



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTI-APOPTÓTICO DE LA METALOTIONEÍNA II EN
UN MODELO DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL EN RATAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

IVÁN SANTANDER RODEA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA MARÍA DE LOS ÁNGELES ARACELI DÍAZ RUÍZ

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA "MANUEL VELASCO SUARÉZ"

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DRA. SANDRA OROZCO SUAREZ

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CENTRO MÉDICO SIGLO XXI

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2015



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 11 de mayo de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **SANTANDER RODEA IVÁN** con número de cuenta **304229224**, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTI-APOPTÓTICO DE LA METALOTIONEÍNA II EN UN MODELO DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL EN RATAS"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES ARACELI DÍAZ RUIZ**:

Presidente: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE
Vocal: DRA. MARISELA MÉNDEZ ARMENTA
Secretario: DRA. SANDRA OROZCO SUÁREZ
Suplente: DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS
Suplente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de octubre de 2015



DRA. MARÍA DEL CÓRO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por otorgarme la beca N° 545325/294525

A mi tutora:

Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz

Y Comité Tutorial:

Dr. José Pedraza Chaverri

Dra. Sandra Orozco Suárez

N° de proyecto de CONACYT: 183667

ÍNDICE

Lista de figuras y cuadros.....	I
Resumen.....	1
Abstract.....	3
1. Introducción.....	5
1.1 Generalidades.....	5
2. Epidemiología de la lesión traumática de la médula espinal (LTME).....	7
2.1 Fisiopatología de la LTME.....	8
2.1.1 Alteraciones vasculares.....	10
2.1.2 Respuesta inflamatoria.....	10
2.1.3 Excitotoxicidad.....	11
2.1.4 Estrés oxidativo.....	12
2.1.5 Muerte celular por Apoptosis.....	15
3. Metalotioneínas.....	20
3.1 Degradación de las metalotioneínas.....	26
3.2 Efecto antioxidante de las Metalotioneínas.....	26
3.3 Efecto antiapoptótico de las Metalotioneínas.....	28
3.4 Las Metalotioneínas como inductoras de la regeneración.....	30
4. Metalotioneínas y LTME.....	30
5. Hipótesis.....	32
6. Objetivo general.....	32
7. Objetivos particulares.....	32
8. Materiales y métodos.....	33
8.1 Consideraciones éticas para el uso de animales en la experimentación.....	33

8.2	Diseño experimental y tratamientos	33
8.3	Modelo de lesión por contusión.....	34
8.4	Sacrificio y almacenamiento de muestras.....	36
8.5	Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.....	36
8.6	Evaluación del efecto anti-apoptótico de la MT-II	37
8.6.1	Ensayo fluorométrico de actividad enzimática de caspasa 3 y 9.....	37
8.6.2	Ensayos de inmunofluorescencia para Anexina V y TUNEL.....	38
8.6.2.1	–Inmunomarcaje con Anexina V/Neurofilamento/Hoechst.....	38
8.6.2.2	Inmunomarcaje de extremos libres del DNA mediante TUNEL.....	39
8.6.2.3	Análisis del número de células positivas para Anexina V y TUNEL	41
8.6.3	Análisis estadísticos de los datos.....	42
9.	Resultados	43
9.1	Evaluación de la actividad de caspasa 9.....	43
9.2	Evaluación de la actividad enzimática de caspasa 3.....	45
9.3	Marcaje de extremos libres del DNA mediante TUNEL.....	47
9.4	Ensayo de muerte celular mediante tinción con Anexina V	51
10.	Discusión	55
11.	Conclusiones	61
12.	Literatura citada	62

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Nervios espinales.....	6
Figura 2. Fisiopatología de la LTME.....	9
Figura 3. Vías de señalización que conducen a la muerte por apoptosis.....	18
Figura 4. Control transcripcional de las metalotioneínas I y II.	25
Figura 5. Principales funciones de las metalotioneínas I y II en el sistema nervioso.....	29
Figura 6. Recuperación funcional y preservación de tejido nervioso cuando se administra MT-II exógena.....	31
Figura 7. Modelo de lesión traumática de la médula espinal por contusión en ratas	35
Figura 8. Método de fraccionador óptico.....	42
Figura 9. Evaluación de la actividad de caspasa 9 en un modelo de LTME 24 y 72 horas después del procedimiento quirúrgico.....	44
Figura 10. Evaluación de la actividad de caspasa 3 a las 24 y 72 horas después del procedimiento quirúrgico.....	46
Figura 11. Número de células positivas a TUNEL a las 24 horas.....	48
Figura 12. Número de células positivas a TUNEL a las 72 horas.....	48
Figura 13. Imagen representativa de las células positivas para la tinción con TUNEL a las 24 horas (verde brillante) y Neurofilamento (rojo).....	49
Figura 14. Imagen representativa de las células positivas para la tinción con TUNEL a las 72 horas (verde brillante) y Neurofilamento (rojo).....	50
Figura 15. Número de células positivas a Anexina V por mm ³ a las 24 horas.....	52
Figura 16. Número de células positivas a Anexina V por mm ³ a las 72 horas.....	52



Figura 17 Imagen representativa de las células positivas para la tinción con Anexina V (rojo), Neurofilamento (verde) y Hoechst (azul) a las 24 horas.....53

Figura 18. Imagen representativa de las células positivas para la tinción con Anexina V (rojo), Neurofilamento (verde) y Hoechst (azul) a las 72 horas.....54

Cuadro 1. Resumen de las principales especies reactivas de oxígeno y Nitrógeno.....14

Cuadro 2. Efecto de la MT-II sobre procesos involucrados en la muerte celular por apoptosis después de una LTME.....55



Resumen

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) es ocasionada por el daño irreversible de la función neurológica. Actualmente, no existe tratamiento capaz de revertir el daño y promover la recuperación funcional de los pacientes sin generar efectos secundarios. Las metalotioneínas (MT's) son proteínas que intervienen en la homeostasis de metales esenciales y el secuestro de especies reactivas de oxígeno, y se conocen cuatro isoformas: MT-I, MT-II, MT-III y MT-IV. Anteriormente en un modelo de LTME en ratas se observó un incremento bifásico de MT endógena 4 y 24 horas, así como una mejor recuperación motora y mayor tejido preservado después de la administración de MT-II a 3.2, 10 y 100 µg/peso.

Objetivo: Evaluar el efecto antiapoptótico de la metalotioneína II en un modelo de lesión traumática de médula espinal en ratas. **Metodología:** se utilizaron ratas Wistar hembras de 200-250g distribuidas en 4 grupos: Lam + S.S. o MT-II 10µg/peso y LTME + S.S. o MT-II y el sacrificio se realizó a las 24 y 72 horas. Se utilizaron las técnicas de actividad enzimática de caspasas 3 y 9 e inmunofluorescencia para Tunel y Anexina V. **Resultados:** Se observó un incremento curso-temporal en la actividad de las caspasa-9 y 3, siendo los grupos de LTME + S.S. de las 72 horas los que presentaron los valores más altos. La actividad enzimática de la caspasa 3 disminuyó significativamente ($p < 0.05$) cuando los animales fueron administrados con MT-II. Por otro lado, en los conteos de células positivas a Anexina V y TUNEL, se observó que el número de células positivas también incrementa a través del tiempo en los grupos con LTME + S.S., obteniéndose los valores más elevados a las 72 horas. En el conteo de células positivas para Anexina V se observó que el tratamiento con MT-II disminuye

significativamente ($p < 0.05$) el número de células positivas tanto a las 24 como a las 72 horas después de una LTME. De igual manera, se observó que la administración de MT-II disminuye el número de células positivas a TUNEL, sin embargo, únicamente se alcanzó un valor significativo ($p < 0.05$) en el grupo LTME + MT de las 72 horas. **Conclusiones:** Dichos resultados apoyan la idea de que la MT-II posee un efecto antiapoptótico durante la fase aguda de la LTME en ratas, esto al reducir los niveles de actividad de la caspasa 3 a las 24 horas, y al disminuir el número de células positivas a Anexina V a las 24 y 72 horas, y TUNEL a las 72 horas.

ABSTRACT

Traumatic spinal cord injury (SCI) is caused by the irreversible damage of neurological function. There is currently no treatment that can reverse the damage and promote functional recovery of patients without causing side effects. Metallothioneins (MT's) are proteins involved in the homeostasis of essential metals and abduction of reactive oxygen species, and four isoforms are known: MT-I, MT-II, MT and MT-III-IV. Above in a rat model SCI a biphasic increase endogenous MT 4 and 24 hours, as well as better recovery and higher motor preserved tissue after administration of MT-II 3.2, 10 and 100 ug / weight was observed. Objective: To evaluate the antiapoptotic effect of metallothionein II in a model of traumatic spinal cord injury in rats. Methodology: 200-250g Wistar female rats in 4 groups were used: Lam + SS MT-II or 10 ug / weight and S.S. SCI + or MT-II and sacrifice was performed at 24 and 72 hours. Techniques enzymatic activity of caspases 3 and 9 and immunofluorescence TUNEL and Annexin V. Results were used: time-course increase was observed in the activity of caspase-9 and 3, where groups SCI + SS 72 hours which had the highest values. The enzymatic activity of caspase-3 decreased significantly ($p < 0.05$) when animals were administered with MT-II. Furthermore, in counts of Annexin V positive cells and TUNEL, it was observed that the number of positive cells also increases over time in SCI + SS groups, yielding the highest values at 72 hours. In counting Annexin V positive cells it was observed that treatment with MT-II significantly decreased ($p < 0.05$) the number of positive cells at both 24 and 72 hours after SCI. Similarly, we observed that administration of MT-II decreased the number of TUNEL positive cells, however, only significant value ($p < 0.05$) in group SCI + MT

72 hours was reached. Conclusions: These findings support the idea that the MT-II has an antiapoptotic effect during the acute phase in rats SCI, this to reduce the levels of caspase 3 to 24 hours, and decreasing the number of cells Annexin V positive at 24 and 72 hours, and 72 hours TUNEL.

1. Introducción

1.1 Generalidades.

El sistema nervioso está organizado anatómicamente y funcionalmente en dos regiones: el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico. El sistema nervioso central se integra por la médula espinal y el encéfalo. La médula espinal se divide en cuatro regiones anatómicas: cervical, torácica, lumbar y sacra, y comprende 31 nervios: 8 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacras y 1 coccígeo (Fig. 1). La estructura interna de la médula espinal se divide en: la sustancia gris, constituida por un conjunto de neuronas, células endoteliales, oligodendrocitos, astrocitos, microglía y células ependimarias (Cunningham, 2009; Dafny, 2008) y la sustancia blanca, compuesta en su mayoría de grupos de axones mielinizados (Van-De-Graaff, 2001). Se encuentra ubicada en el eje mayor del cuerpo y ocupa la alineación central desde la región cefálica hasta la región sacra-coxígea y está protegida por la columna vertebral, que impide, que los componentes celulares y tisulares puedan ser dañados fácilmente (Ponce, 2012).

En la médula espinal se integra una gran parte de la actividad refleja del organismo, tal es el caso de los reflejos de tracción, tendinoso, flexor, extensor y de postura, así como de erección, eyaculación, micción y defecación, entre otros (Snell, 2007). La información sensorial que se recoge mediante los nervios periféricos viaja a través de las vías ascendentes hasta el cerebro, mientras que la información para el control motor y autónomo generada en el cerebro es conducida hasta los órganos efectores por las vías espinales descendentes.

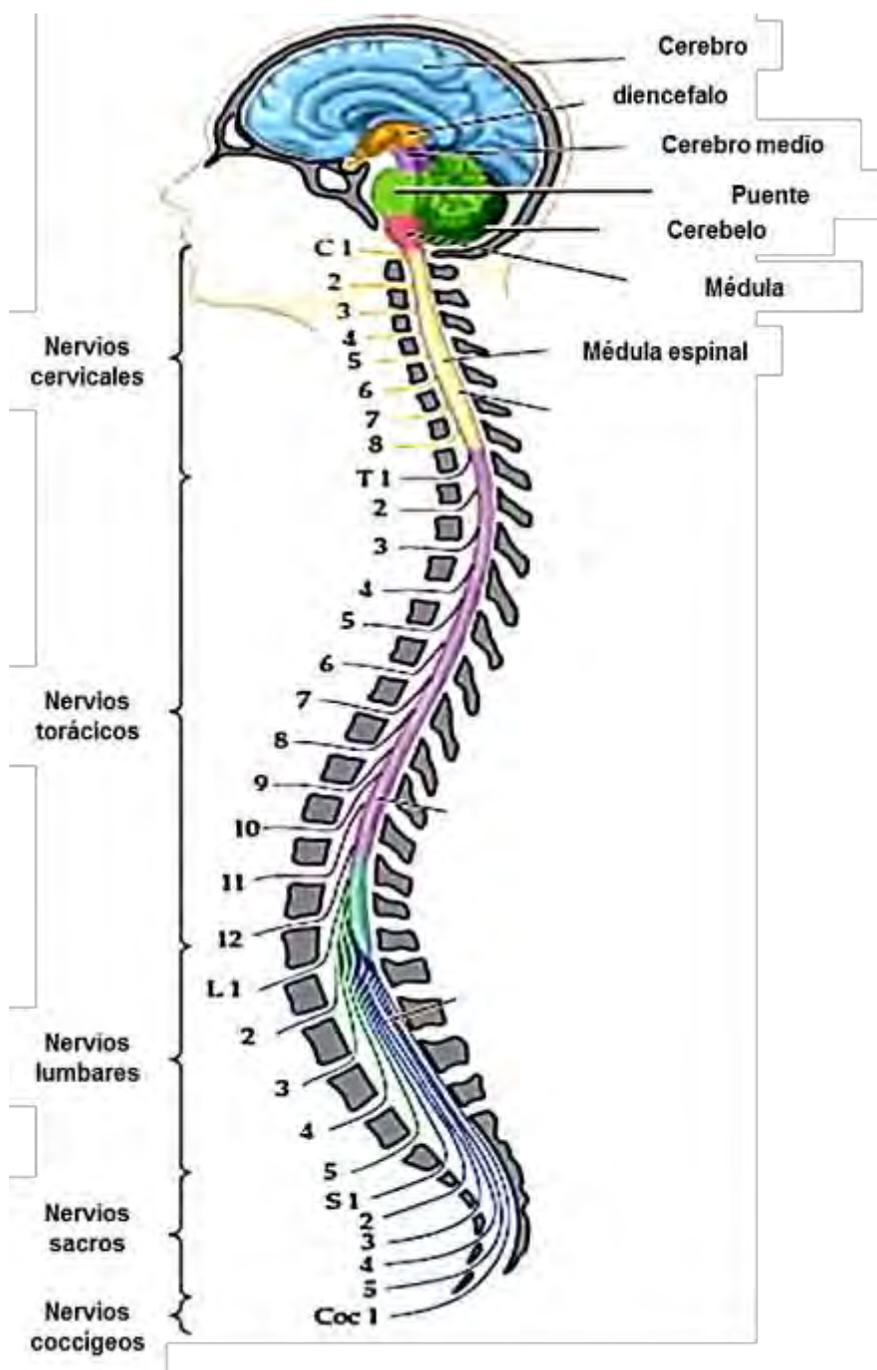


Figura 1. Nervios espinales. Esquema que muestra los cinco tipos de nervios presentes en la médula espinal: cervicales, torácicos, lumbares, sacros y coccígeos. Imagen tomada de Silva y cols., 2014.

2. Epidemiología de la lesión traumática de la médula espinal (LTME)

La LTME es un padecimiento discapacitante ocasionado por el daño irreversible de la función neurológica, lo cual conlleva a la pérdida de la función motora y sensitiva de los pacientes, motivo por el cual, es considerado un problema de salud pública. De acuerdo con la Asociación Nacional de Lesiones de Médula Espinal de Estados Unidos, dicho padecimiento es ocasionado en un 38.6% por accidentes automovilísticos, violencia (22.5%), caídas de altura (23.2%), deportes extremos (6.7%) y otras (9%) (Pérez y cols. 2008). En el año 2010, de acuerdo con lo estimado por el Centro de Estadísticas Nacionales de Lesiones en la Médula Espinal (NSCISC por sus siglas en inglés) (<https://www.nscisc.uab.edu>), existían alrededor de 265,000 pacientes con daño medular en los Estados Unidos. En México se ha reportado que la incidencia anual de LTME es de aproximadamente 18.1 por millón de habitantes por año. De acuerdo con estos reportes, el 80% de los casos se presenta en varones de 16 a los 35 años, es decir, en etapa económicamente activa, convirtiéndose así en un problema de salud pública (Pardini, 1998). Actualmente no existen terapias efectivas para el tratamiento de la LTME, debido principalmente al amplio impacto generado por los mecanismos de daño secundarios y al periodo de tiempo en el cual son trasladados los pacientes a sus respectivos hospitales (McEwen y cols., 2011)

2.1 Fisiopatología de la LTME

La fisiopatología de la LTME involucra dos tipos de alteraciones: el daño primario inducido directamente por el trauma mecánico, el cual provoca hemorragia y la muerte instantánea de las células en el sitio de la lesión; y el daño secundario, ocasionado por alteraciones bioquímicas y moleculares que promueven la expansión del daño primario, entre los cuales se encuentran alteraciones vasculares, excitotoxicidad, inflamación, daño oxidativo y la activación de vías de señalización apoptóticas (Zhang y *cols.*, 2012; Díaz-Ruiz y *cols.*, 2011) (Figura 2).

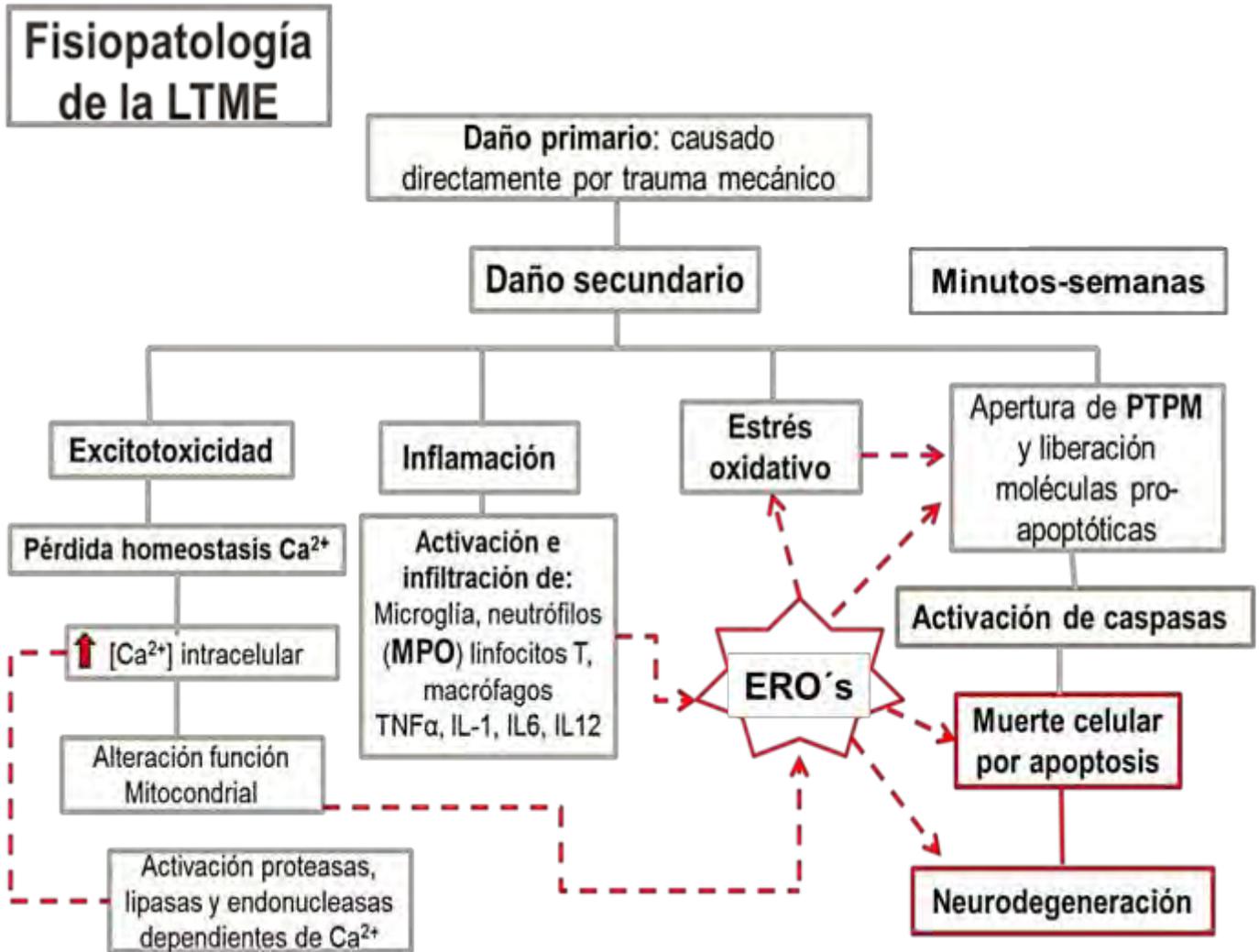


Figura 2. Fisiopatología de la LTME. El daño medular involucra dos eventos: el daño primario, en el cual se induce un trauma mecánico directo en la médula, induciendo muerte celular por necrosis y el daño secundario provocado por procesos de excitotoxicidad, inflamación y estrés oxidativo que promueven la muerte celular por apoptosis. Ca^{2+} : calcio, MPO: mieloperoxidasa, $\text{TNF}\alpha$: factor de necrosis tumoral alfa, IL: interleucina, ERO's: especies reactivas de oxígeno, PTPM: Poro de transición de permeabilidad mitocondrial.

2.1.1 Alteraciones vasculares

Un cambio patológico importante después de una LTME es la alteración de la microvasculatura, produciendo hemorragia e hinchamiento medular, los cuales combinados producen isquemia, misma que puede extenderse a lo largo de la medula espinal tanto en sentido rostral como caudal (Rowland y cols., 2008). Asimismo, después del daño mecánico, la ruptura de vasos sanguíneos altera la barrera hematoencefálica, dañando a las células endoteliales y a los procesos astrocíticos que la conforman, modificando sus propiedades selectivas y permitiendo la entrada de mediadores inflamatorios al sitio del daño, tales como citocinas pro-inflamatorias (TNF α e IL-1 β) y ERO's (Zhang y cols., 2012).

2.1.2 Respuesta inflamatoria

La inflamación, es un importante evento de daño secundario que ocurre inmediatamente después de la LTME y persiste durante semanas o meses (Fehlings y Nguyen 2010). Las citocinas pro-inflamatorias secretadas por las células del sistema inmune, tales como: interleucina IL-1 β , 6 y TNF- α incrementan de manera significativa el proceso inflamatorio. La respuesta inflamatoria es importante para la eliminación de residuos celulares, y permite la recuperación de neuronas sobrevivientes. Sin embargo, la sobre-activación de esta respuesta genera daño en el tejido sano y promueve la expansión del daño primario (Oyinbo, 2011). El proceso de inflamación resultante de una LTME induce el reclutamiento células del sistema inmune como: neutrófilos, monocitos, microglía y linfocitos T

(Bareyre y Schwab, 2003). Los neutrófilos son las primeras células del sistema inmune en arribar al sitio del daño se encargan de remover los dendritos celulares, así como la liberación de citocinas, proteasas y radicales libres, los cuales activan otras células gliales o inflamatorias que pueden finalmente llevar al daño o a la muerte neuronal (Liverman y cols., 2005). Después del daño mecánico, los monocitos se infiltran hacia la médula espinal y se diferencian a macrófagos. La microglía (son las células con actividad fagocítica en el sistema nervioso central) se activan, y junto con los macrófagos secretan citocinas y factores de crecimiento, los cuales a su vez afectan a las células vecinas de manera positiva o negativa (Anderson, 2002). Los radicales libres y las citocinas pro-inflamatorias contribuyen a la expansión del daño. El papel de los linfocitos después de una LTME es controversial, algunos argumentan que los linfocitos T reactivos tienen propiedades destructivas y exacerbaban el daño a axones, induciendo desmielinización y promoviendo pérdida de la función (Popovich y Jones 2003).

2.1.3 Excitotoxicidad

La excitotoxicidad es un proceso que se caracteriza por la excesiva y prolongada activación de receptores de aminoácidos excitatorios como el glutamato y el aspartato, lo cual conlleva a la activación de mecanismos de muerte celular (Mehta y cols., 2012). Uno de los principales mediadores del daño excitotóxico es el Ca^{2+} , el cual bajo condiciones fisiológicas activa enzimas que participan en procesos como el crecimiento celular, la diferenciación y la actividad sináptica (Lipton y cols., 2008). Durante el proceso excitotóxico, la liberación excesiva de

glutamato conlleva a la desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} , mediante activación de receptores NMDA, AMPA y kainato. La liberación excesiva de Ca^{2+} se ha visto involucrada en la generación de radicales libres como una consecuencia de la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} , como la fosfolipasa A2, la óxido nítrico sintasa y la Xantina oxidasa, así como, por alteración de la función mitocondrial (Mariet y cols., 2012). Se ha reportado que después de una LTME se promueve la liberación y el incremento en las concentraciones de glutamato y aspartato (Díaz-Ruiz y cols.,2007), promoviendo la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} , como la calpaina, calcineurina, sintasa del óxido nítrico constitutiva (Díaz-Ruiz y cols.,2002; Díaz-Ruiz y cols.,2008), fosfolipasas A2 y C, cinasas, fosfatasa, endonucleasas y lipasas que promueven la activación de vías de señalización de segundos mensajeros generando radicales libres y estrés oxidativo, el cual puede conducir a la muerte celular neuronal por apoptosis (Díaz-Ruiz y cols.,2000).

2.1.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un proceso que se define como una alteración en el balance pro-oxidante-antioxidante de las células, comprometiendo la viabilidad celular (Sinha y cols., 2013). Los radicales libres (RL) son moléculas químicas conteniendo uno o más electrones desapareados, lo cual promueve que sean altamente reactivas. Los RL pueden ser generados por radiación UV, gamma o rayos X, por reacciones químicas catalizadas por metales, producidos por neutrófilos y macrófagos durante la inflamación y son sub-productos de la cadena

de transporte de electrones en la mitocondria (Ruttkay-Nedecky y cols., 2013). Los radicales libres más importantes en los organismos aerobios se encuentran dentro de las ERO's y las especies reactivas de nitrógeno (ERNs) como se observa en el cuadro 1. (Pourova y cols., 2010).

En la mitocondria se lleva a cabo la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa, durante este proceso, el oxígeno (O_2) es reducido hasta H_2O como producto final de la vía. El O_2 acepta electrones uno a la vez, en un evento secuencial, generando anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH\cdot$) y agua. En condiciones normales la formación de ERO's es probablemente menor al 5%, sin embargo esta producción puede incrementarse, cuando la concentración de calcio o sodio aumentan súbitamente como respuesta a un proceso excitotóxico (Dykens, 1994). Un exceso de O_2 , puede llevar a la formación de muchas otras especies reactivas, incluyendo el radical $OH\cdot$, altamente citotóxico. A pH fisiológico el $O_2^{\cdot-}$ (superóxido) tiende a dismutarse formando H_2O_2 y oxígeno, por medio de la enzima superóxido dismutasa (SOD); el H_2O_2 , a su vez es detoxificado, por la catalasa, en un proceso catalizado por la glutatión peroxidasa. El H_2O_2 no es un radical libre, sin embargo, puede difundirse fácilmente a través de las membranas biológicas induciendo daño citotóxico en sitios distantes de su generación, favoreciendo la producción del radical $OH\cdot$. El radical $OH\cdot$, es considerado el oxidante más potente en los sistemas biológicos, debido a su alta reactividad. Tiene una vida media muy corta ($10^{-9}s$) y como consecuencia es limitada su capacidad de difusión, y sólo existen algunas proteínas antioxidantes capaces de atrapar y secuestrar este radical como lo son las metalotioneínas, Las ERO's presentan efectos duales los sistemas biológicos.

Un ejemplo del papel benéfico es su participación en la respuesta inmune durante una infección. Por el contrario, a altas concentraciones son mediadores de daño a distintas estructuras y moléculas como son: membranas lipídicas, proteínas y ácidos nucleicos (Poli y cols., 2004).

Cuadro 1. Resumen de las principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Ruttkey-Nedecky y cols., 2013).

Especies Reactivas de Oxígeno		Especies Reactivas de Nitrógeno	
Radicales libres	No radical	Radicales libres	No radical
Anión supeóxido $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno H_2O_2	Óxido nítrico NO	Peroxinitrito $ONOO^-$
Radical hidroxilo OH^{\cdot}	Ácido hipocloroso HOCl	Dióxido nítrico NO_2	Nitritos NO_2^-
Radical alcóxido RO	Ozono O_3		Nitratos NO_3^-
Radical peróxido ROO	Oxígeno singulete 1O_2		

Se ha observado que después de una LTME se incrementa la formación de radicales libres y la peroxidación de lípidos, los cuales, promueven la muerte celular por estrés oxidativo en las neuronas y a su vez, reducen el flujo sanguíneo hacia la médula espinal provocando edema y respuesta inflamatoria. Asimismo, la peroxidación de lípidos causa la formación de productos aldehído que alteran la función de importantes enzimas metabólicas, como la ATPasa de Na^+/K^+ , crucial para el mantenimiento de la excitabilidad neuronal (Silva y cols., 2014). Adicionalmente, durante la etapa aguda de la LTME, el óxido nítrico (ON) también participa en la inducción de estrés oxidativo. El ON es sintetizado por tres isoformas de la sintasa del óxido nítrico (SON), dos constitutivas y dependientes de calcio (SON neuronal y SON endotelial) y otra inducible e independiente de

calcio (SON inducible). Díaz-Ruiz y cols. (2000) en un modelo de LTME, demostraron un incremento del 138% (comparado con el grupo control no lesionado) en la actividad de la SON constitutiva 4 horas después de la lesión, y un incremento del 103% en la actividad de la SON inducible 72 horas después del daño. La actividad de las isoformas SONn, SONi, SONE, se mantiene en neuronas, microglía y células endoteliales, respectivamente, en todas las etapas de la lesión.

2.1.5 Muerte celular por apoptosis

La apoptosis es considerada un componente vital de varios procesos entre los cuales se encuentra la renovación de células normales, desarrollo y funcionamiento del sistema inmune, atrofia dependiente de hormonas, desarrollo embrionario y muerte celular inducida por sustancias químicas. La apoptosis a diferencia de la necrosis que ocurre en segundos es mucho más lenta e involucra una serie de eventos sincronizados de cambios morfológicos y bioquímicos que se llevan a cabo a lo largo de horas o días, dependiendo del estímulo iniciador (Springer, 2002). Existen tres vías involucradas en la muerte celular por apoptosis (Figura 3): **la vía intrínseca o mitocondrial** en la cual se induce la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial que conlleva a la liberación de diversas moléculas pro-apoptóticas, entre las cuales se encuentran SMAD/Diablo, AIF, HtrA2, EndoG y citocromo C, este último, se une a caspasa 9 y a Apaf-1 para la formación de apoptosoma para inducir la activación de la caspasa 3 efectora. La regulación de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial es

mediada por las proteínas de la familia Bcl-2. Los miembros de la familia que promueven la muerte celular incluyen a aquellos que contienen múltiples dominios BH (Bcl2 homology o dominios de homología) como Bax y Bak o una sola secuencia BH3 entre los que se encuentran Bad, Bik, Bid, Puma, Bim y Noxa. Mientras que los miembros antiapoptóticos incluyen a las proteínas Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w. Entre los principales factores involucrados en la activación de la vía intrínseca se encuentran el daño genético, procesos de hipoxia, altas concentraciones citosólicas de calcio y el estrés oxidativo (Springer, 2002; Elmore, 2007; Chaabane y cols., 2013). La **vía extrínseca** o de **receptores de muerte** se lleva a cabo mediante la activación de receptores transmembranales de muerte celular como CD95 / APO-1 / Fas, TNFR, o TRAIL. La unión de los ligandos Fas y TNF a sus respectivos ligandos resultan en la unión del adaptador de proteínas TRADD el cual recluta a FADD y a RIP. Posteriormente FADD se asocia a la procaspasa 8 a través de la dimerización del dominio efector de muerte. En este punto, se forma el complejo de señalización inductor de muerte (DISC por sus siglas en inglés), resultando en la activación auto-catalítica de la procaspasa 8. Una vez activada, se lleva a cabo la fase de ejecución de la apoptosis a través de la activación de la caspasa 3 (Pop y Salvensen, 2009; Martinou y Youle, 2011). Las caspasas son una familia de proteasas de cisteína, que inducen cortes proteolíticos en residuos de aspartato y son las principales reguladoras de la apoptosis. Se dividen en iniciadoras (2, 8, 9, 10, 11 y 12) y efectoras (3, 6 y 7) (Pop y Salvensen, 2009). Después de la activación de la caspasa 3, se induce una rápida redistribución y exposición del fosfolípido aniónico fosfatidilserina (PS) sobre la superficie celular. La PS esta normalmente anclada a la superficie interna

de la bicapa lipídica por medio de una enzima dependiente de ATP llamada flipasa, una translocasa de fosfolípidos. La flipasa en colaboración con una segunda enzima dependiente de ATP, la flopasa, que bombea fosfolípidos catiónicos, mantienen una distribución asimétrica de diferentes fosfolípidos entre el interior y el exterior de la membrana plasmática. La rápida redistribución (medida en minutos) de la fosfatidilserina a través de la membrana celular es facilitada por la desactivación dependiente de calcio de la flipasa y la activación de una tercera enzima llamada escambrasa (flipasa que facilita el paso de los fosfolípidos de la cara interna a la externa de la membrana celular). La exteriorización de la PS sirve como uno de los marcadores que identifican a la célula como un blanco para la fagocitosis (Formigari y cols., 2007). Asimismo, la exposición selectiva de la PS forma la base de la unión de la Anexina V a células apoptóticas (Blankenberg, 2009). La vía de muerte celular por **estrés del retículo endoplásmico** es otra vía intrínseca de inducción de apoptosis y se caracteriza por la alteración de la homeostasis de calcio y la acumulación de proteínas mal plegadas. En este caso, se dispara una cascada que inicia con la activación de la caspasa-12 localizada en la cara citosólica del retículo endoplásmico, lo cual a su vez, induce la activación de la caspasa-9 y ésta la de la caspasa-3, pero de una forma independiente de liberación de citocromo c por lo que esta vía no requiere la activación previa de la vía mitocondrial (Lizarbe, 2007)

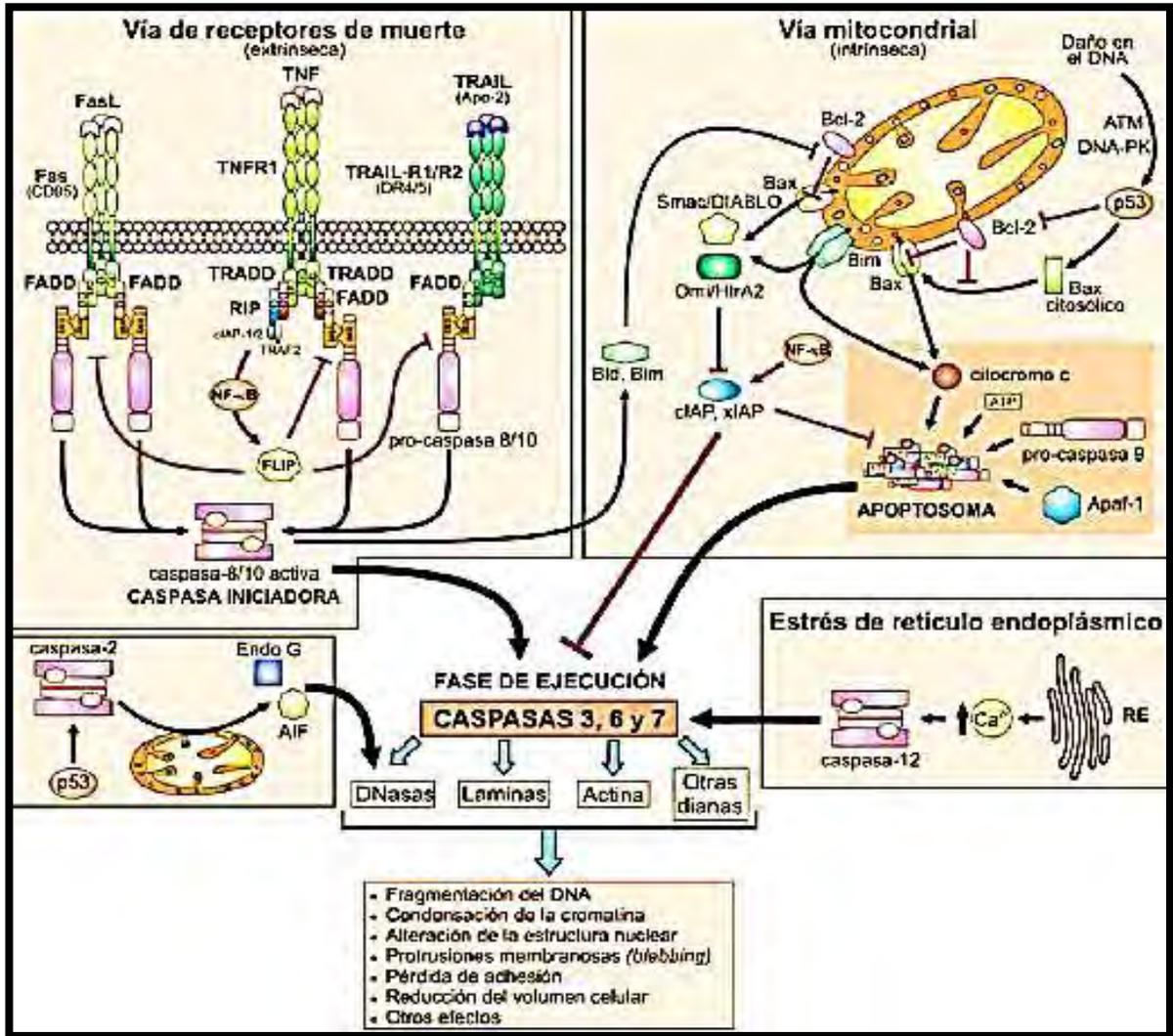


Figura 3. Vías de señalización que conducen a la muerte por apoptosis. Vía extrínseca o de receptores de muerte activada por ligandos con $TNF\alpha$ promueven la formación del complejo DISC (complejo de señalización inductor de muerte), la activación de la caspasa 8 y 3. La vía intrínseca es activada por mecanismos de daño mitocondrial y la liberación de moléculas pro-apoptóticas como el citocromo C, Apaf-1 y caspasa 9, los cuales forman parte del apoptosoma, encargado de activar a la caspasa 3. El estrés de retículo endoplásmico es otra de las vías intrínsecas de inducción de apoptosis en la que se altera la homeostasis de calcio; en esta ruta está implicada la caspasa-12, la cual a su vez activa caspasa 9 y finalmente caspasa 3. Imagen tomada de Lizarbe, 2007.

Por otro lado, en modelos de lesión medular se ha demostrado muerte celular por apoptosis en neuronas, oligodendrocitos, microglía y astrocitos (Springer *et al.* 1997; Beattie *y cols.*, 2000; Silva *y cols.*, 2014). En este sentido, Liu *y cols.* (1997), demostraron que la apoptosis contribuye a la muerte neuronal y glial, después de una lesión medular moderada, y que dicho proceso promueve la expansión del daño desde el epicentro a la periferia. Realizaron un conteo de células positivas a TUNEL, utilizando marcadores celulares para diferenciar entre neuronas y glía. Observaron que las neuronas positivas a TUNEL se restringieron al área de lesión a las 4 y 24 horas después del daño; con un pico máximo de presencia a las 8 horas. Por otro lado, las células gliales positivas fueron observadas en un curso temporal desde las 4 y 24 horas, 3, 7 y 14 días después del daño, con un primer pico máximo a las 24 horas y un segundo pico a los 7 días a varios milímetros del epicentro de la lesión, demostrando el papel de la muerte celular por apoptosis en la expansión del daño.

Asimismo, Knobloch *y cols.* (2005) realizaron un estudio sobre la activación de las caspasas 1, 2, 3, 6, 8 y 9 a lo largo del tiempo a partir de 1 hora y hasta 7 días después de una lesión moderada por contusión y observaron la activación de las caspasas 3, 8 y 9 a partir de 1 hora y hasta las 72 horas, mientras que las caspasas 1, 2 y 6 no se activaron. Ese mismo año, McEwen *y Springer* observaron la activación de la caspasa 3 en un curso-temporal después de una LTME, y mostraron un incremento en la actividad de dicha proteasa desde las 4h hasta los 8 días después del procedimiento quirúrgico, sugiriendo que la activación de la misma es un mediador bioquímico de muerte celular al menos en la primera semana después del daño en el tejido nervioso de la médula espinal.

3 Metalotioneínas

Las metalotioneínas (MT's) son proteínas intracelulares de bajo peso molecular de 61 residuos de aminoácidos (6-7kDa), con baja o ninguna proporción de aminoácidos aromáticos y alto contenido de cisteínas (25-30%) (Palacios y cols., 2011). Presentan un dominio- α (residuos 32-61) que se une a cuatro iones zinc y contiene 11 residuos de cisteínas y un dominio- β (residuos 1-31) que se une a tres iones zinc y contiene nueve residuos de cisteínas, cada dominio está totalmente separado del otro y se unen entre sí por un loop altamente flexible ((Penkowa, 2006; Thirumoorthy y cols., 2011; Álvarez y cols., 2015). Las principales funciones de las MT's son la detoxificación de metales pesados como el cadmio, la homeostasis de metales esenciales como el cobre y el zinc y el secuestro de ERO's (Higashimoto y cols., 2009). La función antioxidante de las MT's radica en su capacidad para capturar y neutralizar radicales libres a través de la oxidación de sus ligandos sulfuro-cisteínas (Álvarez y cols., 2015). En mamíferos se conocen cuatro isoformas: MT-I, MT-II, MT-III y MT-IV y los genes que codifican cada una de las isoformas se encuentran en la banda 13 del brazo largo del cromosoma 16 en humanos y (Penkowa, 2006).

Las **MT-I** y **II** presentan de 61 y 62 aminoácidos, respectivamente, de los cuales 20 son cisteínas y ningún aminoácido aromático, lo cual confiere a la molécula plasticidad para aceptar átomos de diferentes tamaños. Ambas contienen 7 iones zinc o cadmio/zinc unidos a su molécula (Vasak y Meloni, 2011). La localización intracelular de las MT-I y II es citoplasmática, aunque también se han observado en lisosomas, fracciones mitocondriales y núcleos (Carrasco, 2000). Se expresan

prácticamente en todos los tejidos, siendo particularmente importantes en órganos parenquimatosos como el hígado, riñón, intestino, testículos pulmón corazón y cerebro. En el SNC, en condiciones normales, se expresan en células endodiales, plexo coroideo, aracnoides, piamadre y astrocitos, donde, en caso de existir daño son inducidas y actúan como promotores de supervivencia neuronal (Carrasco, 2000; Chung y West, 2004). Sus regiones promotoras presentan elementos de respuesta a metales (elementos de respuesta a metales), glucocorticoides (elementos de respuesta a glucocorticoides), citocinas y especies reactivas de oxígeno (elementos de respuesta antioxidante) (Figura 4). Participan en el almacenamiento y distribución de metales como el cobre, zinc, cadmio, mercurio, plomo, níquel y cobalto, lo que les confiere efectos citoprotectores, modulan el transporte y la transferencia de los metales esenciales cobre y zinc favoreciendo la actividad de enzimas antioxidantes dependientes de dichos metales como la superóxido dismutasa de CuZn (Feng *et al*, 2005; Nielsen y cols., 2007). Su participación en dichos eventos puede ser de manera directa, vía la interacción con apoenzimas inactivas, o indirecta, mediante la regulación de la disponibilidad de zinc en las células (Vasak y Meloni, 2011). Asimismo, se ha observado su participación durante la respuesta inmune, en interacciones proteína-proteína y proteína-nucleótidos, en la regulación de factores de transcripción conteniendo dedos de Zn, en la respiración mitocondrial, supervivencia y diferenciación celular (Chung y West, 2004; Formigari y cols., 2007).

Existen algunas diferencias fundamentales entre la MT-I y II. Kershaw y Klaassen (1992), utilizando espectrofotometría de absorción atómica demostraron que la

MT-II tiene una vida media mayor que la MT-I en ratas tratadas con Zn (21 vs 33 horas), con Cd (58 vs 61 horas) y en ratas no tratadas (49 vs 73 horas), indicando que la MT-I es más susceptible a degradación intracelular que la MT-II. Por otro lado, mostraron que la administración de 1000 $\mu\text{mol Zn/kg}$ promueve una inducción de la MT-II cinco veces mayor que la MT-I, e incrementa los niveles de RNAm de la MT-II dos veces más que la MT-I. Asimismo, una vez que se alcanza un punto máximo de síntesis de proteínas después de la administración de Zn, determinaron que la MT-II incorpora más cisteínas que la MT-I. De igual manera, utilizando la técnica pulse-labeling comprobaron que la administración de Zn confiere una vida media mayor a la MT-II con valores de 12.2 ± 0.9 y 21.9 ± 3.0 horas para la MT-I y la MT-II, respectivamente (Lehman-McKeema y cols., 1988). Por último, la MT-II tiene mayor afinidad de unión a Zn y Cd que la MT-III, haciendo suponer que tiene un papel más importante en la regulación y disposición de dichos metales (Palumma y cols., 2005). En este sentido, el Zn es un metal esencial en el mantenimiento de la integridad de las membranas y es componente de más de 300 enzimas que participan en el metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos, y es un componente esencial de proteínas antioxidantes como la CuZn-SOD y las MT's. Sus principales funciones son la estabilización de factores de transcripción y la modulación de procesos de transducción de señales. Puede retrasar los mecanismos oxidativos inducidos por Cu y Fe, mediante interacción directa, por mecanismos competitivos o a través del mantenimiento de los niveles de MT's (Formigari y cols., 2007). De igual manera, se ha observado que el Zn es un potente inhibidor de la caspasa-3 y de endonucleasas

dependientes de calcio, ambas involucradas en procesos de muerte celular (Shimoda y cols., 2003).

En el sistema nervioso se ha observado que las MT I y II están involucradas en la inhibición de citocinas pro-inflamatorias, en la respuesta de los astrocitos (suministrando antioxidantes, anti-inflamatorios y factores tróficos a las neuronas) (Sofroniew y cols., 2005) y en el incremento en la expresión de IL-10, FGF, TGF- β , VEGF, NGF, NT-3-5, BDNF, GDNF involucrados en procesos de neuroprotección, reparación, angiogénesis y reorganización vascular (Natale y cols., 2004) (Figura 5).

Por otro lado, la **MT-III** presenta una disposición de cisteínas prácticamente idéntica a las MT-I y MT-II, sin embargo, como se ha observado la presencia de estructuras intercambiables en el *cluster* del dominio β , es decir, que existe más de una conformación posible de la proteína y debido a esto, podría variar su topología de superficie (Carrasco, 2000). La MT-III está presente en el SNC principalmente en neuronas y astrocitos, así como en páncreas e intestinos. Su región promotora presenta elementos de respuesta a metales, sin embargo, su expresión no es inducida por los mismos estímulos que las MT I y II, otros mecanismos tales como la organización de la cromatina o modificaciones epigénéticas podrían estar participando en dicho evento. Asimismo, las secuencias de DNA responsables de la regulación célula-específica son desconocidas (Vasak y Meloni, 2011). Participa en el desarrollo, organización y muerte celular programada, así como en la inhibición de crecimiento celular en cultivos neuronales y de riñón, lo cual hace suponer que dicha isoforma participa en procesos patogénicos (Nielsen y cols., 2007; Vasak y Meloni, 2011). En

estudios *in vivo*, donde a ratones sobre-expresando dicha isoforma, murieron como resultado de una atrofia pancreática, mientras que la administración de MT-I o MT-II tuvo efecto (Quaife y cols., 1998). En otro estudio *in vivo*, en un modelo de daño cerebral en ratones, la administración exógena de MT-III, a diferencia de la MT-II, no tuvo efecto sobre los marcadores de la inflamación, estrés oxidativo y de muerte celular observados (Penkowa y cols., 2006).

La **MT-IV** se encuentra únicamente en células epiteliales escamosas y su papel no está muy bien definido. Su expresión no es inducida por los mismos estímulos que las MT I y II y su regulación célula-específica es actualmente desconocida (Vasak y Meloni, 2011).

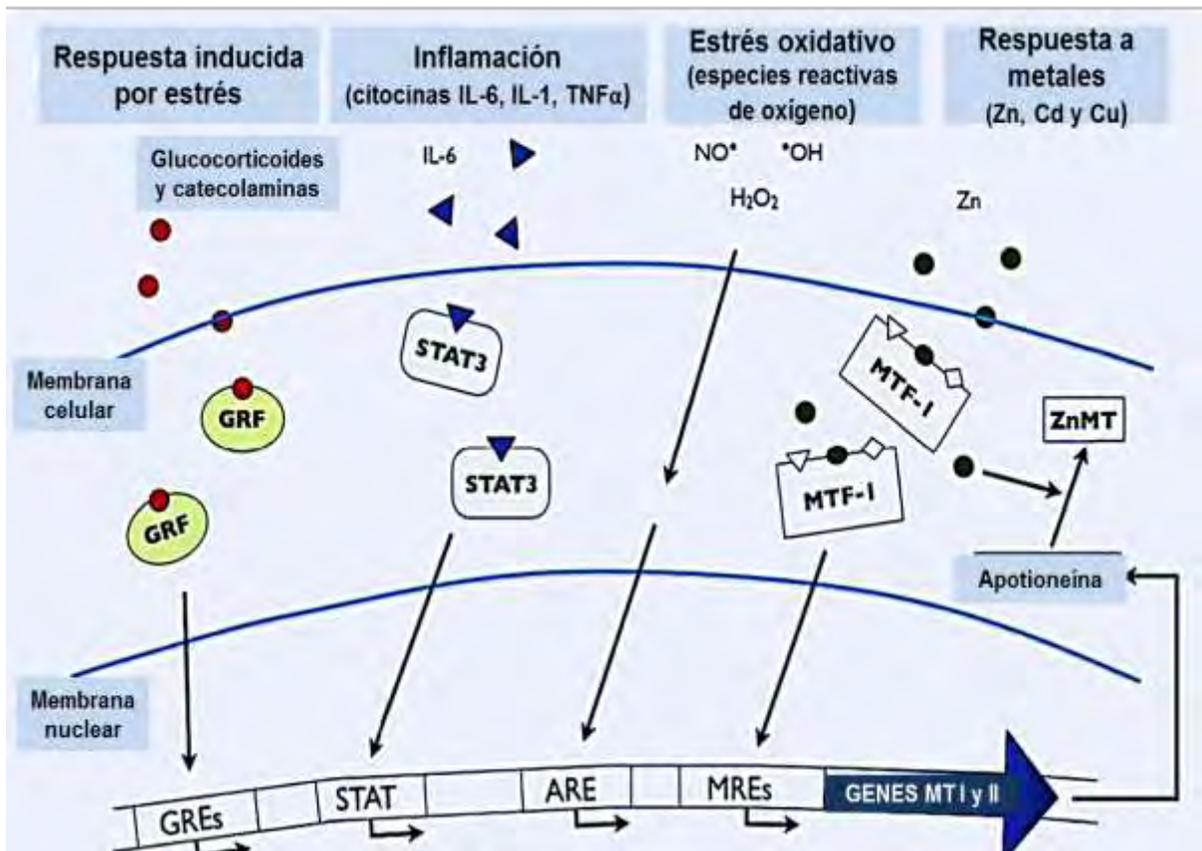


Figura 4. Control transcripcional de las metalotioneínas I y II. En el promotor (5' no codificante) de las metalotioneínas I y II están presentes elementos de respuesta o elementos *cis* a los cuales se les pueden unir proteínas denominadas elementos *trans* o factores de transcripción, los cuales modulan la expresión del gen. Entre los elementos de *cis* se encuentran los elementos de respuesta a metales (MRE), los cuales ejercen su acción independientemente de su posición y orientación, y realizan su función gracias a la unión con el factor de transcripción de respuesta a metales 1 (MTF-1); elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE por sus siglas en inglés); a citocinas, los cuales se unen a proteínas tipo signal transducer and activation of transcription (STAT) para llevar a cabo su función, y elementos de respuesta antioxidante (ARE), los cuales también interactúa con MTF-1 y el factor estimulador río arriba (USF) para promover la expresión génica. Imagen modificada de West y cols. (2008).

3.1 Degradación de las metalotioneínas

La degradación de las MT's toma lugar en compartimentos lisosomales y no-lisosomales. En este sentido, la degradación lisosomal ocurre más fácilmente que en el citoplasma, aunque la unión de metales a la proteína, la estabiliza y previene su proteólisis. En citoplasma, el complejo proteosomal 26S degrada a la apotioneína, la cual, debido a la falta de metales tiene una vida media menor que las MT's (Formigari y cols., 2007).

3.2 Efecto antioxidante de las metalotioneínas.

Una molécula antioxidante debe presentar las siguientes características: 1) una alta especificidad para atrapar y bloquear radicales libres, 2) inhibir los procesos óxido-reducción de los metales, 3) interactuar con otras moléculas antioxidantes dentro de un "sistema antioxidante", 4) tener un efecto positivo sobre la expresión de genes, y 5) tener una alta biodisponibilidad dentro de las células (Formigari y cols., 2007). La capacidad antioxidante de las MTs (incluso mayor que el glutatión) es uno de los mecanismos a través de los cuales ejerce su efecto neuroprotector (Cai y Cherian, 2003). Dicha función radica en su capacidad para capturar y neutralizar radicales libres a través de la oxidación de sus ligandos sulfuro-cisteínas (Álvarez y cols., 2015). Asimismo, muestran un efecto antioxidante indirecto, al estar involucradas en la regulación de la disponibilidad de los metales Zn y Cu, los cuales pueden activar enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (Formigari y cols., 2007). Reaccionan rápidamente con radicales

hidroxilo, superóxido y óxido nítrico, y sus grupos tioles pueden unirse fácilmente al peroxinitrito y al ácido peroxinitroso, haciendo de esta proteína una defensa antioxidante altamente eficiente (Aschner y West 2005; Penkowa, 2006). Wanpen y cols. (2004), demostraron que cultivos de células dopaminérgicas expuestos a Sansolinol, una neurotoxina endógena que incrementa los niveles de ERO's y disminuye los niveles de glutatión, la sobreexpresión de MT-I y MT-II protege a las células de muerte celular al inhibir el estrés oxidativo. Por otro lado, en un modelo de encefalomiелitis autoinmune se observó que la administración vía intraperitoneal de MT-II/Zn (3.5, 10 y 100µg peso) induce un menor reclutamiento de linfocitos y macrófagos, así como una disminución de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12 y TNF α , esta última involucrada en la vía extrínseca de apoptosis (Penkowa e Hidalgo, 2001). Finalmente, en ratones transgénicos que sobre-expresan MT I y II, se observa una disminución en la activación de la microglía, macrófagos y linfocitos T, así como una reducción en los niveles de citocinas pro-inflamatorias y ERO (Pedersen y cols., 2009). Aunado a esto, se ha observado un claro efecto protector de las MT-I y MT-II en diversos modelos de daño al SNC, como son la exposición a ácido kaínico, un potente excitotóxico, en el traumatismo cerebral, el cual promueve la infiltración y activación de leucocitos y microglía, así como la generación de ERO's, y en modelos animales de esclerosis lateral amiotrófica, en la cual existe una mutación en el gen que codifica para la enzima antioxidante SOD1. En todos estos modelos se ha observado que las MT-I y MT-II disminuyen el estrés oxidativo, la respuesta inflamatoria y la muerte celular (Penkowa y cols., 2006).

3.3 Efecto antiapoptótico de las metalotioneínas.

El efecto antiapoptótico de las MT's ha sido poco estudiado, por lo que no se conoce el mecanismo de acción a través del cual ejerce dicho efecto. Ratones Knock Out para MT-I y MT-II (MTKO) a los que se les provocó daño cerebral o se les administró ácido kaínico (como modelo excitotóxico), presentaron un incremento en la producción de ERO's, así como una mayor neurodegeneración y muerte celular por apoptosis (Penkowa, 2006). Por otro lado, se observó que la administración de MT-I + II en un modelo de encefalomiелitis autoinmune disminuye el reclutamiento de leucocitos CD11+, el número de células expresando IL-6 y TNF- α y positivas a TUNEL, así como el número de células inmunoreactivas para caspasa-3 y citocromo C (Penkowa e Hidalgo, 2001). Finalmente, se ha observado que la activación de MT en modelos de daño por agentes alquilantes, disminuye los niveles de TNF- α y caspasa 3 activa (Helal y cols., 2009). Se ha observado el efecto antiapoptótico de las MT's en muchos modelos de daño al SNC (Carrasco y cols., 2000) y en modelos en los cuales, la presencia o ausencia de dichas proteínas modifica la muerte celular (Kondo y cols., 1997; Deng y cols., 1999), sin embargo el mecanismo de acción a través del cual ejercen dichas acciones no ha sido dilucidado, pero se piensa que sus propiedades antioxidantes y la inhibición de procesos inflamatorios modulan dichas acciones.

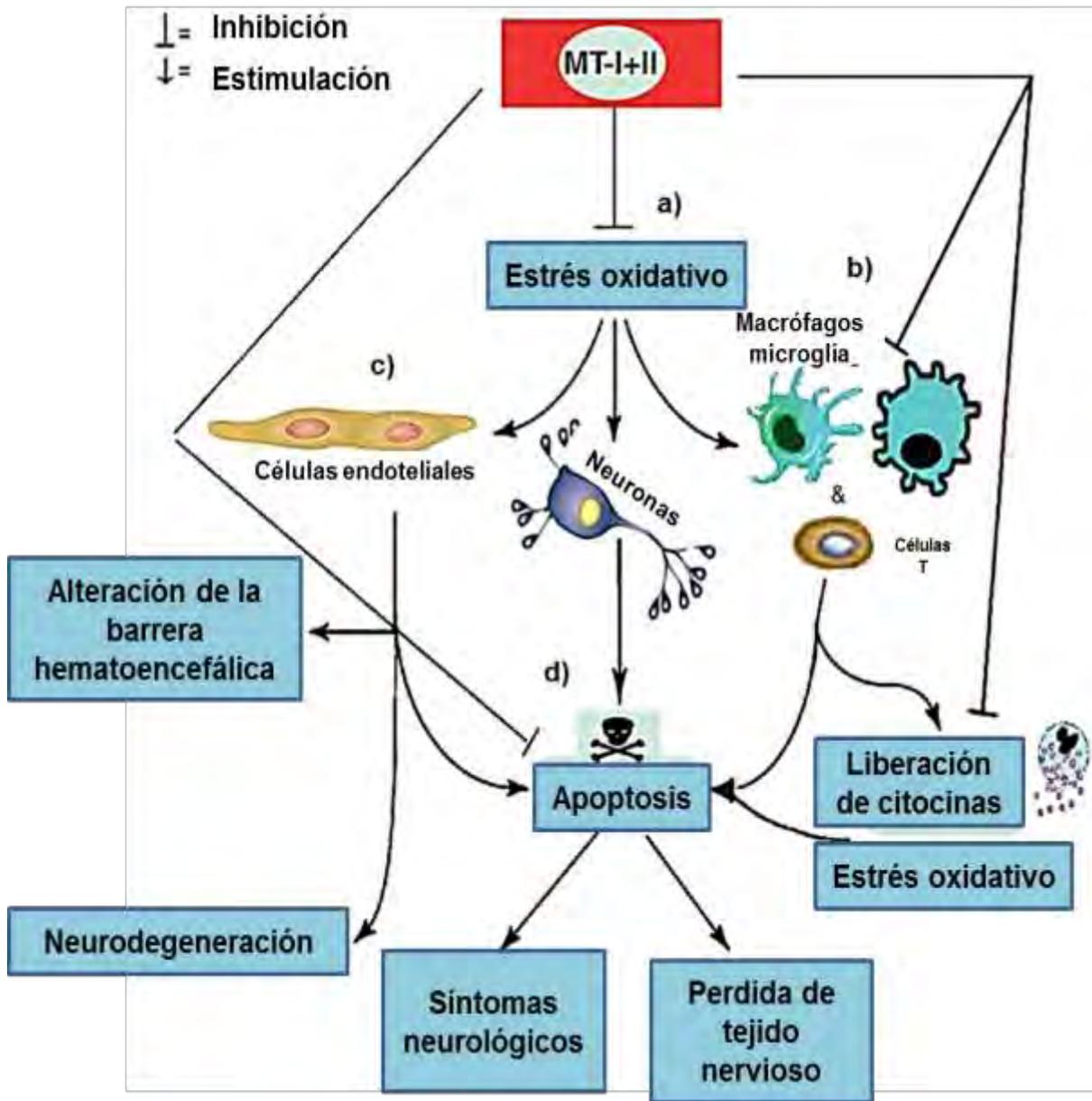


Figura 5. Principales funciones de las metalotioneínas I y II en el sistema nervioso. Están involucradas en el secuestro de radicales libres, inhibiendo el estrés oxidativo **a)**, evita la liberación de citocinas pro-inflamatorias **b)** por macrófagos, microglía y células T, participa en procesos de neuroprotección, reparación, angiogénesis y remodelamiento vascular **c)** y finalmente, bloquea la apoptosis **d)**, evitando la de pérdida de tejido nervioso y la neurodegeneración. Imagen modificada de Penkowa, 2006.

3.4 Las metalotioneínas como inductoras de regeneración

Se ha observado que la sobre-expresión de las MT-I y II promueven la regeneración axonal y participan en la inducción del crecimiento neurítico (Asmussen y cols., 2009), la angiogénesis y la neurogénesis (Pederson y cols., 2009). En este último estudio, se demostró que las MT-I y II funcionan como factor neurotrófico, cuando se adicionan directamente sobre cultivos de neuronas hipocampales y dopaminérgicas, favoreciendo la supervivencia y el crecimiento axonal. Finalmente, Leung y cols. (2012), observaron el efecto de la administración de MT exógena en explantes de raíces de ganglios dorsales lesionados, los resultados mostraron que la aplicación de MT incrementa de manera significativa la regeneración neuronal 16 h después del daño.

4 Metalotioneínas y LTME

Anteriormente se reportó el curso-temporal para establecer los picos máximos de MT endógena presentes durante la etapa aguda de la lesión en un modelo de LTME en ratas Wistar hembras. Se observó una dinámica bifásica en el incremento de las concentraciones de MT, con un primer pico a las 4 h y un segundo pico a las 24 horas después del daño (Díaz-Ruiz y cols., 2009). Posteriormente, se determinó el efecto neuroprotector del tratamiento con MT-II administrada de manera exógena en tres diferentes dosis (3.2, 10 y 100µg vía intraperitoneal). Los resultados demostraron que los tratamientos de 10 y 100µg por rata promueven la recuperación funcional así como el incremento en la

cantidad de tejido preservado en animales con LTME (Arellano-Ruiz y cols., 2012) (Figura 6).

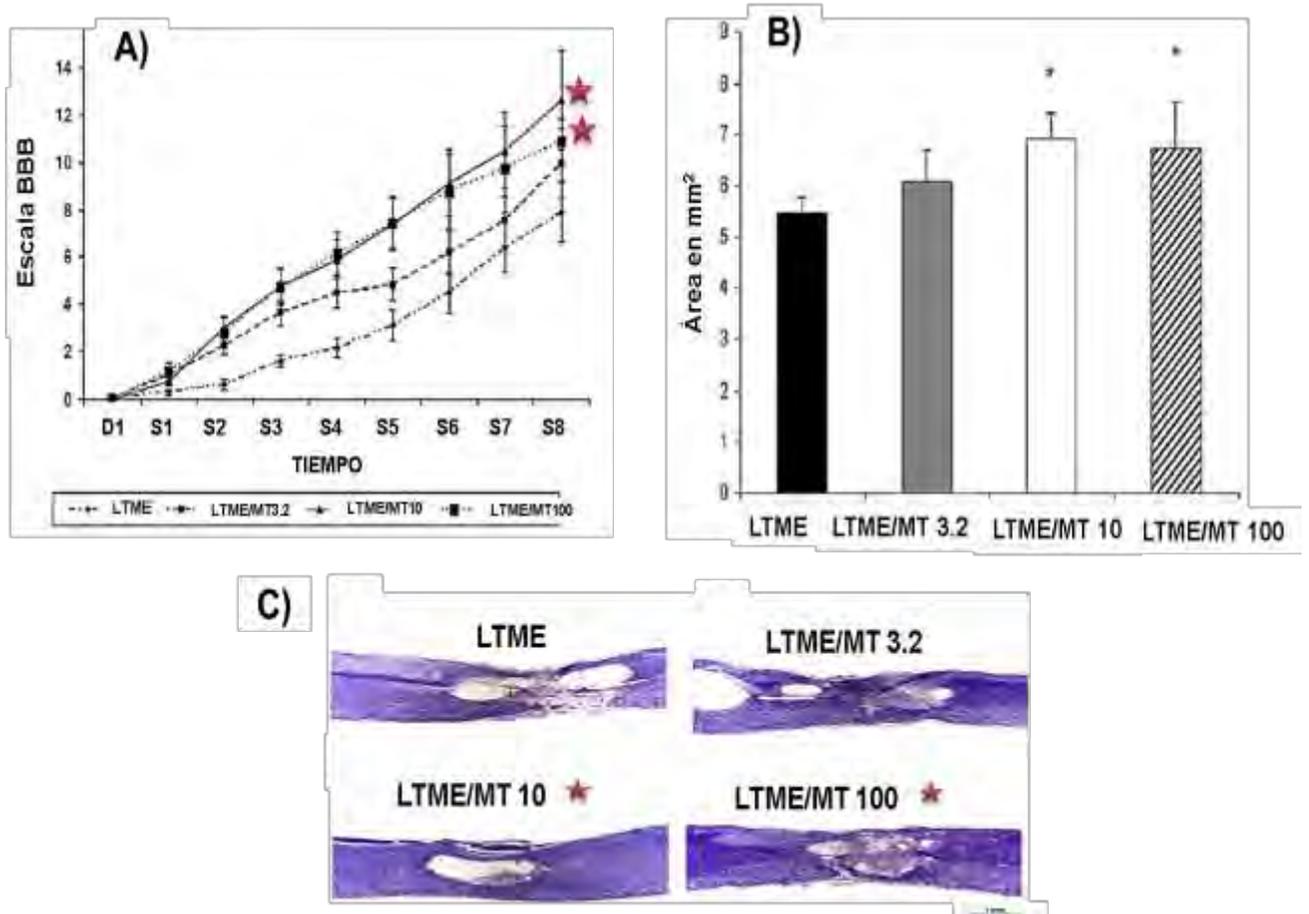


Figura 6. Recuperación funcional y preservación de tejido nervioso cuando se administra MT-II exógena (3.5, 10 y 100µg/rata) después de una LTME en ratas. A) La gráfica representa el promedio de la recuperación funcional en un curso temporal de dos meses después de una LTME. Se observa una mayor recuperación funcional estadísticamente significativa cuando se administran 10 o 100µg/rata. B) y C) Asimismo se observa una mayor preservación de tejido nervioso, cuando los animales se administraron con las mismas dosis. Imagen modificada de Arellano-Ruiz y cols., 2012.

5 Hipótesis

Si el tratamiento con MT-II tiene efecto anti-apoptótico después de una LTME, entonces se observará una disminución en los marcadores de apoptosis en aquellos animales tratados con dicha proteína al ser comparado con el grupo control.

6 Objetivo General

Caracterizar el efecto antiapoptótico de la metalotioneína II en un modelo de lesión traumática de médula espinal en ratas.

7 Objetivos particulares

- Determinar mediante la cuantificación de la actividad enzimática de las caspasas 9 y 3 el efecto antiapoptótico de la MT-II administrada de manera exógena en ratas con LTME.
- Evaluar mediante técnicas de inmunofluorescencia el efecto antiapoptótico de la MT-II administrada de manera exógena en ratas con LTME.

8 Materiales y métodos

8.1 Consideraciones éticas para el uso de animales en la experimentación:

Para la realización del presente proyecto, se siguieron los lineamientos establecidos a nivel internacional y nacional por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 —Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

8.2 Diseño experimental y tratamientos.

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar adultas hembras de 12 a 14 semanas de edad, con un peso de 200 a 250g, distribuidas aleatoriamente en los siguientes grupos (24 y 72 horas):

GRUPO I: ratas con laminectomía (Lam) sin lesión + S.S. (S.S.)

GRUPO II: ratas con Lam sin lesión + MT-II a las 2, 8, 24 y 48 horas dependiendo del tiempo de sacrificio.

GRUPO III: ratas con LTME + S.S.

GRUPO IV: ratas con LTME + MT-II a las 2, 8, 24 y 48 horas dependiendo del tiempo de sacrificio.

La dosis de MT-II administrada (i.p.) fue de 10µg/ peso según lo reportado por Arellano-Ruiz y cols., 2011. El tratamiento de MT-II se realizó 2 y 8 horas después del procedimiento quirúrgico de acuerdo a los tiempos reportados por Díaz-Ruiz y

cols., 2009 como los valores mínimos de MT endógena presentes en el sitio de daño.

8.3 Modelo de lesión por contusión

Se utilizó la técnica de lesión traumática de la médula espinal por contusión previamente reportada por Basso y colaboradores en 1996. Con dicha técnica, se utiliza el equipo N.Y. Spinal Cord Impactor^{MR}, el cual es un equipo estandarizado que realiza lesiones con características altamente reproducibles y similares a las que se observan en los pacientes con traumatismo medular (Basso y cols., 1996). Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico 50 mg/kg vía intraperitoneal. Una vez anestesiadas se les realizó una pequeña incisión en la piel (caudal-rostral) y se ubicó la vértebra número 12 (presente al final de la caja torácica) como punto de referencia. Posteriormente, se delimitó el área de la novena vértebra torácica para realizar una laminectomía, que consiste en la remoción de la mitad del cuerpo vertebral. Inmediatamente después de realizar la laminectomía, las ratas se colocan sobre el equipo utilizando unas pinzas de soporte, para ubicar la médula utilizando el cilindro metálico de 10g, (una vez que toca la médula se escucha un ligero sonido), se coloca el cilindro a una altura de 25 mm (valor estándar para la generación de una lesión medular moderada) y se deja caer libremente sobre la médula. Las ratas sin lesión fueron operadas quirúrgicamente igual, únicamente que no se les realizó la lesión medular (Figura 7). Finalmente, las ratas fueron colocadas en cajas individuales de cuidados intensivos para animales pequeños (Schoer Manufacturing Co., Kansas City, MO),

para permitir la recuperación después de los procedimientos anestésicos y quirúrgicos. Una vez recuperadas se les dejó alimento y agua *al libitum* hasta su sacrificio.

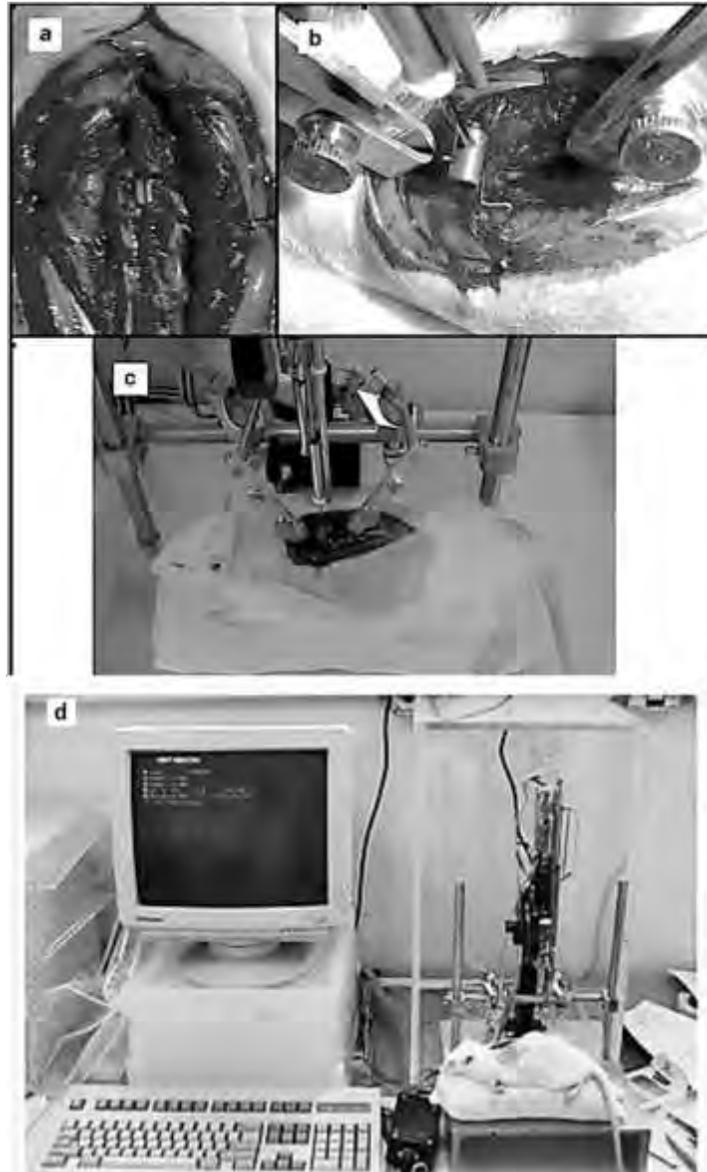


Figura 7. Modelo de lesión traumática de la médula espinal por contusión en ratas. a) Exposición de la médula espinal a nivel de T9 mediante una laminectomía. b) colocación sobre equipo New York Impactor^{MR} utilizando pinzas de soporte. c y d) Lesión medular mediante la caída de cilindro metálico de 10g a una altura de 25mm y registro de datos en equipo.

8.4 Sacrificio y almacenamiento de muestras.

Las ratas fueron sacrificadas a las 24 y 72 horas de acuerdo a lo reportado por Cheng y cols. (1998), para la evaluación de procesos de apoptosis temprana y tardía respectivamente. El sacrificio se realizó mediante dos técnicas dependiendo del tipo ensayo que se realizarían con las muestras. Para el primer caso (pruebas de inmunofluorescencia), se llevó a cabo la fijación de tejido mediante perfusión intracardiaca con formaldehído al 10% y las muestras se almacenaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento. Por otro lado, para los ensayos bioquímicos las ratas fueron sacrificadas mediante guillotina, una vez realizada la toma de muestra se pesó en una balanza analítica y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70C hasta su procesamiento. **Nota:** para ambos tipos de sacrificio el tamaño de muestra obtenido fue de aproximadamente 1cm de longitud, es decir, 0.5 cm del epicentro de la lesión en sentido rostral y 0.5 cm en sentido caudal.

8.5 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

El método de Lowry es una técnica colorimétrica de valoración cuantitativa de las proteínas. Las muestras fueron homogeneizadas y centrifugadas en buffer de lisis (caspasa 9) o buffer RIPA (caspasa 3) dependiendo de la actividad de caspasa a determinar con ellas. Se tomó la muestra del sobrenadante y se realizó una dilución 1:50, posteriormente se trasladaron 400ul en dos tubos de cristal de 2ml (200ul por tubo) y se les adicionó 1ml de la mezcla de Na₂CO₃, tartrato de sodio y potasio y sulfato de cobre, dejándolo reposar 10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se agregaron 100µl de Folin-Ciocalteu, agitando ligeramente los tubos y dejando incubar durante 30 minutos. Una vez terminada la reacción (observable por la coloración azul intenso) se procedió a cuantificar la intensidad de fluorescencia de las muestras y se determinó la cantidad total de proteína presente utilizando como base a una curva estándar de albúmina. Finalmente se calculó la cantidad de µl necesarios de nuestra muestra para tener una concentración de 200ug/ml para nuestros ensayos de actividad de caspasas.

8.6 Evaluación del efecto antiapoptótico de la MT-II en la LTME.

Para determinar del efecto antiapoptótico de la MT-II en el modelo de LTME se realizaron ensayos de actividad enzimática de caspasas 3 y 9 utilizando los kits comerciales de Roche^{MR} y Calbiochem^{MR}, respectivamente, así como el ensayo de **TUNEL** y **Anexina V** (anticuerpo anti-Anexina V).

8.6.1 Ensayo fluorométrico de actividad enzimática de caspasa 3 y 9.

Se realizó el cálculo para la obtención de 200µg de proteína por muestra. Brevemente, las muestras para la determinación de actividad de **Caspasa 3**, fueron homogenizadas con buffer RIPA, y las muestras para **Caspasa 9** se homogenizaron en buffer de lisis. Una vez que las muestras fueron homogenizadas, se incubaron en hielo 10 minutos e inmediatamente después las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos. Se tomó el volumen necesario para 200µg de proteína y se trasladaron a la placa de ELISA, donde se

llevaron a 100µl con buffer de reacción. Finalmente, se agregaron 5µl del sustrato 1mM IETD-AFC y se incubaron a 37°C durante 2 horas. Las muestras fueron leídas en un lector de placas de ELISA por fluorescencia a una longitud de onda de 400nm de excitación y 505nm de emisión. Se realizaron lecturas a los 30, 60 y 120 minutos y la actividad de caspasas se determinó restando el valor de la lectura de 1 hora a la de 2 horas.

8.6.2 Ensayos de inmunofluorescencia para Anexina V y TUNEL

Las muestras de médula espinal obtenidas mediante perfusión con formaldehído al 10% fueron trasladadas a sacarosa al 30% y se mantuvieron en este medio durante 24 horas. Posteriormente, fueron congeladas sumergiéndolas en metilbutano y colocándolas inmediatamente en hielo seco. Las muestras fueron cortadas a un grosor de 5µm en un criostato y colocadas en portaobjetos previamente tratados con poliL-lisina.

8.6.2.1 Inmunomarcaje con Anexina V/Neurofilamento/ Hoechst

La exposición selectiva de la fosfatidilserina (PS) forma la base de la unión de la Anexina V a células apoptóticas. La Anexina V es una proteína humana intracelular ubicua que tiene una afinidad nanomolar por la PS y puede unirse hasta a 8 moléculas de la misma (Blankenberg, 2009). En el ensayo de Anexina V, dicha proteína se encuentra acoplada a un fluoróforo que permite su reconocimiento mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia para la

cuantificación del número de células en apoptosis temprana (Padierna, 2006; Rivera, 2011).

La detección de **Anexina V** se realizó de la siguiente manera: las laminillas fueron hidratadas en una solución amortiguadora de pH de fosfatos (PBS) 0.12M por 5 minutos, se incubaron durante 30 minutos con suero normal de caballo y pasado este tiempo se les escurrió el exceso. Se realizó una incubación de 48 horas con los anticuerpos primarios Annexin V, rabbit y NF, mouse, ambos Chemicone^{MR}, cubriendo perfectamente las laminillas con Parafilm^{MR} para asegurar la distribución uniforme de los anticuerpos. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS y se incubó con los anticuerpos secundarios Alexa 546 Anti-rabbit y Alexa 486-488 Anti-mouse 3 horas. Se realizó un lavado con PBS durante 10 minutos y se contrastaron los núcleos utilizando Hoechst durante 2 minutos. Se lavó nuevamente con PBS y fueron montadas utilizando en medio de montaje Vecthasield. Finalmente las laminillas fueron selladas con barniz de uñas y se dejaron secar un día para ser observadas.

8.6.2.2 Inmunomarcaje de extremos libres del DNA mediante TUNEL

La endonucleolisis es considerada un importante evento bioquímico durante la apoptosis, resultando en el corte del DNA nuclear a pequeños fragmentos del tamaño de oligonucleosomas. Durante este proceso, las endonucleasas generan grupos 3'-OH libres en los extremos del DNA fragmentado, los cuales son aprovechados por la enzima Tdt (desoxinucleotidil transferasa terminal) para catalizar la incorporación de desoxinucleótidos marcados con fluoresceína en

dichos extremos del DNA, los cuales pueden ser cuantificados mediante fluorescencia para identificar el número de células apoptóticas (Padierna, 2006).

La técnica de **TUNEL** se realizó utilizando el kit *In Situ Cell Death Detection* de Roche^{MR}, siguiendo las especificaciones de los fabricantes. Brevemente, los cortes histológicos se colocaron en una solución amortiguadora de pH de fosfatos (PBS) 0.12M por 5 minutos, posteriormente fueron incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente con proteinasa K 20µg/ml en TRIS/HCl y lavados con PBS durante 5 minutos. A continuación, las secciones fueron permeabilizadas con tritón X-100 al 0.1% en citrato de sodio 0.1% sobre hielo o en el refrigerador por 5 minutos, posteriormente las laminillas fueron lavadas dos veces con PBS y se incubaron con 50µl de la mezcla de reacción TUNEL durante 60 minutos a 37°C. Se realizó un inmunomarcaje utilizando el anticuerpo específico para neurofilamento (NF, mouse Chemicone^{MR}) y se dejó incubando durante 24 horas más. Cumplido el tiempo se realizaron tres lavados con PBS y se colocó el anticuerpo secundario Alexa 546 anti-mouse y se montaron las laminillas utilizando el medio de montaje Vecthasield^{MR}. Finalmente fueron selladas con barniz de uñas y se dejaron secar un día para ser observadas.

8.6.2.3 Análisis del número de células positivas a Anexina V y TUNEL

Las células positivas a Anexina V y TUNEL fueron contadas en secciones transversales de médula espinal en el sitio de la lesión. Todas las imágenes se digitalizaron usando una cámara de congelación Evolution MP (Media Cybernetics, USA) conectada a un microscopio Axiolab (Zeiss, Germany) y se utilizó el software Image-Pro Plus 7 para analizar y contar las células. Se realizó un conteo en las laminillas de 27 y 28 ratas divididas en los cuatro grupos y dos tiempos para el ensayo de TUNEL y Anexina V, correspondientemente, y en cada una de las laminillas se llevó a cabo el conteo de celular en un promedio de 16 y 18 campos, respectivamente.

El promedio de densidad celular por unidad de volumen fue determinado utilizando el método Fraccionador Óptico (West, 1993). Este procedimiento utiliza distintas secciones y estima el número total de células del número de células muestreadas, esto, utilizando un conjunto de muestras sistemáticamente aleatorizadas de espacios visuales, los cuales cubren la región de interés en todas direcciones (X, Y, Z) (Figura 8). Este método es apropiado para la cuantificación de células en tejidos biológicos y es necesario que las muestras sean gruesas para el análisis de neuronas. Los conteos llevados a cabo con el método Fraccionador Óptico son imparciales y no son influenciados por el tamaño, forma, orientación espacial y distribución espacial de las células evaluadas. El principio fraccionador establece que si se toma una muestra de una fracción conocida de una población, entonces la estimación objetiva para la población es el valor de la muestra dividida por la fracción.

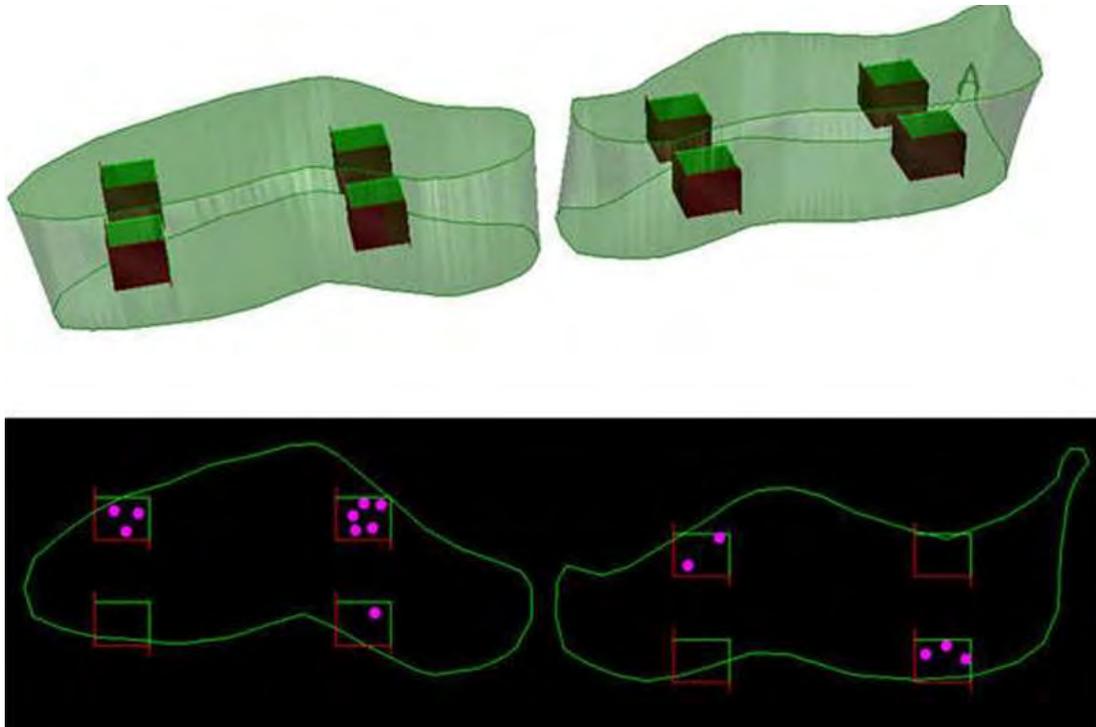


Figura 8. Método de fraccionador óptico. El método Fraccionador Óptico utiliza secciones gruesas para estimar el número total de células del número de células muestreadas (representadas por círculos rosas) aplicando un sistema aleatorizado de muestras de espacios visuales imparciales, los cuales cubren el área de interés en todas las direcciones (X,Y y Z)

8.6.3 Análisis estadísticos de los datos

En todos los casos se realizó un análisis exploratorio de los datos para determinar una distribución normal aplicando la prueba de Kolmogorov-Smirnov y homogeneidad de varianzas aplicando la prueba de Levene. Una vez determinado esto, se utilizaron pruebas estadísticas paramétricas (ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Tukey) o no paramétricas (Kruskal-Wallis). En todos los casos se tomó como diferencia significativa una $p < 0.05$. Paquete estadístico SPSS 17.0.

9 Resultados

9.1 Evaluación de la actividad enzimática de caspasa 9

Los resultados del efecto de la MT-II sobre la actividad de dicha caspasa se muestran en la figura 9, panel A (24 horas) y panel B (72 horas), los valores están expresados como promedios \pm error estándar de 5 a 8 animales por grupo. Los resultados mostraron un incremento curso-temporal en la actividad enzimática de la caspasa 9. A las 24 horas se observó un incremento en las unidades de fluorescencia del 32% (250.937 ± 28.349) en el grupo LTME + SS al ser comparado con el grupo control (190.666 ± 51.481), mientras que a las 72 horas la actividad aumentó significativamente ($p < 0.05$) 152% (451.416 ± 61.347) al ser comparado con el grupo control (178.800 ± 31.574). Por otro lado, se determinó que la actividad enzimática incrementa a lo largo del tiempo. Los grupos de 72 horas presentaron mayor actividad al ser comparados con los grupos de 24 horas. Finalmente, la administración de MT-II en los grupos con LTME no modificó la actividad enzimática de la caspasa 9 a ningún tiempo evaluado, esto al ser comparado con los grupos lesión + S.S..

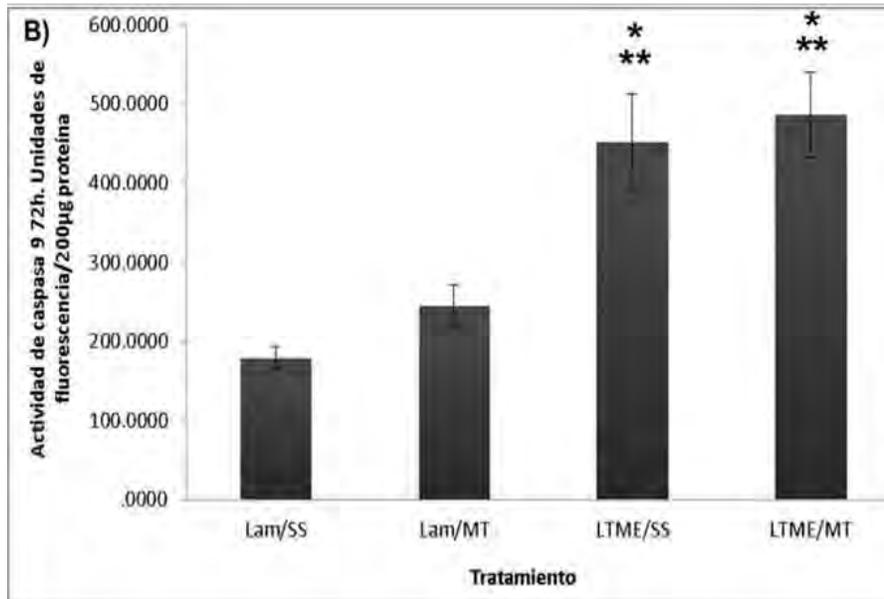
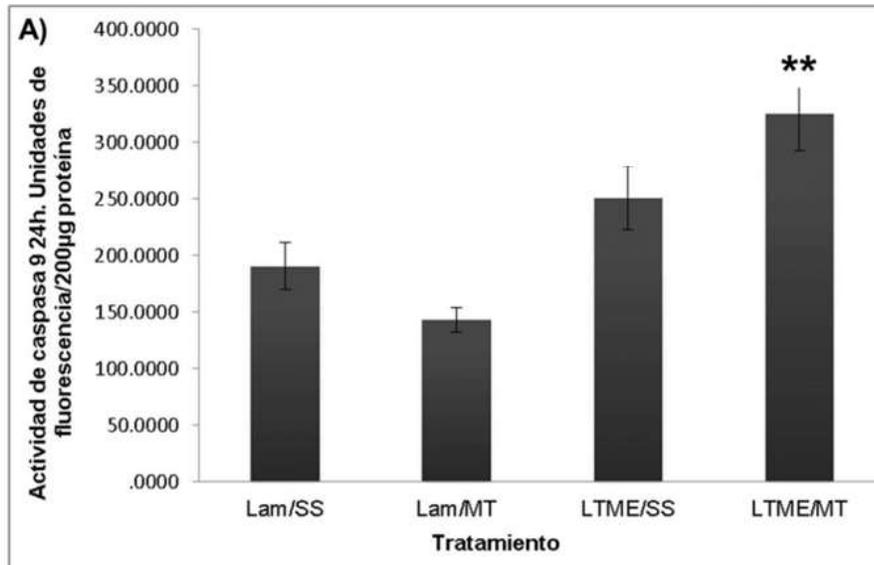


Figura 9. Evaluación de la actividad de caspasa 9 en un modelo de LTME 24 y 72 horas después del procedimiento quirúrgico. A) actividad enzimática 24 horas después procedimiento quirúrgico. B) actividad enzimática a las 72 horas. LTME= lesión traumática de la médula espinal. Lam= laminectomía, SS= solución salina, MT= metalotioneína. Valores expresados promedio \pm error estándar; n= 24 y 22 ratas por tiempo, respectivamente. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. * = $p < 0.05$ diferentes vs control (Lam/SS). ** = $p < 0.05$ diferentes vs Lam/MT

9.2 Evaluación de la actividad enzimática de caspasa 3

Los resultados del efecto de la MT-II sobre la actividad de la caspasa 3 se muestran en la figura 10, panel A (24 horas) y panel B (72 horas), los valores están expresados como promedios \pm error estándar de 5 a 9 animales por grupo. Se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad de la caspasa 3 a través del tiempo, obteniéndose los valores más altos de actividad en el grupo LTME + SS de 72 horas, esto al ser comparado con el grupo control de su respectivo tiempo. A las 24 horas se observó un incremento del 81% (1048.937 ± 101.220) en la actividad enzimática de caspasa 3 en el grupo LTME + SS al ser comparado con el grupo control (580.285 ± 56.025), y dicho valor disminuyó significativamente ($p < 0.05$) al 17% (678.444 ± 94.635) de actividad en el grupo LTME + MT-II, esto es una disminución del 64% con respecto al grupo LTME + S.S. Adicionalmente, se observó que el grupo Lam + MT-II de las 24h tuvo una disminución del 53% (270.714 ± 41.1800) en la actividad enzimática de la caspasa 3 al ser comparado con el grupo control (figura 10), efecto que no fue observable con en el grupo Lam + MT-II de las 72 horas, donde los valores fueron similares a los del grupo control. En este sentido, tampoco fueron observables cambios en la actividad enzimática en el grupo LTME + MT-II al ser comparados con el grupo LTME + S.S., mostrando únicamente un efecto a etapas tempranas de la activación de la caspasa 3.

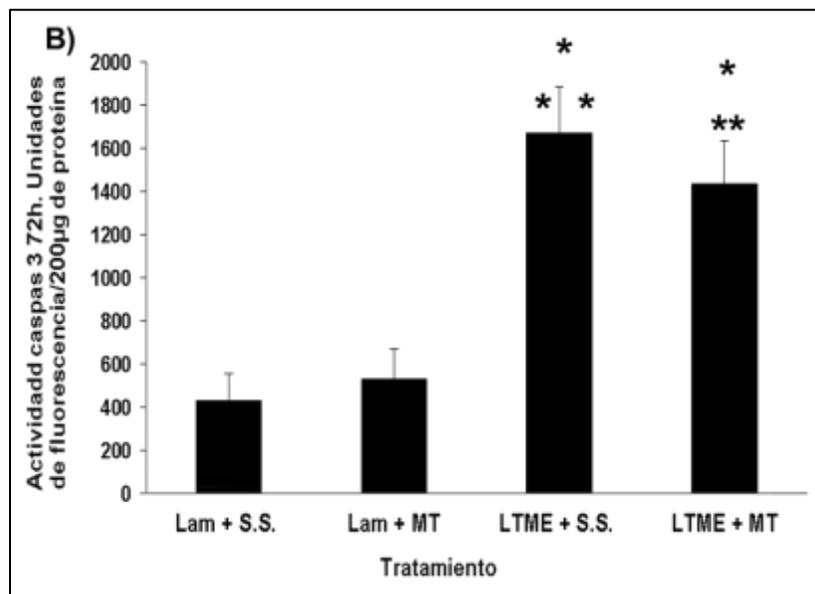
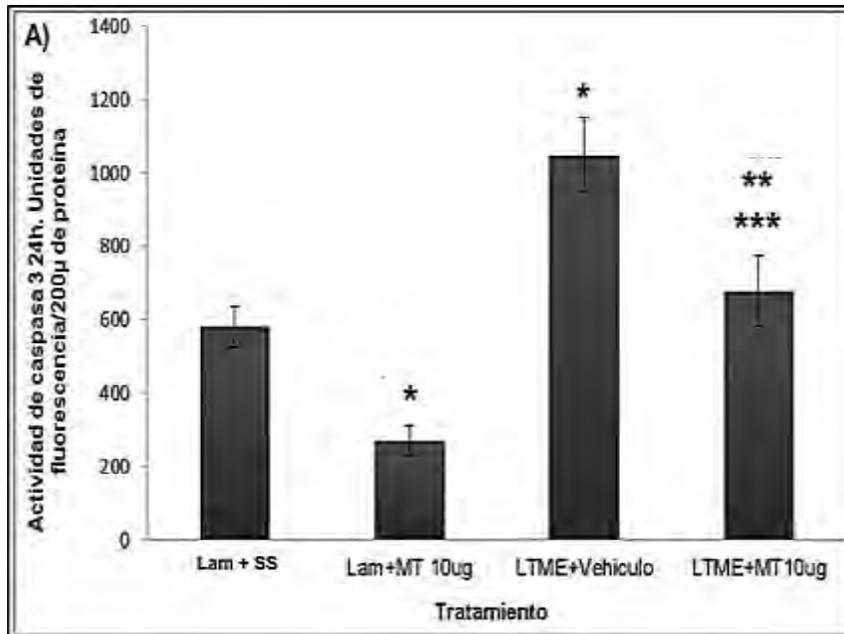


Figura 10. Evaluación de la actividad de caspasa 3 a las 24 y 72 horas después del procedimiento quirúrgico. A) actividad de caspasa 3 a las 24h, n= 31. B) actividad de caspasa 3 a las 72h, n= 18.. Lam= laminectomía, SS= solución salina, LTME= lesión traumática de la médula espinal. Datos representados como el promedio \pm error estándar de la intensidad de fluorescencia/mg de proteína. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. * = $p < 0.05$ diferentes VS el control (Lam/SS). **= $p < 0.05$ diferentes VS Lam/MT, ***= $p < 0.05$ diferente VS LTME/SS.

9.3 Marcaje de extremos libres del DNA mediante TUNEL

En las figuras 13 y 14, paneles A-D se muestra la histología normal (con algunas motoneuronas marcadas con NF) de los cortes histológicos de médula espinal de ratas a las cuales únicamente se les realizó una laminectomía sin lesión. En este sentido, no se observaron células inmuno-positivas a TUNEL en ningún grupo con Lam sin lesión (figuras 13 y 14, paneles A-D). En los grupos con LTME se observó un incremento en el número de células positivas por mm^3 , obteniéndose el valor más alto a las 72 horas. El conteo de células realizado a las 24 horas no arrojó diferencias significativas entre el grupo LTME+ S.S. con un valor promedio de **537.76** \pm 40.89936 células positivas por mm^3 versus el grupo LTME+MT con **477.93** \pm 14.35009 células por mm^3 (figura 11). En las muestras de las 72 horas se obtuvieron los siguientes datos: **LTME+SS** con un valor promedio de **612.39** \pm 40.55720 células por mm^3 , lo cual disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en el grupo **LTME + MT** a **389.30** \pm 11.88085 células por mm^3 (figura 12). En la figura 14 y 15, paneles E-H se muestran imágenes representativas de células positivas a TUNEL en los grupos con LTME + S.S. (SS) y LTME + MT en los dos tiempos evaluados.

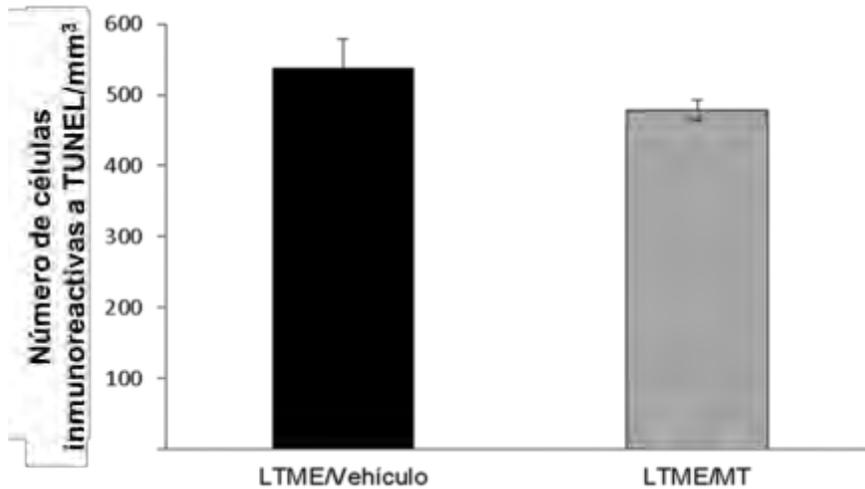


Figura 11. Número de células positivas a TUNEL a las 24 horas. No se observaron diferencias significativas. Datos representados como el promedio \pm error estándar del número de células positivas a TUNEL por mm³. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. LTME= lesión traumática de la médula espinal. MT= metalotioneína

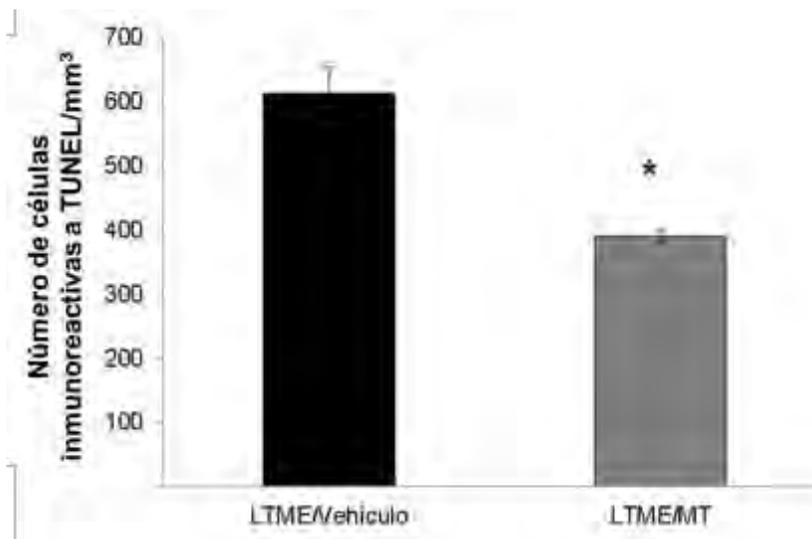


Figura 12. *Número de células positivas a TUNEL a las 72 horas. Se observó una disminución significativas ($p < 0.05$) en el número de células positivas en el grupo con LTME+ MT con un valor de 389.30 al ser comparado con el grupo LTME+ S.S.. Datos representados como el promedio \pm error estándar del número de células positivas a TUNEL por mm³. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. LTME=lesión traumática de la médula espinal. MT= metalotioneína. * $\rightarrow p < 0.05$.*

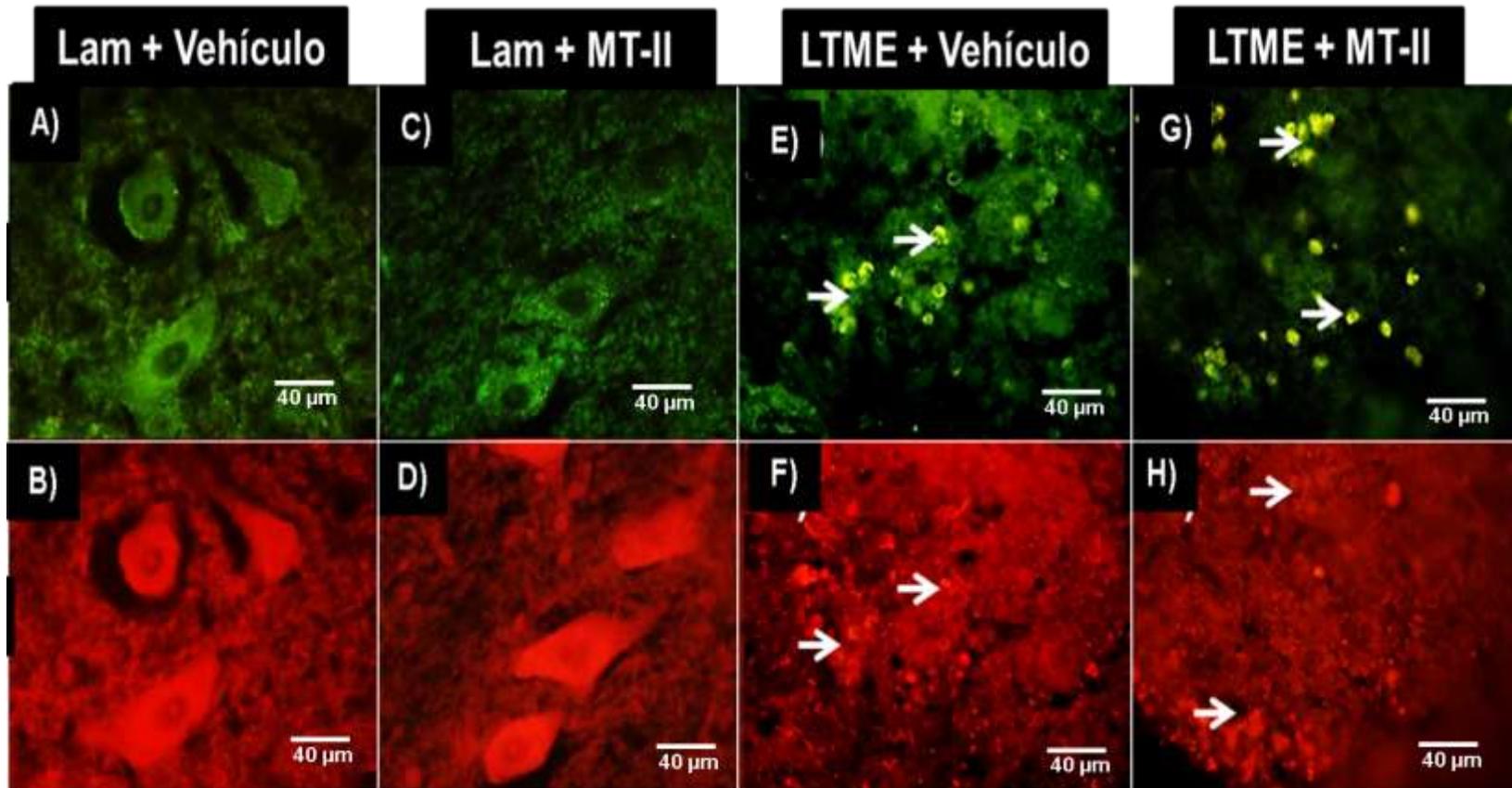


Figura 13. Imagen representativa de las células positivas para la tinción con TUNEL a las 24 horas (verde brillante) y Neurofilamento (rojo). Las flechas blancas indican la posición de las células inmunopositivas a la marca de TUNEL. Barra de calibración 40 μm

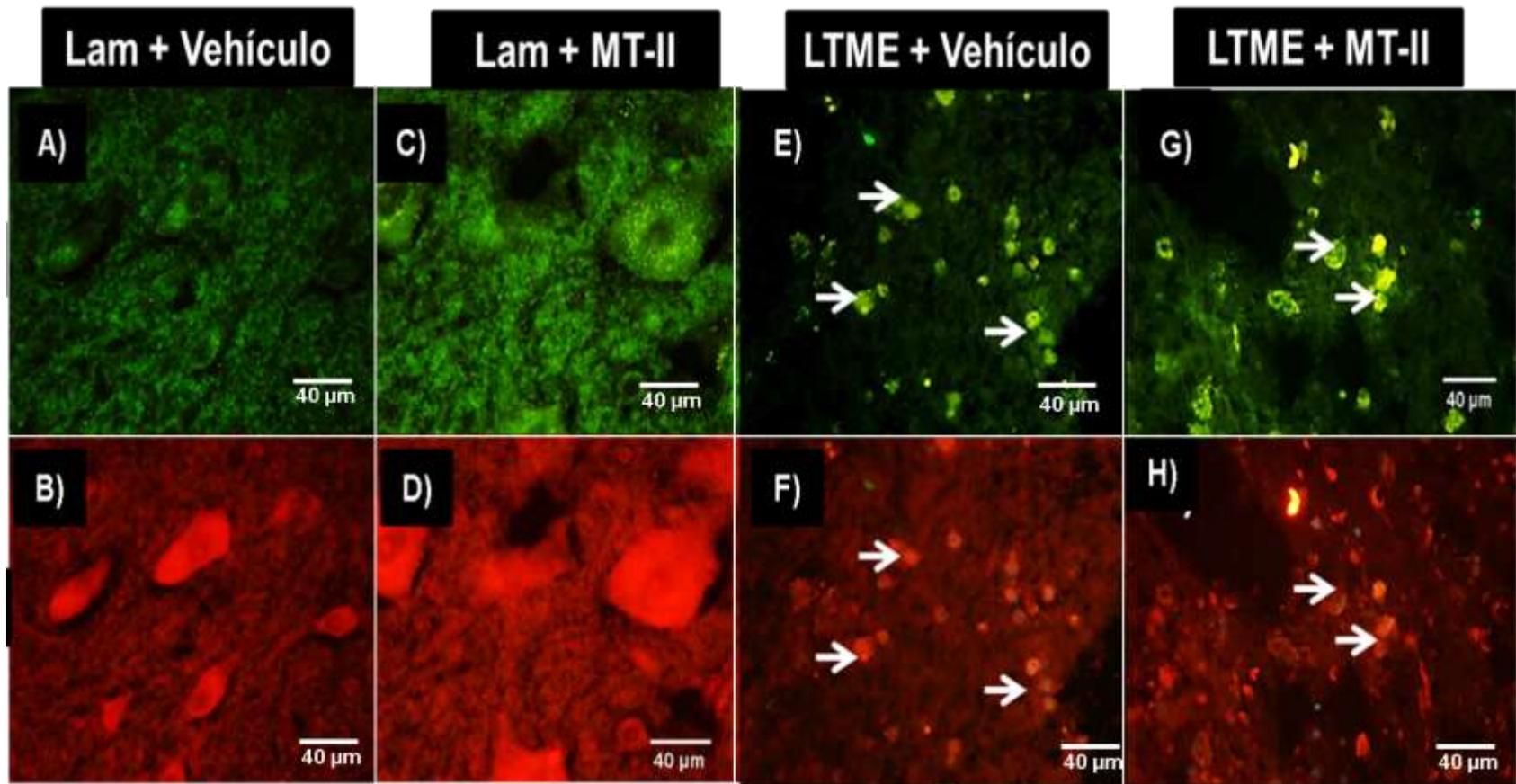


Figura 14. Imagen representativa de las células positivas para la tinción con TUNEL a las 72 horas (verde brillante) y Neurofilamento (rojo). Las flechas blancas indican las células inmunopositivas a TUNEL.

9.4 Ensayo de muerte celular mediante tinción con Anexina V

En las figuras 18 y 19, paneles A-D se muestra la histología normal (con algunas motoneuronas marcadas con NF) de los cortes histológicos de médula espinal de ratas a las cuales únicamente se les realizó una laminectomía sin lesión. De manera similar a lo obtenido con TUNEL, no se observaron células inmunopositivas en ninguno de los grupos con Laminectomía evaluados (figura 17 y 18, paneles A-D). En el conteo celular del grupo LTME con o sin MT a las 24 horas se observaron los siguientes datos: **LTME+SS** con **747.01** \pm 46.110 células positivas por mm³, el cual disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en el grupo **LTME + MT** a **548.13** \pm 16.682 células positivas por mm³ (figura 15). Asimismo, cuando las ratas fueron administradas con MT-II se observó una mayor preservación de prolongaciones neuronales, visible con el anticuerpo contra NF (Figura 18, inciso H). Por otro lado, en las muestras de 72 horas se obtuvo lo siguiente: **LTME+SS** con **1069.46** \pm 46.40936 células positivas por mm³, lo cual disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en el grupo **LTME + MT** a **809.29** \pm 37.31851 células positivas por mm² (figura 16). Del mismo modo se observó preservación de prolongaciones celulares, no tan evidente como en el grupo de las 24 horas (Figura 18, inciso H).

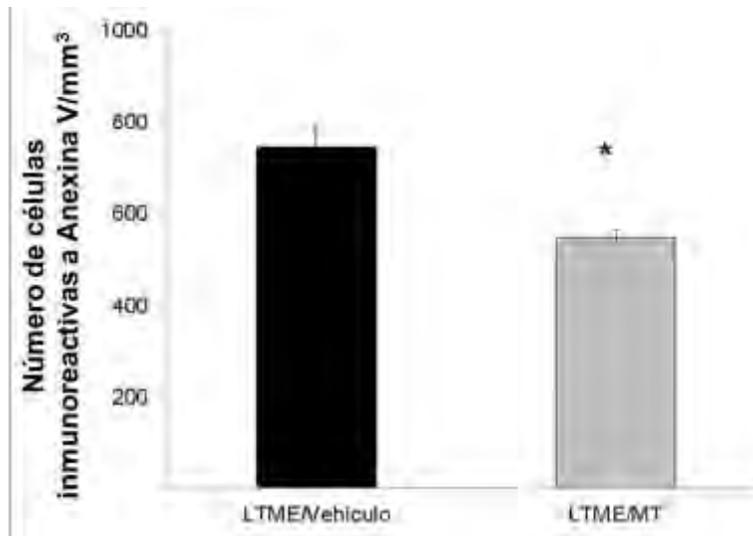


Figura 15. Número de células positivas a Anexina V por mm^3 a las 24 horas. El grupo con LTME + S.S. presentó un número promedio de células de 747, el cual disminuyó significativamente ($p < 0.05$) a 548.13 en el grupo LTME + MT. Datos representados como el promedio \pm error estándar del número de células positivas a Anexina V por mm^3 ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. LTME= lesión traumática de la médula espinal. MT= metalotioneína *= $p < 0.05$.

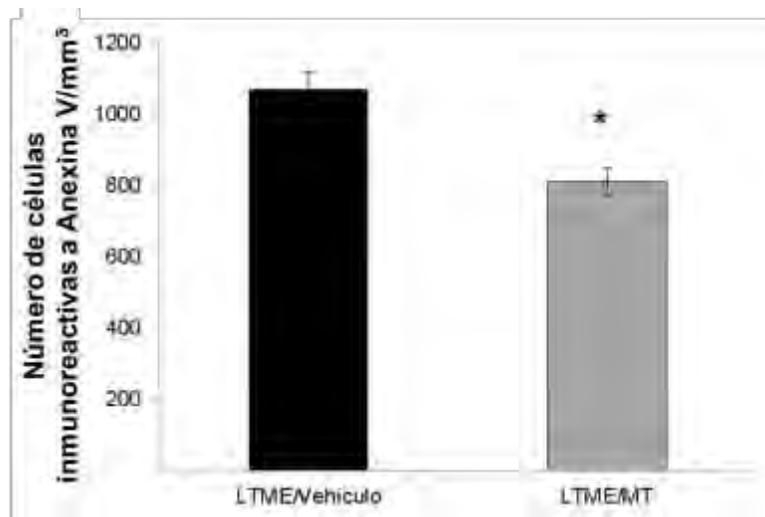


Figura 16. Número de células positivas a Anexina V a las 72 horas. El grupo con LTME + S.S. tuvo un valor de 1069.4, el cual disminuyó significativamente ($p < 0.05$) a 809.29 en el grupo LTME + MT. Datos representados como el promedio \pm error estándar del número de células positivas a Anexina V por mm^2 . ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. LTME= lesión traumática de la médula espinal. MT= metalotioneína. *= $p < 0.05$.

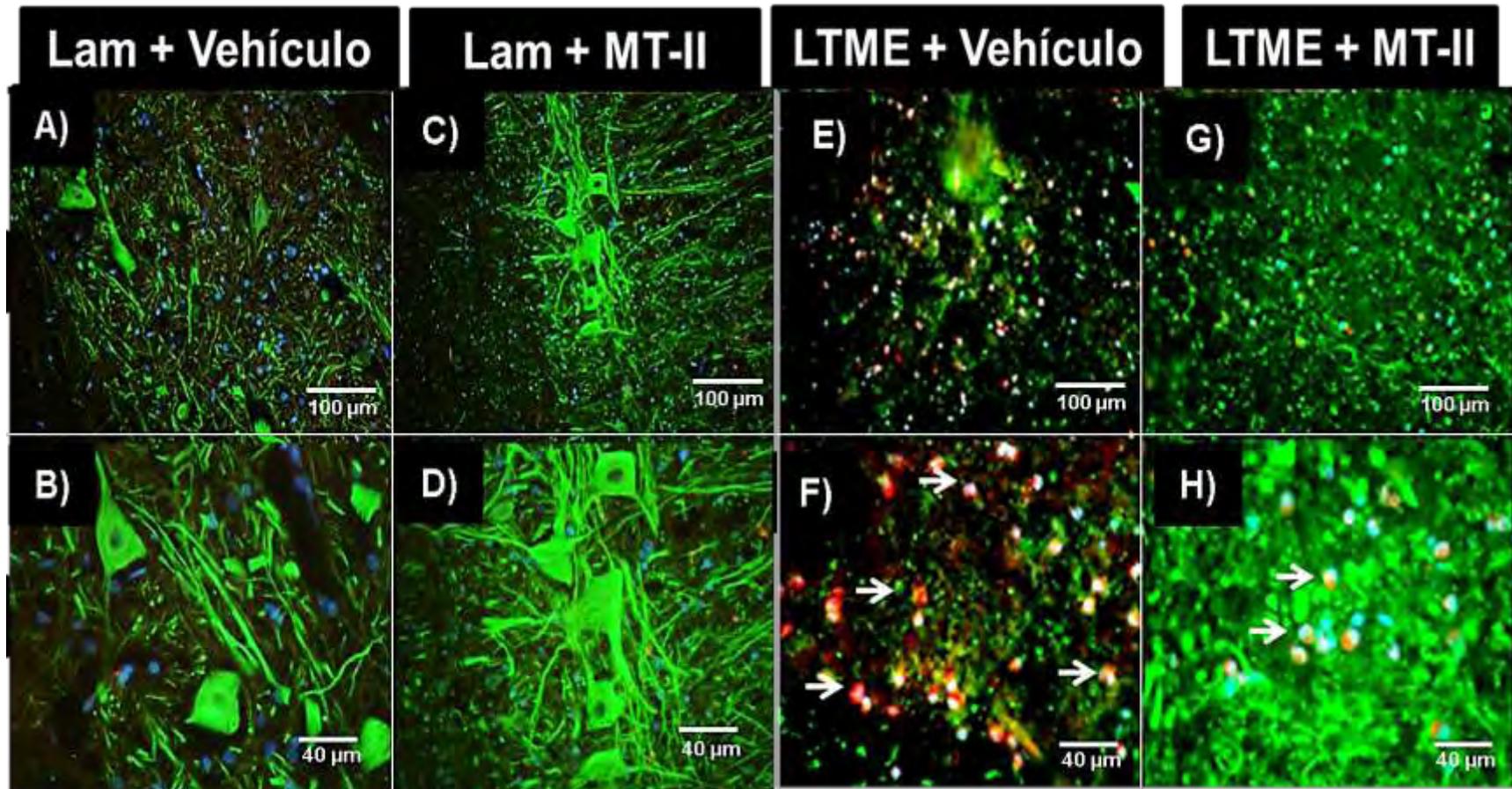


Figura 17. Imagen representativa de las células positivas para la tinción con Anexina V (rojo), Neurofilamento (verde) y Hoechst (azul) a las 24 horas. 20X (A, C, E, G) y 40X (B, D, F, H). Las flechas blancas indican las células inmunopositivas a la marca de Anexina V. Barra de calibración B;D;F;H 40 μ m y 1 A;C,E y G 100 μ m

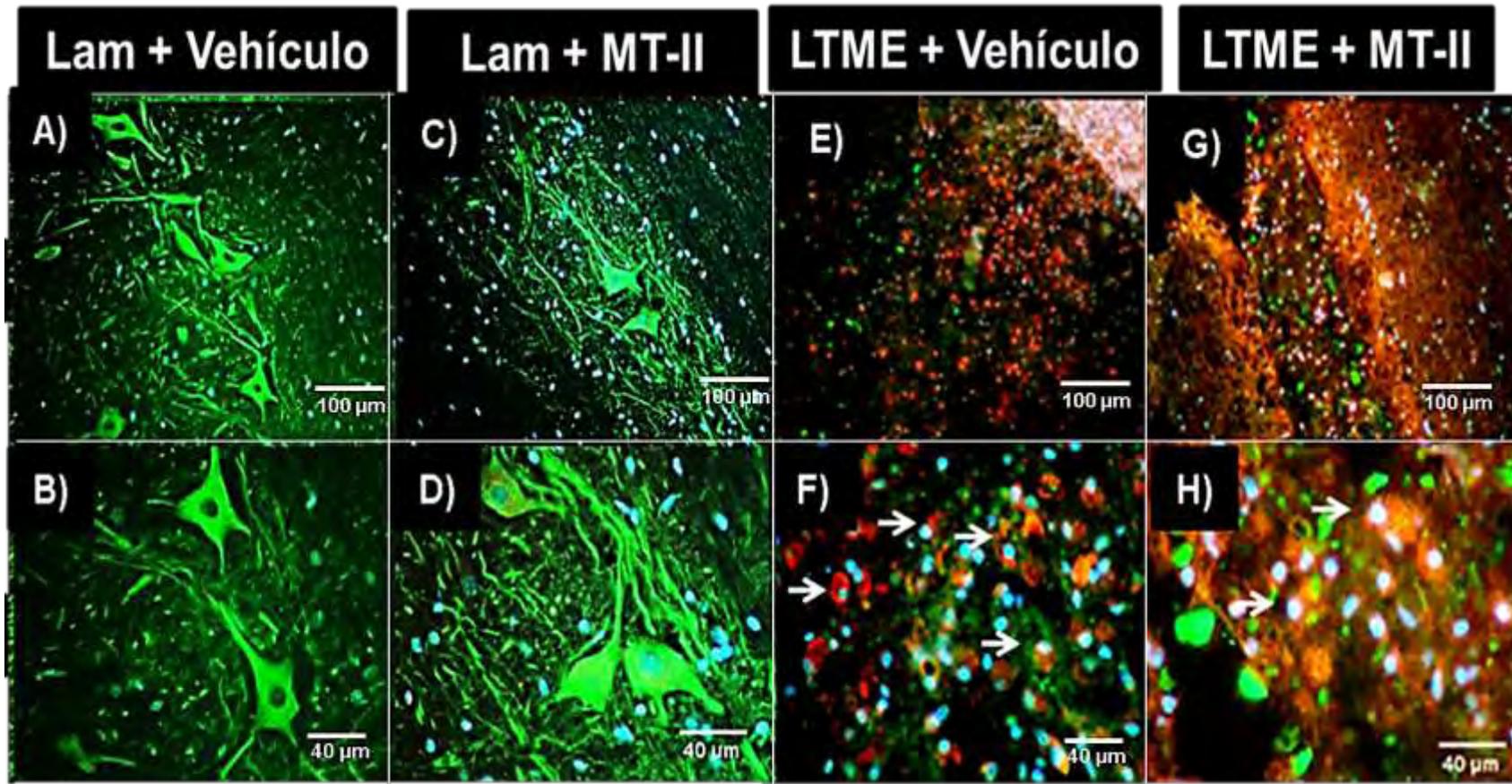


Figura 18. Imagen representativa de las células positivas para la tinción con Anexina V (rojo), Neurofilamento (verde) y Hoechst (azul) a las 72 horas. 20X (A, C, E, G) y 40X (B, D, F, H). Las flechas blancas indican las células inmunopositivas a la marca de Anexina V. Barra de calibración B;D;F;H 40 μ m y 1 A;C,E y G 100 μ m

10 Discusión

En el presente estudio se demostró el efecto neuroprotector de la metalotioneína II durante la fase aguda de una LTME en ratas al promover una disminución de la actividad enzimática de la caspasa 3 y del número de células positivas a TUNEL y Anexina V, marcadores de muerte celular por apoptosis (tabla 2).

Cuadro 2. Efecto de la MT-II sobre procesos involucrados en la muerte celular por apoptosis después de una LTME.

	24 horas	72 horas
Caspasa 3	Disminuye	Sin efecto
Caspasa 9	Sin efecto	Sin efecto
TUNEL	Sin efecto	Disminuye
ANEXINA V	Disminuye	Disminuye

En primera instancia, se observó la activación enzimática de las caspasas 9 y 3, 24 y 72 horas después de una lesión medular, lo cual concuerda con lo obtenido por Knoblach y cols. (2005) quienes observaron la activación de dichas proteasas a partir de 1 y hasta las 72 horas después un LTME en ratas. Se demostró que la administración exógena de MT-II inhibe la activación de la caspasa 3 a las 24 y 72 horas después una LTME, alcanzando la significancia únicamente a las 24 horas. Contrario a esto, no se observó efecto alguno sobre la actividad enzimática de la caspasa 9. En este sentido, la caspasa 3 está involucrada en la muerte celular por apoptosis, a través de la activación de la intrínseca o mitocondrial y la extrínseca

de receptores de muerte, como efectora de los procesos de condensación de la cromatina y fragmentación del DNA; mientras que la activación de la caspasa 9 depende de la vía intrínseca y la vía del estrés del retículo endoplásmico, la cual es activada debida a un acumulación excesiva de Ca^{2+} intracelular y de proteínas mal plegadas, en la cual no se necesita la liberación de citocromo c para la activación de la caspasa 9 (Porter y Janicke, 1999), proceso que podría explicar porque no se observa una disminución en la actividad enzimática de la dicha proteasa después de la administración de MT-II. El mecanismo exacto por medio del cual la MT-II bloquea la actividad de la caspasa 3 no ha sido dilucidado; sin embargo, Leung y cols. (2012) señalan que ésta puede ser transportada a través del receptor megalina de lipoproteínas de baja densidad e inhibir el estrés oxidativo al inducir un equilibrio oxidante-antioxidante dentro de las células y por consiguiente bloquear la liberación de citocromo C, evitando la activación de la caspasa 9 y por ende, de la caspasa 3. Asimismo, se ha observado que las MT's disminuyen los niveles de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α , ésta última involucrada en la activación de la vía extrínseca de muerte celular (Meerarani y cols., 2000; Wang y cols., 2001; Helal y cols., 2009), lo cual hace suponer la participación de la MT-II como una reguladora negativa de dicha vía y por lo tanto, de la caspasa 3, sin embargo, aún son necesarios más estudios para determinar el mecanismo de acción exacto. Nuestros datos concuerdan con los conseguidos por Helal y cols. (2009), quienes mediante la activación de MT con ZnSo_4 , demostraron una disminución en los niveles de caspasa 3 activa en ratas Wistar, después de 24 horas de tratamiento con Carmustina, un agente alquilante que induce estrés oxidante y daño al DNA. Así mismo, nuestros

resultados concuerdan con los obtenidos por Wang y cols. (2001), quienes en un modelo de cardiomiocitos transgénicos que sobre-expresaban MT observaron una inhibición de la caspasa 3 6 horas después de la administración de doxorubicina, un antineoplásico ampliamente utilizado capaz de inducir la activación de dicha proteasa mediante estrés oxidativo, mecanismo de daño secundario observado igualmente después de una LTME. Adicionalmente, observamos que el grupo con Laminectomía + MT-II de las 24 horas presentó una disminución significativa de la actividad enzimática de la caspasa 3, sin embargo, el mecanismo y la función biológica que podría conllevar este efecto aún debe ser dilucidado.

Una vez obtenidos los resultados de la actividad enzimática de las caspasas 3 y 9, se realizaron los ensayos de cuantificación de células en apoptosis temprana (Anexina V) y tardía (TUNEL). En este sentido, el conteo de células positivas por mm^3 a TUNEL incrementó a lo largo del tiempo, siendo las muestras de 72 horas las que mostraron valores más altos, lo cual podría estar relacionado con la actividad de caspasa 3, la cual también incrementa con respecto al tiempo en los grupos con LTME. Nuestro conteo concuerda con lo obtenido por el grupo de Liu y cols. (1997), quienes utilizando marcadores específicos para diferenciar entre neuronas y células gliales demostraron la presencia de células positivas a TUNEL desde las 4h hasta los 14 días en ambos grupos celulares. Observaron que el número de células positivas incrementa con el tiempo en la periferia de la lesión, concluyendo que la muerte celular por apoptosis contribuye a la muerte neuronal y glial, después de una lesión medular moderada, y que dicho proceso promueve la expansión del daño desde el epicentro de la lesión hacia la periferia.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los grupos con LTME a las 24 horas con o sin tratamiento con MT-II, esto a pesar de que en el grupo con LTME + MT-II hubo una disminución en el número de células positivas a TUNEL. Dicho evento podría ser explicado por la continua activación de la caspasa 9 (tabla 2), ya sea mediante la vía intrínseca o por la vía del estrés del retículo endoplásmico, por la entrada masiva de Ca^{2+} a la célula mediante los procesos excitotóxicos generados después de una lesión medular. En este sentido, el Ca^{2+} es un importante activador de enzimas dependientes de Ca^{2+} , como la calpaina, la calcineurina, la sintasa del óxido nítrico constitutiva (Díaz-Ruiz y cols., 2002; Díaz-Ruiz y cols., 2008), fosfolipasas A2 y C, cinasas, fosfatasas, endonucleasas (endonucleolisis del DNA) y lipasas que promueven la activación de vías de señalización de segundos mensajeros generando radicales libres y estrés oxidativo, el cual puede conducir a la muerte celular por apoptosis (Díaz-Ruiz y cols., 2000). Contrario a lo observado a las 24 horas, en las muestras obtenidas 72 horas después de la lesión se observó una disminución significativa en el número de células positivas a TUNEL en el grupo LTME + MT-II con respecto al grupo LTME+SS (figura 11). Dichos resultados podrían estar relacionados con la disminución de la actividad enzimática de la caspasa 3 (tabla 2), así como a la inhibición de diversas moléculas pro-inflamatorias, como TNF- α (Helal y cols., 2009), la cual participa en la vía extrínseca de muerte celular, sugiriendo la participación de la MT-II como inhibidora de dicha vía. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Penkowa y cols. (2005), en un modelo de daño cerebral utilizando ácido kaínico (AK), un excitotóxico que promueve muerte celular e inducir estrés oxidativo. Observaron que en ratones

transgénicos sobreexpresando MT, el número de células positivas a TUNEL disminuye significativamente después de 48 y 72 horas de tratamiento con AK, comparado con el grupo sin MT. Del mismo modo, observaron una menor neurodegeneración de células CA3 del hipocampo, confirmando un efecto neuroprotector de la MT en este modelo. A pesar de ser modelos diferentes de daño, dichos resultados apoyan la propuesta de una función antiapoptótica de la MT-II.

Los resultados del número de células positivas para Anexina V apoyan los obtenidos con la prueba de TUNEL. Observamos un incremento a través del tiempo, siendo el grupo de las 72 horas el que presentó el mayor número de células positivas, lo cual se corresponde con los resultados de actividad enzimática de la caspasa 3 y 9, las cuales incrementan a través del tiempo (tabla 2), promoviendo eventos de muerte celular. Por otro lado, se observó una disminución significativa en los grupos administrados con MT-II 10µg/kg tanto a las 24 como a las 72 horas después de una LTME, esto al ser comparados con el grupo con LTME + S.S., mostrando un posible efecto antiapoptótico de la esta proteína. Es posible que inhibición de la caspasa 3 por la MT-II a las 24 horas en nuestro modelo de LTME, sea suficiente para inhibir procesos de muerte celular temprana, como la exposición de la fosfatidilserina y así, promover una mayor supervivencia celular, como se observó en los resultados de TUNEL a las 72 horas (tabla 2). Consistente con los resultados anteriores, cuando las ratas fueron administradas con MT-II se observó una mayor preservación de prolongaciones

neuronales las cuales fueron visibles utilizando el anticuerpo contra Neurofilamento (figura 17).

Los resultados obtenidos en el presente estudio se suman a los observados anteriormente por diversos grupos de trabajo, en los cuales proponen a las MT's como posibles proteínas neuroprotectoras en modelos de daño al sistema nervioso incluyendo lesión cerebral focal, (Giralt *et al.* 2002), isquemia cerebral focal (Trendelenburg *et al.* 2002), y modelos de encefalomiелitis autoinmune (Penkowa e Hidalgo, 2001). Asimismo, se ha observado que promueve la elongación neurítica e incrementa el tamaño axonal en corteza de ratas adultas dañadas (Chung *y cols.*, 2003) y promueve el crecimiento neurítico en células ganglionales retinales (Fitzgerald *y cols.*, 2007).

Finalmente, nuestros resultados complementan el estudio realizado por Arellano y cols. (2012) quienes demostraron que la administración de MT-II 10 y 100µg/kg vía intraperitoneal, promueve la recuperación motora y funcional en un modelo de LTME en ratas, así como una mayor preservación de tejido nervioso en la zona de la lesión.

11 Conclusiones

Los resultados obtenidos en presente estudio apoyan la idea de que la MT-II induce un efecto antiapoptótico durante la fase aguda de una LTME en ratas, al reducir la actividad enzimática de la caspasa 3 a las 24 horas; así como el número de células positivas para TUNEL a las 24 horas y para Anexina V tanto a las 24 como a las 72 horas después de una LTME moderada.

El mecanismo de acción por medio del cual podría estar generando dicho efecto, aún no ha sido dilucidado completamente, es posible que la inhibición de la caspasa 3 a través de la vía extrínseca de muerte celular sea la responsable de dichos resultados, sin embargo, es necesario realizar más estudios para confirmarlo.

12 LITERATURA CITADA

- Alvarez L, Gonzalez-Iglesias H, Garcia M, Ghosh S, Sanz-Medel A, Coca-Prados M. (2012). The stoichiometric transition from Zn₆Cu₁-metallothionein to Zn₇-metallothionein underlies the up-regulation of metallothionein (MT) expression: quantitative analysis of MT-metal load in eye cells. *J Biol Chem.* 17; 287(34):28456-69.
- Anderson A J (2002) Mechanisms and pathways of inflammatory responses in CNS trauma: Spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 25: 70–79.
- Arellano-Ruiz S, Rios C, Salgado-Ceballos H, Méndez-Armenta M, Del Valle-Mondragón L, Nava-Ruiz C, Altagracia-Martínez M, Díaz-Ruiz A. (2012). Metallothionein-II improves motor function recovery and increases spared tissue after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett.* 11; 514(1):102-5.
- Aschner M, West AK. (2005).The role of MT in neurological disorders. *J Alzheimers Dis.* 8(2):139-45
- Asmussen JW, Von Sperling ML, Penkowa M. (2009). Intraneuronal signaling pathways of metallothionein. *J Neurosci Res.* 87(13):2926-36.
- Bareyre FM, Schwab ME (2003) Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: Insights from DNA microarrays. *Trends in Neurosci* 26: 555– 563.
- Bareyre, F.M., Schwab, M.E. (2003). Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *Trends Neurosci.* 26, 555–563.

- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 12 (1): 1-21.
- Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC. (2002). Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res*. 137:37-47.
- Beattie, M.S., Farooqui, A.A., Bresnahan, J.C., 2000. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 17, 915–925.
- Blankenberg FG. (2009). Imaging the molecular signatures of apoptosis and injury with radiolabeled annexin V. *Proc Am Thorac Soc*. 15; 6(5):469-76.
- Cai L, Cherian MG. (2003). Zinc-metlothionein protects from DNA damage induced by radiation better than glutathione and copper-or cadmium-metlothioneins. *Toxicol Lett*. 13; 136 (3): 193-8.
- Carrasco T. J. (2000). Regulación de las metalotioneínas durante el estrés y la inflamación, y su influencia durante la respuesta inflamatoria. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Carrasco, J., M. Penkowa, H. Hadberg, A. Molinero, and J. Hidalgo. (2000). Enhanced seizures and hippocampal neurodegeneration following kainic acid induced seizures in metallothionein- I + II deficient mice. *Eur. J. Neurosci*. 12: 2311–2322.
- Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, Jaksik R, Sajjadi E, Rzeszowska-Wolny J, Los MJ. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 61(1):43-58.

- Chen J, Nagayama T, Jin K, et al. (1998). Induction of caspase-3-like protease may mediated delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci.* 1; 18 (13): 4914-28.
- Cherian MG, Jayasurya A and Bay BH. (2003). Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res*, 533(1—2):201—209.
- Chung RS, Hidalgo J, West AK. (2008). New insight into the molecular pathways of metallothionein-mediated neuroprotection and regeneration. *J Neurochem.* 104(1):14-20.
- Chung RS, Vickers JC, Chuah MI, West AK. (2003). Metallothionein-IIA promotes initial neurite elongation and postinjury reactive neurite growth and facilitates healing after focal cortical brain injury. *J Neurosci.* 15; 23(8):3336-42.
- Chung, R.S., West, A.K. (2004). A role for extracellular metallothioneins in CNS injury and repair. *Neuroscience* 123, 595–599.
- Cunningham G James. G Klein Bradley. (2009). *Fisiologia Veterinaria.* 4^a Edicion. Editorial Elsevier. Barcelona España.136-144.
- Dafny N. Sensory systems: Anatomy of the spinal cord. In J. H. Byrne (2008). *Neurosciences online: Electronic textbook for the neurosciences.* Houston, Texas: The University of Texas Health Science Center at Houston.
- Deng, D. X., L. Cai, S. Chakrabarti, and M. G. Cherian. (1999). Increased radiation-induced apoptosis in mouse thymus in the absence of metallothionein. *Toxicology* 134: 39–49.

- Díaz-Ruiz A, Alcaraz-Zubeldia M, Maldonado V, et al. (2009). Differential time-course of the increase of antioxidant thiol-defenses in the acute phase after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett.* 6; 452 (1): 56-9.
- Díaz-Ruiz A, Ibarra A, Pérez-Severiano F, et al. (2002). Constitutive and inducible nitric oxide synthase activities after spinal cord contusión in rats. *Neurosci Lett.* 22; 319 (3): 129-32.
- Díaz-Ruiz A, Rios C, et al. (2000). Lipid peroxidation inhibition in spinal cord injury: cyclosporin-A vs methylprednisolone. *Neuroreport.* 5; 11 (8): 1765-7.
- Diaz-Ruiz A, Salgado-Ceballos H, Montes S, Guizar-Sahagún G, Gelista-Herrera N, Mendez-Armenta M, Diaz-Cintra S, Ríos C. (2011). Delayed administration of dapsone protects from tissue damage and improves recovery after spinal cord injury. *J Neurosci Res.* 89(3):373-80.
- Díaz-Ruiz A, Salgado-Ceballos H., Montes S, et al. (2007). Acute alterations of glutamate, glutamine, GABA, and other amino acids after spinal cord contusión in rats. *Neurochem Res.* 32 (1): 57-63.
- Diaz-Ruiz A, Zavala C, Montes S, Ortiz-Plata A, Salgado-Ceballos H, Orozco-Suarez S, Nava-Ruiz C, Pérez-Neri I, Perez-Severiano F, Ríos C. (2008). Antioxidant, antiinflammatory and antiapoptotic effects of dapsone in a model of brain ischemia/reperfusion in rats. *J Neurosci Res.* 15;86(15):3410-9
- Dykens JA. (1994). Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^{+} : Implication for neurodegeneration. *J Neurochem.* 63: 584-591.

- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35(4):495-516..
- Espejo C, Penkowa M, Demostré M, et al. (2005). Time-course expression on CNS inflammatory, neurodegenerative tissue repair markers and metallothioneins during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience.* 132 (4): 1135- 49.
- Fatima G, Sharma VP, Das SK, Mahdi AA. (2015). Oxidative stress and antioxidative parameters in patients with spinal cord injury: implications in the pathogenesis of disease. *Spinal Cord.* 53(1):3-6.
- Felten DI, Józefowicz R. In Kelly P., Surich J. (Eds.), *Netter's (2003). Atlas of human neuroscience (First ed.)*. Teterboro, New Jersey: Icon Learning Systems.
- Feng W, Cai J, Pierce WM, et al. (2005). Metallothionein transfers zinc to mitochondrial aconitase through a direct interaction in mouse hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332: 853-8.
- Fitzgerald M, Nairn P, Bartlett CA, Chung RS, West AK, Beazley LD. (2007). Metallothionein-IIA promotes neurite growth via the megalin receptor. *Exp Brain Res.* 183(2):171-80.
- Formigari A, Irato P, Santon A. (2007). Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146(4):443-59.
- Giralt M, Penkowa M, Lago N, Molinero A, Hidalgo J (2002) Metallothionein-1 + 2 protect the CNS after a focal brain injury. *Exp Neurol* 173:114–128

- Higashimoto M, Isoyama N, Ishibashi S, Inoue M, Takiguchi M , Suzuki S, Ohnishi Y and Sato Masao: (2009). Tissue dependent preventive effect of metallothionein against DNA damage in dyslipidemic mice under repeated stresses of fasting or restraint. *Life Sciences* 84:569-575.
- Klaassen CD, Lehman-McKeeman LD. (1989). Regulation of the isoforms of metallothionein. *Biol Trace Elem Res.* 21:119-29.
- Knoblach SM, Huang X, VanGelderren J, Calva-Cerqueira D, Faden AI. (2005). Selective caspase activation may contribute to neurological dysfunction after experimental spinal cord trauma. *J Neurosci Res.* 1; 80(3):369-80.
- Kondo, Y., J. M. Rusnak, D. G. Hoyt, C. E. Settineri, B. R. Pitt, and J. S. Lazo. (1997). Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. *Mol. Pharmacol.* 52: 195–201.
- Lee BB, Cripps RA, Fitzharris M, Wing PC. (2014). The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord.* 52(2):110-6.
- Lehman-McKeeman LD, Andrews GK, Klaassen CD. (1988). Mechanisms of regulation of rat hepatic metallothionein-I and metallothionein-II levels following administration of zinc. *Toxicol Appl Pharmacol.* 92(1):1-9.
- Leung JY, Bennett WR, Herbert RP, West AK, Lee PR, Wake H, Fields RD, Chuah MI, Chung RS. (2012). Metallothionein promotes regenerative axonal sprouting of dorsal root ganglion neurons after physical axotomy. *Cell Mol Life Sci.* 69(5):809-17.

- Lipton. (2008). NMDA receptor activity regulates transcription of antioxidant pathways. *Nat.Neurosci.*11, 381–382a.
- Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, Dong HX, Wu YJ, Fan GS, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW. (1997). Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci.* 15; 17(14):5395-406.
- Liverman TC, Altevogt MB, Joy EJ, Johnson TR (2005) Spinal cord injury: progress, promise, and priorities. National Academy of Sciences. N.W. Washington, DC.
- Lowry OH, Roserbrough NJ, Farr AL, et al. (1951). Protein measure with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 93 (1): 265-75.
- Mabon, P.J., Weaver, L.C., Dekaban, G.A., (2000). Inhibition of monocyte/macrophage migration to a spinal cord injury site by an antibody to the integrin α D: a potential new anti-inflammatory treatment. *Exp. Neurol.* 166, 52–64.
- Manso Y, Adlard PA, Carrasco J, et al. (2011). Metallothionein and brain inflammation. *J Biol Inorg Chem.*16 (7): 1103-13. 19.
- Mariet, Allen., Fanggeng, Zou., High, Seng Chai, Curtis, S. Younkin, Richard, Miles, Asha, A. Nair, Julia, E. Crook, Shane, Pankratz, Minerva, M. Carrasquillo, Christopher, N. Rowley. (2012). Glutathione S-transferase omega genes in Alzheimer and Parkinson disease risk, age-at-diagnosis and brain gene expression: an association study with mechanistic implications. *Mol. Neurodegeneration* 7,1–13.

- Martinou JC, Youle RJ (2011) Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev. Cell* 21(1), 92–101.
- McEwen ML, Springer JE. (2005). A mapping study of caspase-3 activation following acute spinal cord contusion in rats. *J Histochem Cytochem.* 53(7):809-19.
- McEwen ML, Sullivan PG, Rabchevsky AG, Springer JE. (2011). Targeting mitochondrial function for the treatment of acute spinal cord injury. *Neurotherapeutics.* 8(2):168-79.
- Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. (2013). Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol.* 5; 698(1-3):6-18.
- Miller, J.P., Holcomb, J., Al-Ramahi, I., de Haro, M., Gafni, J., Zhang, N., (2010). Matrix metalloproteinases are modifiers of huntingtin proteolysis and toxicity in Huntington's disease. *Neuron* 67, 199–212.
- Nielsen AE, Bohr A, Penkowa M. (2007). The balance between life and death of cells: roles of metallothioneins. *Biomark Insights.* 7 (1): 99-111.
- Oyinbo CA. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars);* 71(2):281-99. Review.
- Padierna ML. (2006). Inducción de apoptosis en linfocitos T por células tumorales. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía.
- Palacios O, A trian S, Capdevilla M. (2011). Zn- and Cu-thioneins: a functional classification for metallothioneins *J Biol Inorg Chem.* 8.

- Palumaa P, Tammiste I, Kruusel K, Kangur L, Jörnvall H, Sillard R. (2005). Metal binding of metallothionein-3 versus metallothionein-2: lower affinity and higher plasticity. *Biochim Biophys Acta.* 14; 1747(2):205-11.
- Pardini CM. (1998). Tesis de Doctorado de la SSA.
- Penkowa M, Florit S, Giralt M, Quintana A, Molinero A, Carrasco J, Hidalgo J. (2005). Metallothionein reduces central nervous system inflammation, neurodegeneration, and cell death following kainic acid-induced epileptic seizures. *J Neurosci Res.* 15; 79(4):522-34.
- Penkowa M, Tio L, Giralt M, Quintana A, Molinero A, Atrian S, Vasák M, Hidalgo J. (2006). Specificity and divergence in the neurobiologic effects of different metallothioneins after brain injury. *J Neurosci Res.* 1; 83(6):974-84.
- Penkowa M. (2006). Metallothionein I + II expression and roles during neuropathology in the CSN. *Dan Med Bull.* 53 (2): 105-21.
- Pérez R., Martín del Campo S., Renán S., Durán O. S. (2008). Aspectos epidemiológicos de la lesión medular de la población del Centro Nacional de Rehabilitación. *Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación;* 20: 74-82.
- Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. (2004). Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem.* 11(9):1163-82. Review.
- Ponce Mejia Tomas. (2012). *Fundamentos Psicopedagógicos.* Editorial Red Tercer Milenio S.C. México. Pp.17-21.
- Pop C, Salvesen GS (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.* 284(33), 21777–81.

- Popovich PG, Jones TB (2003) Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: Back to basics. *Trends Pharmacol Sci* 24: 13–17.
- Porter AG, Jänicke RU. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6(2):99-104. Review.
- Pourova, J.; Kottova, M.; Voprsalova, M.; Pour, M. (2010). Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta Physiol.*, 198, 15–35.
- Quaife CJ, Kelly EJ, Masters BA, Brinster RL, Palmiter RD. (1998). Ectopic expression of metallothionein-III causes pancreatic acinar cell necrosis in transgenic mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 148(1):148-57.
- Rivera R. Y. (2011). Efecto cototóxico *in vitro* de extractos de *Tagetes erecta* L. en células HeLa. Tesis de maestría.
- Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, Fehlings MG. (2008). Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus.*; 25(5):E2.
- Ruttkay-Nedecky B, Nejdil L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, Stiborova M, Adam V, Kizek R. (2013). The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci.* 15; 14(3):6044-66.
- Schwartz et al. (2005). Ex vivo evaluation of ADC values within spinal cord White matter tracts. *Am J Neuroradiol.* 26: 390-397.
- Shimoda R, Achanzar WE, Qu W, Nagamine T, Takagi H, Mori M, Waalkes MP. (2003). Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicol Sci.* 73(2):294-300.

- Silva NA, Sousa N, Reis RL, Salgado AJ. (2014). From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Prog Neurobiol.* 114:25-57.
- Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. (2013). Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol.*87(7):1157-80
- Snell Richard. (2007). *Neuroanatomia clinica.* 5ª Edicion. Ed Panamerican. Bogota Colombia. 153-163.
- Springer JE. (2002). Apoptotic cell death following traumatic injury to the central nervous system. *J Biochem Mol Biol.* 31; 35(1):94-105. Review.
- Stankovic RK, Chung RS, Penkowa M. (2007). Metallothioneins I and II: neuroprotective significance during CNS pathology. *Int J Biochem Cell Biol.*; 39 (3): 484-9.
- Thirumoorthy N , Shyam SA, Manisenthil KK, Senthil KM, Ganesh G, Chatterjee M. (2011). A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J SurgOncol.* 20; 9:54. Review.
- Torres A. (2013). *Terapia celular para lesiones que afectan a la médula espinal. Transplante de células mesenquimales estromales o células de la glia envolvente del bulbo olfativo como tratamiento para lesiones de médula espinal.* Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.
- Trendelenburg G, Prass K, Priller J, Kapinya K, Polley A, Muselmann C, Ruscher K, Kannbley U, Schmitt AO, Castell S, Wiegand F, Meisel A, Rosenthal A, Dirnagl U (2002) Serial analysis of gene expression identifies metallothionein-II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 22:5879–5888

- Van-De-Graaff. (2001). Human Anatomy. McGraw-Hill, Boston.
- Vašák M, Meloni G. (2011). Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. J Biol Inorg Chem. 16(7):1067-78. Review.
- Wang GW, Klein JB, Kang YJ. (2001). Metallothionein inhibits doxorubicin-induced mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in cardiomyocytes. J Pharmacol Exp Ther. 298(2):461-8.
- Wanpen S, Govitrapong P, Shavali S, Sangchot P, Ebadi M. (2004). Salsolinol, a dopamine-derived tetrahydroisoquinoline, induces cell death by causing oxidative stress in dopaminergic SH-SY5Y cells, and the said effect is attenuated by metallothionein. Brain Res. 16; 1005(1-2):67-76.
- West MJ. (1993). New stereological methods for counting neurons. Neurobiol Aging. 14(4):275-85. Review.
- Wong RS. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J Exp Clin Cancer Res. 26; 30:87. Review.
- Yang L, Wang J, Yang J, Schamber R, Hu N, Nair S, Xiong L, Ren J. (2015). Antioxidant metallothionein alleviates endoplasmic reticulum stress-induced myocardial apoptosis and contractile dysfunction. Free Radic Res.; 49(10):1187-98.
- Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Wu YP, Chen WS. (2012). Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. Indian J Med Res.135:287-96. Review.

Direcciones electrónicas

- <https://www.nscisc.uab.edu>

