



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACIÓN SUR DEL DISTRITO FEDERAL
UMAE CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
“DR. BERNARDO SEPÚLVEDA GUTIÉRREZ”**

**“CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA
CASPARA-8 DURANTE LA ETAPA AGUDA DEL DAÑO,
ASÍ COMO EL POSIBLE EFECTO ANTIAPOPTOTICO DE
LA DAPSONA EN UN MODELO DE LESIÓN
TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL DE RATAS.”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA ESPECIALIDAD EN:

MEDICINA INTERNA

PRESENTA:

DR. VALENTE ARMANDO MALDONADO RÍOS

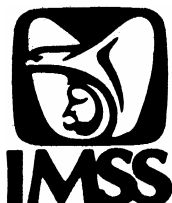
ASESOR INTERNO:

DR. FERNANDO LAREDO SÁNCHEZ

ASESOR EXTERNO:

DRA. MARÍA DE LOS ANGELES ARACELI DÍAZ RUIZ

Folio: 22/07



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dra. Diana G. Menez Díaz

Jefe de la División de Educación e Investigación en Salud
U.M.A.E. Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI

Dr. Haiko Nellen Hummel.

Profesor Titular del Curso de Medicina Interna
U.M.A.E Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI

Dr. Fernando Laredo Sanchez.

Asesor interno de Tesis
Médico Adscrito al Servicio de Medicina Interna
U.M.A.E. Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI

Dra. Maria De los Angeles Araceli Díaz Ruíz.

Asesor externo de Tesis
Investigador tipo C del departamento de Neuroquímica
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Dr. Valente Armando Maldonado Ríos.

Investigador Principal
U.M.A.E. Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI



**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIURGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
DEPARTAMENTO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN**

JUNIO 18, 2007

Insurgentes Sur No. 3877
Col. La Fama Deleg. Tlalpan
C. P. 14269 México, D. F.
Tel. 54-24-70-06 Ext. 4062/2019
www.innn.edu.mx

No.Reg.22/07

DRA. MARÍA DE LOS ANGELES ARACELI DÍAZ RUIZ
DEPARTAMENTO DE NEUROQUÍMICA
P R E S E N T E .

COMUNICO A USTED QUE EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN TITULADO:
**“EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA TERAPIA
COMBINADA DE CICLOSPORINA-A Y DAPSONA EN UN MODELO DE
LESION TRAUMÁTICA DE LA MEDULA ESPINAL EN RATAS” HA SIDO
APROBADO POR EL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN DE ESTE INSTITUTO,
PARA SU REALIZACIÓN.**

ATENTAMENTE



DRA. ESPERANZA GARCÍA MENDOZA
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN.



IMSS

REGISTRO NACIONAL DE TESIS DE ESPECIALIDAD

Delegación	3 SURESTE	Unidad de Adscripción	UMAE	HECMN SIGLO XXI
Autor				
Apellido Paterno	MALDONADO	Materno	RÍOS	Nombre VALENTE ARMANDO
Matricula	508216833	Especialidad	MEDICINA INTERNA	
Asesor				
Apellido Paterno	FERNANDO	Materno	LAREDO	Nombre SANCHEZ
Matricula	3426068	Especialidad	MEDICINA INTERNA	
Fecha Grad.	28 DE FEBRERO 2011	No. de Registro	R-2010-3601-136	

Título de la tesis:

“CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA-8 DURANTE LA ETAPA AGUDA DEL DAÑO, ASÍ COMO EL POSIBLE EFECTO ANTIAPOPTÓTICO DE LA DAPSONA EN UN MODELO DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL DE RATAS.”

INTRODUCCIÓN: En la lesión traumática de la médula espinal, (LTME) después del daño mecánico se ponen en marcha distintos mecanismos de extensión, como la excitotoxicidad, la generación de radicales libres, la inflamación y la apoptosis. Por lo tanto, en el presente trabajo, planteamos evaluar la actividad de la Caspasa-8 a diferentes tiempos después de una LTME en un modelo de contusión en ratas y evaluar el posible efecto antiapoptótico de la Dapsona, (DDS) inhibiendo la activación de dicha proteasa, a través de sus posibles efectos neuroprotectores, dadas sus probables propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antagonistas del Glutamato y moduladoras del calcio. Para lo cual caracterizamos el curso temporal de la actividad de Caspasa-8 en un modelo de LTME en ratas y el efecto de la DDS sobre la actividad de dicha Caspasa al ser administrada a las 3 hrs o a las 5 horas siguientes al daño.

MATERIAL Y METODOS: Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar de 200-250 gr de peso, las cuales, fueron sometidas a laminectomía de T9 y a un modelo de LTME por contusión a través de un dispositivo computarizado, (NYU impactor) los animales fueron sacrificados dentro de las 4, 24 y 72 hrs siguientes. La actividad de caspasa -8 fue cuantificada por un método fluorométrico utilizando un lector de placas. Los resultados fueron analizados por el paquete estadístico SPSS.

RESULTADOS: Se observó un incremento estadísticamente no significativo en la actividad de la caspasa -8 en la medula espinal a las 4 y 24 horas posteriores a la lesión de 18.1% y 28.6% respectivamente vs grupo control. (laminectomía) Por otro lado a las 72 horas posteriores a la lesión, se encontró la máxima actividad de caspasa-8, al detectarse un aumento estadísticamente significativo (p<0.05) del 68.8% con respecto al grupo solo sometido a laminectomía. Dentro de las 72 horas siguientes a la lesión, se vio que la actividad de caspasa-8 en los grupos con LTME, tratados con DDS a las 3 y 5 horas posteriores a la lesión presentaron un incremento de la actividad de caspasa-8 de 13.8% y 1.4% respectivamente al ser comparados con el grupo con laminectomía (Resultados estadísticamente no significativos), mientras que en el grupo tratado solo con vehículo de DDS i.p. se observó un incremento del 78% en la actividad de caspasa -8 comparado con las ratas que solo se sometieron al procedimiento de laminectomía, un incremento estadísticamente significativo (p<0.05), evidenciando el posible efecto antiapoptótico de la DDS en la LTME.

CONCLUSIONES: Durante la etapa aguda de la LTME en un modelo experimental en ratas el tiempo de máxima actividad de caspasa -8 es a las 72 hrs. La administración de DDS dentro de las 3 a 5 hrs posteriores a la LTME podría ser neuroprotector al disminuir la actividad de caspasa-8 durante la etapa aguda, al bloquear la vía extrínseca de la apoptosis.

Palabras Clave:

- 1.- Dapsona
- 2.- Caspasas
- 3.- Caspasa-8
- págs.- 55
- 4.- Apoptosis
- 5.- Lesión traumática de la Médula espinal
- 6.- Neuroprotector

Tipo de Investigación _____

Tipo de Diseño _____

Tipo de Estudio _____

Ilust.- 2

ÍNDICE

	Página
I. RESÚMEN.	1
II. INTRODUCCIÓN.	3
III. ANTECEDENTES.	6
III.1. APOPTOSIS.	6
III.2. CASPASAS.	10
III.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA LESION TRAUMATICA DE LA MÉDULA ESPINAL	16
III.4. APOPTOSIS Y LA LESIÓN DE LA MEDULA ESPINAL	19
III.5. DAPSONA	25
III.5.1. Absorción	25
III.5.2. Distribución	26
III.5.3. Metabolismo	26
III.5.4. Excreción	26
III.5.5. Biodisponibilidad	27
III.5.6. Acción Antimicrobial	27
III.5.7. Acción Antioxidante	27
III.5.8. Acción Antiinflamatoria	28
IV. JUSTIFICACIÓN	30
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
VI. HIPÓTESIS	31

VII. OBJETIVO GENERAL	31
VIII. OBJETIVOS PARTICULARES	31
IX. MATERIALES Y METODOS	32
IX.1. Animales	32
IX.2. Laminectomia	33
IX.3. Modelo de lesión por contusión	33
IX.4. Determinación de proteínas por el método de Lowry	33
IX.5. Ensayo fluorometrico de actividad de caspasa-8/FLICE	34
IX.6. Analisis estadistico	35
X. RESULTADOS	36
XI. DISCUSIÓN	38
XII. CONCLUSIONES	41
XIII. BIBLIOGRAFÍA	42

I. RESUMEN

“CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA-8 DURANTE LA ETAPA AGUDA DEL DAÑO, ASÍ COMO EL POSIBLE EFECTO ANTIAPOPTOTICO DE LA DAPSONA EN UN MODELO DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL DE RATAS.”

INTRODUCCIÓN: En la lesión traumática de la médula espinal, (LTME) después del daño mecánico se ponen en marcha distintos mecanismos de extensión, como la excitotoxicidad, la generación de radicales libres, la inflamación y la apoptosis. Por lo tanto, en el presente trabajo, planteamos evaluar la actividad de la Caspasa-8 a diferentes tiempos después de una LTME en un modelo de contusión en ratas y evaluar el posible efecto antiapoptótico de la Dapsona, (DDS) inhibiendo la activación de dicha proteasa, a través de sus posibles efectos neuroprotectores, dadas sus probables propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antagonistas del Glutamato y moduladoras del calcio. Para lo cual caracterizamos el curso temporal de la actividad de Caspasa-8 en un modelo de LTME en ratas y el efecto de la DDS sobre la actividad de dicha Caspasa al ser administrada a las 3 hrs o a las 5 horas siguientes al daño.

MATERIAL Y METODOS: Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar de 200-250 gr de peso, las cuales, fueron sometidas a laminectomía de T9 y a un modelo de LTME por contusión a través de un dispositivo computarizado, (NYU impactor) los animales fueron sacrificados dentro de las 4, 24 y 72 hrs siguientes. La actividad de caspasa -8 fue cuantificada por un método fluorométrico utilizando un lector de placas. Los resultados fueron analizados por el paquete estadístico SPSS.

RESULTADOS: Se observó un incremento estadísticamente no significativo en la actividad de la caspasa -8 en la médula espinal a las 4 y 24 horas posteriores a la lesión de 18.1% y 28.6% respectivamente vs grupo control. (laminectomía) Por otro lado a las 72 horas posteriores a la lesión, se encontró la máxima actividad de caspasa-8, al detectarse un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) del 68.8% con respecto al grupo solo sometido a laminectomía. Dentro de las 72 horas siguientes a la lesión, se vio que la actividad de caspasa-8 en los grupos con LTME, tratados con DDS a las 3 y 5 horas posteriores a la lesión presentaron un incremento de la actividad de caspasa-8 de 13.8% y 1.4% respectivamente al ser comparados con el grupo con laminectomía (Resultados estadísticamente no significativos), mientras que en el grupo tratado solo con vehículo de DDS i.p. se observó un incremento del 78% en la actividad de caspasa -8 comparado con las ratas que solo se sometieron al procedimiento de laminectomía, un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$), evidenciando el posible efecto antiapoptótico de la DDS en la LTME.

CONCLUSIONES: Durante la etapa aguda de la LTME en un modelo experimental en ratas el tiempo de máxima actividad de caspasa -8 es a las 72 hrs. La administración de DDS dentro de las 3 a 5 hrs posteriores a la LTME podría ser neuroprotector al disminuir la actividad de caspasa-8 durante la etapa aguda, al bloquear la vía extrínseca de la apoptosis.

PALABRAS CLAVE: Dapsona, apoptosis, caspasas, Caspasa-8. Lesión traumática de la Médula espinal.

1.-Datos del alumno (autor)	
Apellido Paterno:	Maldonado
Apellido Materno:	Ríos
Nombre:	Valente Armando
Teléfono:	56560685
Universidad:	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad o escuela:	Facultad de Medicina
Carrera:	Medicina Interna
Número de cuenta:	508216833
2.-Datos del asesor:	
Apellido paterno:	Laredo
Apellido Materno:	Sanchez
Nombre:	Fernando
3.-Datos de la tesis	
Título:	“Caracterización de la actividad de la caspasa-8 durante la etapa aguda del daño, así como el posible efecto antiapoptótico de la dapsona en un modelo de lesión traumática de la médula espinal de ratas.”
Número de páginas:	55
Año:	2011
Datos del asesor interno:	
Apellido paterno:	Laredo
Apellido Materno:	Sánchez
Nombre:	Fernando
Datos del asesor externo:	
Apellido paterno:	Díaz
Apellido Materno:	Ruíz
Nombre:	Maria de los Angeles Araceli

II. INTRODUCCION

Cuando existe una lesión de la médula espinal, debido a un trauma o a otras causas, genera una significativa y catastrófica disfunción neurológica que lleva a una discapacidad física, con implicaciones económicas y psicológicas, no sólo en el individuo, si no que también para sus familiares y para la sociedad. (Peter AC Lim et al., 2007)

En el 2004, el Centro Nacional de Estadística de Lesión Traumática de Médula Espinal de Estados Unidos de Norteamérica, (NSCISC, siglas en inglés) reportó una incidencia anual mundial de 15, 000 a 40, 000 casos nuevos por millón de habitantes, con una prevalencia de 250,000 casos, (Jackson et. al., 2004) lo cual denota que se trata de un importante problema de salud pública con un gasto derivado de los cuidados por los servicios de salud estimado en 2.9 millones de dólares por paciente a lo largo de toda su vida. (Peter AC Lim et al., 2007)

La mayor incidencia se presenta en promedio a los 37.6 años, siendo su causa más común los accidentes automovilísticos, (50.4%) seguido por caídas (23.8%) y eventos violentos. (11.8%) (Chester et. al., 2007) Después de la lesión traumática de la médula espinal, se inicia una compleja cascada de procesos fisiopatológicos, lo que involucra la extensión del daño primario hacia el tejido nervioso adyacente. Estos eventos de daño secundario se han descrito ampliamente en la literatura e incluyen a la isquemia, (Tei et. al., 2005) la respuesta inflamatoria (Bethea et al., 2002; Hausmann et al., 2003), el daño al citoesqueleto e inducción de vías apoptóticas, (Ekshyyan et al., 1994) excitotoxicidad (McAdoo et al., 2000; Park et al., 2004) y el estrés oxidativo. (EO) Es decir, mientras el trauma mecánico inicia con procesos de muerte celular rápida de las neuronas y la glía, se disparan otros mecanismos de daño secundario que se caracterizan por el incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, un desequilibrio electrolítico, excitotoxicidad, una compleja y pobre entendida respuesta neuroinflamatoria que puede persistir por meses o años después del trauma inicial, que finalmente desembocan en un incremento de la muerte celular por apoptosis. (Norenberg et al., 2004; Profýris et al., 2004; Fleming et al., 2006) Es decir, durante la LTME, la apoptosis juega un papel importante en la progresión del daño, contribuyendo a la degeneración secundaria de las estructuras contiguas al epicentro de la lesión, a través de la degeneración Walleriana de los tractos ascendentes y descendentes en la sustancia blanca. (Crowe et al., 1997; Hulsebosch et al., 2002) Dado que son varios los estímulos que pueden activar la apoptosis a través de la vía extrínseca. Tales como, el estrés intra y extracelular, generados por cambios en la temperatura y osmolaridad, el daño del ADN, radicales libres, (RL) remoción de nutrientes,

oxígeno, factores de crecimiento, citocinas proinflamatorias. (L.Portt et al., 2010) Es así como la muerte celular por apoptosis, se pone en marcha a través de la vía extrínseca por la unión de los ligandos de la familia TNF a los receptores de muerte pertenecientes a la familia de los receptores de TNF entre los que se incluyen los TNFR, Fas y TRAIL la activación de estos inicia la formación de complejos de señalización, inductores de muerte celular multiproteicos, generando la agregación de estos complejos, y causando los cambios conformacionales que desencadenan la actividad catalítica de las caspasas iniciadoras - 8 y -10. (R.S.Hotchkiss et al., 2009) Este proceso involucra la formación y la activación de complejos como el complejo de señalización inductor de muerte, (DISC) esto lleva a la activación, de una caspasa efectora típicamente la caspasa - 3, la cual en su forma activa es la responsable de la escisión de substratos de muerte, que producen las características distintivas de la apoptosis, tanto cambios morfológicos como bioquímicos, entre los que se incluyen: La fragmentación del ADN, fragmentación nuclear y ampollamiento de la membrana celular. (L.Portt et al., 2010) Por lo que el bloqueo de la apoptosis podría promover la neuroconducción e incrementar la capacidad de recuperación. (Matushita et al., 2000)

Ya que el receptor Fas y la procaspasa -8 se han identificado en las motoneuronas y neuronas de la sustancia gris de la médula espinal normal y el creciente conocimiento de la muerte neuronal secundaria a apoptosis, incrementa la posibilidad de que el receptor Fas se encuentre involucrado en la puesta en marcha de la apoptosis durante la LTME, a través de la activación de la caspasa-8. Por lo que el uso de medicamentos inhibidores de las caspasas podría ser de utilidad en la neuroprotección y limitación del daño en la LTME. (Matushita et al., 2000)

Por lo tanto, en el presente trabajo, planteamos evaluar la actividad de la caspasa-8 a diferentes tiempos después de una LTME en un modelo de contusión en ratas y evaluar el posible efecto anti-apoptótico de la Dapsona. (DDS) inhibiendo su activación, a través de su efecto antiinflamatorio ya que este fármaco actúa como un inhibidor irreversible de la mieloperoxidasa, al modificar el sitio activo de esta enzima. (S.M. Debol et al., 1997) Otros mecanismos por medio de los cuales la DDS tiene propiedades anti-inflamatorias inherentes a su grupo sulfona, (Y.I. Zhu et al., 2001) que reducen la generación de radicales libres (RL) neurotóxicos son: la interferencia con la migración quimiotáctica y la supresión del reclutamiento de neutrófilos, (Harvath et al., 1986; Debol et al., 1997) la inhibición de la actividad de la peroxidasa de eosinófilos, (Bozeman et al., 1992) inhibición de la generación de los productores de 5- lipooxigenasa. ((G.Wozel et al., 1995) Otros efectos neuroprotectores de la DDS son el antagonismo, contra las acciones desencadenadas por el Glutamato. (Suzuki et al., 1992; Altagracia et al., 1994; Minato et al., 1997)

Estos datos en conjunto con evidencia de la probabilidad de la DDS como agente terapéutico que probablemente minimiza el estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas (Chun Cho et al., 2010) y al no existir una terapéutica eficaz para la LTME, la cual es un verdadero problema de salud pública, nosotros proponemos, en el presente trabajo evaluar el posible efecto antiapoptótico de la DDS en la etapa aguda después de la lesión traumática de la médula espinal de ratas.

III. ANTECEDENTES

III.1. APOPTOSIS

Los mecanismos que regulan la muerte celular son de gran importancia para el mantenimiento de la homeostasis. Las células crecen controladamente gracias a la expresión de nuevos genes que inducen señales de muerte en estadios definidos de diferenciación y en respuesta a determinados estímulos fisiológicos. (Ellis et al., 1991; Martín et al., 1993) Por lo que se considera a la apoptosis como un mecanismo de muerte inherente al desarrollo celular, que se desencadena por diversas señales, las cuales pueden ser fisiológicas o exógenas ambientales. Estas señales pueden actuar sobre receptores de superficie y causar la activación en cascada de proteínas citoplasmáticas; ello ocasiona la activación de un programa genético que conduce, a la nucleólisis por acción de endonucleasas, (Ribatti et al., 1995) este mecanismo de muerte celular interviene en importantes fenómenos fisiológicos como: embriogénesis, mantenimiento de la homeostasis, renovación tisular, desarrollo y como parte de la función del sistema inmune. (Onishi et al., 1994)

Los trastornos en la regulación de la apoptosis, están presentes en la etiopatogenia de diversas enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas e infecciosas (Amesisen et al., 1992; Onishi et al., 1994) y debido a que la apoptosis puede considerarse como un proceso de eliminación de células defectuosas, la desregulación de los genes que codifican las proteínas relacionadas con ella, puede ser el origen de diversos tumores. (Korsmeyer et al., 1992)

Las características morfológicas de la célula apoptótica difieren de las observadas en las células que sufren necrosis. Esta última, es un proceso que tradicionalmente sea considerado "pasivo" que no requiere de síntesis proteica, y que es causado por la pérdida de la homeostasis. Se caracteriza por daño mitocondrial, rotura de la membrana, lisis celular y liberación de su contenido al medio extracelular. (Raff et al., 1992) Por el contrario, la apoptosis se considera un proceso activo que implica síntesis proteica, en el cual la célula sufre una condensación nuclear y citoplasmática. Sus características morfológicas revelan condensación de la cromatina nuclear, desintegración nucleolar, disminución del tamaño nuclear, compactación del citoplasma y de organelos (excepto mitocondrias y ribosomas), alteraciones del citoesqueleto y aspecto de ampollas en la membrana. Durante el proceso final ocurre fragmentación del ADN debido a una ruptura internucleosomal de este y se forman fragmentos nucleares recubiertos de membrana, llamados cuerpos apoptóticos, que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria. (Cohen et al., 1993)

Por otro lado se han identificado antígenos (Ag) de membrana celular capaces de inducir señales de apoptosis. Como el receptor Fas o Apo-1, grupo de diferenciación, (CD95) una proteína transmembrana tipo II glicosilada de aproximadamente 43 kD que se expresa constitutivamente en gran variedad de tejidos normales y líneas tumorales. (Tucek – Scabo et al., 1996)

El Fas/Apo-1 es miembro de la superfamilia de los Factores de Necrosis Tumoral (TNF) entre los que se encuentran los Receptores TNF tipo I y II, el receptor del factor de crecimiento neuronal (NGF), CD40 y CD27. (Itho et al., 1991)

El ligando del Fas/Apo-1 es una proteína de membrana tipo II de 40 kD miembro de la familia del TNF. (Suda et al., 1993) La unión del Ag de membrana Fas/Apo-1 con su ligando y con anticuerpos antagonistas, es una de las vías de inicio de señales para la apoptosis. (Itho et al., 1991) Existe una relación estrecha entre la participación del ligando Fas y la citotoxicidad mediada por los linfocitos T CD8+. (Kagi et al., 1994)

Por otro lado la mayoría de las células nucleadas experimentan ruptura internucleosomal del ADN mediante endonucleasas Ca^{2+} Mg^{2+} dependientes, entre las que se encuentran la NUC-18, la DNAsa I y la DNAsa II.

Así mismo cabe mencionar la importancia de los genes involucrados en la apoptosis como lo es, el gen Bcl-2, el cual, forma parte de una familia de genes que intervienen en la regulación de la supervivencia de la célula. Los miembros de la familia Bcl-2 están integrados por: Bcl-2, Bax, Bad, Bcl-X1, Bcl-Xs, Mcl-1. El destino de una célula de morir o sobrevivir está determinado por las diferencias en la expresión de estas proteínas, actuando algunas como promotoras y otras como inhibidoras de las señales de apoptosis. (Boise et al., 1995)

Por ejemplo, el heterodímero Bcl-2 - Bax y la variante Bcl-X1 tienen efecto inhibitorio de la muerte celular, al impedir la acción de las proteasas cisteinas (caspasas) que median señales de apoptosis. (Boise et al., 1995)

Sin embargo, la formación de homodímeros Bax-Bax, así como elevados niveles de Bax o Bcl-Xs, pueden favorecer la muerte programada de la célula. (Boise et al., 1995)

Existen otros oncogenes y genes supresores de tumor que influyen en el mecanismo de apoptosis, como los genes *c-myc* y *nur-77*, (Nuñez et al., 1994) que a pesar de estar asociados con la progresión del ciclo celular participan en la inducción de apoptosis en algunas células, y el gen *p53*, cuya expresión se incrementa en casos de daño genómico, (Osborne et al., 1994) donde detiene a las células en la fase G1 del ciclo celular, con el objetivo de que se produzca la reparación del ADN antes de que se replique. (Meyn et al., 1996) La sobreexpresión de *p53* conduce directamente a la apoptosis. (Cory et al., 1995)

El producto de *nur77* es una proteína que pertenece a la familia del receptor nuclear de hormonas esteroides y su efecto en la apoptosis está dado porque actúa como un factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en la muerte celular. (Nuñez et al., 1994) Otro regulador fisiológico del ciclo celular que participa en la apoptosis es la proteína *Myc*, que es producto del proto-oncogén *c-myc*. La sobreexpresión del gen *c-myc* pudiera resultar en mitosis o apoptosis dependiendo de la disponibilidad de otros factores que estimulan el crecimiento celular. (Cohen et al., 1993)

Es así como la apoptosis es regulada por una cascada celular proteolítica, principalmente mediada por miembros de la familia de proteasas de cisteína, conocidas como caspasas, las cuales, proteolíticamente activan a otras proteínas intracelulares claves, que median la muerte celular programada, para lo cual se han descrito tres vías de señalización: (Keane et al., 2001)

Una vía involucra la unión de receptores de muerte que activa la pro-caspasa -8 y probablemente otras caspasas iniciadoras. (Keane et al., 2001)

Una segunda vía es controlada por la mitocondria e involucra el Factor 1 proteasa activador de la apoptosis, (*Apaf-1*) y caspasa -9 localizada en la mitocondria.

Una vez activado por citocromo *c*, *Apaf-1* junto con trifosfatos cofactores de nucleótido (d ATP o ATP) une y activa caspasa -3 y otras caspasas descendentes, de este modo la caspasa-8 y la caspasa -9 representan las proteasas de cisteína angulares en la vía del receptor de muerte y la vía mitocondrial (Citocromo *c*/*Apaf-1*), respectivamente. (Keane et al., 2001)

La tercera vía de apoptosis, la del RE, es mediada, a través de la caspasa -2. Los mecanismos que ponen en acción a esta caspasa aun no están del todo claros, sin embargo, cada día hay mas evidencia de que su activación tiene lugar en los mecanismos iniciales en la cascada de activación en la mitocondria, dentro de la vía intrínseca, al escindir y activar al latente proapoptotico Bid. Un modelo mas reciente sugiere que la proteína adaptadora *p53* inducida con un dominio de muerte (PIDD), es

inducida en respuesta a ciertos estímulos apoptóticos como lo es el daño al ADN, posteriormente PIDD atrae una segunda proteína adaptadora RAIDD, generando el reclutamiento de caspasa -2 a través de la interacción CARD- CARD y la formación del PIDDosoma (estructura análoga al apoptosoma, la cual la caspasa- 2 dimeriza y activa. (Kurokawa et al., 2009)

Durante la apoptosis, la activación de la caspasa -8, (a través de la vía de los receptores de muerte) y de la caspasa - 9, (vía mitocondrial) movilizan a las caspasas - 3, -6 y - 7, lo cual, genera la destrucción celular por escisión de diversas proteínas y activación de ADNasas. Es así como, la muerte celular por apoptosis, se pone en marcha por la unión de los miembros de la familia TNF a los receptores de muerte pertenecientes a la familia de receptores - TNF, entre los que se incluyen a los TNFR, Fas y TRAIL y la activación de estos inicia la formación de complejos de señalización, inductores de muerte celular multiproteicos, generando la agregación de estos complejos, lo cual causa los cambios conformacionales que desencadenan la actividad catalítica de las caspasas iniciadoras - 8 y -10. (R.S.Hotchkiss et al., 2009) Este proceso involucra la formación y activación de complejos como el complejo de señalización inductor de muerte (DISC), esto lleva a la activación, de una caspasa efectora típicamente, la caspasa -3, la cual en su forma activa es la responsable del anclaje de substratos de muerte, que generan las características morfológicas y bioquímicas distintivas de la apoptosis como lo son: La fragmentación del ADN, fragmentación nuclear y el abombamiento de la membrana. (L.Portt et al., 2010) Por lo que los agonistas de los receptores de muerte pueden ser usados por las células del sistema inmune para desencadenar la muerte celular programada. (L.Portt et al., 2010) Son varios los estímulos que pueden activar la apoptosis a través de la vía extrínseca, tales como, el estrés intra y extracelular, generados por cambios en la temperatura y la osmolaridad, agentes de daño al ADN, RL, remoción de nutrientes, oxígeno, factores de crecimiento, citocinas proinflamatorias, y procesos fisiológicos como el envejecimiento y el desarrollo. (L.Portt et al., 2010)

Mientras que la caspasa -9 regula principalmente la vía mitocondrial. Entre los factores precipitantes de esta vía, se encuentra el incremento intracelular de los RL, el daño al ADN, la repuesta a proteínas no plegadas y la privación de factores de crecimiento. (R.S.Hotchkiss et al., 2009) Estos iniciadores llevan a incremento de la permeabilidad mitocondrial, generando la liberación de proteínas proapoptóticas, de la membrana intermitocondrial, al espacio citosólico, como el citocromo c, y su homólogo DIABLO, (SMAC/ DIABLO) el cual, antagoniza inhibidores de proteínas proapoptóticas, ocasionando con esto, la activación de caspasas e incrementando la progresión a la apoptosis. (R.S.Hotchkiss et al., 2009)

Es importante comentar que los factores que determinan cual vía de muerte celular ha de activarse, incluye la etapa de ciclo celular, el tipo y magnitud del estímulo apoptótico. (R.S.Hotchkiss et al., 2009) Lo que genera la muerte celular programada, caracterizada por sus cambios morfológicos que incluye el redondeo y el ampollamiento de las membranas, el desensamblaje del citoesqueleto, la fragmentación del ADN y la condensación de la cromatina, lo que genera el empaquetamiento de las células moribundas y la inmersión de las células circundantes o fagocitos. Estas acciones pueden ser atribuidas a la acción de las caspasas, que desempeñan un rol importante en la apoptosis neuronal lo cual se ha asociado con la afección funcional que acompaña a las enfermedades neurodegenerativas y en las lesiones agudas de SNC. (Keane et al., 2001)

III.2. CASPASAS

El término caspasas es el término abreviado para proteasa específica – aspartato – dependiente de cisteína. (Basil et al., 2000) Las caspasas al compararse con otras proteasas, tienen una inusual especificidad por los residuos de aspartilo. (Basil et al., 2000) Se han identificado 14 miembros de la familia de este grupo de proteasas, las cuales se han numerado en el orden de su descubrimiento. De estas, la caspasa -11 y la caspasa -12, se han identificado solo en ratones, el resto están presentes en el humano. (Basil et al., 2000) Todas las caspasas se trasladan inicialmente como zimógenos inactivos y tienen las siguientes características en común:

Un pre-dominio N-Terminal de longitud variable de 22 a > 200 aminoácidos; Una subunidad larga de 17 - 20kDa; Una región corta subinterunidad de 10 aminoácidos y una subunidad pequeña de 10 - 12 kDa. La porción C-Terminal de la subunidad larga contiene un residuo catalítico de cisteína; juntos el acompañamiento de este y otros residuos conservados forman la secuencia semiconservada del pentapéptido QACXG en el sitio activo. (Alnemri et al., 1996; Thornberry et al., 1998; Basil et al., 2000)

Las pro-caspasas son procesadas por una proteólisis limitada a su forma activa, la cual consiste en un dímero de subunidad larga y corta. Sin embargo, *in vivo* las caspasas están conformadas más establemente como tetrameros constituidos de dos subunidades de dímeros largo/corto. (Basil et al., 2000) La clasificación de las caspasas se basa en sus funciones putativas y la homología en secuencias y las coloca en tres categorías: (Thornberry et al., 1998; Basil et al., 2000)

Iniciadores apoptóticos, ejecutores de la apoptosis y mediadores inflamatorios. (Thornberry et al., 1998; Basil et al., 2000)

Las caspasas -2, -8, -9 y -10 son consideradas iniciadoras de la apoptosis, dado que, actúan en posiciones hacia arriba de la cascada de apoptosis en diversas vías; esto es, en la superficie celular y la mitocondria. (Basil et al., 2000) Ellas tienen en común el α - hélice antiparalelo con capacidad de predominio N- Terminal que contiene 6 sitios de fijación complementaria. (Basil et al., 2000)

La caspasa -8 y la caspasa -10 tienen dos de estos dominios en su N- Terminal, conocido como dominios efectores de muerte. (DEDs) Mientras que la caspasa -2 y la caspasa -9 tienen solo uno de estos dominios, los cuales en caso de estos miembros son conocidos como de reclutamiento de caspasas. (CARDs) Estos juegan un papel importante en la localización y activación de procaspasas específicas. (Thornberry et al., 1998; Basil et al., 2000) Los ejecutores de la apoptosis, están constituidos por la caspasa -3, caspasa -6 y la caspasa -7, estas proteasas median algunas de las manifestaciones morfológicas y bioquímicas de la apoptosis: Como el ampollamiento de la membrana plasmática, la disolución de la membrana nuclear, la condensación y la marginación de la cromatina y la fragmentación del ADN. (Basil et al., 2000) Las caspasas ejecutoras tienen predominios cortos N-terminales cuya función aun se mantiene sin conocimiento. (Basil et al., 2000) Las caspasas -1 y -11 se consideran inflamatorias. De hecho la caspasa- 1 fue la primera en descubrirse y se vio que es la responsable del procesamiento de la prointerleucina 1- β a su forma madura. (Thornberry et al., 1992; Wang et al., 1998; Basil et al., 2000) La activación de las caspasas se ha descrito, como ya hemos comentado a través de dos vías principales, designadas como la vía intrínseca y extrínseca.

La vía extrínseca es iniciada por la unión de receptores de muerte celular, pertenecientes de la superfamilia del receptor de TNF/ FNG. (Ashkenazi et al., 1998) Estos incluyen TNF receptor 1 (TNFR1)/p55/ CD120 a, Fas/ Apo1/ CD95, Receptor de Muerte- 3 (DR3)/ Apo 3/WSL-1/TRAMP/LARD, FR4/TRAIL-R1 y DR5/Apo2/ TRAIL-R2/TRICK2/KILLER. De los cuales, TNFR1 y Fas tienen en común una región de 68 aminoácidos en su porción citoplásmica llamada “dominio de muerte”. La unión y trimerización de estos receptores por sus respectivos ligandos, TNF/ o ligando Fas, inducen cambios conformacionales que promueven la fijación de α linfotoxina, una molécula adaptadora al dominio de muerte. Las moléculas adaptadoras para Fas y TFR1 son la proteína asociadora de Fas con el dominio de muerte (FADD) y TNF- receptor asociado con el dominio de muerte, (TRADD) estas dos moléculas adaptadoras se caracterizan por un dominio C- Terminal de muerte complementario al del receptor. (Basil et al., 2000) Una vez formado el complejo trimerizado

receptor/ proteína adaptadora (Conocido como complejo receptor muerte- inductor o DISC) el DED de la proteína adaptadora fija pro-caspasa -8 o pro-caspasa -10, (Boldin et al.,1996 ; Muzio et al., 1996) la pro-caspasa aparentemente se autoactiva cuando múltiples zimógenos se agrupan en la superficie del receptor. (Muzio et al., 1998) Otra molécula adaptadora RAIDD / CRADD recluta procaspasa-2 a los receptores de muerte vía interacciones con CARD y a través de la proteína interactuante del receptor. (RIP) (Ahmad et al., 1997)

Mientras que la vía intrínseca es iniciada por la mitocondria, la cual, una vez que recibe estímulos apoptóticos libera citocromo c hacia el citosol, este último, se fija al factor- 1 activador de proteasa apoptotica, (APAF-1) que contiene un CARD N- Terminal. (Liu et al., 1996) En presencia de dATP un cambio conformacional en el APAF-1 recluta procaspasa -9 a través del CARDS de ambas proteínas, la procaspasa -9 luego aparentemente se autoactiva cuando un número suficiente de zimógenos se agrupan de modo muy similar a la procaspasa -8 y la procaspasa -10. (Liu et al., 1996) De hecho se ha demostrado que la pro caspasa -9 reside dentro del espacio intermembrana de la mitocondria y que se libera al citosol posterior a un estimulo apoptotico. (Krajewski et al., 1999) El dominio central de APAF-1 contiene una región fijadora para el homodímero Bcl-xL y en ausencia de estimulo apoptotico, APAF-1, procaspasa-9 y Bcl-xL existen en un complejo estable ternario, conocido como apoptosoma. (Y. Hu et al., 1998) Sin embargo después de un estimulo apoptotico, proteínas proapoptóticas semejantes a Bcl-2 como Bax y Bak dimerizan con Bcl-xL de este modo evitando su unión y represión de la activación de procaspasa -9. (Y. Hu et al., 1998) Es así, como, el proceso de activación de las caspasas, es complejo y letal para la célula, por lo que existen inhibidores endógenos que regulan la maquinaria de muerte celular en diversos puntos. entre estos se incluyen la familia de proteínas conocida como los inhibidores de apoptosis (IAPs) y otros como lo son, los receptores señuelo y las moléculas adaptadoras señuelo. (Basil et al., 2000) Los IAPs se caracterizan por secuencias N- terminales, de aproximadamente 65 aminoácidos, conocidos como “repeticiones Baculovirus IAP”. Además los IAPs también contienen un segmento C- Terminal, que es llamado dominio RING, el cual media interacciones proteína- proteína a través de una región semejante a un dedo de zinc. (Borden et al., 1995) En humanos se han identificado 5 IAPs: hIAP- 1/c- IAP-2, hIAP -2/c-IAP-1, IAP ligado a X (X- IAP/ humano, proteína semejante a IAP (hILP), proteína neuronal inhibidora de apoptosis (NAIP) y survivina. (Ambrosini et al., 1997) Los IAPs contienen 2 a 3 copias de BIR, a excepción de la survivina que contiene uno, e inhiben a las caspasas a través de dos mecanismos distintos:

La inhibición directa de caspasas activas y la interferencia de la activación de las procaspasas. Estudios cinéticos han demostrado que hIAP- 1/c- IAP-2, hIAP - 2/c-IAP-1, y X- IAP/hILP inhiben a las caspasas -3, -7 y -9 con poco efecto en caspasas -1,-6,-8 y -10, además X- IAP/hILP también inhibe a la caspasa -9 activa. Este efecto inhibitorio aparentemente es mediado por dominios selectivos dentro de cada IAP. (Basil et al., 2000) Otro tipo de inhibidores, que se ha visto se encuentran asociados con los receptores de muerte, son los receptores señuelo, los cuales, son homólogos a Fas o DR 4/5 pero carecen de los dominios de muerte citoplásmicos funcionales, por lo que competitivamente secuestran al ligando y de este modo previenen la activación del receptor de muerte. (Golstein et al., 1997; Marsters et al., 1997) Otra clase de inhibidores son las moléculas adaptadoras, las cuales son tipificadas por la familia de proteínas virales conocida como proteínas inhibidoras semejantes a FADD- ICE, (v Flips) estas proteínas contienen dos DED N- terminales que median su unión a FADD, procaspasa- 8 o procaspasa 10, lo que da como resultado el bloqueo del reclutamiento de las procaspasas a DISC y de este modo la apoptosis mediada por receptores es bloqueada. (Basil et al., 2000)

Una vez activadas las caspasas actúan sobre diversos ligandos, es decir mientras las caspasas tienen un absoluto requerimiento para un residuo de aspartil en la posición de sustrato de P1, otros residuos se ligan a este aspartato dependiendo de la especificidad de cada una de las caspasas. (Basil et al., 2000) Fue por esto que basado en su especificidad por sustratos las caspasas fueron divididas en tres categorías generales, que casualmente es la misma que la que ya describimos de acuerdo a su función: (Basil et al., 2000)

Las caspasas -1, -4 y -5 tienen predilección por la escisión después de DE (V/H) D, mientras que las caspasas -2,-3 y -7 prefieren DE (V/H) D, mientras que las caspasas -6, -8, -9 prefieren (V/L) E (H/T) D.

Ambas vías de la apoptosis, la intrínseca y la extrínseca convergen en la vía final en la cual las caspasas ejecutoras son activadas, de las cuales la caspasa -3 es el prototipo, por lo que las caspasas iniciadoras prefieren a los aminoácidos de cadena ramificada en la posición P4. Particularmente la caspasa -8 prefiere LETD y la caspasa -9 prefiere LEHD. (Thornberry et al., 1997) Así mismo, las caspasas -6, -7, y -10 también pueden activar procaspasa -3. Por su parte la caspasa -3 puede escindir a las procaspasas -6 y -9 por sí misma. Este dato, sugiere, que una vez activada la caspasa ejecutadora propaga su actividad a través de una asa de retroalimentación positiva que garantiza la muerte celular. (Basil et al., 2000) Una vez activadas las caspasas ejecutoras o efectoras, escinden muchos sustratos que conducen directamente al fenotipo de apoptosis. Se ha demostrado que el desmantelamiento del

citoesqueleto puede ser el resultado de la despolimerización de los filamentos de actina, lo cual involucra una proteína de 80 kDa asociada al citoesqueleto conocida como gelsolina. La escisión de esta proteína por la caspasa -3 genera un fragmento amino-terminal servidor de actina independiente de Ca^{+} , generando la apoptosis del núcleo y del citoplasma. (Kothakota et al., 1997) La caspasa -3 también escinde otra proteína abundante en el citoesqueleto, la cual ancla microtubulos a la superficie citoplásmica de la membrana plasmática, esta escisión puede resultar en el agrandamiento celular característico de la apoptosis inicial. (Basil et al., 2000) Otro ejemplo lo constituyen las proteínas nucleares laminillas las cuales anclan a la cromatina a la membrana nuclear, la cual puede ser escindida por la caspasa -6, esto puede dar como resultado las observaciones típicas de la marginación y condensación de la cromatina durante la apoptosis. (Orth et al., 1996) A su vez, el desmantelamiento del ADN puede ser generado por el factor -40 de fragmentación del ADN (DFF-40). Esta proteína de 40 kDa existe en estado de reposo unida al factor inhibidor de fragmentación del ADN factor 45, también conocido como inhibidor de CAD (ICAD). (Basil et al., 2000) DFF-45 es un sustrato para la caspasa -3 y su escisión, elimina su acción recesiva en DFF-40 permitiendo que este último entre al núcleo vía una localización nuclear de su secuencia C-Terminal y una vez en el núcleo este digiere directamente el ADN genómico. (Liu et al., 1997) Sin embargo habrá que mencionar que existen otras endonucleasas que participan en la apoptosis neuronal, y podría ser que la digestión del ADN facilita la fagocitosis de las células apoptóticas y la posibilidad de la transformación genética de los fagocitos. Por lo que durante este proceso se debe abolir cualquier proceso de reparación del ADN que podría interferir con la fragmentación de este. (Basil et al., 2000) Este es el caso de la polimerasa Poli (ADP – Ribosa) (PARP) y de la proteincinasa dependiente de ADN (DNA – PK), las cuales, son dos enzimas reparadoras que ADP ribosilan o fosforilan elementos nucleares, en respuesta a daño del ADN respectivamente. (Casciola et al., 1996) La polimerasa PARP contiene 3 dominios dentro de su secuencia de 113 –kDa: un dominio N- Terminal fijador de ADN (DBD), un dominio de automodificación central y un dominio catalítico C- Terminal. La porción de dedo de zinc del DBD se fija al sitio de rotura de ADN, permitiendo que el sitio catalítico ADP- ribosile la cromatina y de este modo repara el ADN. La caspasa -3 activa y escinde a PARP en un sitio DEVD²¹⁶G, lo cual , contrarresta su actividad al separar el DBD del resto de la proteína. De igual modo DNA –PK contiene un dominio N-Terminal de cierre de leucina y un dominio catalítico los cuales son escindidos aparte por la caspasa -3, en un sitio N DEVD²⁷¹. (Casciola et al., 1996) Además de escindir proteínas que reparan el ADN, la caspasa -3 también interfiere con la replicación de ADN. La subunidad de 140-kDa factor C de replicación (RF-C 140) contiene un dominio N- Terminal vinculante de ADN, un dominio central que liga el antígeno nuclear de célula proliferando (PCNA) y un dominio C- Terminal que permite que RF-C 140 se ligue a otras subunidades del complejo pentamerico RF-C. La caspasa -3

escinde a RF-C 140 en tres sitios putativos: DEVD⁷²³G, DLVD⁹²²S y IETD¹¹¹⁷A, lo que da como resultado que el dominio vinculante de la subunidad RF-C este separado del resto de la molécula. Sin embargo, en lugar de una pérdida de la función, esta escisión convierte al fragmento N- Terminal a su forma negativa que se une al ADN y previene su replicación, evitando así, la replicación de ADN innecesario. (Rheaume et al., 1997)

Así mismo cabe mencionar la existencia de las proteínas asociadas con regulación de las caspasas, dado que la conversión de una proteína a su forma dominante negativa se observa también en ciertas proteínas semejantes a Bcl-2. Aunque normalmente antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-xL son escindidos por la caspasa -3, lo que genera fragmentos C- terminales que se vuelven proapoptóticos. Como el ciclo de retroalimentación positiva para propagar la activación de caspasas, la amplificación de señales de apoptosis puede también ser alcanzada retroalimentación a nivel del apoptosoma. (Basil et al., 2000)

De modo similar la caspasa -8 puede escindir BID una proteína proapoptótica semejante a Bcl-2 cuyo fragmento C- Terminal promueve la liberación de citocromo c de la mitocondria potenciando la muerte celular. (Li et al., 1998)

Es por esto que es de particular interés para nosotros hacer énfasis en que después de la lesión traumática de la médula espinal, se inicia una compleja cascada de procesos fisiopatológicos, lo que involucra la expansión del daño primario hacia el tejido nervioso adyacente. Estos eventos de daño secundario se han descrito ampliamente en la literatura e incluyen a la isquemia, (Tei Kaido et al., 2005) la respuesta inflamatoria, (Bethea et al., 2002; Hausmann et al., 2003) el daño al citoesqueleto e inducción de vías apoptóticas, (Ekshyyan et al., 1994) excitotoxicidad (McAdoo et al., 2000; Park et al., 2004;) y el estrés oxidativo. Es decir, mientras el trauma mecánico inicia procesos de muerte celular rápida de las neuronas y la glía, se pone en marcha un insidioso y tardío mecanismo secundario que se caracteriza por el incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, un desequilibrio electrolítico, excitotoxicidad, una compleja y pobre entendida respuesta neuroinflamatoria que puede persistir por meses o años después del trauma inicial, que finalmente desembocan en un incremento de la muerte celular por apoptosis. (Norenberg et al., 2004; Profyris et al., 2004; Fleming et al., 2006)

III.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL.

En las etapas iniciales de la LTME ocurre un daño a la microcirculación, lo cual, produce isquemia que desencadena una falla energética que se traduce en la pérdida de la regulación iónica, este evento involucra la movilización de cationes monovalentes y divalentes como K^+ , Na^+ e incremento tanto de las concentraciones intracelulares como extracelulares de Ca^{2+} , también se observa un aumento en las concentraciones de Glutamato y otros aminoácidos excitatorios de 6 a 8 veces mayores que las concentraciones normales, (Agrawal et al., 1997) esta excesiva liberación de Glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio en el Sistema Nervioso Central, ha sido asociado con la presencia de excitotoxicidad en la materia gris y blanca. (Choi et al., 1992; Oka et al., 1993; McDonald et al., 1998; Li et al., 2000;) Normalmente el Glutamato es depurado del espacio extracelular por los astrocitos y en menor grado por la microglía. (Rimaniol et al., 2000; Van Landeghem et al., 2001; Matute et al., 2006.) Sin embargo, después de la lesión, el metabolismo de este neurotransmisor por los astrocitos se encuentra alterado, y su eliminación se encuentra inhibida indirectamente por el $TNF-\alpha$ y la $IL-1\beta$, (Chao et al., 1995; Pitt et al., 2003; Takahashi et al., 2003) las especies reactivas de Oxígeno (EROS) (Piani et al., 1993; Volterra et al., 1994) y el ácido araquidónico. (Zerangue et al., 1995) Del mismo modo, la microglía y los macrófagos activados podrían facilitar la acumulación de Glutamato en la hendidura sináptica. (Piani et al., 1991; Piani et al., 1994; Noda et al., 1999.) Estos cambios en conjunto, son capaces de disminuir el umbral de las neuronas a otros eventos bioquímicos celulares asociados con el incremento en la entrada de Ca^{2+} y Na^+ a la célula, lo que puede desencadenar la muerte celular. El círculo vicioso podría propiciarse ya que el mismo Glutamato es capaz de reclutar citocinas proinflamatorias como el $TNF-\alpha$ y elevar la expresión de receptores metabotrópicos o ionotrópicos de los tipos NMDA y AMPA/kainato, los cuales tienen asociado un canal de Ca^{2+}/Na^+ , lo que preserva el incremento del Ca^{2+} intracelular y la activación de enzimas dependientes del Ca^{2+} como: La sintasa del óxido nítrico constitutiva, la fosfolipasa C, la fosfolipasa A_2 , diversas cinasas y fosfatasa. (Beattie et al., 2002; Stellwagen et al., 2005) Al mismo tiempo, se activan proteasas como la calpaína que destruyen la mielina, favoreciendo un proceso desmielinizante, (Ray et al., 2003) por medio de estos eventos se promueven la muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis.

Otro evento que juega un papel muy importante en la etapa aguda de la lesión es la respuesta inflamatoria. La lesión de la médula espinal por contusión o compresión causa una necrosis hemorrágica central, acompañada de una prominente activación glial e infiltración leucocitaria. (Popovich et al., 1997; Hausmann, 2003; Sroga et al., 2003; Fleming et al., 2006) Es decir, mientras las

fuerzas mecánicas ocasionan una disrupción inicial de la barrera hematoencefalica, mediadores inflamatorios como el TNF- α y la IL-1 β , sobrerregulados inmediatamente después de la lesión, inducen cambios tardíos en la función endotelial incluyendo el incremento en la permeabilidad de la barrera. (Schnell et al., 1999) Así mismo, otras sustancias vasoactivas son liberadas por la glía y los leucocitos incluyendo: EROS, histamina y Óxido Nítrico que incrementan aún más este proceso. (Ellis et al., 1987; Unterberg et al., 1988; Butt et al., 1995; Armao et al., 1997; Carlson et al., 1998; Sarker et al., 1998; Nag et al., 2000) También, la metaloproteinasa de matriz (MMP-9), la cual puede ser un factor permeabilizante, producida por los neutrofilos y el endotelio, facilita la diapédesis de leucocitos. (Mautes et al., 2000) Los macrófagos y neutrófilos activados liberan citocinas, RL, eicosanoides y proteasas que causan toxicidad glial y neuronal. (Chao et al., 1992; Merrill et al., 1993; Chandler et al., 1995; Newman et al., 2001; Shamash et al., 2002; Bao et al., 2002; Liu et al., 2006; Brady et al., 2006) A su vez, las neuronas y la glía sintetizan citocinas proinflamatorias, particularmente, TNF- α e IL-1 β como parte de la comunicación intercelular normal. (Hopkins et al., 1995; Probert et al., 1997) Sin embargo, los incrementos sostenidos de estos mediadores causan una inflamación sin control que incrementa la muerte celular de neuronas y astrocitos. (Lee et al., 2000; Hermann et al., 2001; Shamash et al., 2002; Cai et al., 2003; Lu et al., 2005) De hecho la IL-6, también ha sido implicada en la neurodegeneración secundaria derivada de la lesión. (Zhu et al., 2000; Lacroix et al., 2002; Okada et al., 2004; Kerr et al., 2004) Por lo que la sobreexpresión de dichos mediadores en la médula espinal incrementa la infiltración leucocitaria e inhibe el crecimiento axonal, con lo que decrementan la recuperación locomotora. (Lacroix et al., 2002) Por su parte el estrés oxidativo (EO) ha demostrado una participación clave en la progresión de la lesión primaria de la médula espinal, ya sea traumática o isquémica. (Hall et al., 1989; Hulsebosch et al., 2002) Ya que después de la lesión traumática, éste EO se establece a través de eventos asociados con los procesos de isquemia/reperfusión a lo que se suma la liberación de los productos de la inflamación, lo que contribuye a la muerte celular. (Hall et al., 1989; Springer et al., 1997; Azbill et al., 1997; Lifshitz et al., 2004; Xu et al., 2005; Xiong et al., 2007) Los RL generados durante estos procesos inducen la apoptosis a través de la oxidación irreversible de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. (Merrill et al., 1993; Evans et al., 1996; Lewen et al., 2000; Liu et al., 2002; Xiong et al., 2007) De hecho, es bien sabido que la apoptosis puede ocurrir con un moderado pero letal estímulo oxidativo, mientras que, la necrosis resultaría de cambios oxidativos más agresivos. Esto se explica dado que la muerte por apoptosis requiere energía en forma de ATP. (Searle et al., 1982; Liu et al., 1996; Richter et al., 1996; Lelli et al., 1998; Lee et al., 1989) Por lo que, un EO suficientemente agresivo depleta las reservas energéticas y daña la maquinaria encargada de producir la energía necesaria para implementar los cambios estructurales asociados con la apoptosis. Por ejemplo, se ha reportado en distintas estirpes celulares la inducción de apoptosis por medio de la exposición a

bajas concentraciones de H_2O_2 ; mientras que, la exposición a altas concentraciones induce muerte celular por necrosis. (Lennon et al., 1991; Buttke et al., 1994; Lee et al., 1997)

De este modo Liu y colaboradores demostraron que la concentración de ONOO⁻ se incrementa dentro de las primeras 3 horas posteriores a la lesión de la médula espinal y que estos incrementos inducen la muerte celular de astrocitos y neuronas; es decir, hay evidencia creciente que el ONOO⁻ que se genera en la materia gris de la médula espinal posterior a una lesión, genera apoptosis probablemente secundario a la activación de caspasas, demostrando con esto su papel como agente durante el daño secundario de la lesión medular y que su remoción a través de la administración de antioxidantes y/o atrapadores de radicales podría reducir la extensión del daño y mejorar la funcionalidad. (Bao et al., 2003)

De hecho la peroxidación de lípidos juega un papel importante en la progresión del daño de la médula espinal. (Hall et al., 1989) La enzima Glutatión peroxidasa cataliza la reducción de lipoperoxidos y otros hidroperoxidos orgánicos usando el Glutatión reducido (GSH) como un donante de H^+ . (Norastola et al., 2004) De este modo, esta enzima junto con su sustrato GSH, proveen una importante protección contra el daño secundario a la lipoperoxidación. Existen estudios donde se ha encontrado un aumento en la expresión de GPx en las dos semanas siguientes a la transección de la médula espinal en ratas. (Norastola et al., 2004) Más relevante aún, nosotros en un estudio observamos cambios en la actividad de esta enzima a partir de las 2 horas posteriores a la misma que mantuvo un ascenso continuo dentro de las 24 horas consecutivas a la LTME. (Díaz- Ruiz et al., 2010) Estos resultados son compatibles con las disminuciones que determinamos de las concentraciones de GSH, dado que, al encontrarse incrementada la actividad enzimática de la GPX se consume una mayor cantidad de este sustrato, esto nos indica la importancia de diseñar estrategias terapéuticas más eficaces encaminadas a preservar las reservas de grupos Tioles como neuroprotectores para contrarrestar el estrés oxidativo durante la etapa aguda de la lesión traumática de la médula espinal. (Díaz – Ruiz et al., 2010) Además, algunas citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), el interferón (IFN) y la interleucina-1 (IL-1) son capaces de inhibir la actividad de la GPx. (Zachara et al., 1991; Lam et al., 1993) La inhibición de la síntesis del GSH, incrementa la formación de radicales libres, (Merad-Borudia et al., 1998) eleva la actividad de la Sintasa del Óxido Nítrico, (Heales et al., 1995) disminuye la actividad mitocondrial (Heales et al., 1995; Heales et al., 1995) e incrementa la vulnerabilidad excitotóxica. (Bridges et al., 1991) Además, se ha implicado al GSH en la síntesis y reparación de ADN.

Es así como son varios los estímulos, que se generan en la LTME que pueden activar la apoptosis a través de la vía extrínseca. Como, el estrés intra y extracelular, generados por cambios en la temperatura y osmolaridad, el daño del ADN, RL, remoción de nutrientes, oxígeno, factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias. (L.Portt et al., 2010) Es decir, durante la LTME, la apoptosis juega un papel principal en la progresión del daño, contribuyendo a la degeneración secundaria de las estructuras contiguas al epicentro de la lesión, a través de la degeneración Walleriana de los tractos ascendentes y descendentes en la sustancia blanca. (Crowe et al., 1997; Hulsebosch et al., 2002)

III.4. APOPTOSIS Y LA LESIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL

Hay evidencia creciente de la contribución de la muerte celular por apoptosis, en la generación del daño secundario de la LTME. (Keane et al., 2001) Como hemos comentado ampliamente, las caspasas se consideran importantes mediadores de muerte celular por estímulos generados durante la LTME. De hecho, en modelos experimentales, se ha encontrado que la procaspasa -8 (Enzima convertidora semejante a IL-1 β - FADD), es una caspasa iniciadora de 55kDa. (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996) Esta procaspasa puede procesarse así misma después de su unión con un miembro de la familia de receptores de muerte de TNF, el Fas. (Kischkel et al., 1995; Medema et al., 1997) Este último, el Fas es un receptor de membrana de 45 kDa, que forma un complejo de señalización inductor de muerte (DISC) con una proteína adaptadora FADD y procaspasa -8. (Nagata et al., 1995) Una vez activa la caspasa -8, de modo directo o a través de mecanismos mitocondriales dependientes de la interacción BH3 producen la escisión del dominio de muerte agonista, generando con esto, la escisión cascada abajo, de la caspasa -3 y por lo tanto, activando la muerte celular por apoptosis. Al mismo tiempo, la caspasa-3 puede escindir por sí misma a la procaspasa -8 perpetuando, de este modo el mecanismo de apoptosis. (Slee et al., 1999; Woo et al., 1999) Y dado que la procaspasa -3 es una proteína de 32 kDa constitutivamente expresada en el cerebro y en la médula espinal (Namura et al., 1998; Hayashi et al., 1998) y que una vez que se activa y escinde en caspasa-3, interactúa con más de cuarenta proteínas sustrato diferentes, incluyendo: Proteínas del citoesqueleto, enzimas de reparación, proteincinasas y factores de transcripción; Se ha demostrado que la inhibición, de su activación (entre las que se involucra la forma activa de la caspasa -8) bloquea la muerte neuronal por apoptosis en diseños de isquemia de médula espinal y cerebral. (Hara et al., 1997; Chen et al., 1998; Matsushita et al., 2000)

Todo esto parte de que la pro forma de caspasa -8, a través de inmunohistoquímica se ha encontrado en las neuronas de sustancia gris, y de modo poco frecuente en neuronas de sustancia blanca. Lo que coincide con el hecho de que, se ha detectado ARNm de caspasa -8 en tejido normal, en mayor proporción en sustancia gris que en sustancia blanca de médula espinal, (Matsushita et al., 2000) por lo que, su fijación al receptor Fas constituye uno de los mecanismos precursores en la activación de caspasa -8. De hecho Matsuchita y colaboradores evaluaron la expresión de Fas en tejido medular normal y sometido a isquemia, encontrando la expresión constitutiva de Fas en neuronas de tamaño medio y grande dentro del cuerno ventral de la médula espinal y en los microvasos. (Matsuchita et al., 2000) De mayor relevancia fue el hecho de que después de la lesión por isquemia de la médula espinal, se incremento la positividad para el marcaje de Fas y esto se corrobora por Inmunoblot, encontrándose inmunoreactividad para Fas en menos del 10% de las neuronas positivas para procaspasa-8 previo a la lesión y en 10 a 20% de las neuronas positivas para procaspasa- 8 posterior a la lesión, encontrándose mayor intensidad y diseminación de la inmunoreactividad para procaspasa- 8 en las neuronas de la sustancia gris, y mayor intensidad de la elevación del ARN para caspasa- 8 un día después de la reperfusión, este incremento, fue evidente a las 3 horas y se mantuvo hasta 24 horas después de la reperfusión, con predominio de caspasa -8 escindida dentro de la sustancia gris ventral isquémica y en la zona intermedia, mostrando caspasa- 3 activa en la misma distribución. (Matsushita et al., 2000)

En este mismo estudio para corroborar el daño del ADN, se practico tinción de Neuronas Terminal positivas con etiquetados finales de ADN mediadas por desoxinucleotidil transferasa, (TUNEL) siendo positivas entre las 18 y 24 horas posteriores a la lesión en el cuerno dorsal, en las regiones intermedia y medial de la sustancia ventral, mostrando que las caspasas activadas están presentes en los sitios de daño al ADN. (Matsushita et al., 2000) A su vez, los autores evaluaron la presencia de Citocromo c, el cual se encontró predominantemente en citoplasma al día siguiente a la reperfusión y determinaron Gelsolina degradada en el mismo curso temporal. (Matsushita et al., 2000) Lo que coincide con los hallazgos de Casha y colaboradores, quienes en un modelo de lesión de médula espinal por compresión en ratas, demostraron correlación espacial y temporal entre degeneración axonal, apoptosis de oligodendrocitos y niveles de Fas y caspasa -8 (Casha et al., 2001) y al administrar un inhibidor de caspasa -8, FLIP-L, encontraron disminución de muerte celular por apoptosis. (Casha et al., 2001) Por su parte otros investigadores como Li y colaboradores en modelos de LTME, reportaron células positivas para marcadores de apoptosis (TUNEL) y expresión de Bcl-2 lo que sugiere que la lesión induce protección para apoptosis. (Crowe et al. 1997; Li et al., 1997; Micharel S. Beattie et al., 2000)

Así mismo existen varios estudios que demuestran células apoptóticas en el epicentro de la lesión a las 6 horas posteriores a la LTME, las cuales se incrementaron a las 24 horas en sitios distantes siempre en sustancia blanca, con persistencia de pocas células en el centro, respetándose un delgado anillo de sustancia blanca. (Michael S, Beattie et al., 2000) Estos hallazgos fueron corroborados por inmunohistoquímica sugiriendo que las células apoptóticas son oligodendrocitos y microglía. Lo que prueba que hay al menos dos etapas de lesión secundaria que involucran a la apoptosis, dentro de estas. Una etapa inicial de muerte celular por necrosis en el centro de la lesión acompañada de apoptosis de diversos tipos celulares y una fase tardía confinada principalmente a la sustancia blanca que involucra a los oligodendrocitos y a la microglía, esta última etapa, dura al menos tres semanas y aparentemente la muerte de oligodendrocitos podría estar asociada con la degeneración axonal inducida por la lesión. Es decir, la apoptosis de los oligodendrocitos podría asociarse con la degeneración Walleriana, lo cual puede contribuir a la desmielinización de axones intactos, probablemente por que la remoción de axones retira el soporte trófico necesario para los oligodendrocitos, o bien, por que los productos de la degeneración de los axones podrían ser tóxicos para los oligodendrocitos circundantes. (Crowe et al., 1997; Liu et al., 1997; Michael S, Beattie et al., 2000) Esta última hipótesis, también fue sugerida por Takagi y colaboradores, quienes, demostraron por tinción doble por inmunohistoquímica con TUNEL, HOECHST y al medir la actividad colorimétrica de caspasa -8, que la muerte ocurre tanto en neuronas como en oligodendrocitos siendo mayor en la sustancia blanca, donde tiene lugar la degeneración Walleriana, en este estudio la pérdida de oligodendrocitos, también se extendió a sitios distales de la lesión concluyendo en su trabajo, con la teoría de que la muerte neuronal de oligodendrocitos es debida probablemente por activación de caspasas, dado que encontraron incrementos significativos en la actividad de la caspasa- 8 en los días 3 y 8, así como de la actividad de caspasa - 3 al día 7. (Takagi et al., 2003) Sugiriendo que TNF- α , puede ser importante en la apoptosis generada posterior a LTME a través del reclutamiento de receptor de muerte asociado a dominio/proteína de dominio asociada a receptor de muerte TNF 1. (Ashkenazi et al., 1998; Takagi et al., 2003) Esto ha sido reafirmado por la caracterización de la participación de TNF- α posterior a LTME., además de que la microglía activada puede secretar citocinas como TNF- α , así como RL, óxido nítrico y que eso puede inducir la apoptosis de oligodendrocitos. (Gehrman et al., 1995) Lo cual, podría concordar con el hecho de que existe una correlación entre la microglía activada en los tractos de sustancia blanca y los oligodendrocitos apoptóticos, estos datos sugieren que la microglía activada se pone en contacto con los oligodendrocitos apoptóticos, sin embargo aun no está claro si esta interacción puede ser iniciada por señales apoptóticas o si la microglía contribuye a la apoptosis de oligodendrocitos por liberación de factores y citocinas. (Michael S, Beattie et al., 2000) De hecho hay estudios reportados en la literatura en donde, en un modelo de microlesiones de columna cervical la microglía fue activada por los

oligodendrocitos dañados y que esto inducía la invasión de células de Schwann probablemente por la liberación de algunos factores no determinados. (Michael S. Beattie et al., 2000)

Así mismo la microglía produce una cantidad de moléculas citotóxicas como la IL-1 β , otras asociadas con protección tisular, como el NGF, y algunas con propiedades tanto citotóxicas como protectoras como el TNF- α . (Michael S. Beattie et al., 2000) Por otro lado la microglía puede liberar Glutamato, lo cual, potencialmente aumentaría la excitotoxicidad. (Michael S. Beattie et al., 2000) Mas aún la glía modula la conducción axonal y hay datos descritos por diversos autores de que la activación de receptores AMPA/Kainato en los astrocitos y en la oligodendroglía de la médula espinal, contribuye a la degeneración axonal postraumática de la médula espinal. Acorde a esto Wada y colaboradores demostraron, tras la administración de un antagonista del receptor metabotropico NMDA de Glutamato, una reducción en el número de células apoptóticas en un modelo de LTME en ratas. (Wada et al., 1999)

Otros estudios refuerzan la importancia de estos hallazgos, como es el hecho de que los oligodendrocitos expresan in Vitro el receptor TNF p55, el cual, contiene un dominio intracelular de muerte celular Fas-like. Cuya activación ha demostrado desencadenar muerte celular y desmielinización en modelos de Esclerosis múltiple. (Michael S. Beattie et al., 2000) Por lo que estos mediadores se han evaluado en modelos de LTME, tomando en cuenta el soporte trófico que proporcionan los oligodendrocitos para los axones y que estos a su vez, influyen la proliferación glial, a través de la familia del ligando neurogulina, el cual incluye Heregulina, factor de diferenciación Neu, factor de crecimiento glial (GGF) y receptor inducido por actividad de la acetilcolina. (Vartanian et al., 1997) En particular GGF2 interactúa con la oligodendroglía vía el receptor HER4 influyendo en su supervivencia y diferenciación; las integrinas también aparentemente juegan un papel clave en la mediación de las interacciones oligodendroglial - axonal, porque la oligodendroglía mieliniza muchos de los axones del SNC, la apoptosis de esta glía podría contribuir a la desmielinización, lo cual exacerbaría los déficits neurológicos en la LTME. (Frost et al., 1999) Es así como, son varios los mediadores de muerte celular, que han sido estudiados en modelos de LTME, por ejemplo factores neurotróficos como el Factor de crecimiento neuronal, (NGF) el cual, es producido por la microglía y podría estar involucrado en la muerte celular por apoptosis mediada por el receptor neurotrófico de baja afinidad p 75 NGFR. Este último no es expresado de modo normal en los oligodendrocitos de la médula espinal de adultos, sin embargo, se han hecho marcajes con anticuerpos para p 75 NGFR dentro de las siguientes 24 hrs. siguientes a lesiones de médula espinal ya sea por contusión o hemisección, en los que los oligodendrocitos que se marcaron en columnas dorsales, coincidieron con el patrón de

muerte celular y degeneración en estudios previos, donde de hecho, muchos de los oligodendrocitos identificados con morfología nuclear apoptótica expresaron p75 NGFR. (Casaccia – Bonnefil et al., 1998; Michael S. Beattie et al., 2000) En otro estudio se detectó por medio de inmunohistoquímica la expresión sobrerregulada de NGF en la microglía después de LME. Estos hallazgos sugieren que el NGF podría actuar paradójicamente como mediador de apoptosis en algunas células después de la lesión de la médula espinal. (Michael S. Beattie et al., 2000)

Aunado a esto, diversos estudios han demostrado que la apoptosis y la activación de caspasas después de la LTME implican neurodegeneración y daño funcional, y es que, se ha visto, que la activación de caspasas - 3, - 8 y - 9 ocurre dentro de las 72 horas siguientes a la lesión, tanto en neuronas como oligodendrocitos, así como, en algunos astrocitos.

Es así como particularmente en la LTME, las caspasas han sido implicadas en el mecanismo de lesión secundaria, ya que, hay reportes de que la activación de la caspasa - 3 ocurre en la LTME en modelos experimentales y en humanos. (Knoblauch et al., 2005) De hecho, Emery y colaboradores en 1998, reportaron apoptosis oligodendroglial y colocalización de caspasa -3 en autopsias de pacientes humanos que fallecieron a las 3 horas y 15 días posteriores a una LTME. Otros han encontrado caspasas activadas tanto en sustancia gris y blanca de segmentos caudales y rostrales al epicentro de la lesión, sugiriendo la participación de estas proteasas en la expansión de la lesión. (Keane et al., 2001; Knoblauch et al., 2005)

Un mecanismo potencial de activación de las caspasas que ha sido descrito en los oligodendrocitos de LTME, es la liberación excesiva de Glutamato, que puede generar la activación de caspasa - 3 y la apoptosis de oligodendrocitos. (Knoblauch et al., 2005) Mientras que en otros estudios se ha visto que la generación de RL secundarios a LTME puede contribuir a la liberación de citocromo c, activación de caspasas - 3 y - 9 y la apoptosis de motoneuronas, estos datos, han demostrado que las caspasas - 8 y - 9, son activadas en materia blanca y gris después de LTME en ratas. (Springer et al., 1997; Knoblauch et al., 2005) Tal es, el caso de Knoblauch y colaboradores, quienes, demostraron un incremento de la subunidad activada de caspasa - 3 y la expresión de subunidades escindidas de caspasas - 8 y - 9 de una a 72 horas posteriores a la LTME en modelos experimentales; (Knoblauch et al., 2005) en estos estudios el mayor incremento en los niveles de caspasa -8 escindida, fue a las 24 horas siguientes a la lesión, mientras que los niveles de caspasa -9 escindida fueron mayores de 1 a 24 horas posteriores al evento (Knoblauch et al., 2005) también, por medio de inmunohistoquímica se encontraron formas activas de caspasas - 3, - 8 y - 9 no solo en el epicentro de la lesión, si no también, a través de de la

materia gris de dos segmentos distales del sitio de impacto a las 4 y 72 horas posteriores a la LTME, así mismo, determinaron caspasas activadas presentes en células con características de neuronas motoras, con predominio prevalente de caspasas- 3 y - 9 sobre caspasa-8, particularmente en las 4 primeras horas posteriores a la LTME. (Knoblatch et al., 2005) De este modo, la activación de las caspasas puede reflejar un paso en la vía general de la muerte celular que lleva ya sea a necrosis o a apoptosis dependiendo de la disponibilidad energética, (Knoblatch et al., 2005) puesto que, la activación temprana de caspasa - 3 puede conducir a necrosis secundaria a través de degradación proteica dependiente de caspasas que regulan el calcio intracelular, (Knoblatch et al., 2005) por lo que, la rápida activación de caspasas en el epicentro de la lesión puede preceder al desarrollo de un núcleo necrótico de la cavidad de la lesión y el involucro en su extensión rostrocaudal. (Keane et al., 2001) Con base en esto, habrá de considerarse que la activación de caspasas no siempre lleva a la muerte celular, ya que, también se han relacionado con la neurogenesis y la plasticidad sináptica. (Knoblatch et al., 2005) Sin embargo, el resultado funcional final de la LTME depende de como responde el SNC a la pérdida neuronal y axonal para alcanzar la reparación y la reorganización, es decir, si la apoptosis ocurre en esta situación compleja puede contribuir tanto a la reparación como a la lesión secundaria. De hecho la muerte celular y la remoción son críticas para la remodelación y la reparación en otras situaciones, en otras palabras, la apoptosis en la LTME puede desempeñar un papel en el daño y en la reparación neuronal, (Michael S. Beattie et al., 2000) lo cual, coincide con los hallazgos de Yi Chi y colaboradores quienes en su estudio, sugieren que la expresión de TNF- α se incrementa, \square en la fase inicial en el periodo agudo (< 7 hrs) y promueve la apoptosis, pudiendo agravar la lesión secundaria, esto contrasta con el periodo crónico de la lesión donde TNF- α puede tener efectos benéficos al inducir la proliferación e hipertrofia de los astrocitos, que podrían estar involucrados en la restauración del ambiente iónico extracelular, recaptura de neurotransmisores, liberación de neuromoduladores, la remoción de EROS y metales, así como, la secreción de factores neurotróficos como NGF, BDNF y moléculas de la matriz extracelular, como: ICAM -1, NCAM y N- cadherina. Por lo que hay que considerar, que todos estos factores podrían proporcionar neuroprotección y promover la regeneración. (Ling -Yi Chi et al., 2008) Otro mecanismo de protección neuronal de la apoptosis, sería el hecho de que algunas proteínas inductoras de muerte celular son también esenciales para la supervivencia, como es el caso de la caspasa - 8 y su activador: El factor de muerte asociado a FAS, (FADD) ya que, son necesarios para la apoptosis mediada por el receptor de muerte pero también son críticos para la diferenciación de macrófagos y la proliferación de células T inducidas por antígenos, por lo que el bloqueo de las vías de muerte celular por apoptosis, puede mantener células dañadas y por tanto disfuncionales. (R.S.Hotchkiss et al., 2009) Esto último, podría estar en relación con que las células apoptóticas inducen anergia o un fenómeno inmunosupresor, mientras que las células necróticas

umentan la inflamación, en parte por la fijación del dominio del receptor de tipo C de la familia 9 de lectina. (CLEC9A) en las células dendríticas. (R.S.Hotchkiss et al., 2009) Además la neurodegeneración esta relacionada con la supresión de la reentrada de las neuronas al ciclo celular por cambios en la expresión de ciclinas y cambios en la actividad de las cinasas dependientes de ciclinas, (CDK) ya que se ha visto que existe una interacción directa entre la maquinaria del ciclo y el programa apoptótico, esto se confirmo en un estudio, en el cual en neuronas postmitóticas cdc 2 el CDK1, (un regulador del ciclo celular) inicia la apoptosis a través de la activación directa de Bad, un desencadenante de apoptosis, representando así otro mecanismo clave de apoptosis neuronal. (Kurokawa et al., 2009)

Es por esto que las opciones terapéuticas dirigidas contra puntos específicos o moléculas clave en la apoptosis requieren la generación de un mayor conocimiento del papel de estos mecanismos en la evolución de la LTME en los diversos tipos celulares, en los tiempos y en los sitios anatómicos. (Michael S. Beattie et al., 2000)

Con base en esta información nosotros proponemos caracterizar la actividad de la caspasa - 8 durante la etapa aguda del daño y evaluar el posible efecto anti-apoptótico de la DDS, sobre esta mecanismo, ya que la literatura sugiere que el bloqueo de la apoptosis podría favorecer la neuroconducción e incrementar la capacidad de recuperación. (Michael S. Beattie et al., 2000)

III. 5. DAPSONA (DDS).

La DDS (4-4'-diaminodifenilsulfona) su estructura química es la más simple de las sulfonas, una sulfona que se une a dos átomos de carbono.

III. 5.1. Absorción.

Se absorbe en el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad del 86%. En voluntarios sanos se probaron dosis de 100 mg de DDS vía oral y se obtuvieron concentración máxima en suero de 1.10 a 2.33 mg/L alcanzadas entre las 0.5 y las 4 h. La vida media tiene un rango de 12 a 30 h. La farmacocinética es similar en adultos y en niños. (Zhu et al., 2001)

III. 5.2. Distribución.

La DDS se une al 75% de las proteínas, su metabolito monoacetilado se une completamente a las proteínas. Se distribuye en todo el organismo incluyendo la piel, el hígado, los riñones y los eritrocitos. La DDS cruza la barrera hematoencefálica y la placenta, asimismo se ha encontrado en la leche materna. (Zhu et al. 2001)

III.5.3. Metabolismo.

Después de su absorción en el tracto gastrointestinal, la DDS es transportada a través de la circulación portal al hígado donde es metabolizado vía acetilación o N-hidroxilación. La hidroxilación da como producto una hidroxilamina, metabolito tóxico producido por el citocromo P-450, mientras que la acetilación por la N-acetiltransferasa produce dos metabolitos no tóxicos que son la monoacetil DDS y la diacetil DDS.

El CYP3A es la isoforma de citocromo que preferentemente hidroxila a la DDS, aunque algunos estudios señalan que también son importantes los CYP2E y CYP2C.

Diversos investigadores han estudiado el efecto de la velocidad de acetilación sobre la eficacia y toxicidad de la DDS y han sugerido que la velocidad no interfiere con la vida media o la eficacia. Finalmente, permanecía la controversia sobre el efecto del polimorfismo de la acetilación (de acetiladores rápidos y pobres), a través de diversos estudios se pudo comprobar que este evento no afecta la vida media ni interfiere con la eficacia ni la toxicidad del fármaco. (Zhu et al., 2001)

III. 5.4. Excreción.

Cerca del 85% de la DDS se excreta a través de la orina, principalmente como glucuronidos, y alrededor del 10% se elimina por medio de la bilis. El 50% de la DDS se elimina 24 h después de ser administrada, sin embargo se ha reportado que su excreción puede incrementarse o disminuirse cuando se administran de manera conjunta con rifamicina y probenecid, respectivamente. (Zhu et al., 2001)

III. 5.5. Biodisponibilidad.

La farmacocinética de la DDS administrada de manera intravenosa fue analizada por Pieters y Zuidema en 1987, en este estudio se administraron 100 mg de DDS por las vías intravenosa y oral, los valores fueron comparados y no se observaron diferencias farmacocinéticas significativas entre las dos vías de administración. La vida media se encuentra en un rango de 16.4 a 30.4 h y la biodisponibilidad es de 63.5 a 98.1 mg (concentraciones determinadas por HPLC en suero), por lo que la biodisponibilidad oral de la DDS en humanos fue del 86 al 100%.

III.5.6. Acción Antimicrobial.

Como un antibiótico, la DDS actúa con el mismo mecanismo de acción que las sulfonamidas, inhibiendo la síntesis de ácido dihidrofolico por un mecanismo competitivo del sitio activo de la dihidropteroato sintetasa, por lo tanto, la DDS inhibe el crecimiento de microorganismos que son dependientes de la síntesis de ácido fólico.

III.5.7. Acción antioxidante.

La DDS podría actuar como un antioxidante, (Niwa et al., 1984; Anderson et al., 1987) ya que se ha propuesto su papel como antioxidante en los neutrofilos fagocíticos. (Suda et al., 2005) Con base a esto, Chun Cho y colaboradores demostraron que la DDS disminuye la citotoxicidad en fibroblastos diploides no fagocíticos humanos inducida por el Paraquat en un 90%, esta citotoxicidad es generada por el Paraquat que produce aniones súper oxido, a través de vías metabólicas dependientes de NADPH. La proteincinasa PKC esta involucrada en el ensamblaje iniciado por ligando de NADPH oxidasa (NOX) para la generación de aniones súper oxido. (Martins et al., 2002) Recientemente el Paraquat ha demostrado que induce la generación de EROS a través de la activación de PKC- delta dependiente de NOX. (Miller et al., 2007) También la mitocondria esta involucrada en el estrés oxidativo y la toxicidad mediada por Paraquat, ya que el sitio de mayor producción de súper oxido por este compuesto es el complejo mitocondrial I, NADH – ubiquinona oxidoreductasa (Cocheme et al., 2008) y el Paraquat reduce la actividad del complejo V mitocondrial. (Yang et al., 2007) Esto genera la disfunción de la maquinaria mitocondrial y el daño de los complejos mitocondriales, ocasionando la inhibición del transporte de electrones con el incremento subsecuente de la producción del anión súper

óxido. (Boeslsterli et al., 2007) Luego entonces, la disfunción mitocondrial se caracteriza por la generación de súper óxido, disminución del potencial de membrana, daño del ADN mitocondrial y cambios morfológicos. Por lo que Chun Cho, en su estudio determinaron que la DDS redujo la citotoxicidad del Paraquat, a través de la inhibición de la generación de aniones súper óxido mitocondrial y citosólico. En este mismo estudio se vio que la DDS protegió a los fibroblastos de los cambios morfológicos mitocondriales y de la reducción de su potencial de membrana. (Sung Chun Cho et al., 2010)

Otra posibilidad de acción antioxidante de la DDS, es su papel como depurador (“scavenger”) de RL, la cual ha sido probada en su reacción con un RL estable el DPPH, reaccionando con el y convirtiéndolo en 1,1,1 – Dífenil - 2 – (2,4,6 – trinitro fenil) hidracina (Dinis et al., 1994; Wang et al., 1998) En contraste, Chun Cho y colaboradores determinaron una reducción en los niveles de súper óxido dismutasas 1 y 2, SOD1 y SOD 2 respectivamente, lo cual podría indicar el menor requerimiento de estas enzimas depuradoras de RL. (Sung Chun Cho et al., 2010)

A su vez, de acuerdo a que, la NOX4 es la isoforma predominante de NOX en el tipo celular empleado en el estudio comentado y que esta isoforma esta asociada con la generación de EROS y que se ha sugerido que la regulación a la baja de NOX4 podría reducir el EO. (Lambeth et a., 2004) Es así como, Chun y Cho encontraron disminución en la expresión de genes de NOX4 dosis dependiente tras la administración de DDS. (Sung Chun Cho et al., 2010)

La importancia de estos hallazgos en conjunto es la actividad antioxidante de la DDS no solo en células fagocíticas y dado que la disfunción mitocondrial generada por el Paraquat se ha caracterizado por la alta producción de súper óxido, el daño al ADN mitocondrial y la reducción del potencial de membrana, por lo que este compuesto se usa en modelos experimentales de Parkinson (Tiruchelvam et al., 2000) Estos datos en conjunto generan la probabilidad de la DDS como agente terapéutico que minimice el EO en enfermedades neurodegenerativas. (Sung Chun Cho et al., 2010)

III..5.8. Acción Antiinflamatoria.

La DDS interfiere con la quimiotaxis y la migración de los neutrófilos y con la adhesión de estos al endotelio vascular al inhibir a la integrina $\beta 2$, (CD 11b7CD18) también, interfiere con la activación y la función de las proteína G (tipo Gi), que inician la cascada de segundos mensajeros para el estímulo

quimiotáctico, esta inhibición suprime a su vez el reclutamiento de neutrófilos, la producción de especies reactivas de oxígeno y la secreción de sustancias tóxicas.

Se sabe que las especies reactivas de oxígenos son bactericidas, pero también dañan el tejido adyacente incrementando los procesos de destrucción. El ácido hipocloroso es un potente oxidante que es producido por la enzima mieloperoxidasa (MPO), una hemoproteína localizada en los neutrófilos. El ácido hipocloroso también se sintetiza por la enzima peroxidasa de eosinófilos. Se ha comprobado que la DDS administrada en dosis terapéuticas, tiene la capacidad de inhibir a la MPO, ya que se une de manera irreversible a la MPO, modificando la estructura química del sitio activo. (Bozeman et al., 1992) La peroxidasa de los eosinófilos es igualmente sensible a la inhibición por DDS que la MPO, (Bozeman et al., 1992) por estas razones, la DDS protege a las células del daño generado por los neutrófilos y los eosinófilos, directamente por la inhibición de la generación de sustancias tóxicas y especies reactivas de oxígeno. (Martin et al., 1985)

La DDS inhibe además la unión del leucotrieno B₄ (LTB₄) a su receptor en los neutrófilos y produce una inhibición de la respuesta quimiotáctica para el LTB₄ (Marloff et al., 1988) e inhibe la síntesis de los productos de la 5-lipooxigenasa en los leucocitos polimorfonucleares, también inhibe a la enzima liposomal, por lo tanto, la DDS reduce la producción de prostaglandinas y leucotrienos y bloquea su efecto inflamatorio, (Zhu et al., 2001) fenómeno importante de daño secundario desencadenado después de una LTME. (Hausmann et al., 2003) Finalmente, en estudios previos de nuestro grupo, se demostró que la DDS tiene efecto neuroprotector contra los efectos de agonistas de los receptores para Glutamato (Santamaria et al., 1997), neurotransmisor implicado en el daño secundario generado después de una LTME. (Li et al., 2000)

Por otra parte, recientemente Lacroix y colaboradores en el año 2002, demostraron que la presencia de neutrófilos y macrófagos inhibe los procesos de crecimiento axonal en un modelo daño médular, donde implantaron fibroblastos genéticamente modificados para sobreexpresar citocinas pro-inflamatorias por lo que el uso de la DDS probablemente revertiría este efecto.

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo proponemos el uso de la DDS como un fármaco antiapoptótico después de una LTME.

IV. JUSTIFICACIÓN

La lesión de la médula espinal, conlleva a una significativa y catastrófica disfunción y discapacidad física, con implicaciones económicas y psicológicas, en el individuo, su familia y la sociedad. (Peter AC Lim et al., 2007) Después de la LTME, se inicia una cascada de procesos fisiopatológicos, que involucran la expansión del daño primario hacia el tejido nervioso adyacente. Estos eventos de daño secundario incluyen: La isquemia, (Tei et al., 2005) la respuesta inflamatoria, (Bethea et al., 2002; Hausmann et al., 2003), el daño al citoesqueleto e inducción de vías apoptóticas, (Ekshyyan et al., 1994) excitotoxicidad, (McAdoo et al., 2000; Park et al., 2004;) el estrés oxidativo, que pueden persistir por meses o años después de la lesión inicial, que finalmente desembocan en un incremento de la muerte celular por apoptosis. (Norenberg et al., 2004; Profyris et al., 2004; Fleming et al., 2006) Dado que son varios los estímulos que pueden activar la apoptosis, a través de la vía extrínseca, (L.Portt et al., 2010) por la unión de los miembros de la familia TNF a los receptores de muerte pertenecientes a la familia de receptores de TNF que desencadenan la actividad catalítica de la proteasa de Cisteína iniciadora, caspasa-8 (R.S.Hotchkiss et al., 2009) y al no existir una terapéutica eficaz para este problema de salud pública, nosotros proponemos, en el presente trabajo evaluar el posible efecto antiapoptótico de la DDS en la etapa aguda después de la lesión, dadas sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antagonista de la excitotoxicidad y moduladoras del calcio, inhibiendo la activación de la vía extrínseca de la apoptosis, a través del bloqueo de la escisión de la proteasa de cisteína ejecutora caspasa- 8 en la etapa aguda de la LTME.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿La administración de DDS posterior a la LTME en un modelo experimental en ratas, es antiapoptotica a través de la reducción en la actividad de la caspasa- 8?

VI. HIPÓTESIS

Si la administración de DDS ejerce efecto antiapoptotico, entonces, observaremos disminución de la actividad de la caspasa -8 en un modelo experimental de LTME en ratas.

VII. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad de la caspasa-8 a diferentes tiempos después de la LTME y analizar el posible efecto antiapoptotico de la DDS en la etapa aguda de la lesión traumática de la médula espinal en ratas.

VIII. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el curso temporal de la actividad de caspasa -8 en el tejido nervioso de la médula espinal durante la etapa aguda de la LTME.
- Determinar el pico máximo de actividad de caspasa -8 en el tejido nervioso de la médula espinal durante la etapa aguda de la LTME.
- Determinar si la administración de DDS posterior a la LTME inhibe la actividad de caspasa -8 evaluada en su pico máximo de actividad.
- Determinar la ventana terapéutica de la administración de DDS como posible antiapoptótico.

IX. MATERIAL Y METODOS

IX .1. Animales.

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar de 200 a 250 g las cuales fueron distribuidas aleatoriamente en los siguientes grupos y sometidas a los procedimientos descritos a continuación:

GRUPO 1:

Animales sometidos al procedimiento quirúrgico, realizando una laminectomia a nivel de la novena vértebra torácica y sacrificados por decapitación a las 4 horas después del pocedimiento quirúrgico. (n=5)

GRUPO 2 – 4:

Animales con laminectomia y lesión por contusión moderada dejando caer un cilindro metálico de una altura de 25 mm directamente en el tejido de la médula espinal a nivel de la novena vértebra torácica, deacuerdo al método descrito por Basso y colaboradores en 1996 y posteriormente, sacrificadas a diferentes tiempos: a las 4, 24 y 72 horas después de la lesión. (n= 5; por grupo)

Grupo 5:

Animales con procedimiento quirúrgico tipo laminectomia y tratadas posteriormente con el vehículo de DDS por vía i.p, y sacrificadas al tiempo previamente determinado de máxima actividad de la caspasa - 8. (a las 72 horas) (n=5)

Grupo 6 y 7:

Animales sometidos a laminectomia y lesión por contusión moderada dejando caer un cilindro metálico de una altura de 25 mm directamente en el tejido de la médula espinal a nivel de la novena vértebra torácica y tratadas posteriormente con DDS a una dosis de 12.5 mg/Kg de peso por vía i.p. (Ríos y et al., 2004), iniciando el tratamiento, a las 3 y 5 horas después del daño respectivamente, sacrificadas al tiempo previamente determinado de máxima actividad de la caspasa -8 . (72 hrs.) (n=5; por grupo.)

Posterior al sacrificio se obtuvieron segmentos de la medula espinal del epicentro de la lesión de 0.25 cm. en dirección distal y proximal. Los pesos de las muestras obtenidas estuvieron comprendidos entre .0250 - .0350 g.

Las cuales fueron colocadas en nitrógeno liquido y almacenadas en congelación hasta realización de los ensayos.

IX .2. Laminectomia.

Bajo anestesia con pentobarbital 50 mg/Kg intraperitonealmente y en condiciones de asepsia y antisepsia se procedió a realizar una incisión longitudinal desde la parte media a baja, de la región dorsal, se realizo una laminectomia de las regiones T9 y T10 exponiendo la medula espinal, con la duramadre íntegra, a continuación se procedió a realizar cierre por planos con nylon de 00.

IX .3. Modelo de lesión por contusión.

Previa administración intraperitoneal de una dosis de pentobarbital sódico de 50 mg/Kg, se procedió a realizar bajo condiciones de asepsia y antisepsia, laminectomía a nivel de T9 exponiendo la médula espinal con la duramadre íntegra. Los animales fueron colocados en un equipo especializado para producir una lesión por contusión (N.Y. Spinal Cord Impactor) a través del cual se deja caer un cilindro metálico de una altura de 25 mm previamente estandarizada para ocasionar una lesión por contusión moderada, este modelo experimental de lesión, fue desarrollado en la Universidad de Nueva York, (Gruner et al., 1992) esté equipo cuenta con un software que tiene la capacidad de analizar la lesión siguiendo diversos parámetros, como: Grado de compresión del tejido medular, velocidad, tiempo y altura con que impacta el cilindro metálico al tejido nervioso. Posterior al trauma los animales fueron suturados y colocados en una cámara de cuidados intensivos para pequeñas especies (Schoer Manufacturing Co., Kansas City. MO) para su recuperación. Asimismo se colocaron en cajas individuales de acrílico con aserrín estéril, hasta el sacrificio.

IX.4. Determinación de proteínas por el método de Lowry.

Las muestras Se analizaron de acuerdo con el método de Lowry y colaboradores en 1951, para determinar su contenido de proteínas. Se diluyo cada muestra en una proporción 1:20, (50 µl del homogenado + 950 µl de agua) se pipetearon 0.4 ml de la muestra diluida y se agregaron 2 ml de la siguiente solución: 49 ml de Na_2CO_3 al 2 % + 0.5 ml de CuSO_4 al 1% 10 minutos después, se agregó el reactivo folin fenol 1:1 (0.2 ml por cada muestra) y se leyó la absorbancia después de 30 minutos en un espectrofotómetro U.V visible a 550nm, lamda 20 Perkin –Elmer.

IX. 5. Ensayo fluorométrico de actividad de caspasa-8 /FLICE

Para la determinación de la actividad de caspasa-8, se utilizó el kit de ensayo fluorométrico Caspase-8/FLICE comercializado por BioVision Research.

El cual mide la actividad de la caspasa-8 que inicia la apoptosis en células de mamíferos.

El kit de ensayo fluorométrico Caspasa-8/FLICE proporciona una simple y conveniente medida de la actividad de caspasa que reconoce la secuencia IETD. Este ensayo se basa en la detección de la escisión del sustrato IETD-AFC (AFC: 7-amino-4-trifluorometilcumarina). El IETD-AFC emite luz azul ($\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$); una vez que se ha generado la escisión del sustrato por FLICE o caspasas relacionadas, el AFC libre emite una fluorescencia amarillo-verde ($\lambda_{\text{max}} = 505 \text{ nm}$), la cual puede ser cuantificada utilizando un fluorómetro o un lector de fluorescencia de placas de microtítulos. La comparación de la fluorescencia de AFC proveniente de una muestra apoptótica con un control no inducido permite la determinación de las veces que se incrementa la actividad de FLICE.

El ensayo se realizó de la manera siguiente:

Primero fue adicionado el DTT al buffer de reacción inmediatamente antes de su uso (concentración final de 10 mM: Para lo cual, se agregaron 10 μl del reactivo 1.0 M de DTT por 1 ml de amortiguador de reacción 2X.)

A continuación, cada muestra se homogeneizó en un volumen de 1:20 de la solución 10 mM de DTT/ amortiguador de reacción 2X.

Previamente se determinaron proteínas por técnica de Lowry para posteriormente usar muestras de homogenizado con un volumen que contenía 50 μg de proteína, las cuales se resuspendieron en 50 μl de buffer de lisis celular enfriado. Se incubaron las muestras en hielo por 10 minutos.

Posteriormente se agregaron 50 μl del Buffer de reacción 2X (que contiene 10 mM DTT) a cada muestra. Y se agregaron 5 μl del sustrato 1 mM IETD – AFC, para obtener una concentración final 50 μM . Finalmente se dejó incubando a 37 °C por dos horas.

A continuación se leyeron las muestras en un fluorómetro de lector de placas equipado con un filtro de excitación de 400 nm y un filtro de emisión de 505 – nm.

Se determinó la actividad restando las lecturas de una hora a la de dos horas con una sensibilidad de 95%.

IX. 6. Análisis Estadístico.

Los resultados de la actividad de la caspasa-8 de animales lesionados o no y sacrificados a diferentes tiempos (4, 24, 48 y 72 horas), fueron analizados con una prueba de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) para poder establecer el uso de pruebas paramétricas o no paramétricas, como la prueba fue no significativa, los resultados de la actividad de la caspasa-8 fueron analizados con una ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett para comparar los grupos con lesión sacrificados a diferentes tiempos con respecto al grupo control. (laminectomía)

Una vez establecido el tiempo máximo de actividad de caspasa-8 después de la lesión, (72 hrs) se analizaron los resultados de la actividad de dicha enzima en animales con LTME y tratados con DDS a 3 y 5 hrs posteriores al daño utilizando una ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett., utilizando el paquete estadístico SPSS versión 17.0.

X. RESULTADOS

En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos de la actividad de la caspasa-8 durante la etapa aguda de la LTME, los cuales, están expresados como U.F./ gr de proteína por hora y son los valores promedio \pm error estandar de la actividad fluorometrica de caspasa-8 de 5 animales por grupo. Donde observamos, un incremento en la actividad de la caspasa-8 en la médula espinal a las 4 y 24 horas posteriores a la lesión de 18.1% y 28.6% respectivamente vs grupo control, (laminectomia) estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

Por otro lado a las 72 horas posteriores a la lesión, se encontro la maxima de actividad de caspasa-8, al observarse un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) del 68.8% con respecto al grupo solo sometido a laminectomia.

Por lo tanto a las 72 hrs posteriores a la lesión traumática se determino la máxima actividad de caspasa-8 en la médula espinal de ratas.

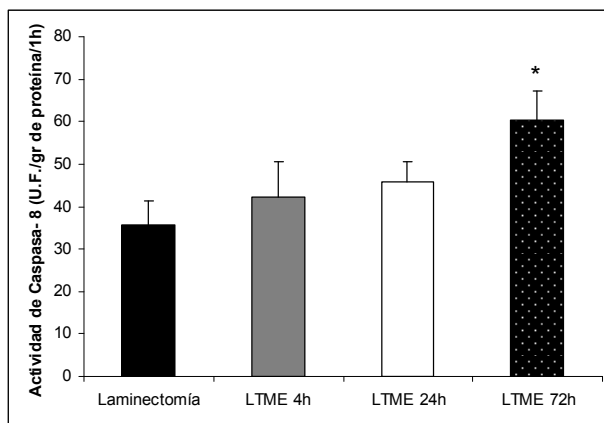


Figura 1. Grafica en la que se muestra los valores promedio de la Actividad de la caspasa -8 presente a diferentes tiempos después de la lesión, los resultados están dados en U.F. por gramo de proteína por hora, y son el valor promedio \pm error estandar de 5 animales por grupo. Laminectomía: Animales solo con laminectomía y sin lesión, LTME: animales con lesión a nivel de la novena vértebra torácica. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$.

En la figura 2, se muestran los valores promedio de la actividad de la caspasa -8 durante la fase aguda de la LTME, de animales tratados o no con DDS administrada a las 3 o 5 horas después del daño, los valores son el promedio \pm error estandar de la actividad fluorometrica de caspasa-8 de 5 animales por grupo y están expresados en Unidades de fluorescencia por gramo de proteína por hora.

Dentro de las 72 horas siguientes a la lesión, (tiempo de maxima actividad de caspasa-8 determinado en el ensayo previo), se encontró que la actividad de caspasa- 8 en los grupos con LTME, tratados con DDS a las 3 y 5 horas posteriores a la lesion presentaron un incremento de la actividad de caspasa- 8 de 13.8% y 1.4% respectivamente al ser comparados con el grupo con laminectomia (Resultados estadísticamente no significativos), mientras que en el grupo tratado solo con vehiculo de DDS i.p. se observó un incremento del 78% en la actividad de caspasa -8 comparado con las ratas que solo se sometieron al procedimiento de laminectomia, un incremento estadísticamente significativo, ($p < 0.05$) evidenciando el posible efecto antiapoptotico de la DDS en la LTME.

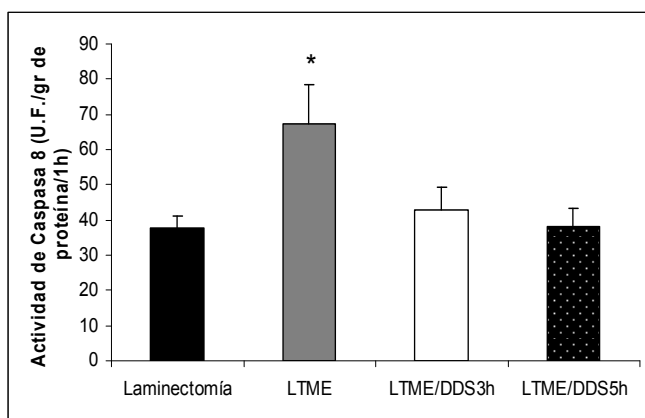


Figura 2. Grafica en la que se muestra los valores promedio \pm error estandar de la Actividad de la caspasa -8 presente a las 72 horas después de la lesión de 5 animales por grupo, los resultados están dados en U.F. por gramo de proteína por hora. Laminectomía: Animales solo con laminectomía y sin lesión, LTME: animales con lesión a nivel de la novena vértebra torácica, LTME/DDS 3h: animales con lesión a nivel de la novena vértebra torácico tratados con una dosis de 12.5 mg/Kg. de peso por vía i.p. a las 3 horas de la lesión, LTME/DDS 5h: animales con lesión a nivel de la novena vértebra torácico tratados con una dosis de 12.5 mg/Kg. de peso por vía i.p. a las 5 horas de la lesión . ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$.

XI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se caracterizó, el curso temporal de la actividad de caspasa-8 en la etapa aguda de la LTME y pudimos observar la máxima actividad de esta proteasa de Cisteína a las 72 horas, con un incremento del 68.8% con respecto al grupo solo sometido a laminectomía. ($p < 0.05$) Esto coincide con los hallazgos de Takagi y colaboradores quienes encontraron incrementos significativos en la actividad de la caspasa-8 en los días 3 y 8. (Takagi et al., 2003)

Y podrían contrastar de modo indirecto con los resultados obtenidos por Knotblach y colaboradores, quienes en 2005 demostraron un incremento en la expresión de la caspasa-9 de una a 72 hrs. posteriores a LTME en modelos experimentales; (Knotblach et al., 2005) y un pico máximo de expresión de la caspasa -8 a las 24 hrs. después del daño, (Knotblach et al., 2005) sin embargo esto se refiere a la expresión de dichas enzimas no a la actividad, por lo que sería interesante realizar estudios de expresión de estas caspasas.

Estos hallazgos sugieren que el TNF- α , puede ser importante en la apoptosis generada posterior a LTME a través de la activación del receptor de muerte asociado a dominio/proteína de dominio asociada a receptor de muerte TNF 1. (Ashkenazi et al., 1998; Takagi et al., 2003) Esto ha sido confirmado por la caracterización de la participación de TNF α posterior a LTME. Además de que la microglía activada puede contribuir a la muerte celular por apoptosis de los oligodendrocitos al secretar citocinas como TNF- α , radicales libres y óxido nítrico. (Gehrman et al., 1995) Otros mediadores implicados en la muerte celular por apoptosis son los aminoácidos excitatorios, dado que, los oligodendrocitos parecen ser altamente sensibles al Glutamato, a través de receptores AMPA/ Kainato y hay estudios en los que el bloqueo de la liberación del calcio intracelular mediado por aminoácidos excitatorios protege contra la muerte celular por necrosis, pero permite la respuesta hacia la muerte celular por apoptosis. (Michael S. Beattie et al., 2000) Alternativamente las células pueden iniciar el programa de apoptosis, pero morir por necrosis por la falla energética debida a la disfunción mitocondrial. (Michael S. Beattie et al., 2000) También se ha visto que el Glutamato activa a la microglía, ya que en estas células se ha detectado la expresión de ARNm del receptor metabotrópico de Glutamato mGlu_{5a} (Biber et al., 1999) que cuando se une a su ligando el neurotransmisor Glutamato estimula la producción de IP₃, generando consiguientemente el incremento en las concentraciones de calcio citosólico, lo que genera que esta libere mayores cantidades de Glutamato, citocinas inflamatorias, como IL- 1 β , IL-6 IFN- γ y TNF- α , lo cual se ha correlacionado con un daño mayor al tejido nervioso, particularmente esta última citocina estimula de modo paracrino la liberación de

Glutamato al sobregular la Glutaminasa, al mismo tiempo, el TNF- α promueve mayor neurodegeneración a través de silenciar señales de supervivencia y activar la cascada apoptótica dependiente de señales promovidas por el ligando Fas. (Takeuchi et al., 2006) Es decir, la respuesta inflamatoria de la LTME puede ser en parte mediada por la microglía, la cual induce la apoptosis. De hecho, hay estudios que demuestran que la activación y la proliferación de la microglía pueden causar la liberación de CD95L y TNF α , los cuales, pueden inducir muerte celular por apoptosis en la LTME, a través de la activación de CD95 y el receptor 1 de TNF (TNFR1) respectivamente, generando la activación de caspasas y la liberación de citocromo c. Aunado a esto, diversos estudios han demostrado que la apoptosis y la activación de caspasas después de la LTME implican neurodegeneración y daño funcional. (Knoblauch et al., 2005) Dado de que son varios los estímulos que pueden activar la apoptosis a través de la vía extrínseca. Como, el estrés intra y extracelular, generados por cambios en la temperatura y osmolaridad, el daño del ADN, RL, remoción de nutrientes, oxígeno, factores de crecimiento, citocinas proinflamatorias (L.Portt et al., 2010) y que la evidencia creciente, sugiere fuertemente la importancia de la activación de la cascada apoptótica prolongada en el mecanismo de la LTME, nosotros probamos el efecto inhibitorio de la actividad de la caspasa-8 de la DDS, ya que hay reportes en la literatura de la probable función neuroprotectora de dicho fármaco.

Nuestros resultados demostraron un incremento estadísticamente no significativo de la actividad de caspasa-8 de 13.8% y 1.4% respectivamente al ser comparados con el grupo con laminectomía en los animales tratados con DDS a 3 y 5 hrs. después del daño respectivamente, mientras que en el grupo tratado solo con vehículo de DDS i.p. se observó un incremento del 78% en la actividad de caspasa-8 comparado con las ratas que solo se sometieron al procedimiento de laminectomía, un incremento estadísticamente significativo, ($p < 0.05$) evidenciando el posible efecto antiapoptótico de la DDS en la LTME.

Los posibles efectos antiapoptóticos de la DDS podrían explicarse por sus propiedades como antiinflamatorio, ya que este fármaco actúa como un inhibidor irreversible de la mieloperoxidasa, al modificar el sitio activo de esta enzima. (S.M. Debol et al., 1997) Otros mecanismos por medio de los cuales la DDS tiene propiedades antiinflamatorias inherentes a su grupo sulfona (Zhu et al., 2001) que reducen la generación de radicales libres neurotóxicos son: la interferencia con la migración quimiotáctica y la supresión del reclutamiento de neutrófilos, (Harvath et al., 1986; S.M. Debol et al., 1997) la inhibición de la actividad de la peroxidasa de eosinófilos, (Bozeman et al., 1992) inhibición de la generación de los productores de 5-lipooxigenasa. (G.Wozel et al., 1995) Entre los efectos neuroprotectores de la DDS son el antagonismo, contra las acciones desencadenadas por el Glutamato,

ya que, se le han atribuido propiedades contra la excitotoxicidad, como el hecho de poder actuar como el antiepiléptico estructuralmente similar, a la Zonisamida, capaz de inactivar los canales de calcio sensibles a voltaje. (H.Minato et al., 1997; Y. Suzuki et al., 2003;) Así mismo, se ha evidenciado que la DDS puede ajustar los niveles intracelulares de Calcio. (Suda et al., 2005) Lo que concuerda con el hecho de que debido a que la activación de NADPH oxidasa (NOX) genera anión súper oxido y que las isoformas de proteincinasa PKC dependientes de calcio están implicadas en su activación. (Inoguchi et al., 2003) Chun Cho y colaboradores evaluaron la actividad de PKC β II que es fosforilada por el Paraquat, encontrando que la DDS suprime la señalización de calcio inducida por Paraquat con la supresión subsiguiente de la activación de NOX4 y la reducción en la generación de EROS. (Sung Chun Cho et al., 2010) Por otro lado hay modelos experimentales, que han valorado la funcionalidad de la DDS como neuroprotector. (M. Altagracia et al., 1994; Santamaría et al., 1997; Ríos et al., 2004) Ya que se ha visto el efecto de la DDS como antagonista en las convulsiones inducidas por un agonista de los receptores AMPA/Kainato, el ácido Kainico. (Santamaría et al., 1997)

La importancia del uso de la DDS como anti apoptótico puede ser en parte atribuido a su papel antioxidante y antiinflamatorio como inhibidora de la MPO (Bozeman et al., 1992) (Díaz –Ruíz et al., 2011) de la NADPH oxidasa tipo 4 NOX4 (Sung Chun Cho et al., 2010), y al atenuar la excitoneurotoxicidad generada por los receptores AMPA/ Kainato (Santamaría et al., 1997) ya que estas vías convergen en la exacerbación de la inflamación generando más TNF- α . Retomando que la vía extrínseca es iniciada por la unión de receptores de muerte celular, pertenecientes de la superfamilia del receptor de TNF/ FNG. (Ashkenazi et al., 1998).

Una vez formado el complejo trimerizado receptor/ proteína adaptadora (Conocido como complejo receptor muerte- inductor o DISC) el DED de la proteína adaptadora fija pro caspasa -8 o -10, (Boldin et al., 1996 ; Muzio et al., 1996) la procaspasa aparentemente se autoactiva cuando múltiples zimógenos se agrupan en la superficie del receptor. (Muzio et al., 1998). Por lo que el efecto de la DDS como antiapoptótico al bloquear la vía extrínseca, disminuyendo la actividad de la caspasa-8 podría por el bloqueo de la perpetuación de la respuesta inflamatoria y la generación de radicales libres, así como, modulando las concentraciones intracelulares de calcio y los efectos excitotóxicos del Glutamato.

XII. CONCLUSIONES

Durante la etapa aguda de la LTME en un modelo experimental en ratas el tiempo de máxima actividad de caspasa -8 fue a las 72 hrs.

La administración de DDS dentro de las 3 a 5 hrs posteriores a la LTME disminuye la actividad de caspasa- 8 durante la etapa aguda, tal vez al bloquear la vía extrínseca de la apoptosis, probablemente por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antagonista del Glutamato y modulador de las corrientes de calcio.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Wang, L. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase- 2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res.* 1997; 57: 615-619.
2. Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. 1996; *Cell* 87: 171.
3. Ambrosini, G., Adida, C, and Altieri, D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. 1997; *Nat. Med.* 3: 917-921.
4. Ameisen JC. Programmed cell death and AIDS: From hypothesis to experiment. *Immunol Today.* 1992; 13:388.
5. Anderson R, Theron AJ, Ras GJ. Regulation by the antioxidants ascorbate, cysteine, and dapsone of the increased extracellular and intracellular generation of reactive oxidants by activated phagocytes from cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis.* 1987;135: 1027-32.
6. Araceli Diaz-Ruiz , Mireya Alcaraz-Zubeldia , Valente Maldonado , Hermelinda Salgado-Ceballos, Marisela Mendez-Armenta, Camilo Rios, *Neuroscience Letters.*2009; 452 : 56–59.
7. Araceli Diaz-Ruiz, Hermelinda Salgado-Ceballos, Sergio Montes, Gabriel Guizar-Sahagun, Noemi Gelista-Herrera, Marisela Mendez-Armenta Sofia Diaz-Cintra, and Camilo Rios Delayed Administration of Dapsone Protects From Tissue Damage and Improves Recovery After Spinal Cord Injury *Journal of Neuroscience Research.* 2011; 89:373–380.
8. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.
9. Armao, D., Kornfeld, M., Estrada, E.Y., Grossetete, M., Rosenberg, G.A. Neutral proteases and disruption of the blood–brain barrier in rat. *Brain Res.* 1997; 767: 259–264.
10. Azbill, R.D., Mu, X., Bruce-Keller, A.J., Mattson, M.P., Springer, J.E. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res.* 1997; 765: 283–290.
11. Bao F. and Liu D. *Neuroscience* ; 2003; 116: 59–70

12. Bao, F., Liu, D., Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces neuron death and neurological deficits. *Neuroscience* 2002; 115: 839–849.
13. Basil A. Eldadah and Alan . Faden. Caspase Pathways, Neuronal Apoptosis, and CNS Injury *Journal Of Neurotrauma*; 2000; Volume 17, Number 10.
14. Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., Ha, B.K., Von Zastrow, M., Beattie, M.S., Malenka, R.C . Control of synaptic strength by glial TNF - alpha. *Science*; 2002; 295: 2282–2285.
15. Bethea JR, Dietrich WD . Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. *Curr OpinNeurol*; 2002; 15: 355–360.
16. Boelsterli UA, Lim PL. Mitochondrial abnormalities--a link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? *Toxicol Appl Pharmacol*; 2007;220: 92-107.
17. Boise LH, González-Garcia M, Postema CE. Bcl-X and Bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*; 1993;74:597-08.
18. Bozeman PM, Learn DB, Thomas EL. Inhibition of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase by dapsone. *Biochem Pharmacol*. 1992; 44: 553-563.
19. Brady, K.M., Texel, S.J., Kishimoto, K., Koehler, R.C., Sapirstein, A. Cytosolic phospholipase A alpha modulates NMDA neurotoxicity in mouse hippocampal cultures. *Eur. J. Neurosci*. 2006; 24: 3381–3386.
20. Butt, A.M. Effect of inflammatory agents on electrical resistance across the blood–brain barrier in pial microvessels of anaesthetized rats. *Brain Res*. 1995; 696, 145–150.
21. Buttke, T. M.; Sandstrom, P. A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol*. 1994; Today 17:7–10.
22. Cai, Z., Pang, Y., Lin, S., Rhodes, P.G. Differential roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. *Brain Res*. 2003; 975: 37–47.
23. Camilo Rios,, Juan Nader-Kawachi, Ana Julia Rodriguez-Payan, Concepcion Nava-Ruiz Neuroprotective effect of dapsone in an occlusive model of focal ischemia in rats *Brain Research*. 2004; 999 : 212–215.

24. Carlson, S.L., Parrish, M.E., Springer, J.E., Doty, K., Dossett, L. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp. Neurol.* 1998; 151: 77–88.
25. Casciola-Rosen, L., Nicholson, D.W., Chong, T. Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair, a fundamental principle of apoptotic death. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 1957-1964.
26. Chandler, S., Coates, R., Gearing, A., Lury, J., Wells, G., Bone, E. Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci. Lett.* 1995; 201: 223–226.
27. Chao, C.C., Hu, S., Ehrlich, L., Peterson, P.K.. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Behav. Immun.* 1995; 9: 355–365.
28. Chao, C.C., Hu, S., Molitor, T.W., Shaskan, E.G., Peterson, P.K.. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J. Neuroimmunol.* 1992; 149: 2736–2741.
29. Chen, J. Nagayama, T., Jin, K.. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 1998; 18: 4914-4928.
30. Choi DW. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 1992; 23: 1261-1276.
31. Cocheme HM, Murphy MP. Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J Biol Chem.* 2008;283:1786-98.
32. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol. Today* 1993;14(3):126-30.
33. Cory S. Regulation of lymphocyte survival by the Bcl-2 gene family. *Ann Rev, Immunol.* 1995;13:513-43.
34. Crowe M.J., Bresnahan J.C., Shuman S.L., Masters J.N., Beattie M.S. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys, *Nat. Med.* 1997; 3: 73–76.
35. Dinis TC, Maderia VM, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 315:161-9.
36. Ekshyyan O, Aw TY. Apoptosis in acute and chronic neurological disorders. (*Front Bioscience* 1994; 9:1567–1576.

37. Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol.* 1991; 7: 663.
38. Ellis,W. Pulsed subcutaneous electrical stimulation in spinal cord injury: preliminary results. *Bioelectromagnetics.* 1987; 8: 159–164.
39. Evans, T.J., Cohen, J. Mediators: nitric oxide and other toxic oxygen species. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996; 216: 189–207.
40. Fleming, J.C., Norenberg, M.D., Ramsay, D.A., Dekaban, G.A., Marcillo, A.E.,Saenz, A.D., Pasquale-Styles, M., Dietrich, W.D. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain.* 2006; 129: 3249–3269.
41. G. Wozel, B. Lehmann, Dapsone inhibits the generation of 5- lipoxygenase products in human polymorphonuclear leukocytes, *Skin Pharmacol.* 1995; 8: 196– 202.
42. Golstein, P. Cell death, TRAIL and its receptors. *Curr. Biol.* 1997; 7: R750-R753.
43. H. Minato, C. Kikuta, B. Fujitani, Y. Masuda, Protective effect of zonisamide, an antiepileptic drug, against transient focal cerebral ischemia with middle-cerebral artery occlusion – reperfusion in rats, *Epilepsia.* 1997; 38: 975–980.
44. Hall, E.D., Braughler, J.M. Central nervous system trauma and stroke: II. Physiological and pharmacological evidence for the involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radic. Biol .Med.* 1989; 6: 303–313.
45. Hará, H, Friedlander, R.M., Gagliardini, V. Inhibition of interleukin 1/3 converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc. Nati. Acad. Sei. U.S.A.* 1997; 94: 2007-2012.
46. Hausmann . Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2003; 41: 369–378 3.
47. Hayashi H, Tatebe S, Osaki M, Goto A, Sato K, Ito H. Anti-Fas antibody-induced apoptosis in human colorectal carcinoma cell lines: role of the p53 gene. *Apoptosis.* 1998; 3(6):431-7.
48. Heales S.J. R Davies, S.E.C,Beates T:E., Clark,.J.B. Depletion of Brain glutathione is accompanied by impaired mitochondrial function and decrease N-acetyl aspartate concentration *Neurochem Res.* 1995; 20: 31-38.

49. Hermann, G.E., Rogers, R.C., Bresnahan, J.C., Beattie, M.S. Tumor necrosis factor-alpha induces cFOS and strongly potentiates glutamate mediated cell death in the rat spinal cord. *Neurobiol. Dis.* 2001; 8: 590–599.
50. Hopkins, S.J., Rothwell, N.J. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. *Trends Neurosci.* 1995; 18: 83–88.
51. Hu, Y., Benedict, M.A., Wu, D., Inohara, N., and Nuñez, G. Bcl-xL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95: 4386-4391.
52. Hulsebosch C.E. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury, *Adv. Physiol. Educ.* 2002; 26: 238– 255.
53. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:S227-32.
54. Itoh N, Yonehara S, Ishii A. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell.* 1991; 6:233-43.
55. Jackson AB, Dijkers M, DeVivo MJ, Poczatek RB. A demographic profile of new traumatic spinal cord injuries: Change and stability over 30 years. *Arch Phys Med Rehabil* 2004;85:1740-8.
56. Joo P, Woo MS, Kuo CJ, Signorelli P, Biemann HP, Hannun YA, Blenis J. FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. *Cell Growth Differ.* 1999 Dec;10(12):797-804.
57. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Depraetere V. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994;265:528-30.
58. Kerr, B.J., Patterson, P.H. Potent pro-inflammatory actions of leukemia inhibitory factor in the spinal cord of the adult mouse. *Exp. Neurol.* 2004; 188: 391–407.
59. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 1995 Nov 15;14(22):5579-88.

60. Knoblauch SM, Huang X, VanGelder J, Calva-Cerqueira D, Faden AI. Selective caspase activation may contribute to neurological dysfunction after experimental spinal cord trauma. *J Neurosci Res.* 2005 May 1;80(3):369-80.
61. Kohji Matsushita, Yongqin Wu, Jianhua Qiu, Loic Lang-Lazdunski, Lorenz Hirt, Christian Waeber, Fas Receptor and Neuronal Cell Death after Spinal Cord Ischemia *The Journal of Neuroscience*, September 15, 2000, 20(18):6879–6887.
62. Korsmeyer SI. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulator of cell death. *Blood* 1992;80:879.
63. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C. Caspase-3-generated fragment of gelsolin, effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 1997; 278: 294-298.
64. Krajewski, S., Krajewska, M., Ellerby, L.M. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. 96: 5752-5757.
65. Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip. *Review Cell.* 2009 Sep 4;138(5):838-54.
66. L. Harvath, K.B. Yancey, S.I. Katz, Selective inhibition of human neutrophil chemotaxis to N-formyl-methionyl-leucyl- phenylalanine by sulfones, *J. Immunol.* 1986. 137: 1305– 1311.
67. L. Portt, et al., Anti-apoptosis and cell survival: A review, *Biochim. Biophys. Acta* 2010
68. Lacroix S, Chang L, Rose-John S, Tuszynski MH. Delivery of hyper-interleukin-6 to the injured spinal cord increases neutrophil and macrophage infiltration and inhibits axonal growth. *J. Comp. Neurol.* 2002; 454: 213-228.
69. Lam KW, Wang L, Hong BS, Treble D. Purification of phospholipid hydroxiperoxide glutathione peroxidase from bovine retina. *Curr Eye Res.* 1993. 12(1):9-15
70. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004;4:181-9.
71. Lee, Y. J.; Shacter, E. Bcl-2 does not protect Burkitt's lymphoma cells from oxidant-induced cell death. *Blood* 1997. 89:4480– 4492.
72. Lee, Y.; Shacter, E. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* 1989. 274:19792–19798.

73. Lee, Y.B., Yune, T.Y., Baik, S.Y., Shin, Y.H., Du, S., Rhim, H., Lee, E.B., Kim, Y.C., Shin, M.L., Markelonis, G.J., Oh, T.H.. Role of tumor necrosis factor-alpha in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury. *Exp.Neurol.*2000; 166, 190–195.
74. Lelli, J. L.; Becks, L. L.; Dabrowska, M. I.; Hinshaw, D. B. ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 25:694–702.
75. Lennon, S. V.; Martin, S. J.; Cotter, T. G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.*1991; 24:203–214.
76. Lewen, A., Matz, P., Chan, P.H. Free radical pathways in CNS injury. *J. Neurotrauma.* 2000; 17: 871–890.
77. Li S, Stys PK. Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *J. Neurosci.* 2000; 20:1190-1198.
78. Lifshitz, J., Sullivan, P.G., Hovda, D.A., Wieloch, T., Mcintosh, T.K. Mitochondrial damage and dysfunction in traumatic brain injury. *Mitochondrion.* .2004; 4: 705–713.
79. Liu, B., Gao, H.M., Wang, J.Y., Jeohn, G.H., Cooper, C.L., Hong, J.S.Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002; 962: 318–331.
80. Liu, N.K., Zhang, Y.P., Titsworth, W.L., Jiang, X., Han, S., Lu, P.H., Shields, C.B., Xu, X.M.. A novel role of phospholipase A2 in mediating spinal cord secondary injury. *Ann. Neurol.* 2006; 59: 606–619.
81. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C, and Wang, X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell.* 1997; 89: 175-184.
82. Liu, X.; Kim, C. N.; Yang, J.; Jemmerson, R.; Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 1996; 86:147–157.
83. Lu, K.T., Wang, Y.W., Yang, J.T., Yang, Y.L., Chen, H.I.. Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *J. Neurotrauma.* 2005; 22: 885–895.
84. M. Altgracia, A. Monroy-Noyola, L. Osorio-Rico, J. Kravzov, R. Alvarado-Calvillo, J. Manjares-Marmolejo, C. Rios, Dapsone attenuates kainic acid-induced seizures in rats, *Neurosci. Lett.* 1994; 176: 52– 54.

85. Ma, T.C., Zhu, X.Z. Neurotoxic effects of interleukin-6 and sodium nitroprusside on cultured rat hippocampal neurons. *Arzneimittelforschung*. 2000; 50: 512–514.
86. Maloff BL, Fox D, Bruin E, Di Meo TM. Dapsone inhibits LTB4 binding and bioresponse at the cellular and physiologic levels. *Eur. J. Pharmacol.* 1988; 158: 85-89.
87. Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Pitti, R.M.. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr. Biol.* 1997; 7: 1003-1006.
88. Martín SJ. Apoptosis: suicide, execution or murder?. *Trens in cell biology*. 1993; 3:141.
89. Martin WJ and, Kachel DL. Reduction of neutrophil-mediated injury to pulmonary endothelial cells by dapsone. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1985; 131: 544-547.
90. Martins Chaves M, Prates Rodrigues AL, Pereira dos Reis A, Gerzstein NC, Nogueira-Machado JA. Correlation between NADPH oxidase and protein kinase C in the ROS production by human granulocytes related to age. *Gerontology* 2002;48:354-9.
91. Matute, C., Domercq, M., Sanchez-Gomez, M.V.,. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *GLIA*. 2006 ; 53: 212–224.
92. Mautes, A.E., Weinzierl, M.R., Donovan, F., Noble, L.J. Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. *Phys. Ther.* 2000; 80: 673–687.
93. McAdoo DJ, Xu G, Robak G. Evidence that reversed glutamate uptake contributes significantly to glutamate release following experimental injury to the rat spinal cord. *Brain Res.* 2000; 865:283–285.
94. Mcdonald, J.W., Althomsons, S.P., Hyrc, K.L., Choi, D.W., Goldberg, M.P. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat. Med.* 1998; 4: 291–297.
95. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 1997 May 15;16(10):2794-804.
96. Merad- Borudia, M., Nicole A., Satiard-Bron, D., Saille, C y Cevallos-Picot, I. Mitochondrial impairment as an early in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevante to Parkinson disease *Biochem. Pharmacol.* 1998; 56: 645-655.

97. Merrill, J.E., Ignarro, L.J., Sherman, M.P., Melinek, J., Lane, T.E. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J. Immunol.* 1993; 151: 2132–2141.
98. Meyn RE, Stephens LC, Mason KA, Medina D. Radiation-induced apoptosis in normal and premoplastic mammary glands in vivo: significance of gland differentiation and P53 status. *Int J Cancer* 1996;66:466-72.
99. Michael S. Beattie, Akhlaq A. Farooqui, and Jacqueline C. Bresnahan Review of Current Evidence for Apoptosis After Spinal Cord Injury *Journal of Neurotrauma.* 2000; Volume 17, Number 10.
100. Miller RL, Sun GY, Sun AY. Cytotoxicity of paraquat in microglial cells: Involvement of PKCdelta- and ERK1/2-dependent NADPH oxidase. *Brain Res.* 2007;1167: 129-39.
101. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signalling complex. *Cell* 1996; 85:817–27.
102. Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 2926-2930.
103. Nag, S., Picard, P., Stewart, D.J. Increased immunolocalization of nitric oxide synthases during blood–brain barrier breakdown and cerebral edema. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)* 2000; 76: 65–68.
104. Nagata S, Golstein P The Fas death factor. *Science. Review.* 1995; Mar 10;267(5203):1449-56.
105. Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci.* 1998 May 15;18(10):3659-68.
106. Newman, T.A., Woolley, S.T., Hughes, P.M., Sibson, N.R., Anthony, D.C., Perry, V.H., T-cell- and macrophage-mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases. *Brain.* 2001; 124: 2203–2214.
107. Niwa Y, Sakane T, Miyachi Y. Dissociation of the inhibitory effect of dapsone on the generation of oxygen intermediates-- in comparison with that of colchicine and various scavengers. *Biochem Pharmacol.* 1984; 33:2355-60.

108. Noda, M., Nakanishi, H., Akaike, N. Glutamate release from microglia via glutamate transporter is enhanced by amyloid-beta peptide. *Neuroscience*. 1999; 92: 1465–1474.
109. Norenberg, M.D., Smith, J., Marcillo, A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J. Neurotrauma*. 2004 21: 429–440.
110. Nosratola D. Vaziria, Yu-Shang Leeb, Ching-Yi Linb, Vernon W. Linc, Ram K. Sindhua. NAD(P)H oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and nitric oxide synthase expression in subacute spinal cord injury *Brain Research*. 2004; 995 : 76– 83.
111. Núñez G, Merino R, Grillot D, Gonzales-García M. Bcl-2 y Bcl-x regulatory switches for lymphoid death and survival. *Immunol. Today* 1994;15(12):582-88.
112. Oka, A., Belliveau, M.J., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J. Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms, and prevention. *J. Neurosci*. 1993; 13, 1441–1453.
113. Okada, S., Nakamura, M., Mikami, Y., Shimazaki, T., Mihara, M., Ohsugi, Y., Iwamoto, Y., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Toyama, Y., Okano, H., Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J. Neurosci. Res*. 2004; 76: 265–276.
114. Onishi Y, Kizaki H. Apoptosis and diseases. *Hum. Cell* 1994;7(1):27-32.
115. Orth, K., Chinnaiyan, A.M., Garg, M., Froelich, C.J., and Dixrr, V.M. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J. Biol. Chem*. 1996; 271: 16443-16446.
116. Osborne BA, Schwartz LM. Essential gens that regulate apoptosis. *Trends in Cell. Biol*. 1994;4:394-99.
117. Park E, Velumian AA, Fehlings MG. The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J Neurotrauma*. 2004; 21:754–774 7.
118. Peter AC Lim,, Adela M Tow, *Ann Acad Med Singapore* 2007;36:49-57.
119. Piani, D., Fontana, A. Involvement of the cystine transport system xc- in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J. Immunol*. 1994; 152: 3578–3585.

120. Piani, D., Frei, K., Do, K.Q., Cuenod, M., Fontana, A. Murine brain macrophages induced NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neurosci. Lett.* 1991; 133: 159–162.
121. Piani, D., Frei, K., Pfister, H.W., Fontana, A. Glutamate uptake by astrocytes is inhibited by reactive oxygen intermediates but not by other macrophage-derived molecules including cytokines, leukotrienes or platelet activating factor. *J. Neuroimmunol.* 1993; 48, 99–104.
122. Pieters FA, Zuidema J. The absolute oral bioavailability of dapsone in dogs and humans. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 1987; 25: 396–400.
123. Popovich, P.G., Wei, P., Stokes, B.T. The cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague–Dawley and Lewis rats. *J. Comp. Neurol.* 1997; 377: 443–464 .
124. Probert, L., Selmaj, K. TNF and related molecules: trends in neuroscience and clinical applications. *J. Neuroimmunol.* 1997; 72: 113–117.
125. Profyris, C., Cheema, S.S., Zang, D., Azari, M.F., Boyle, K., Petratos, S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* 2004; 15: 415–436.
126. R.S. Hotchkiss, A. Strasser, J.E. McDunn, P.E. Swanson, Cell death, *N Engl J. Med.* 2009; 361: 1570–1583.
127. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992;356:397.
128. Ray SK, Hogan EL, Banik NL. Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Res. Rev.* 2003; 42: 169–185.
129. Rhéaume E, Cohen LY, Uhlmann F, Lazure C, Alam A, Hurwitz J, Sékaly RP, Denis F. The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 in vitro and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis. *EMBO J.* 1997 Nov 3;16(21):6346–54.
130. Richter, C.; Schweizer, M.; Cossarizza, A.; Franceschi, C. Control of apoptosis by cellular ATP level. *FEBS Lett.* 1996; 378:107–110.
131. Rimaniol, A.C., Haik, S., Martin, M., Le Grand, R., Boussin, F.D., Dereuddre- Bosquet, N., Gras, G., Dormont, D. Na⁺-dependent high-affinity glutamate transport in macrophages. *J. Immunol.* 2000 ; 164 : 5430–5438.

132. Robert W. Keane, Susan Kraydieh, George Lotocki, John R. Bethea, Apoptotic and Anti-Apoptotic Mechanisms Following Spinal Cord Injury *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2001; 60: No. 5 May. 422-429.
133. S.M. Debol, M.J. Herron, R.D. Nelson, Anti-inflammatory action of dapsone: inhibition of neutrophil adherence is associated with inhibition of chemoattractant-induced signal transduction, *J. Leukoc. Biol.* 1997;62: 827–836.
134. Santamaria A, Ordaz-Moreno J, Rubio-Osornio M, Solis-Hernandez F, Rios C. Neuroprotective effect of dapsone against quinolinate- and kainate-induced striatal neurotoxicities in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 1997; 81:271-275.
135. Sarker, M.H., Easton, A.S., Fraser, P.A. Regulation of cerebral microvascular permeability by histamine in the anaesthetized rat. *J. Physiol.* 1998.507 (Pt 3), 909–918.
136. Schleimer RP, Freeland HS, Peters SP, Brown KE, Derse CP. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation leukotriene B₄ by purified human neutrophils. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989; 250: 598-605.
137. Schnell, L., Fearn, S., Schwab, M.E., Perry, V.H., Anthony, D.C. Cytokine-induced acute inflammation in the brain and spinal cord. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1999; 58: 245–254.
138. Searle, J.; Kerr, F. J.; Bishop, C. J.. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu.* 1982; 17:229–259.
139. Shamash, S., Reichert, F., Rotshenker, S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J. Neurosci.* 2002; 22: 3052–3060.
140. Silvestri F, Ribatti D, Nico B, Silvestri N, Romito A, Dammacco F. Apoptosis or programmed cell death: regulatory and pathophysiological mechanisms (editorial). *Ann Ital Med Int* 1995;10(1):7-13.
141. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 1999 Jan 25;144(2):281-92.

142. Springer, J.E., Azbill, R.D., Mark, R.J., Begley, J.G., Waeg, G., Mattson, M.P. 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, rapidly accumulates following traumatic spinal cord injury and inhibits glutamate uptake. *J. Neurochem.* 1997; 68: 2469–2476.
143. Sroga, J.M., Jones, T.B., Kigerl, K.A., Mcgaughy, V.M., Popovich, P.G. Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. *J. Comp. Neurol.* 2003; 462: 223–240.
144. Stellwagen, D., Beattie, E.C., Seo, J.Y., Malenka, R.C. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . *J. Neurosci.* 2005; 25: 3219–3228.
145. Suda T, Suzuki Y, Matsui T, Inoue T, Niide O, Yoshimaru T, Suzuki H, Ra C, Ochiai T. Dapsone suppresses human neutrophil superoxide production and elastase release in a calcium-dependent manner. *Br J Dermatol* 2005;152:887-95.
146. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75:1169-78.
147. Sung Chun Cho, Ji Heon Rhim, Young Hoon Son, Suk Jin Lee and Sang Chul Park Suppression of ROS generation by 4,4'-diaminodiphenylsulfone in non-phagocytic human diploid fibroblasts *Experimental and molecular medicine.* 2010; 42: No. 3, March.223-232.
148. Takagi T, Takayasu M, Mizuno M, Yoshimoto M, Yoshida J. Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2003 Jan;43(1):20-9; 29-30.
149. Takahashi, J.L., Giuliani, F., Power, C., Imai, Y., Yong, V.W. Interleukin-1 β promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Ann. Neurol.* 2003; 53: 588–595.
150. Tei R, Kaido T, Nakase H. Secondary spinal cord hypoperfusion of circumscribed areas after injury in rats. *Neurol Res.* 2005; 27:403–408.
151. Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998; 281: 1312-1316.
152. Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature.* 1992; 356: 768-774.
153. Thiruchelvam M, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Cory-Slechta DA. *J Neurosci* 2000;20:9207-14

154. Tucek-Scabo C, Andjelic S, Lacy E, Elkon KB, Nikolic-Zingic J. Surface T cell Fas Receptors/CD95 Regulation, in vivo Activation and Apoptosis. *J. Immunol.* 1996;156(1):192-00.
155. Unterberg, A., Wahl, M., Baethmann, A. Effects of free radicals on permeability and vasomotor response of cerebral vessels. *Acta Neuropathol.(Berl).* 1988; 76: 238–244.
156. Van Landeghem, F.K., Stover, J.F., Bechmann, I., Bruck, W., Unterberg, A., Buhner, C., Von Deimling, A. Early expression of glutamate transporter proteins in ramified microglia after controlled cortical impact injury in the rat. *GLIA.* 2001; 35: 167–179.
157. Vartanian T, Goodearl A, Viehöver A, Fischbach G. Axonal neuregulin signals cells of the oligodendrocyte lineage through activation of HER4 and Schwann cells through HER2 and HER3. *J Cell Biol.* 1997 Apr 7;137(1):211-20.
158. Volterra, A., Trotti, D., Tromba, C., Floridi, S., Racagni, G. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 1994 ; 14: 2924–2932.
159. Xu, W., Chi, L., Xu, R., Ke, Y., Luo, C., Cai, J., Qiu, M., Gozal, D., Liu, R. Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2005; 43: 204–213.
160. Wang CX, Olschowka JA, Wrathall JR. Increase of interleukin- 1beta mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat. *Brain Res.* 1998; 759:190–196.
161. Y. Suzuki, Y. Takagi, R. Nakamura, K. Hashimoto, K. Umemura, Ability of NMDA and non-NMDA receptor antagonists to inhibit cerebral ischemic damage in aged rats, *Brain Res.* 2003; 964: 116– 120.
162. Yang W, Tiffany-Castiglioni E. The bipyridyl herbicide paraquat induces proteasome dysfunction in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Toxicol Environ Health A* 2007;70:1849-57.
163. Zachara BA. Mamalian selenoproteins. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 1991 ;6(3):137-45.
164. Zerangue, N., Arriza, J.L., Amara, S.G., Kavanaugh, M.P. Differentia modulation of human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid. *J.Biol. Chem.* 1995; 270: 6433–6435.
165. Zhu YI, Stiller MJ. Dapsone and sulfones in dermatology: overview and update. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2001; 45: 420-434.