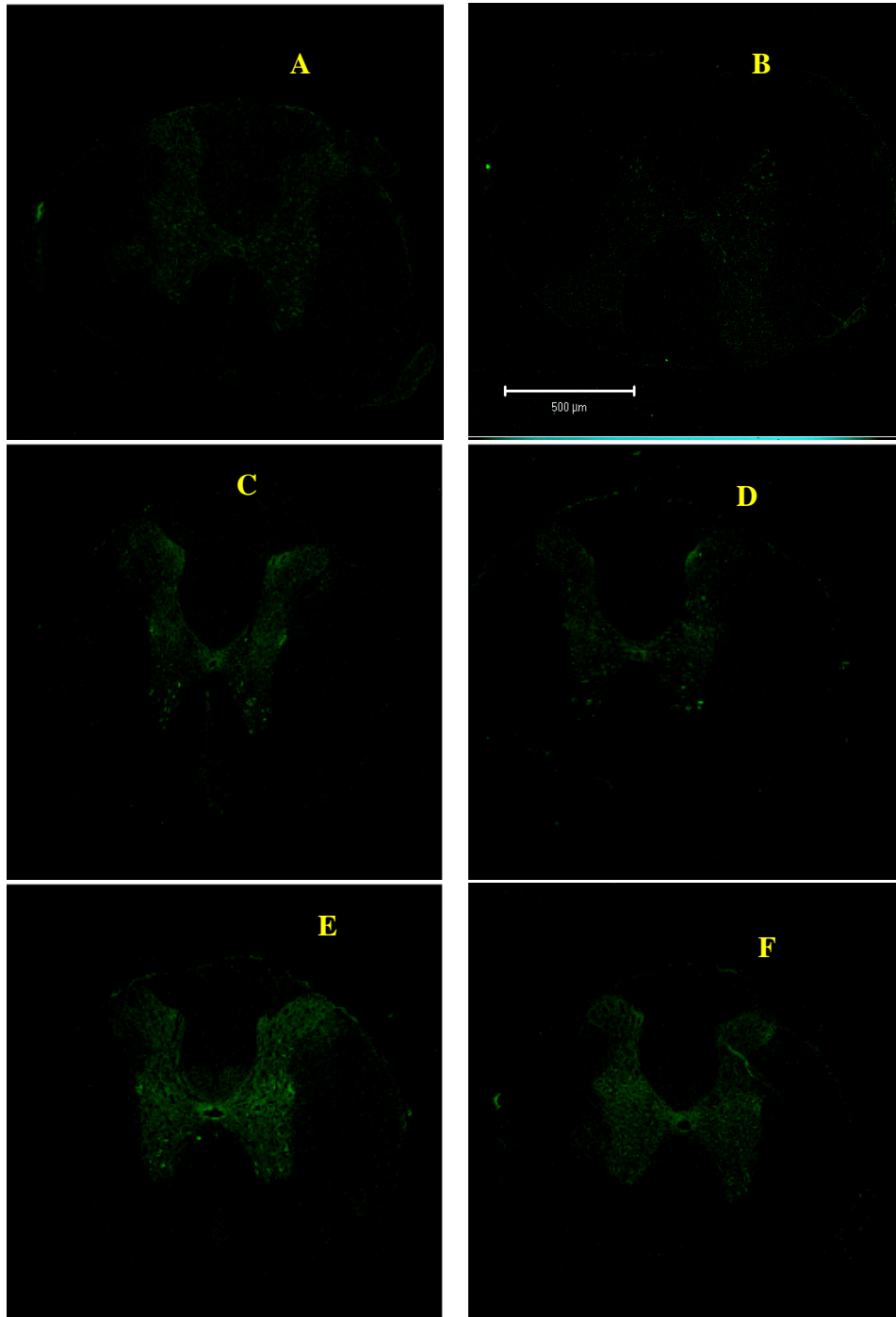


FIGURA 11. Inmunofluorescencia de los diferentes grupos experimentales, porción distal. A) Testigo sin anticuerpo primario, B) Testigo con un anticuerpo primario irrelevante para el anticuerpo secundario, c) Laminectomia + Vehículo, d) Laminectomia + CsA, e) Lesión + Vehículo y f) Lesión + CsA.

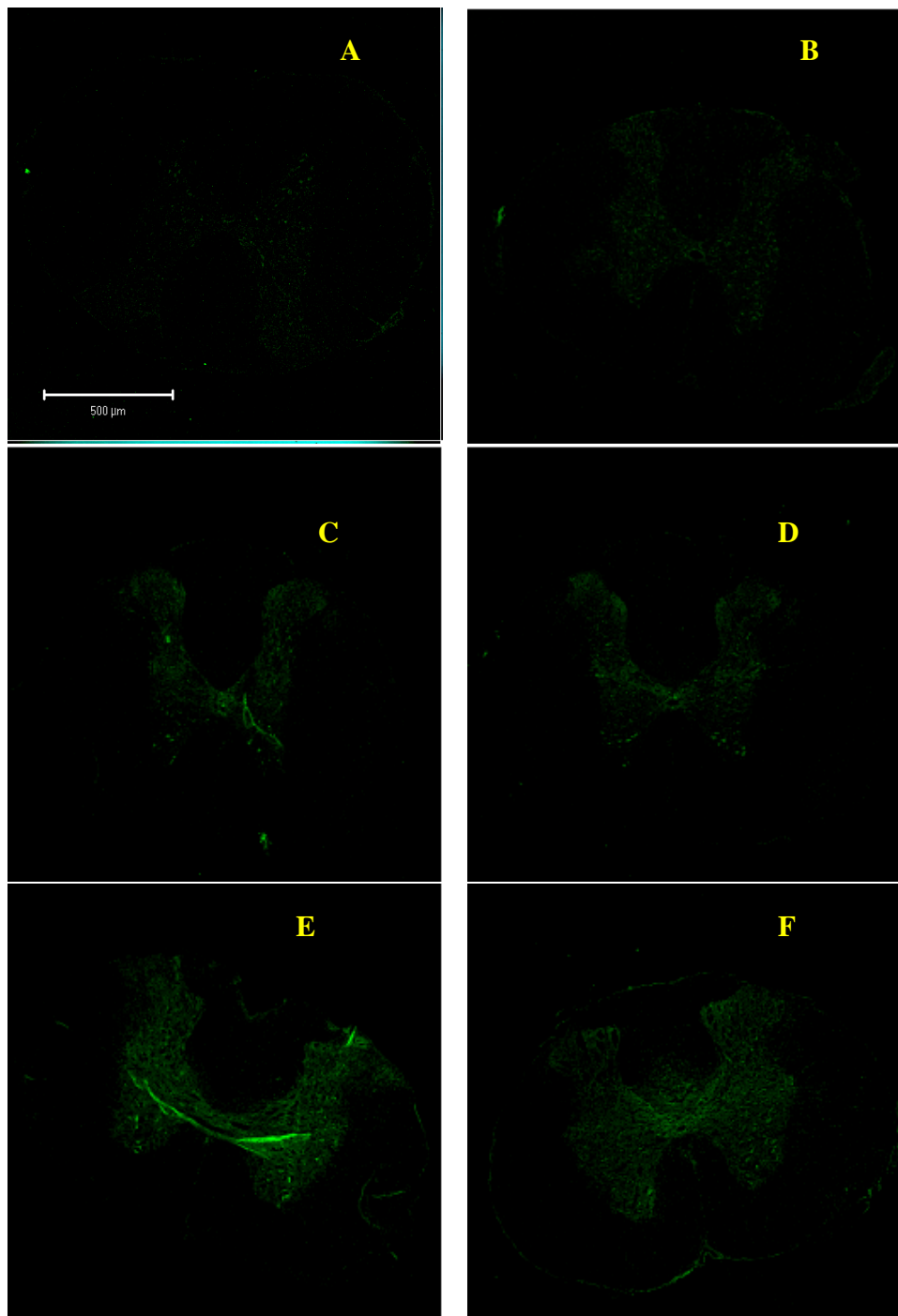


FIGURA 12. Inmunofluorescencia de los diferentes grupos experimentales, porción proximal. A) Testigo sin anticuerpo primario, B) Testigo con un anticuerpo primario irrelevante para el anticuerpo secundario, c) Laminectomia + Vehículo, d) Laminectomia + CsA, e) Lesión + Vehículo y f) Lesión + CsA.

superficial y, a diferencia de los animales sin lesión (Figuras 11c y 11d), aumentó la inmunofluorescencia en la región laminar VII (núcleo de Clarke). Así también se observó una disminución en los núcleos motores. Respecto a la sustancia blanca, se observó una importante IR-GAP-43 en el tracto corticoespinal y un aumento en la región del funículo dorsal (sistema propio espinal dorsal).

De manera similar a la parte proximal, los extremos distales de los animales sin lesión (Figuras 12c y 12d), mostraron fluorescencia más homogénea en la sustancia gris de la ME, observándose un discreto aumento en la región laminar X y en la lámina superficial. Así también se observaron núcleos motores en la región laminar VIII y IX. En la sustancia blanca de dichas figuras, se observó una escasa fluorescencia en el tracto de Lissauer.

Respecto a los extremos distales de los animales lesionados tratados con vehículo y CsA (Figuras 12e y 12f, respectivamente), mostraron un ligero aumento de IRGAP-43 en el área delimitada por la sustancia gris, aumentando en la región laminar X (solo en la figura 12f) y disminuyendo tanto en la lámina superficial como en los núcleos motores. Respecto a la sustancia blanca, se observó un aumento de IRGAP-43 en la región del funículo dorsal (sistema propio espinal dorsal).

Finalmente en la figura 13 se presenta una doble tinción (yoduro de propidio + anti-GAP-43) de la región laminar VII donde se observó mayor IRGAP-43. Como puede observarse algunas moléculas de GAP-43 co-localizan con varios cuerpos neuronales pero además existe IRGAP-43 que no co-localiza con neuronas misma que muy probablemente sea el resultado de la expresión de GAP-43 a nivel axonal (ver Figura 13b y 13c).

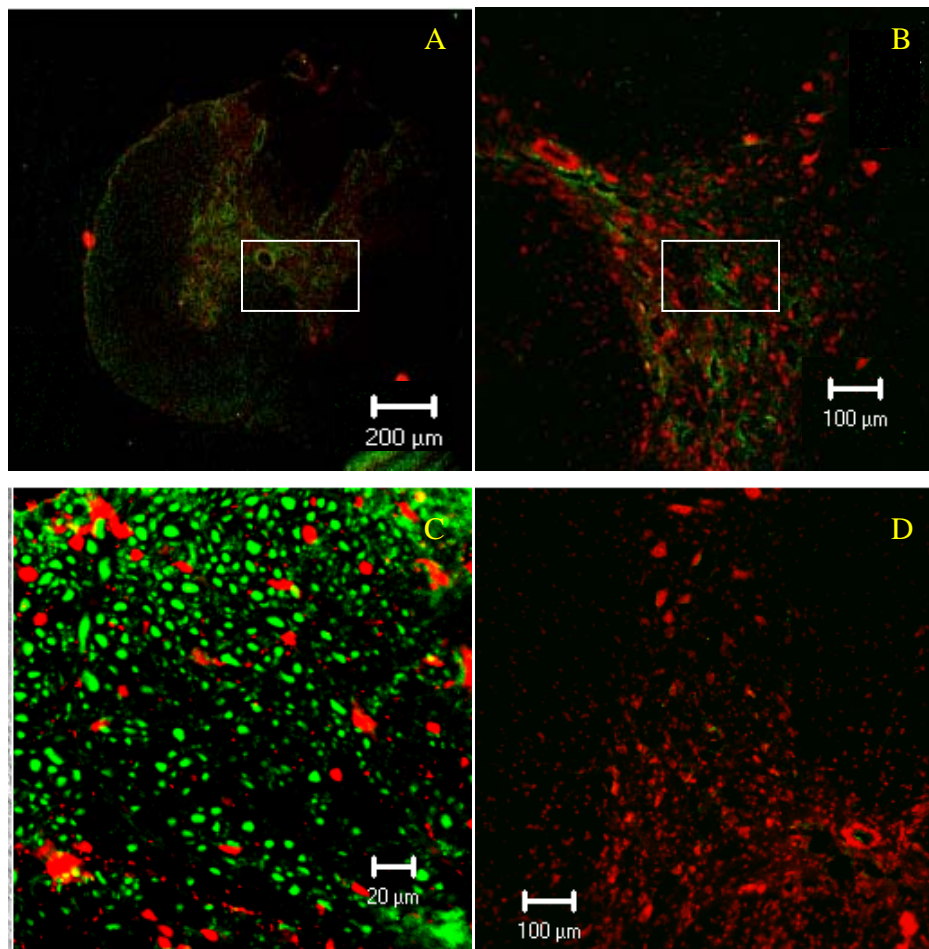


FIGURA 13. Inmunofluorescencia con doble tinción de tejido medular. A) Tejido medular lesionado (4X). B) Magnificación de la zona en recuadro fig. A, región laminar VI - X. C) Magnificación de la región laminar VII, recuadro fig.b. D) Control negativo a FITC.

DISCUSIÓN

La LME origina pérdidas devastadoras en la función neurológica por debajo del nivel de lesión, afecta importantemente los diferentes sistemas de nuestro organismo (sistema cardiovascular, respiratorio, endocrino, muscular entre otros). Hasta hace poco, se demostró que si se proporciona un microambiente propicio tanto extracelular como intracelular, se puede acelerar y mejorar el proceso de regeneración en el SNC. Esto puede realizarse estimulando al cuerpo neuronal para que genere un estado de crecimiento intrínseco, provocando la expresión concertada de genes asociados a regeneración (GARs). Entre estos genes, la expresión de GAP-43, se ha relacionado importantemente con los procesos regenerativos en el SNC (Plunet et al, 2002). La CsA es un fármaco que por su mecanismo de acción podría promover la actividad regeneradora de GAP-43.

En el presente trabajo se evidenció crecimiento axonal en los animales tratados con CsA, sin embargo dichos axones no atravesaron la zona de lesión.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Palladini y cols. (1996) en un estudio previo demostraron re-crecimiento axonal después de una terapia por 30 días con CsA. En el presente trabajo utilizamos la misma terapia pero por un tiempo mucho más prolongado (3 meses), por lo que esperabamos observar una gran densidad de axones atravesando el sitio de lesión en los animales tratados con CsA, sin embargo esto no fue así. En realidad gran parte de los axones que re-crecieron se desviaron al llegar al epicentro de la lesión lo cual impidió una reconexión axonal. Este fenómeno “repulsivo” pudo originarse por diversos factores microambientales, entre ellos la presencia de moléculas repulsoras como Eph-B3 (receptor proteico para efrinas). En un estudio previo, Miranda y cols. (1999) demostraron un incremento significativo de esta molécula repulsora después de una LME y sugirieron que Eph-B3 podría ser uno de los factores que impiden la regeneración del SNC. Por otra parte, los axones también pudieron ser repelidos por la cicatriz fibrogliar que se forma después de la lesión, dicha cicatriz se ha observado que funciona como una barrera física que impide el paso de los axones

(Strittmatter et al, 2001). Después de una LME existe abundante depósito de colágena tipo IV (Iseda et al., 2003), producción de glucosaminoglicanos (Grimpe et al., 2004) y un gran incremento en la replicación astrocítica (Aldskogius, 2005). Estos 3 factores participan importantemente como barrera física e impiden el paso de los axones en crecimiento (Hermanns et al., 2001a). Varios estudios han demostrado que al inhibir o degradar la cicatriz fibrogliar, es posible hacer que los axones en crecimiento pasen el sitio de lesión (Grimpe et al., 2004; Hermanns et al., 2001b; Iseda et al., 2003; Stichel et al., 1999).

Cualquiera de los mecanismos antes mencionados o ambos pudieron originar la desviación de los axones y con ello impidieron la unión de fibras nerviosas entre los muñones opuestos (regeneración funcional). Así pues, aunque las neuronas sean capaces de regular GARS, y en especial, de incrementar la expresión de GAP-43 y los axones crezcan, no hay indicios de regeneración funcional debido muy probablemente a la existencia de estos dos factores inhibitorios.

Respecto a la expresión y distribución de GAP-43 en el tejido medular, se pudo establecer que en condiciones normales (animales sin lesión y no tratados) GAP-43 se expresó de manera similar a lo reportado por Curtis y cols. (Curtis et. al, 1993): GAP-43 se expresó más importantemente en los cuernos dorsales de la médula espinal, este patrón de expresión es consistente con la distribución de fibras aferentes primarias de pequeño calibre. Las terminales de las neuronas sensoriales primarias muestran una distribución laminar en la materia gris con fibras de fino calibre, terminando en la lámina superficial, justificando la expresión de GAP-43 en esa región. Así también, el tracto de Lissauer contiene fibras aferentes primarias de fino calibre. La presencia de fluorescencia a nivel de la lámina X, se debe a fibras provenientes de neuronas sensoriales primarias y, probablemente al sistema descendiente monoaminérgico (Curtis et. al, 1993; Williams, 1998). La IR-GAP-43 que se observó en el cordón ventral, comprende el grupo de neuronas motoras de las láminas VIII y IX (Brook et. al, 1998).

En los animales lesionados, la expresión de GAP-43 se incrementó importantemente. El aumento de IR-GAP-43 a nivel del funículo posterior es propiciado por la remodelación sustancial en esa región. Posterior a la denervación en ese punto, los axones aferentes trigeminales invaden el funículo dorsal (Nacimiento et. al, 1995; Bregman et. al, 2002). En la región del tracto de Lissauer solo se observó un ligero incremento en la IR-GAP-43. A diferencia del funículo dorsolateral, en la lámina superficial disminuye la IR-GAP-43 muy probablemente debido a la denervación de las fibras aferentes que se llevan a esa región. Una región importante en la sustancia gris con mayor IR-GAP-43 fue la correspondiente a la lámina VII, o mejor conocida como núcleo de Clarke, provocado muy probablemente por la reacción de las neuronas a la lesión. Otra región que fue inmunoreactiva, es la región X. En este segmento medular, existen células del canal ependimario, las cuáles pueden activarse y diferenciarse cuando se daña el tejido medular (Takahashi et. al, 2003). La estirpe celular en la que se diferencian es la de astrocitos reactivos, estas células tienen la capacidad de producir ácido araquidónico, el cual tiene propiedades neurotróficas e incrementa la expresión de GAP-43 (Granada et. al, 2003).

La expresión de GAP-43 fue muy similar en los animales tratados con CsA y en los no tratados. Aunque los animales tratados con CsA presentaron evidentemente un mayor crecimiento axonal, cuando se evaluó la expresión de GAP-43 en la zona de lesión por medio de inmunoelectrotransferencia (IET), no se logró demostrar una diferencia significativa entre los 2 grupos lesionados. A pesar de que los animales tratados con CsA presentaron un ligero incremento en la expresión de GAP-43, éste no fue significativo con respecto a la expresión de esta molécula en los animales lesionados no tratados. Este resultado aunado al obtenido en este mismo trabajo en relación al crecimiento axonal en los animales tratados, nos sugiere que la CsA no incrementa la expresión de GAP-43 pero si puede estar promoviendo la actividad de GAP-43 (forma fosforilada), es decir que aunque las concentraciones de GAP-43 sean iguales en ambos grupos lesionados,

la actividad regeneradora de dicha molécula está siendo permitida en mejor forma en los animales tratados con CsA. Como se mencionó antes, la CsA evita la acción de la calcineurina sobre GAP-43 y con ello su defosforilación. Al estar fosforilada dicha molécula, se encuentra en su forma activa y con ello puede colaborar en los procesos de regeneración. En el presente trabajo evaluamos por IET la cantidad relativa de GAP-43 mediante un anticuerpo que reconoce dicha molécula sin distinguir si está o no fosforilada, de tal manera que si la CsA no es capaz de incrementar la expresión de GAP-43, se podría esperar encontrar concentraciones muy similares entre los animales lesionados tratados o no con CsA. Por tanto, la regeneración observada en los animales tratados puede deberse a un incremento en las moléculas de GAP-43 fosforiladas (activas) como consecuencia del tratamiento con CsA. Esto deberá comprobarse posteriormente evaluando específicamente los niveles de GAP-43 fosforilado con un anticuerpo específico.

En el presente trabajo no se logró demostrar la inducción de una regeneración funcional, es decir que los axones atravesaran el sitio de lesión y se reconectaran con los del muñón opuesto, es por ello que nuestros resultados no apoyan los obtenidos por Palladini y cols. Dichos autores reportaron un importante crecimiento axonal que atravesaba la zona de lesión y que permitía una reconexión axonal entre ambos muñones e incluso permitía una importante recuperación motora de animales sometidos a una sección completa de la médula espinal y tratados con CsA. La sección completa de la médula espinal es un modelo que, de no tenerse el cuidado y el entrenamiento suficiente para realizarlo, puede dar lugar a falsas interpretaciones. Aunque este modelo de sección está diseñado para seccionar todos los axones, algunas fibras pueden ser estiradas y desplazadas pero permanecen intactas (Steward et al., 2003) más aun si se realiza el corte sin incluir las meninges. Por lo general en los extremos de las meninges pueden quedar no solo axones sino incluso tractos remanentes. Este fenómeno puede llevar a promover una importante recuperación motora y confundir un axón que no fue cortado con uno que está regenerando. En el estudio de Palladini la sección se

realizó con una navaja de bisturí y sin incluir las meninges, lo que pudo muy probablemente ocasionar que algunos axones quedaran sin ser cortados. Esta pudiera ser una posible explicación del porque sus animales presentaron una recuperación importante. En nuestro trabajo la sección se realizó con microtijeras y las meninges fueron incluidas en el corte, además para asegurarnos de haber cortado todos los axones, antes de la sección pasamos por debajo de la médula una sutura muy delgada misma que después del corte hicimos pasar a través de los dos muñones para verificar la ausencia de axones remanentes. Todo este procedimiento se realizó con el cuidado suficiente para evitar un mayor daño al tejido. Esto podría explicar de alguna forma los resultados diferentes obtenidos en ambos trabajos. En nuestro grupo de investigación se han realizado otros estudios para evaluar el efecto neuroregenerador de la CsA después de una LME, se han analizado los potenciales evocados medulares (Hernández y cols. 2005), la recuperación motora (Hernández y cols. 2005; Buenrostro y cols. 2005) y la regeneración de vías específicas (Buenrostro y cols. 2005) como la corticoespinal de animales tratados con CsA y en ninguno de los casos hemos logrado demostrar regeneración funcional. Es muy probable que la terapia con CsA tenga que combinarse con otra que inhiba o degrade la formación de la cicatriz fibrogliosa o que neutralice las moléculas repulsoras que se generan después la LME para que los axones en crecimiento logren atravesar la zona de lesión y así establezcan las conexiones necesarias para promover una recuperación funcional. Con el presente trabajo se demuestra que la CsA es capaz de inducir regeneración axonal, sin embargo los axones en re-crecimiento no logran atravesar el sitio de lesión. Además se comprobó que la CsA no incrementa la expresión de GAP-43 en el sitio de lesión.

CONCLUSIONES

- 1.- La administración de CsA en animales con sección completa de ME favorece la regeneración axonal, pero no la regeneración funcional.
- 2.- La administración de CsA en animales con sección completa de ME no incrementa la expresión de GAP-43 en la zona de lesión.

PERSPECTIVAS

- 1.- Deberá evaluarse el efecto de CsA sobre la expresión de GAP-43 con un número de animales suficientes mediante IET, en función a la variabilidad encontrada.
- 2.- Deberá determinarse los niveles de GAP-43 mediante una técnica de cuantificación más sensible, como ELISA (Ensayo inmunoenzimático ligado a enzima).
- 3.- Deberá evaluarse el efecto que tiene CsA sobre los niveles de GAP-43 fosforilada.
- 4.- Deberá evaluarse el efecto de CsA sobre la regeneración axonal, complementado con una terapia que inhiba o degrade la formación de la cicatriz fibrogliosa o que neutralice las moléculas repulsoras que se generan después de una LME.

APÉNDICES

Apéndice A: Material.

Lesión de medula espinal

Mango de bisturí.

Hoja de bisturí.

Pinzas AA.

Pinzas Aa.

Pinzas de diente de ratón.

Tijeras.

Tijeras de microcirugía.

Gubia.

Ganchos de microcirugía.

Histoquímica

Vasos de precipitado 250 mL (Pirex).

Matraz Erlenmeyer 250 mL (Pirex).

Recipientes de vidrio de 250 mL (Pirex).

Portaláminas metálico.

Cubreobjetos (Corning).

Tinta China.

Papel poroso (China).

Molde metálico.

Laminillas de vidrio (Corning).

Vasos de Coplin.

Pipeta Pasteur (Corning).

Pipeta volumen variable de 50 μ L, 200 μ L y 1 mL (Gilson).

Tubos cónicos de 15 y 50 mL (Corning).

Papel aluminio.

Immunofluorescencia

Pipeta volumen variable de 50 μ L, 100 μ L y 1 mL (Gilson).

Laminillas de vidrio esmeriladas (Corning).

Cubreobjetos (Corning).

Portaláminas de metal.

Pipeta Pasteur (Corning).

Pinzas metálicas.

Pinzas AA.

Lápiz punta de diamante.

Vaso de precipitado de 50 mL y 125 mL (Pirex).

Hoja de bisturí.

Matraz Erlenmeyer 250 mL (Pirex).

Pipeta graduada 10 mL (Pirex).

Recipiente de vidrio 500 mL (Pirex).

Vaso de Coplin.

Tubos cónicos de 15 y 50 mL (Costar).

Puntas para micropipeta.

Papel aluminio.

Immunoelctrotransferencia.

Hoja de bisturí.

Pinzas AA.

Pinzas Aa.

Gubia.

Tijeras.

Tubos eppendorf (1 mL).

Tripie.

Vaso de precipitado de 100 mL y 500 mL (Pirex).

Mechero Fisher.

Tela de asbesto.

Pipeta volumen variable 50 μ L, 200 μ L y 1mL (Gilson).

Pipeta graduada 25 mL (Pirex).

Pipetas Pasteur (Corning).

Matraz volumétrico 100mL y de 1 L (Pirex).

Frascos ámbar.

Espátula.

Puntas.

Tubos de ensaye 15X100 (Kimax).

Placas de vidrio para electroforesis (BioRad).

Peine para formar pozos (BioRad).

Jeringas Hamilton 100 μ L.

Cajas de Petri (Kimax).

Vidrio de reloj.

Guantes de latex (Ambiderm).

Fibra Scotch.

Papel filtro.

Agitador magnético

Antirefrigerante.

Membranas de nitrocelulosa.

Hule cristal.

Embudo de separación.

Soporte universal.

Anillo de acero.

Apéndice B: Equipos.

Lesión de médula espinal.

Microscopio quirúrgico.

Histoquímica.

Bomba peristáltica (Masterflex).

Estufa (Lab-Line).

Criostato (Leite, American Optical).

Refrigerador (Toledo).

Microscopio óptico (Karl Zeiss).

Inmunofluorescencia.

Bomba peristáltica (Masterflex).

Potenciómetro (Basic).

Crióstato (Leite, American Optical).

Refrigerador (Toledo).

Agitador (Shaker Orbital).

Microscopio confocal.

Inmunoelectrotransferencia.

Potenciómetro (ICA-Combimag RCT)

Bomba peristáltica (Masterflex).

Sonicador (Fisher).

Microcentrífuga para tubos Eppendorf (BioRad).

Espectrofotómetro (Perkin Elmer).

Cámara para electroforesis (BioRad).

Fuente de poder (BioRad).

Cámara para inmunoelectrotransferencia (BioRad).

Agitador magnético.

Incubador (Shaker Orbital).

Densitómetro (Software Total Lab Control Center version 1).

Apéndice C: Reactivos.

Lesión de médula espinal.

Clorhidrato de Xilacina.

Isodine.

Ketamina.

Solución salina estéril (ICN).

Histoquímica.

Heparina (SSA).

Paraformaldehido (Sigma).

Glucosa (Sigma).

Hidróxido de sodio (Sigma).

Ácido clorhídrico (J. T. Baker).

Poli-L-Lisina (sol. Concentrada 0.01%, Sigma),

Solución salina isotónica (Solaria).

Alcohol etílico al 100%, 95%, 80%, 70% y 50% (J. T. Baker).

Xilol (J.T. Baker).

Parafina.

Nitrato de Plata (, Sigma).

Nitrato de Plata amoniacal.

Agua destilada (Solaria).

Bisulfito de sodio (Laboratorios laítz)

Resina.

Solución de referencia pH 4 (Merck).

Solución de referencia pH 7(Merck).

Inmunofluorescencia.

Paraformaldehido (Sigma).

Sacarosa (Sigma).
Acido clorhídrico (J.T. Baker).
Hidróxido de sodio (Sigma).
Tissue Teck (Iacsa, USA).
Grenetina.
Sulfato Crómico de potasio (Merck).
Fosfato monobásico de Sodio (Merck).
Fosfato dibásico de Sodio (Merck).
Anti-GAP-43 de cabra (Zymed, CA).
Anti IgG de ratón (Zymed, CA).
Tween 20 (Sigma).
Leche descremada.
Suero fetal bovino libre de ácido (Hyclone).
Yoduro de propidio (Sigma).
Agua bidestilada (Solaria).
Solución salina isotónica (Solaria).
Medio de montaje (Vecta Shield; Vector, Alemania, Ingold Road Burlingame; Ca 94010).
Solución de referencia pH 4 (Merck).
Solución de referencia pH 7 (Merck).

Immunoelctrotransferencia.

EDTA (Sigma).
TRIS-HCl (BioRad).
SDS (BioRad).
Agua bidestilada.
Reactivo de Bradford (BioRad).
Glicerol (Sigma).
Fosfato monobásico de Sodio (Sigma).

Fosfato dibásico de Sodio (Sigma).
Leche descremada.
Tween 20 (Sigma).
Azul de bromofenol (Sigma).
 β -mercaptoetanol (Sigma).
Poliacrilamida (BioRad).
Bisacrilamida (BioRad)
Persulfato de amonio (Sigma).
TEMED (BioRad).
Glicina (Sigma).
TRIS base (Sigma).
Marcadores de peso molecular (Sigma).
Metanol (Laboratorios Monterrey).
4-Cloro1-Naftol (Merck).
Peróxido de hidrógeno (Laboratorios Monterrey).
Solución de referencia pH 4 (Merck).
Solución de referencia pH 7 (Merck).

Apéndice D: Preparación de soluciones.

Histoquímica.

SOLUCION SALINA DE FOSFATOS (PBS).

Medir 800 mL de agua destilada. Agregar 100 mL de *PB 10x y 8.75g de NaCl.

Disolver las sales y ajustar el pH a 7.2. Aforar a 1L con agua bidestilada.

*PB 10x 2.62 g de fosfato sódico monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) + 11.5g de fosfato de sodio dibásico anhidro. Disolver en 200 mL de agua bidestilada (calentar un poco hasta disolver los cristales) y aforar a 1L con agua bidestilada.

SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE SODIO 1M.

Disolver en 50 mL de agua bidestilada 4 g de hidróxido de sodio (NaOH). Llevar a 100 mL. Trasvasar a un matraz aforado de 100 mL y llevar hasta la marca.

SOLUCIÓN DE PARAFORMALDEHIDO AL 4%.

Adicionar a un matraz Erlenmeyer de 1L 200 mL de agua bidestilada. Calentar a 37°C. Adicionar 20 g de paraformaldehido y 25 g de glucosa. Adicionar 50 mL de PB 10x. Adicionar lentamente gotas de solución de hidróxido de sodio 1M hasta aclarar la solución. Dejar enfriar. Ajustar el pH a 7.2. Llevar a 500 mL. Filtrar y enfriar a 4°C.

SOLUCIÓN DE POLI-L-LISINA.

En un vaso de precipitado, adicionar 10 mL de solución de poli-L-Lisina a 90 mL de agua bidestilada.

SOLUCIÓN DE NITRATO DE PLATA 20%.

Se pesan 20 g de nitrato de plata (AgNO_3) y se disuelven en 50 mL de agua desionizada. Una vez homogenizada la solución, se lleva a un volumen de 100 mL.

SOLUCIÓN DE NITRATO DE PLATA AMONIACAL - FORMALINA.

Se miden 100 mL de solución de nitrato de plata al 20% y se colocan en un vaso precipitado de 250 mL. Se adicionan gotas de cloruro de amonio (NH_4Cl)

concentrado lentamente y en agitación constante hasta que se observe que la solución quede transparente.

SOLUCIÓN DE TIOSULFATO DE SODIO 5%.

Se pesan 5 g de tiosulfato de sodio y se disuelven en 50 mL de agua desionizada.

Una vez disuelto, se lleva a 100 mL.

Immunofluorescencia.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS (PBS).

Medir 800 mL de agua destilada. Agregar 100 mL de *PB 10x y 8.75 g de NaCl.

Disolver las sales y ajustar el pH a 7.2. Aforar a 1L con agua bidestilada.

*PB 10x 2.62 g de fosfato sódico monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) + 11.5g de fosfato de sodio dibásico anhidro. Disolver en 200 mL de agua bidestilada (calentar un poco hasta disolver los cristales) y aforar a 1L con agua bidestilada.

SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE SODIO 1M.

Disolver en 50 mL de agua bidestilada 4 g de hidróxido de sodio (NaOH). Llevar a 100 mL. Trasvasar a un matraz aforado de 100 mL y llevar hasta la marca.

SOLUCIÓN DE PARAFORMALDEHIDO AL 4%.

Adicionar a un matraz Erlenmeyerde 1L 200 mL de agua bidestilada. Calentar a 37°C. Adicionar 20 g de paraformaldehido y 25 g de glucosa. Adicionar 50 mL de PB 10x. Adicionar lentamente gotas de solución de hidróxido de sodio 1M hasta aclarar la solución. Dejar enfriar. Ajustar el pH a 7.2. Llevar a 500 mL. Filtrar y enfriar a 4°C.

SOLUCIÓN DE SACAROSA 30%.

Se pesan 30 g de sacarosa y se disuelven en 50 mL de agua bidestilada en un vaso de precipitado. Una vez disuelta completamente la sacarosa, se adiciona agua hasta 100 mL.

SOLUCIÓN DE GELATINA 0.5%.

En un vaso de precipitado calentar a 60°C 600 mL de agua bidestilada. Adicionar 4 g de gretina y esperar a que se disuelva completamente. Posteriormente adicionar 0.4 g de sulfato de cromo y potasio (KCrSO₄). Llevar a 800 mL. Dejar enfriar y mantener en refrigeración protegida de la luz.

SOLUCIÓN DE BLOQUEO.

En 50 ml de amortiguador de fosfatos, diluir 50 mL de Tween 20. Posteriormente, disolver 5 g de leche descremada. Llevar el volumen hasta 100 mL y mezclar hasta obtener una suspensión homogénea.

SOLUCIÓN ANTI-GAP-43 2.5 µg/mL.

Diluir con solución de bloqueo 1, 5 µL del vial original del anticuerpo por cada mL de solución a utilizar.

SOLUCIÓN ANTICUERPO DE CABRA ANTI-IgG DE RATÓN ACOPLADO A FICT 1:100.

Diluir con solución de bloqueo 1, 15 µL del vial original del anticuerpo secundario por cada mL de solución a utilizar.

SOLUCIÓN PBS-TWEEN 20 AL 0.05%.

Por cada 100 mL de PBS pH 7.2 adicionar 50 mL de Tween 20. Agitar suavemente hasta que se diluya éste último por completo.

SOLUCIÓN DE YODURO DE PROPIDIO 1:500.

Se realiza una solución madre disolviendo 1 g del compuesto en 1 mL de agua bidestilada. Se toman 2 µL de la solución madre y se llevan hasta 1mL con solución PBS-Tween 20 al 0.05%. Realizar el proceso de preparación de esta solución en campana de flujo laminar.

Immunoelctrotransferencia.

SOLUCIÓN DE LISIS.

En un vaso de precipitado de 100 mL, adicionar 25 mL de agua bidestilada. Pesar 290 mg de cloruro de sodio (NaCl), 78.8 mg de TRIS-HCl y 18.6 mg de EDTA. Disolver cada una de las especies químicas y llevar a 100 mL.

SOLUCIÓN SDS AL 10%.

Pesar 10 g de SDS (Dodecil sulfato de sodio) y aforar a 100 mL con agua bidestilada. Distribuir en frascos y mantenerlos a 4°C hasta su uso.

SOLUCIÓN DE ACIDO CLORHIDRICO HCl 1N.

En un vaso de precipitado de 100 mL, adicionar 60 mL de agua bidestilada. Medir 8.3 mL de HCl y adicionar al agua lentamente por las paredes del vaso de precipitado. Agitar y aforar hasta la marca.

SOLUCIÓN DE ACIDO CLORHIDRICO HCl 6N.

En un vaso de precipitado de 100 mL, adicionar 40 mL de agua bidestilada. Medir 50.4 mL de HCl y adicionar al agua lentamente por las paredes del vaso de precipitado. Agitar y aforar hasta la marca.

AMORTIGUADOR TRIS-HCl 0.5 M pH 6.8

En un vaso de precipitado de 100 mL con 60 mL de agua bidestilada, adicionar 6g de TRIS base. Disolver completamente y ajustar con sol HCl 1N hasta pH 6.8. Trasvasar el contenido a un matraz volumétrico de 100 mL y aforar.

SOLUCIÓN DE DIGESTIÓN.

En un vaso de precipitado de 50 mL, adicionar 4 mL de agua bidestilada. Posteriormente adicionar 1 mL de buffer TRIS-HCl 0.5M pH 6.8. A continuación diluir 0.8 mL de glicerol, 1.6 mL de solución SDS 10%, 0.4 mL de β -mercaptoetanol, y por último, disolver una pizca de azul de bromofenol.

BUFFER TRIS-HCl 2 M pH 8.8

Dissolver 24.22 g de TRIS-Base (Hidroximetil aminometano Trizma-base) en 85 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH poco a poco con HCl 6N hasta que se alcance un pH de 8.8. Aforar a 100 mL con agua bidestilada. Guardar a 4°C.

SOLUCIÓN ACRILAMIDA 30% BIS-ACRILAMIDA 0.8%.

Pesar 29.2 g de acrilamida (99.9% de pureza) mas 0.8 g de bis-acrilamida. Dissolver en agua bidestilada y aforar a 100 mL. Filtrar con papel Whatman 1. Guardar en frasco color ambar a 4°C.

SOLUCIÓN PERSULFATO DE AMONIO 10%.

Pesar 1 g de persulfato de amonio y dissolver en 10 mL de agua bidestilada.

GEL SEPARADOR 12%.

En un vaso de precipitado, adicionar 3.35 mL de agua bidestilada, 2.5 mL de TRIS-HCl 2M pH 8.8, 100 µL de SDS 10%, 4 mL de solución acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.8% y 50 µL de solución persulfato de amonio 10%. Homogenizar la solución resultante. Adicionar por último 5 µL de TEMED, homogenizar rápidamente, y verter en las placas de vidrio para formar el gel separador.

GEL CONCENTRADOR 5%.

En un vaso de precipitado, adicionar 3.05 mL de agua bidestilada, 1.25 mL de TRIS-HCl 2M pH 8.8, 50 µL de SDS 10%, 650 µL de solución acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.8% y 25 µL de solución persulfato de amonio 10%. Homogenizar la solución resultante. Adicionar por último 5 µL de TEMED, homogenizar rápidamente, y verter en las placas de vidrio para formar el gel concentrador.

BUFFER DE CORRIDA

Medir 120 mL de buffer de corrida 5* y diluir con 300 mL de agua bidestilada. Homogenizar completamente y llevar a un volumen de 600 mL con agua bidestilada.

Buffer de corrida 5: Pesar 43.2 g de glicina, 9.0 g de TRIS base y 3.0 g de SDS. Disolver cada una de las especies químicas en 200mL de agua bidestilada. Homogenizar y llevar hasta un volumen de 600 mL.

BUFFER DE TRANSFERENCIA.

Medir 125 mL de buffer de transferencia 8X* pH 8.3 y adicionar 200 mL de metanol. Homogenizar hasta obtener una solución clara. Aforar hasta 1 L con agua bidestilada.

*Buffer de transferencia 8X: Pesar 48.45g de TRIS base, 230.615 g de glicina y disolver cada especie química en 800 mL de agua bidestilada. Homogenizar completamente y aforar hasta 2 L.

SOLUCIÓN DE BLOQUEO.

En 50 ml de amortiguador de fosfatos, diluir 50 mL de Tween 20. Posteriormente, disolver 5 g de leche descremada. Llevar el volumen hasta 100 mL y mezclar hasta obtener una suspensión homogénea.

SOLUCIÓN ANTI-GAP-43 1.0µg/mL.

Diluir 20 µL del vial original del anticuerpo con 20 mL de solución de bloqueo a utilizar.

SOLUCIÓN PBS-TWEEN 20 AL 0.05%.

Por cada 100 mL de PBS pH 7.2 adicionar 50 mL de Tween 20. Agitar suavemente hasta que se diluya éste último por completo.

SOLUCIÓN DE ANTICUERPO DE CABRA ANTI-IgG DE RATÓN-PEROXIDASA 1:200.

Diluir 100 µL del vial original del anticuerpo secundario con 20 mL de solución PBS-Tween 20 al 0.05%. Mezclar suavemente hasta lograr una homogenización completa.

SOLUCIÓN REVELADORA

En un recipiente disolver en 2 mL de metanol, 6mg de 4-Cloro-1-Naftol. Esta solución adicionarla lentamente en 10 mL de amortiguador de fosfatos, evitando que se forme precipitado.

GLOSARIO

LME	Lesión de Médula Espinal.
ME.....	Médula espinal.
GAP-43	Proteína asociada al crecimiento.
CsA.....	Ciclosporina A.
IET.....	Inmunoelectrotransferencia.
NFG.....	Factor de Crecimiento Nervioso.
SNP	Sistema Nervioso Periférico.
SNC.....	Sistema Nervioso Central.
SNS.....	Sistema Nervioso Somático.
SNA.....	Sistema Nervioso Autonomo.
AAE	Aminoácidos Exitatorios.
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (del ingles <i>brain-derived neurotrophic factor</i>).
NT-4/5.....	Neurotrofina 4/5.
NT-3	Neurotrofina 3
NGF.....	Factor de crecimiento nervioso (del ingles <i>nervous growth factor</i>).
cAMP	Adenilato mono fosfato cíclico.
MAG	Glicoproteína asociada a la mielina (del ingles <i>myelin associated Glycoprotein</i>).
CaN.....	Calcineurina.
CaM.....	Calmodulina.
NF-ATc.....	Factor citoplásmico de transcripción nuclear de células T
IL-2	Interleucina 2.
CyPA.....	Ciclofilina A.
GI.....	Gastrointestinal.
GAP-43	Proteína asociada al crecimiento 43 (del ingles <i>growth associated protein 43</i>).
ARNm.....	Acido ribonucleico mensajero.

PKC..... Proteína cinasa C.
CKII..... Caseína cinasa II.
FITC Isotiocianato de fluoresceína (del inglés fluorescein isothiocyanate)
SDS..... Dodecilo sulfato de sodio.
IR-GAP-43..... Inmunoreacción a GAP-43.
GARs..... Genes asociados a regeneración.
EpH-B3 Receptor protéico para efrinas.
P_{Ma}..... Peso molecular aparente.

REFERENCIAS

1. Lu J., Ken WS., Ashwell, PhD and Waite Ph. Advances in secondary spinal cord injury. *Spine* 2000; 25: 1859 - 1866.
2. Mc Donald JW. Repairing the damaged spinal cord. *Scientific American* 1999; 281: 64-73.
3. Dumont RJ, Verma S, Okonkwo DO, Hurlbert RJ, Boulos PT, Ellegala DB and Dumont AS. Acute spinal cord injury, part II: Contemporary Pharmacotherapy. *Clin. Neuropharmacol.* 2001; 24: 265-79.
4. Ibarra A, Díaz A, Rios C, Duarte I, Correa D, Guizar G, Grijalva I. Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats. *Neurosci. Lett.* 1999; 266: 61-64.
5. Amar AP. and Levy ML. Pathogenesis and Pharmacological Strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurg.* 1999; 44(5): 1027 - 1040.
6. Tuszynsky MH, Grill R, Blesch A. Spinal cord regeneration: growth factors, inhibitory factors and gene therapy. En: *CNS Regeneration.* (1999) Academic Press.
7. Taoka Y and Okajima K. Spinal Cord Injury in the rat. *Prog. Neurobiol.* 1998; 56: 341 - 358.
8. DeVivo MJ. Krause JS and Lamertse, DP. Recente trends in mortality and causes of death among persons with spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil* 1999; 80: 1411 - 19.
9. Marino RJ., Dittuno JF., Donovan WH., Maynard FM. Neurologic recovery after traumatic spinal cord injury: data from the Model Spinal Cord Injury System. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 1999; 80: 1391-1396.
10. Williams PL. Anatomía de Gray. Bases anatómicas de la medicina y la cirugía. 38ª. ed. España: Harcout Brace, 1998: vol. 2: 902 - 1312.

11. Martini, FH and Bartholomew, EF. Structure and function of the human body. USA; Prentice Hall, 1999: 148 - 157.
12. Moore KL y Dalley AF. Anatomía con orientación clínica. 4ª ed. España: Editorial médica panamericana, 2002: 38 -54.
13. Burke SK. Fundamentos de anatomía y fisiología humana. México: Editorial Limusa, 1990: 34 - 78.
14. Jacob SW, Francone CA y Lossow WJ. Anatomía y fisiología humana. 4ª. Ed. México: Nueva editorial interamericana, 1982: 234 - 320.
15. Afifi AK y Bergman RA. Neuroanatomía funcional. Texto y atlas. México: McGraw Hill Interamericana Editores, 1999: 3 - 92.
16. López Antunez L. Anatomía funcional del sistema nervioso. México: Editorial Limusa, 2000: 61 - 159.
17. Noback CR, Demares RJ. Sistema Nervioso Humano.1a. ed. México, 1986: 33 - 61; 105 - 148.
18. Bergman RA, Afifi AK y Heidger PM. Histología. México: McGraw - Hill - Interamericana, 1997: 121 - 145.
19. Kiernan JA. El sistema nervioso humano. Un punto de vista anatómico. 7ª. Ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 2000: 17 - 105.
20. Colección Ciba de ilustraciones médicas. Sistema nervioso. Barcelona: Salvat Editores, 1987: tomo I: 21.
21. Schwab ME: Repairing the injured spinal cord. Science 2002; 295: 1029 - 1031.
22. Pagina Web 3: www.ninds.nih.gov/health_and_medical/pubs/sci_report.
23. McDonald JW y Sadowsky C. Spinal cord injury. Lancet 2002; 359: 417 - 25.
24. Tator CH. Biology of neurological recovery and functional restoration after spinal cord injury. Neurosurg. 1998; 42: 696 - 708.
25. Liu D., Li L and Augustus L. Prostaglandins release by spinal cord injury mediates production of hydroxyl radical, malondialdehyde and cell death: a

- site of the neuroprotective action of methylprednisolone. *J. Neurochem.* 2001; 77: 1036 - 1047.
26. Agrawal SK., Fehlings MG. Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: Role of Na⁺, Na (+) - K (+) - ATPase, the Na (+) - H⁺ exchanger, and the Na (+) - Ca²⁺ exchanger. *J. Neurosci.* 1996; 16: 545 - 52.
 27. Yanase M, Sakou T., Fukuda T. Role of N-methyl-D-aspartate receptor in acute spinal cord injury. *J. Neurosurg.* 1995; 83: 884 - 888.
 28. Olsson Y, Sharma HS, Nyberg F, et al. The opioid receptor antagonist naloxone influences the pathophysiology of spinal cord injury. *Prog. Brain Res.* 1995; 104: 381 - 99
 29. Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Phys. Rev.* 1996; 76: 319 - 369.
 30. Sakurai M, Hayashi T, Abe K, et al. Delayed selective motor neuron death and fas antigen induction after spinal cord ischemia in rabbits. *Brain Res.* 1998; 797: 23 - 8.
 31. Eldadah BA, Faden AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis and CNS injury. *J. Neurotrauma* 2000; 17: 811 - 29.
 32. Murray LB., Kiernan JA. *Sistema Nervioso Humano*. 1a ed. España: Editorial Harla, 1986: 15 - 35; 55 - 91.
 33. Ramón y Cajal, S. *Degeneration and Regeneration of the Nervous System* (Oxford Univ. Press, London, 1928).
 34. Raymond J, Grill and Tuszynski. Axonal responses to injury. In Sofroniew M, comp. *CNS regeneration*. Philadelphia: Academic Press, 1999: 27 - 53.
 35. Kobayashi N. *Neurotrophins and the neuronal response to axotomy* PhD Thesis 1998, University of British Columbia.
 36. Novikova LN, Novikov LN, Kellerth JO. Survival effects of BDNF and NT-3 on axotomized rubrospinal neurons depend on the temporal pattern of neurotrophin administration. *Eur. J. Neurosci.* 2000; 12: 776 -780.

37. Horner PJ, Gage FH. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 2000; 407: 963.
38. Oudega M, Hagg T. nerve growth factor promote regeneration of sensory axons into adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 1996; 140: 218-229.
39. Oudega M y Hagg T. Neurotrophins promote regneration of sensory axons in the adult rat spinal cord. *Brain Res.* 1999; 818: 431-438.
40. Pagina web2: www.spinalcord.uab.edu/show.asp?
41. Bromsle C, Hubert AB, Fiedler M, Skerra A, Schwab ME. Regeneration of lesioned corticospinal tract fibes in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment. *J. Neurosci.* 2000; 20: 8061-8068.
42. Weibel D, Cadelli D, Scwab ME. Regeneration of lesioned rat optic nerve fiber is improved after neutralization of myelin-associated neurite growth inhibitors. *Brain Res.* 1994; 642: 259-66.
43. Qiu, J. et al. Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* 2002; 34: 895-903.
44. Bradbury, E. et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416, 636-640 (2002).
45. Savio T, Schwab ME. Lesioned corticospinal tract axons regenerate in myelin-free rat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990; 87: 4130-4133.
46. Giménez y Ribotta M, Gaviria M, Mente V, Privat A. strategies for regeneration and repair in spinal cord traumatic injury. *Prog. Brain Res.* 2002; 137: 191-214.
47. Bunge MB. Bridging areas of injury in the spinal cord. *Neuroscientist* 2001; 7: 325.
48. Gelderd JB, Quarles JB. A preliminary study of homotopic fetal cortical and spinal cotransplants in adult rats. *Brain Res. Bull.* 1990; 35-48.
49. Stokes BT, Reier PJ. Fetal grafts alter chronic behavioral outcome after contusion damage to the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 1992; 116: 1-12.
50. Demierre B., Martinou JC., Kato AC. Embryonic motoneurons grafted into the adult CNS can differentiate and migrate. *Brain Res* 1990; 510: 355 - 359.

51. Ramón-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 2000 25: 425-35.
52. Bjorklund A., Lindvall O., Isacson O., Brundin P., Wictorin K., Strecker RE., Clarke DJ., Dunnet SB. Mechanisms of action of intracerebral neural implants: Studies on nigral and striatal grafts to the lesioned striatum. *TINS* 1987; 10: 509 - 516.
53. Xu XM, Zhand SX, Li HY, et al. Regrowth of axons into the spinal cord through a Schwann-cell-seeded mini-channel implanted into hemisectioned adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 1723-1740.
54. Lu J, Feron F, Mackay-Sim A, Waite PME. Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord. *Brain* 2002; 125: 14-21.
55. Coumans JV, Ted TS, Hai ND, MacArthur L, Marietta M, Nash and Bregman B. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *J Neurosci* 2001; 21: 9334-9344.
56. Bregman BS, Coumans JV, Dai HN, Kuhn PL, Lynskey J, McAtee M and Sandhu F. Transplants and neurotrophic factors increase regeneration and recovery of function after spinal cord injury. *Prog Brain Res* 2002; 137: 257-273.
57. Blesch A, Conner JM, Tuszynski MH. Modulation of neuronal survival and axonal growth in vivo by tetracyclin-regulated neurotrophin expression. *Gene Ther* 2001; 8: 954-960.
58. Grill R, Murai K, Blesch A, Gage FH, Tuszynski MH. Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* 1997; 17: 5560-5572.
59. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 1999; 5: 1410-1412.

60. McDonald JW and Howard MJ. Repairing the damaged spinal cord: a summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination. *Prog Brain Res* 2002; 137: 299-309.
61. Teng YD, Lavik EB, Qu X, et al. functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cell. *Proc Nat Acad Sci USA* 2002; 99: 3024-3029.
62. Shen NJ, Wang SC. Using a direct current electrical field to promote spinal cord regeneration. *J Reconstr Microsurg* 1999; 15: 427-431.
63. Zeman RJ, Feng Y, Peng H. Et al. Clenbutenol, a β_2 adrenoceptor agonist, improves locomotor and histological outcomes after spinal cord contusion in rats. *Exp Neurol* 1999; 159: 267-73.
64. Madsen JR, MacDonald P, Irwin N, Goldberg DE, Yao G, Meiri KF, Rimm IJ, Stieg PE, Benowitz LI. Tacrolimus (FK-506) increases neuronal expression of GAP-43 and improves functional recovery after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 1998; 154:673-683.
65. Guo X, Dillman JF, Dawson VL, Dawson TM. Neuroimmunophilins: novel neuroprotective and neuroregenerative targets. *Ann Neurol* 2001; 50: 6-16.
66. Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med* 1989; 121: 1725-1738.
67. Borel JF, Baumann G, Chapman I, Donatsch P, Fahr A, Mueller EA and Vigouret JM. In vivo pharmacological effects of cyclosporin and some analogues. *Adv Pharmacol* 1996; 35: 115-246.
68. Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL and Goa KL. Cyclosporine: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral) in organ transplantation. *Drugs* 2001; 61: 1957-2016.
69. Hutchinson IV, Bagnall W, Bryce P, Pufong B, Geraghty P and Brogan I. Differences in the mode of action of Cyclosporine and FK506. *Transplan Proc* 1998; 30: 959-960.

70. Halloran PF, Helms LMH, Kung LMH and Noujaim J. The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. *Transplantation* 1999; 68: 1356-1361.
71. Erlanger BF. Dowe know the site of action of cyclosporin?. *Immunol Today* 1992; 13: 487-490.
72. Zav'yalov VP, Denesyuk AI, Lundell J and Korpela T. some new aspects of molecular mechanisms of cyclosporin A effect on immune response. *APMIS* 1995; 103: 401-415.
73. Halloran PF and Batiux TD. The downstream consequences of calcineurin inhibition. *Transplan Proc* 1997; 29: 1239-1240.
74. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. 4^a ed. USA; W.B. Saunders Company, 2000: 140-200.
75. Faulds D, Goa L and Benfield P. Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetics properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs* 1993; 45: 953-1040.
76. Dawson TM. Immunosupresants, immunophilins and the nervous system. *Ann Neurol* 1996; 40: 559-560.
77. Hendey B, Maxfiel FR. Regulation of neutrophil and adhesion by intracellular calcium transients. *Blood Cells*. 1993; 19:143-161.
78. Sherry B, Yarlett N, Strupp A, Cerami A. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide- activade macrophages. *Pro.Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:3511-3515.
79. Díaz Ruiz A, Rios C, Duarte I, Correa D, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Ibarra A. Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats. *Neurosci Let* 1999; 266: 61-64
80. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, et al. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 1999; 284: 339-43.

81. Okonkwo DO, Buki A, Siman R and Povlishock. Cyclosporin A limits calcium-induced axonal damage following traumatic brain injury. *Neuroreport* 1999; 10: 353-358.
82. Sullivan PG, Rabchevsky AG, Hicks RR, Gibson TR, Fletcher-Turner A and Scheff SW. Dose-response curve and optimal dosing regimen of cyclosporin A after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience* 2000; 101: 289-295.
83. Dumont RJ, Verma S, Okonkwo DO, Hurlbert RJ, Boulos PT, Ellegala DB and Dumont AS. Acute spinal cord injury, part II. Contemporary pharmacotherapy. *Clin Neuropharmacol* 2001; 24: 265-279.
84. Teichner A, Morselli E, Buttarelli R, Caronti B, Pontieri FE, Venturini G and Palladini G. Treatment with Cyclosporine A promote axonal regeneration in rats submitted to transverse section of the spinal cord. *J Hinforsch* 1993; 34: 343-349.
85. Palladini G, Caronti B, Pozzessere G, Teichner A, Buttarelli FR, Morselli E, Valle E, Venturini G, Fortuna A and Pontieri FE. Treatment with Cyclosporine A promote axonal regeneration in rats submitted to transverse section in the spinal cord-II-recovery of function. *J Brain Res* 1996; 37: 145-153.
86. Ibarra A, Reyes J, Martinez S, Correa D, Guizar-Sahagún G, Grijalva I, Castañeda-Hernandez G, Flores-Murrieta FJ, Franco-Bourland R, Madrazo I. Use of cyclosporin-A in experimental spinal cord injury: Design of a dosing strategy to maintain therapeutic levels. *J. Neurotrauma* 1996; 13: 569-572.
87. Miyata K, Omori N, Uchino H, Yamaguchi T, Isshiki and Shibasaki F. Involvement of the brain - derived neurotrophic factor/TrkB pathway in neuroprotective effect of Cyclosporin A in forebrain ischemia. *Neuroscience* 2001; 105: 571 - 578.
88. Sugawara T, Itoh Y and Mizoi K. Immunosupresants promote adult dorsal root regeneration into the spinal cord. *Neuroreport* 1999; 10: 3949-3953.

89. Gold BG, Katoh K and Storm-Dickerson T. the immunosupresant FK506 increase the rate of axonal regeneration in rats sciatic nerve. *J Neurosci* 1995; 15: 7509-7516.
90. Udina E, Navarro X. Las inmunofilinas: agentes neuroprotectores y promotores de la regeneración neural. *Neurología* 2002; 17: 200-13.
91. Skene JHP. Axonal growth-associated proteins. *Ann. Rev. Neurosci.* 1989; 12: 127 - 156.
92. Strittmater SM., Valenzuela D., Kenedy TE., Neer EJ. and Fishman MC. G0 is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature* 1991; 344: 836 - 841.
93. Strittmater SM., Vartanian T. and Fsihman MC. GAP-43 as a plasticity protein in neural form and repair. *J. Neurobiol.* 1992; 23: 507 - 520.
94. Curtis R., Averill S., Priestley J. and Wilkin GP. The distribution of GAP-43 in normal rat spinal cord. *J. Neurocytol* 1993; 22: 39-50.
95. Alonso G., Oestreicher AB., Gipsen WH. and Privat A. immunolocalization of B-50 (GAP-43) in intact and lesioned neurohypophysis of adult rats. *Exp Neurol* 1995; 131: 93 - 107.
96. Benowitz LI and Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *TINS* 1997; 20: 84-91.
97. Arni S., Keilbaugh SA, Ostermeyer AG and Brown DA. Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 28478-28485.
98. Coggins PJ., Zwiers H. B-50 (GAP-43): Biochemistry and funtional neurochemistry of a neuron - specific phsphoprotein. *J. Neurochem* 1991; 56: 1095 - 1106.
99. Karns LR., Freeman JA., and Fishman MC. Cloning of complementary DNA for GAP -43, a neuronal growth-related protein. *Science* 1987; 236: 597 - 600.

100. Perrone-Bizzozero NL, Cansino VV, Kohn DT. Post-transcriptional regulation of GAP-43 gene expression in PC12 cells through protein kinase-C-dependent stabilization of the messenger RNA. *J Cell Biol.* 1993; 120: 1263-1270.
101. Verkade P, Verkleij AJ, Annaert WG, Gispen WH and Oestreicher AB. Ultrastructural localization of B50/ growth-associated protein-43 to anterogradely transported synaptophysin-positive and calcitonin gene-related peptide negative vesicle in the regenerative rat sciatic nerve. *Neuroscience* 1996; 71: 489-505.
102. Caroni P. (2001) Actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P₂ rafts. *EMBO J.*, **20**, 4332–4336.
103. Laux T, Fukami K, Thelen M, Golub T, Frey D and Caroni P. GAP43, MARCKS and CAP23 modulate PI(4,5)P₂ at plasmalemmal rafts and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J. Cell Biol.* 2000, **149**, 1455–1471.
104. Qin H, Dent EW, and Meiri KF. Modulation of actin filament behavior by GAP-43 (neuromodulin) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site. *J. Neurosci.* 1997; 17: 3515–3524.
105. Benowitz LI, Perrone - Bizzozero NM, and Finklestein SP. Molecular properties of the growth - associated protein GAP-43 (B50). *J. Neurochem* 1987; 48: 1640 - 1647.
106. Dent EW and Meiri KF. Distribution of phosphorylated GAP-43 (Neuromodulin) in growth cones directly reflects growth cone behavior. *J Neurobiol.* 1998; 287; 287-299.
107. Neve RL, Coopersmith R, McPhie DL, Santeufemio C, Pratt KG, Murphy CJ and Lynn SD. The neuronal growth associated protein GAP-43 interacts with rabaptin-5 and participates in endocytosis. *J Neurosci.* 1998; 18: 7757-7767.
108. Tejero-Diez P, Rodriguez-Sanchez P, Martin-Cofreces NB and Diez-Guerra J. bFGF stimulates GAP-43 phosphorylation at Ser41 and modifies its intracellular

- localization in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 2000; 16: 766-780.
109. Aarts LHJ, Schrama LH, Hage WJ, Bos JL, Gispen WH and Schotman P. B-50/GAP-43 induced Formation of Filopodia depends on Rho-GTPase. *Mol Biol Cell* 1998; 9:1279-92.
 110. Coggins PJ, McLean K, Nagy A, and Zwiers H. ADP-Ribosylation of the neuronal phosphoprotein B-50/GAP-43. *J. Neurochem.* 1993; 60: 368-371.
 111. Heffess CS, Mullick FG. *Histotecnología Neuropatológica en: Métodos Histotecnológicos del AFIP.* 1991. Armada de Estados Unidos.
 112. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
 113. Gamby C, Waage MC, Allen RG and Baizer L. Analysis of the role of calmodulin binding and sequestration in neuromodulin (GAP-43) function. *J. Biol. Chem.* 1996; 271, 26698-36705.
 114. Towbin Staehelin T. and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1979; 76: 4350-4354.
 115. Plunet W, Kwon BK, Tetzlaff. Promoting axonal regeneration in the central nervous system by enhancing the cell body response to axotomy. *J. Neurosci Res* 2002; 68: 1-6.
 116. Miranda JD, White LA, Marcillo Ae, Willson CA, Jagid J and Whittemore Sr. Induction of Eph B3 after spinal cord injury. *Exp Neurol* 1999; 156: 218-222.
 117. Fournier AE, Strittmatter SM. Repulsive factors and axon regeneration in the CNS. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11: 89-94.
 118. Iseda T, Nishio T, Kawaguchi S, Kawasaki T and Wakisaka S. Spontaneous regeneration of the corticospinal tract after transaction in young rats: collagen type IV deposition and astrocytic scar in the lesion site are not the cause but the effect of failure of regeneration. *J. Comp Neurol* 2003; 464: 343-355.

119. Grimpe B and Silver J. A novel DNA enzyme reduces glycosaminoglycan chains in the glial scar and allows microtransplanted dorsal root ganglia axons to regenerate beyond lesions in the spinal cord. *J. Neurosci* 2004; 24: 1393-1397.
120. Aldskogius H. Repairing CNS myelin-astrocytes have to do their jobs. *Exp Neurol*. 2005; 192: 7-10.
121. Hermanns S, Klapka N and Muller HW. The collagenous lesion scar- an obstacle for axonal regeneration in brain and spinal cord injury. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2001a; 19: 139-148.
122. Hermanns S, Reiprich P and Muller HW. A reliable method to reduce collagen scar formation in the lesioned rat spinal cord. *L. Neurosci. Methods* 2001b; 110: 141-146.
123. Stichel CC, Lausberg F, Hermanns S and Muller HW. Scar modulation in subacute and chronic CNS lesions: Effects on axonal regeneration. *Restor. Neurol. Neurosci.* 1999; 15: 1-15.
124. Brook GA, Schmitt AB, Nacimiento W, Weis J, Schroder JM, Noth J. Distribution of B50 (GAP-43) mRNA and protein in the normal adult human spinal cord 1998; 95: 378-86.
125. Nacimiento W, Sappok T, Brook GA, Toth L, Oestreicher AB, Gispén WH, Noth J, Kreutzberg GW. B-50 (GAP-43) in the rat spinal cord caudal to hemisection, lack of intraspinal sprouting by dorsal root axons. *Neurosci Lett* 1995; 194: 13-6.
126. Takahashi M, Arai Y, Kurosawa H, Sueyoshi N, Shirai S. Ependymal cell reactions in spinal cord segments after compression injury in adult rat. *J. Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 185-94.
127. Granada B, Tabernero A, Tello V, Medina JM. Oleic acid induces GAP-43 expression through a protein kinase C-mediated mechanism that is independent of NGF but synergistic with NT-3 and NT-4/5. *Brain Res* 2003; 998: 1-8.

128. Steward O, Zheng B and Tessier-Lavigne M. False resurrection: distinguishin regenerated from spared axons in the injured central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 2003; 459: 1-8.
129. Hernández E. Ibarra A. Evaluación del efecto de la ciclosporina-A sobre la regeneración axonal en ratas con sección completa de la médula espinal. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, 2005.
130. **Buenrostro M, Ibarra A.** Evaluación del efecto de la ciclosporina-A sobre la regeneración de la vía corticoespinal en ratas con sección incompleta en la médula espinal. **Tesis de licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM, 2005.**