



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL FILM EN LA RECUPERACIÓN MOTORA Y
EXPRESIÓN DE GENES DE FASE AGUDA EN RATAS CON LESIÓN TRAUMÁTICA
DE LA MÉDULA ESPINAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

HERRERA GARCÍA JUAN SALVADOR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RAÚL SILVA GARCÍA
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA MORENO FIERROS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES - IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. HAYDEÉ ROSAS VARGAS
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

MÉXICO, CD. MX., MAYO DE 2017



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.

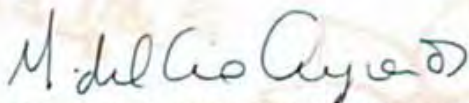
Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de febrero de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **HERRERA GARCÍA JUAN SALVADOR** con número de cuenta 408036801, con la tesis titulada "EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL FILM EN LA RECUPERACIÓN MOTORA Y EXPRESIÓN DE GENES DE FASE AGUDA EN RATAS CON LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL", realizada bajo la dirección del **DR. RAÚL SILVA GARCÍA**:

Presidente: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS
Vocal: DR. FAUSTO SÁNCHEZ MUÑOZ
Secretario: DRA. LETICIA MORENO FIERROS
Suplente: DR. MIGUEL ÁNGEL VELÁZQUEZ FLORES
Suplente: DRA. HAYDEÉ ROSAS VARGAS

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 05 de abril de 2017



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



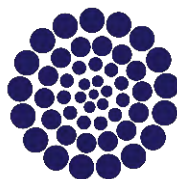
Agradecimientos

Agradezco al programa de Maestría del Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) la oportunidad de continuar mi formación profesional en un área de conocimiento que por demás me apasiona y me da tantas satisfacciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento al proyecto con número de registro 168202 y el apoyo brindado a mi persona y a todos los futuros profesionistas con su programa de becas como la que me fue otorgada (CONACyT CVU/BECARIO 632230/290915).

Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por su financiamiento al proyecto 2007-785-035 y su recibimiento y apoyo a tesistas del área de Ciencias de la Salud con su programa de apoyo a estudiantes en el cual estuve inscrito (MATRICULA IMSS/FOLIO 99096793/2015-038).

A mis tutores, Dra. Leticia Moreno, Dra. Haydée Rosas y Dr. Raúl Silva por su orientación, confianza y motivación por buscar más de mí en lo personal y profesional.



A Isalia Torres, por su apoyo incondicional.

A mis compañeros de laboratorio.

Al Dr Jorge Ramírez Salcedo de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular (Ciudad Universitaria, UNAM) por la asesoría en la elaboración y análisis de los microarreglos.

A la MVZ Rocio Chavez Trejo, quien con toda su paciencia nos auxilia en las oficinas de posgrado en la parte más difícil de la maestría, la parte administrativa.

A todos gracias.

A mis padres

Índice

Índice de tablas	i
Índice de figuras	i
Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción: conceptos clave	3
Anatomía de la médula espinal.....	3
Histología.....	4
Fisiopatología de la LTME.....	7
Fase aguda.....	7
Fase sub-aguda.....	8
Estrategias de neuroprotección	10
Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM)	11
Justificación	13
Hipótesis.....	13
Objetivo general.....	13
Objetivos particulares	13
Metodología.....	14
Consideraciones éticas.....	14
Animales de estudio.....	14
Lesión traumática de la médula espinal (LTME)	14
Preparación y administración del (FILM)	14
Estrategia experimental	14
Evaluación de la recuperación motora.....	16

Obtención de RNA total (RNAt).....	16
Microarreglos	16
Bioinformática.....	17
Validación de expresión en PCR Tiempo-Real.....	17
Método estadístico a aplicar en todo el estudio.....	18
Resultados	19
La administración de FILM promueve la recuperación motora de ratas con LTME	19
El FILM modifica la expresión de familias de genes implicados en la neuroprotección.	24
Validación por qPCR	26
La administración de FILM modifica la expresión de iNOS, Bcl2l10, Egr2 y Vim.	28
Discusión	30
Conclusiones	33
Literatura Citada.....	34
Anexos.....	a
Anexo 1 – Carta dermatomo	a
Anexo 2 – Escala BBB	b
Anexo 3 – Listas de genes modificados en microarreglos.....	c
Tabla A1.1 – Genes del grupo 1na sobre-expresados en microarreglos.....	c
Tabla A1.2 – Genes del grupo 1na sub-expresados en microarreglos	d
Tabla A2.1 – Genes del grupo 3a sobre-expresados en microarreglos.....	e
Tabla A2.2 – Genes del grupo 3a sub-expresados en microarreglos	f
Tabla A3.1 – Genes del grupo 7a sobre-expresados en microarreglos.....	g
Tabla A3.2 – Genes del grupo 7a sub-expresados en microarreglos	h

Anexo 4 – Descripción de contenido de grupos y subgrupos de diagrama de Venn.....	i
Tabla Va – Subgrupo “a”; 331 elementos comunes en "I _{na} ", "3a" and "7a".....	i
Tabla Vb – Subgrupo “b”; 95 elementos comunes en "I _{na} " and "7a"	j
Tabla Vc – Subgrupo “c”; 95 elementos comunes en "I _{na} " and "3a"	j
Tabla Vd – Subgrupo “d”; 151 elementos comunes en "3a" and "7a"	j
Tabla Ve – Subgrupo “e”; 205 elementos exclusivos de "I _{na} "	k
Tabla Vf – Subgrupo “f”; 153 elementos exclusivos de "3a"	k
Tabla Vf – Subgrupo “f”; 153 elementos exclusivos de "3a"	l

Índice de tablas

Tabla 1 – Descripción gráfica de los grupos de estudio.....	15
Tabla 2 – Genes expresados diferencialmente entre los grupos FILM y PBS y funciones asociadas al efecto protector.....	25
Tabla 3 – Selección de genes para pruebas confirmatorias.....	26
Tabla 4 – Diseño de oligos para el análisis de confirmación.....	27

Índice de figuras

Figura 1 – Médula espinal y sus nervios espinales.....	3
Figura 2 – Organización de los nervios espinales.....	4
Figura 3 – Esquema de una neurona.....	4
Figura 4 – Sección transversal de médula espinal humana	5
Figura 5 – Progresión de la respuesta inflamatoria en el parénquima medular	9
Figura 6– Evaluación de habilidad motora con prueba BBB a campo abierto.....	20
Figura 7 – Visualización de integridad de RNA en gel de agarosa.....	21
Figura 8 – Visualización de integridad pool en gel de agarosa	21
Figura 9 – Micoarreglos en placa	22
Figura 10 – Genes expresados diferencialmente por efecto del FILM en un modelo de LTME	23
Figura 11 – Dendrograma y mapa de calor	24
Figura 12 – Curva de amplificación representativa de qPCR	27
Figura 13 – Validación de expresión en qPCR	29

Resumen

Después de la lesión traumática de la médula espinal (LTME), se desencadenan mecanismos autodestructivos que causan procesos neurodegenerativos inmediatos y crónicos que pueden dañar funciones motora, autonómica y de sensibilidad. Varios estudios muestran los efectos de esta respuesta inflamatoria y afirman que el equilibrio entre beneficioso y dañino depende de su intensidad y que los mayores daños secundarios ocurren durante la fase aguda. No existe una terapia totalmente restauradora para la LTME, pero las estrategias para la modulación de la inflamación proporcionan evidencias que la rehabilitación después de la LTME puede ser posible. El factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM) es un pentapéptido que *in vitro* regula la expresión de moléculas inflamatorias e incrementa la expresión de genes de proliferación, angiogénesis, vasculogénesis y orientación axonal. En este contexto, es necesario conocer el efecto del FILM sobre la expresión de genes relacionados con la neuroprotección, degeneración e inflamación, en un modelo *in vivo*. El objetivo de este estudio fue evaluar si el FILM ejerce un efecto neuroprotector que promueve la recuperación motora modulando la expresión de genes de fase aguda en ratas sometidas a un modelo de LTME. Dos diseños experimentales utilizando 75 ratas Sprague Dawley divididas en 5 grupos: Sham, PBS, y FILM en 1, 3 y 7 aplicaciones. Todos los grupos se sometieron a una laminectomía a nivel T9 y a una lesión moderada, seguida por la aplicación de FILM o PBS se acuerdo al grupo. La primera aplicación de FILM o PBS se administró en el sitio de la lesión y las subsecuentes se realizaron intraperitonealmente cada 24 horas. En el primer diseño experimental, la capacidad motora de las ratas tratadas se evaluó durante 8 semanas utilizando la escala "BBB". FILM mostró diferencias significativas en comparación con el grupo control ($\alpha = 0,01$); así mismo, los grupos con dosis múltiples mostraron mejor recuperación motora que el grupo con una sola dosis. En el segundo diseño experimental, 3 horas después de la aplicación del último tratamiento en cada grupo se sacrificaron las ratas y se obtuvo 1 cm de médula espinal del sitio de la lesión; se purificó el RNA y se realizaron estudios de expresión por medio de microarreglos. Se observó la modificación de la expresión de diferentes familias de genes, particularmente de genes de regulación de muerte y sobrevida celular y se seleccionaron candidatos para su validación. Se encontró que el factor produce la sub expresión de iNOS, así como la sobre expresión de Egr2, Bcl2l10 y Vim, lo cual indica que el FILM ejerce un efecto neuroprotector al disminuir el estímulo oxidativo y beneficiar la preservación por factores de sobrevida, crecimiento y estabilidad celular. En conclusión, los protocolos de administración de FILM 3a y 7a mejoran la recuperación motora de ratas con una LTME en comparación a la aplicación de FILM en dosis única; el FILM ejerce sus efecto protector al promover la expresión de familias de genes relacionados con la formación de uniones celulares, preservación estructural, remielinización de axones y control de apoptosis, el factor confiere un efecto neuroprotector al promover la sub expresión de iNOS y la sobre regulación de Bcl2l10, Egr2 y Vim.

Abstract

After spinal cord injury (SCI) self-destructive mechanisms are triggered, such may cause immediate and chronic neurodegenerative processes that can damage motor, autonomic and sensitivity functions. Several studies show the effects of this inflammatory response and affirm that the balance between beneficial and harmful depends on its intensity and that the major secondary damages occur during the acute phase. There is no fully restorative therapy for SCI, but strategies for modulating inflammation provide evidence that rehabilitation after SCI may be possible. Monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) is a pentapeptide that regulates the expression of inflammatory molecules and increases the expression of genes for proliferation, angiogenesis, vasculogenesis and axonal orientation *in vitro*. In this context, it's necessary to know the effect of MLIF on the expression of genes related to neuroprotection, degeneration and inflammation, in an *in vivo* model. The objective of this study was to evaluate if the MLIF exerts a neuroprotective effect that promotes motor recovery modulating the expression of acute phase genes in rats submitted to a SCI model. Two experimental designs using 75 Sprague Dawley rats separated in 5 groups: Sham, PBS and 1, 3 and 7 MLIF applications. All groups were subjected to lamination at a T9 level and a moderate controlled lesion, followed by application of MLIF or PBS as corresponding. The first application of MLIF or PBS was administered at the lesion site and subsequent MLIF applications intraperitoneally every 24 hours. In the first experimental design, the motor capacity of the treated rats was evaluated for 8 weeks using the "BBB" scale. MLIF showed significant differences compared to the control group ($\alpha = 0.01$). Multi-dose groups showed better motor recovery than the single dose group. In the second experimental design, 3 hours after application of the last treatment in each group the rats were sacrificed and 1 cm spinal cord was obtained from the lesion site; RNA was purified and expression studies were performed by microarrays. Modification of expression of different gene families, death regulation genes and cell survival was observed, and candidates were selected for validation. It was found that the factor produces iNOS underexpression, as well as the expression of Egr2, Bcl2l10 and Vim, which indicates that the MLIF exerts a neuroprotective effect by decreasing in the oxidative stimulus and benefit the preservation by the factors of survival, growth and cell stability. In conclusion, the protocols of administration of MLIF 3 and 7a doses improve the recovery of the motorcycle with a SCI in comparison with the application of MLIF in single dose; The MLIF exerts its protective effect as well as the expression of gene families related to the formation of cellular junctions, structural preservation, remission of axons and the control of apoptosis, the factor confers a neuroprotective effect by promoting the iNOS subexpression and the over-regulation of Egr2, Bcl2l10 and Vim.

Introducción: conceptos clave

La función primordial del sistema nervioso (SN) es la de conducir información captada por órganos sensorios hacia el cerebro, procesarla para producir memorias, decisiones y posteriormente emitir una respuesta hacia órganos efectores con la intención de ejercer una influencia en el entorno (Cui *et al.*, 2010). Para su estudio, el sistema nervioso se puede dividir en sistema nervioso central (SNC), conformado por el cerebro y la médula espinal, y en sistema nervioso periférico (SNP), que lo integran todos los nervios craneales, espinales y periféricos.

Anatomía de la médula espinal

Mientras que el encéfalo (cerebro, diencefalo y médula oblonga) se encuentra protegido por el cráneo, la médula espinal es la estructura cilíndrica ubicada dentro del canal vertebral de la espina dorsal y lo recorre desde la médula oblonga hasta el borde de la última vértebra lumbar y al igual que el cerebro se encuentra cubierta por tres membranas de tejido conectivo llamadas meninges: la duramadre es la capa más externa, la aracnoides es la capa intermedia y por último la piamadre que es una capa muy delgada en contacto directo con el tejido nervioso (Cui *et al.*, 2010; Ross & Pawlina, 2011).

Un total de 31 pares de nervios espinales se extienden desde la médula espinal hacia el exterior de la columna a través de foraminas intervertebrales en cada nivel espinal; son nombrados de acuerdo a las regiones de la columna vertebral con las cuales se asocian, de manera que cada uno de estos segmentos incluyen 8 pares de nervios cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacros y 1 coccigeo (Cui *et al.*, 2010) (Figura 1).

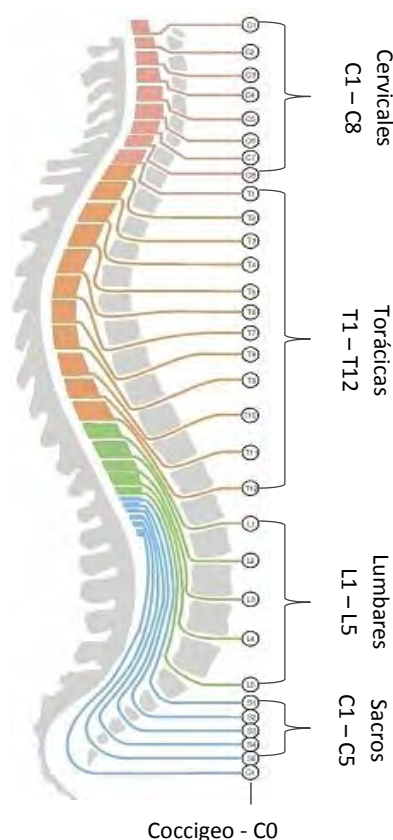


Figura 1 – Médula espinal y sus nervios espinales

Se muestra el esquema de una sección transversal típica de la médula espinal; el SNP incluye todos los nervios periféricos que se unen o salen de la médula como nervios espinales; cada par de nervios espinales reciben su nombre acorde a la vértebra a la cual se encuentre asociado y se extiende hasta una región del cuerpo muy específica de acuerdo a la carta dermatomo (ver Anexo 1).

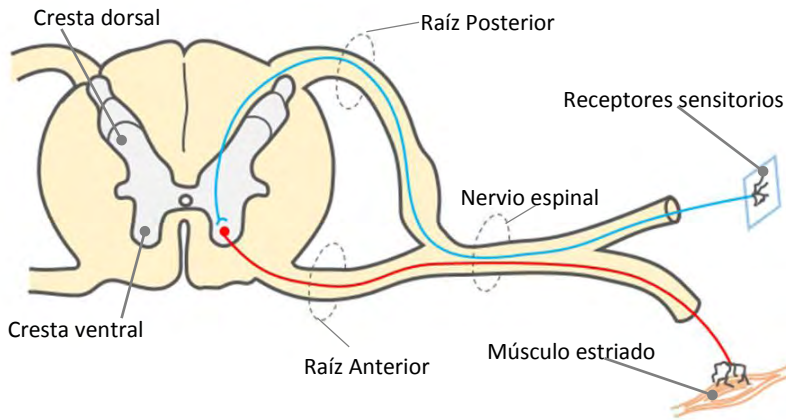


Figura 2 – Organización de los nervios espinales

Las raíces anteriores transportan señales motoras desde el SNC a los músculos y los órganos internos. Las raíces espinales posteriores llevan la información sensorial del cuerpo de regreso al sistema nervioso central.

Modificado de Cui *et al.*, 2010

Cada nervio espinal se conecta con la médula espinal por medio de dos raíces: la raíz anterior y la raíz posterior (Snell, 2014). La raíz anterior consiste en haces de fibras nerviosas que llevan impulsos desde el sistema nervioso central hacia los músculos esqueléticos y causan su contracción y se les denominan fibras

eferentes e integran a la vía descendente motora. La raíz posterior consiste en haces de fibras nerviosas que llevan impulsos nerviosos hacia el sistema nervioso central; dado que estas fibras se vinculan con la transmisión de información acerca de las sensaciones de tacto, dolor, temperatura y vibración, se denominan fibras aferentes e integran a la vía ascendente sensitiva. (Figura 2).

Histología

Las células nerviosas o neuronas son consideradas la unidad básica y funcional del SN debido a que son células excitables capaces de recibir, integrar y transmitir señales eficientemente (Figura 3). Cada neurona está conformada por un cuerpo o pericarion que contiene un núcleo eucromático con un nucléolo prominente y un citoplasma perinuclear con todos los organelos celulares, posee numerosas elongaciones pequeñas denominadas dendritas que incrementan el área superficial para transmitir y recibir señales

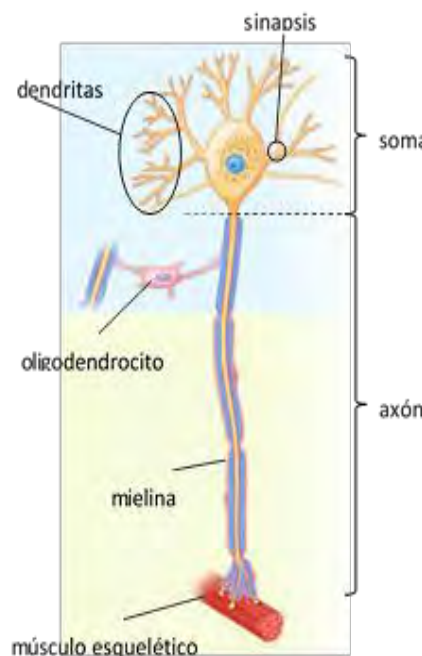


Figura 3 – Esquema de una neurona

El soma, dendritas y axón proximal se encuentran dentro del SNC. En el SNP forma parte de los nervios. Se encuentra revestido por vainas de mielina que es producida por oligodendrocitos en el SNC y por células de Schwann en el SNP.

Modificado de Ross & Pawlina, 2011

y cuenta con al menos un axón generalmente revestido con numerosas vainas de mielina, es la prolongación más grande de la célula y transmite impulsos desde el pericarion hasta terminaciones especializadas denominadas sinapsis, las cuales forman conexiones en forma de cadenas a modo de red de comunicación integrada en las vías ascendente sensorial y descendente motora respectivamente (Ross & Pawlina, 2011).

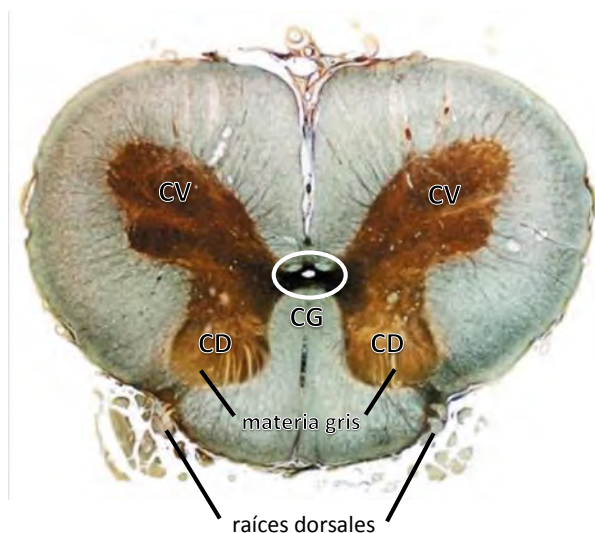


Figura 4 – Sección transversal de médula espinal humana

En la imagen se muestra un corte histológico a nivel de lumbar baja, teñido con la técnica de impregnación argéntica de Bielschowsky (aumento x5). La médula espinal se encuentra conformada, externamente por materia blanca e internamente por materia gris, que contiene cuerpos neuronales asociados a fibras nerviosas. Se puede observar la silueta de una mariposa en la que los lóbulos anteriores son llamados crestas dorsales (CD), y a los lóbulos posteriores, crestas ventrales (CV) y se encuentran conectadas por la llamada comisura gris (CG) y en el centro se encuentra el canal endimario. Externamente la médula se encuentra cubierta por meninges y vasos sanguíneos. Imagen tomada de Ross & Pawlina, 2011

Tradicionalmente se identifican dos zonas muy definidas en la organización tisular del SN: La sustancia gris formada por el acúmulo de cuerpos neuronales y la sustancia blanca la cual es rica en fibras nerviosas (axones) y es de color blanco debido a la presencia de material lipídico en las vainas de mielina (Snell, 2014).

Al hacer un corte transversal de la médula espinal (Figura 4) se puede observar que la sustancia blanca rodea una silueta más oscura en forma de mariposa compuesta por sustancia gris, la cual posee un canal central (canal endimario) por donde fluye el líquido cerebro-espinal (Ross & Pawlina, 2011).

Las neuronas del SNC están sostenidas por un grupo de células no excitables que en conjunto se denominan neuroglia o simplemente glía que en general son más pequeñas que las neuronas y las superan en proporción de 5 a 10 veces. Las principales células de la neuroglia son: astrocitos, oligodendrocitos, células endimarias y microglia (Ross & Pawlina, 2011).

Los astrocitos son las células neurogliales más grandes de aspecto estrellado que forman redes que se comunican con las neuronas para mantener y modular muchas de sus actividades, juegan un papel muy importante en la motilidad de metabolitos y desechos, ayudan a mantener las uniones

adherentes de los capilares sanguíneos que inervan el tejido nervioso y proveen cobertura en áreas desnudas de axones mielinizados, por ejemplo en los nódulos de Ranvier y en las sinapsis (Ross & Pawlina, 2011).

Los oligodendrocitos producen la mielina que recubre a los axones, un solo oligodendrocito es capaz de mielinizar simultáneamente varios axones cercanos mediante proyecciones citoplasmáticas que los rodean hasta que la vaina mielínica está formada. La mielina se dispone formando varias capas alrededor de los axones, de tal forma que los protege y aísla eléctricamente, lo cual contribuye a incrementar la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos a través de los axones (Ross & Pawlina, 2011).

Las células endoteliales forman una monocapa de epitelio columnar cúbico que recubre cavidades que contienen líquido cerebro espinal, se encuentran fuertemente unidas por complejos ocluyentes en su parte apical, la cual posee cilios y microvelocidades que les permite absorber elementos del medio (Ross & Pawlina, 2011).

La microglia son células fagocíticas residentes del SNC consideradas parte del sistema mononuclear fagocítico que se originan de células progenitoras de granulocitos/monocitos (GMP); aunque representan el 5% de las células gliales en el SNC adulto, pueden activarse y proliferar (microglia reactiva) como respuesta a una inflamación o enfermedad con el fin de eliminar bacterias y restos celulares (Ross & Pawlina, 2011). La microglia parenquimática es el único tipo de macrófago especializado que se encuentra dentro del parénquima del SNC en un individuo saludable, el cual cabe mencionar, se encuentra en un ambiente inmunosupresor; no se ha documentado la presencia de algún otro tipo celular del sistema inmunitario como neutrófilos u otros granulocitos, linfocitos o células dendríticas residentes (Ransohoff & Engelhardt, 2012).

El SNC presenta además una extensa vasculatura, que a diferencia de la periferia, está separada del tejido nervioso por medio de una barrera formada por lámina basal y tejido conectivo que restringe el ingreso de muchas sustancias que normalmente abandonan los vasos sanguíneos y entran a otros tejidos, esta restricción selectiva de sustancias se le conoce como barrera hematoencefálica (BHE) (Ross & Pawlina, 2011), misma que regula en gran medida el ingreso de macrófagos perivasculares y otras células que transitan por la periferia (Ransohoff & Engelhardt, 2012; Obermeier *et al.*, 2013).

Ahora bien, la preservación de la integridad del tejido medular es de suma importancia pues la médula espinal es la única vía de comunicación entre el cuerpo y el cerebro. La lesión traumática de

la médula espinal (LTME) es un tipo de mielopatía debilitante que de acuerdo a la magnitud y sitio donde ocurre puede comprometer completa o parcialmente funciones autonómicas, motoras, de sensibilidad y reflejo en individuos de cualquier edad (Campagnolo *et al.*, 2000; Wu & Ren 2009; Dumont *et al.*, 2001; Oyinbo, 2011) y su recuperación neurológica es limitada (Selassie *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013).

A nivel mundial se le atribuye una alta tasa de morbilidad y mortalidad con una incidencia anual de 15-40 casos por millón de habitantes. De acuerdo con el Rick Hansen Institute, Canadá, 85 000 personas padecen de una LTME a las que se suman 4 000 nuevos casos por año. En el último reporte detallado en México se estima una incidencia de 18.1 personas con LTME por cada millón de habitantes, teniendo una mayor prevalencia en el sexo masculino (Pardini, 1998, revisado en Estrada-Mondaca *et al.*, 2007).

Fisiopatología de la LTME

Esta patología inicia con una lesión primaria mecánica sobre la médula espinal, la cual desencadena una serie de eventos físicos y bioquímicos definidos que siguen una secuencia temporal y pueden ser divididos en tres fases principales que incluso pueden traslaparse (Tanhoffer *et al.*, 2007; Oyinbo, 2011).

- Aguda – segundos a minutos después de la lesión.
- Sub-aguda – minutos a semanas después de la lesión.
- Crónica – meses a años después de la lesión.

Diversos grupos de células y moléculas de los sistemas nervioso, inmunitario y vascular están involucradas en cada fase. La mayoría residen en la médula espinal, pero otras migran al sitio de lesión desde la periferia (Liverman *et al.* 2005; Oyinbo, 2011).

Fase aguda

En la fase aguda, el daño primario ocurre como resultado directo de un traumatismo en el que fuerzas de tracción y compresión directa sobre elementos neurales lesionan y destruyen células residentes produciendo compromiso de membranas plasmáticas celulares y disrupción axonal, trastorno en homeostasis iónica, acumulación de neurotransmisores, pérdida de integridad de la barrera hematoencefálica y alteración de la microcirculación (hipotensión, shock neurogénico, vasoespasmo, isquemia) (Dumont *et al.*, 2001; Whalley *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012).

La ruptura de vénulas y capilares produce microhemorragias dentro de la materia gris central que difunden axial y radialmente durante las siguientes horas, en poco tiempo se genera un edema que provoca que la médula espinal se hinche para ocupar todo el diámetro del canal espinal a nivel de la lesión provocando un evento isquémico secundario.

Fase sub-aguda

Ocurre la continuación de algunos eventos de la fase aguda; edema, muerte celular necrótica y cambio de concentración de electrolitos, así como de producto de los mecanismos de lesión secundaria derivados de las interacciones dentro del SNC como respuesta para reparar el daño, los cuales causan daños colaterales a células que sobrevivieron al traumatismo original (Thuret, *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012; Ray *et al.* 2002; Rossignol *et al.* 2007; Oyibo, 2011).

Se produce la despolarización debida al evento físico que provoca la apertura de canales iónicos dependientes de voltaje y una liberación masiva de neurotransmisores como glutamato cuya concentración en el medio incrementa hasta 6 veces en comparación al estado fisiológico normal; canales iónitrópicos de glutamato como el N-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y los de Kainato son activados y promueven el ingreso de una gran cantidad de Ca^{2+} y una sobreexcitación tóxica para las células neurales que las lleva a la muerte en un fenómeno denominado excitotoxicidad (Weber, 2004).

El exceso de Ca^{2+} intracelular activa proteasas neutras y fosfolipasas que destruyen neurofilamentos, parte fundamental del citoesqueleto axonal, en las primeras horas o días post-lesión, destruyen la mielina e inhiben la transmisión de señales a nivel del SNC con lo cual se desprotegen las células nerviosas y se generan diversas disfunciones (Nehrt *et al.*, 2007). La activación de la fosfolipasa A2 en oligodendrocitos, neutrófilos, macrófagos, microglía y neuronas libera ácido araquidónico, substrato necesario para la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (LT), que pueden promover el aumento en la permeabilidad vascular y de la barrera hematoencefálica para facilitar la infiltración celular e iniciar una respuesta inflamatoria (Titsworth *et al.*, 2008; An *et al.*, 2014). A pesar que el proceso inflamatorio en el SNC es esencial para la plasticidad y la regeneración cuando los componentes pro y anti-inflamatorios se modulan apropiadamente, la respuesta inflamatoria es el mayor componente involucrado en el desarrollo de la patogénesis de la LTME y se le atribuye un papel importante en el daño indirecto al tejido neural y al fallo en la respuesta regenerativa (Genovese *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Las células gliales reactivas residentes y células del sistema inmune periférico que migran y proliferan dentro del sitio

de lesión contribuyen en parte mediante la liberación de citocinas, TNF, IL-1, IL-6, e IL-10, interferón, y la activación de receptores para citocinas (IL-4R e IL-2R) (Tian *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). Estas citocinas promueven la expresión de citocinas adicionales, quimiocinas y radicales libres [anión superóxido (O_2^-) y óxido nítrico (ON)] causantes de estrés oxidativo (Figura 5). En particular, el SNC es muy sensible a las especies oxidativas, debido a su contenido de sustratos altamente oxidables susceptibles a lipoperoxidación (ácidos poliinsaturados y catecolaminas), a los bajos niveles de enzimas y agentes antioxidantes (GSH peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa, glutatión y vitamina E) que producen un desbalance entre estos mediadores de la inflamación y la capacidad del tejido para contrarrestar sus niveles con antioxidantes (Fulda *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; Muralidharan & Mandrekar, 2013); adicional a esto, las células neuronales no son replicativas

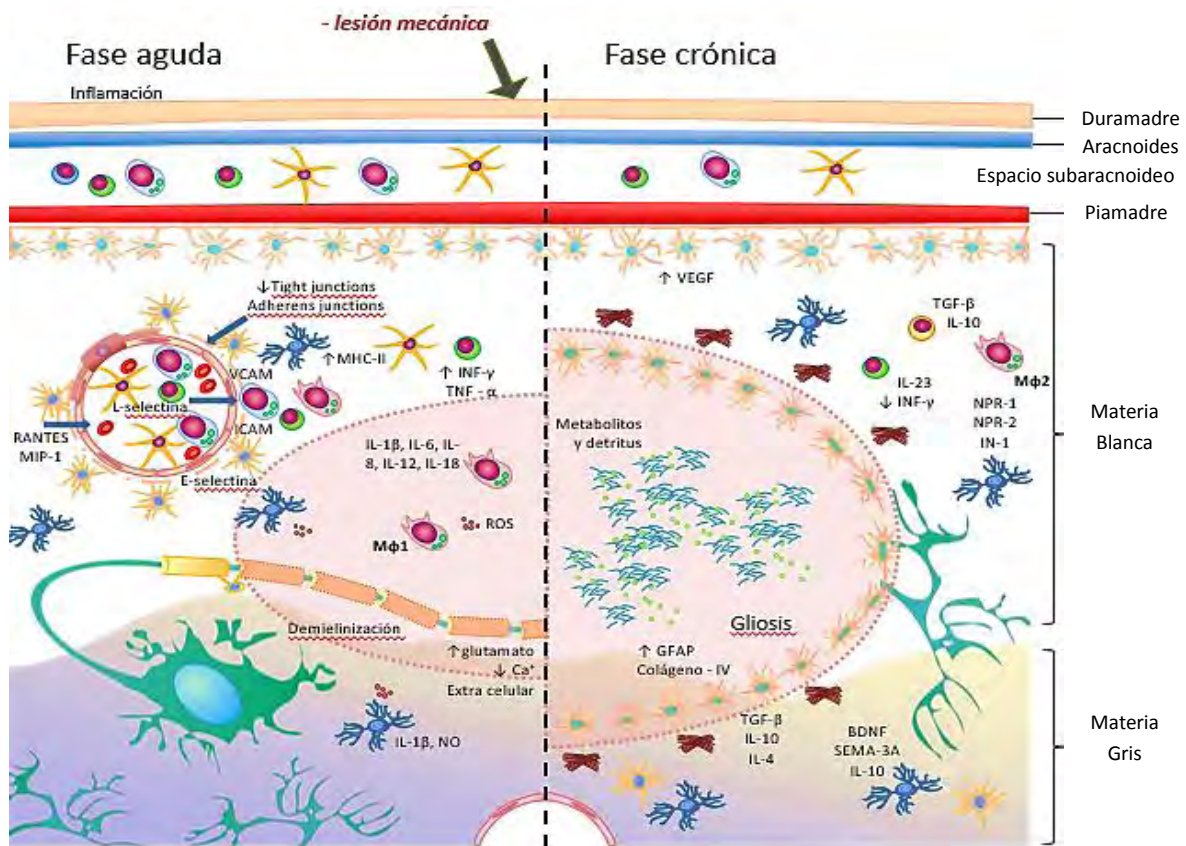


Figura 5 – Progresión de la respuesta inflamatoria en el parénquima medular

La afección producida por la lesión mecánica induce la activación de mecanismos de focalización del daño, inicialmente propiciada por la microglia residente, la cual secreta citocinas pro-inflamatorias, los astrocitos y células endoteliales permiten la permeabilización de la barrera hematoencefálica y expresan quimioatrayentes para facilitar el ingreso de células del sistema inmunitario periférico e incrementar la respuesta en el sitio, pueden producirse lesiones colaterales debida, en gran medida, a la baja capacidad antioxidante del tejido neural para contrarrestar especies reactivas de oxígeno producidas por las células inflamatorias propagando el daño a otras células no comprometidas. La extensión del daño inicial es proporcional a la capacidad final del organismo para recuperar sus funciones motoras y sensitivas.

y al ser dañadas pueden permanecer disfuncionales o destinadas a la apoptosis (Kovacic & Somanathan, 2012) a través de la oxidación irreversible de proteínas esenciales, ácidos nucleicos y lípidos (Liu *et al.*, 2000; Mestre 2015; Baruch 2015).

Estrategias de neuroprotección

La mayoría de los enfoques clínicos realizados en pacientes están dirigidos a reducir la muerte neuronal ocurrida en un lapso de entre 6 a 8 hrs (Loane & Faden, 2010). A nivel experimental se utilizan fármacos y otras sustancias químicas que buscan disminuir el grado de lesión del tejido neural después de una LTME teniendo como blanco terapéutico los puntos de regulación en los procesos involucrados en la etapa secundaria tales como la inflamación, desregulación iónica, producción de radicales libres, excitotoxicidad, lipoperoxidación y muerte celular. La Metilprednisolona (MPSS), es un fármaco de elección capaz de suprimir la neuroinflamación (Hurlbert & Hamilton, 2008; Lukas *et al.*, 2011); el tratamiento con metoprolol disminuye la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) en el tejido lesionado, lo que indica una reducción en la actividad de los neutrófilos en el sitio de lesión y favorece la neuroprotección a los efectos secundarios (Beril *et al.*, 2007); los inhibidores de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) como NG-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) promueven una recuperación clínica en modelos experimentales en fase aguda, mientras que los antagonistas de los receptores NMDA y AMPA/Kainato como MK-801, 2,3-dihidroxy-6-nitro-7-sulfamoilbenzo-quinoxalina administrados en el sitio de la lesión atenúan el daño excitotóxico y se proponen como fármacos neuroprotectores, al igual que los fármacos anti-excitotóxicos como el sulfato de magnesio y el riluzol que atenúan el fenómeno necrótico al prevenir la paraplejía originada por el daño en las motoneuronas (Li & Tator, 2000; Gorgulu *et al.*, 2000, Wilson *et al.*, 2014).

Por otro lado, el uso de fármacos moduladores del metabolismo del ácido araquidónico, como el ibuprofeno (inhibe la ciclo-oxigenasa), el antioxidante EPC-K1 (que se une a la vitamina E y C) o el U63447A (que inhibe la actividad de la sintasa de tromboxanos) disminuyen la lipoperoxidación y atenúan el daño en modelos de la LTME (Fujimoto *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2011).

Además, existen estudios que demuestran que la disminución de neutrófilos, macrófagos y microglia activa en el sitio de lesión con anticuerpos bloqueadores de integrinas, antagonistas de quimiocinas y depleción de tipos celulares (Mabon *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2015), bloqueo de la síntesis o acción de interleucinas inflamatorias (ej. TNF- α , IL-1 β , IL-6) y administración de citocinas

anti-inflamatorias (ej. IL-10) (Sharma 2010; Okada *et al.*, 2004; Guerrero *et al.*, 2012; Bethea *et al.*, 1999) dan como resultado una recuperación neurológica significativa con mejoras en la parte sensorial motora así como en la función anatómica.

A pesar que todas estas opciones han sugerido efectos benéficos potenciales, a la fecha no existe uno que satisfaga en su totalidad los requerimientos necesarios para lograr la recuperación óptima de las funciones neurológicas. En la actualidad se están desarrollando diferentes estrategias terapéuticas, que se fundamentan en la modulación de la respuesta inflamatoria con el uso de péptidos inmunomoduladores y/o con actividad antioxidante con el fin de preservar y proteger el tejido neural (Ibarra & Martinon, 2009; Loane & Faden, 2010; Bermeo *et al.* 2013).

Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM)

El FILM es un pentapéptido de 583 Da con una secuencia de Met-Gln-Cis-Asn-Ser (Kretschmer *et al.*, 2001) que *in vitro* inhibe la migración de monocitos humanos (MP) sin afectar la locomoción de otros tipos celulares como neutrófilos polimorfonucleares o eosinófilos (nPMN y ePMN), evita la producción de intermediarios reactivos del oxígeno [ROI (H_2O_2 , O_2^- , OH)] y la síntesis inducida de óxido nítrico [RNI (ON)] (en MP y nPMN sin afectar a ePMN) e induce un aumento importante en la formación de microtúbulos asociados al centriolo y la concentración del cAMP mientras que disminuye el cGMP (Rico *et al.*, 1992; 2003).

Estudios de análisis de microarreglos, PCR tiempo real, citometría de flujo, y determinación de proteínas por el método inmuno-enzimático ELISA en las líneas celulares U-937 (premonocítica) y MRC-5 (fibroblastos) activadas con PMA, mostraron que el FILM inhibe la producción de interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-12 e INF- γ) y quimiocinas pro-inflamatorias (MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 β , MIP-3 α , MIG) y favorece la producción de citocinas anti-inflamatorias (IL-10 e IL-1r), con lo cual promueve el balance homeostático crítico para la modulación de la respuesta inflamatoria (Utrera *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2008); además favorece la sobre expresión de mensajeros de genes como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), trombopoyetina (Tpo), neuropilina, follistatina, ephrinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), involucrados en la modulación de la inflamación, proliferación, angiogénesis, síntesis/degradación de matriz extracelular, vasculogénesis y guía axonal (Silva *et al.*, 2008, 2012).

En estudios *in vivo*, el factor retarda el arribo de células mononucleares en ventanas de Rebeck en piel humana e inhibe la hipersensibilidad retardada cutánea al dinitroclorobenceno (DNCEB) en cobayas (Giménez *et al.*, 1997), abate la expresión de moléculas de adhesión VLA-4 y VCAM-1 en endotelio vascular post-capilar de jerbos y disminuye la formación de adherencias pericárdicas en ratas al aplicarlo directamente en el sitio de lesión posterior a una intervención quirúrgica (Giménez *et al.*, 2000).

En un modelo de LTME moderada en ratas donde se les aplicó 200µg de FILM como dosis única sobre el sitio de la lesión posterior a un impacto controlado, se observó la desregulación en la expresión del gen para iNOS y la sobre-expresión de las citocinas antiinflamatorias IL-10 y TGF-β desde las primeras horas y hasta los 7 días, lo cual se reflejó en la recuperación motriz de los animales debida a la preservación de los tractos neuronales de las crestas ventrales y rubroespinales; este fue el primer reporte que menciona al FILM como un tratamiento de la LTME como neuroprotector (Bermeo *et al.*, 2013), sin embargo el mecanismo por el cual ocurre este efecto no fue descrito, por lo que los esfuerzos se enfocaron en proveer información que ayuden a vislumbrar lo que ocurre en el tejido al aplicar el péptido.

Más aún, considerando que el factor es capaz de inhibir la producción de ROI e iNOS en neutrófilos y su efecto positivo es evidente tras la evaluación a los dos meses, se postula que es posible obtener mejores resultados al restringir el arribo de monocitos durante su primer y segunda migración al sitio de lesión durante la fase sub-aguda (similar a Mabon *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2015), es decir, a los 3 y 7 días post-lesión (3 y 7 dpl) (Beck *et al.*, 2010), con la intención de prevenir efectos colaterales de una inflamación exacerbada y propiciar el comienzo del proceso de recuperación (Donnelly & Popovich, 2008).

Justificación

Debido a la falta de un tratamiento que amortigüe o incluso revierta los problemas ocasionados por la LTME, es necesario continuar con la búsqueda de nuevas estrategias neuroprotectoras. El FILM se propone como un buen candidato para cumplir con este papel, debido a su capacidad de modular la respuesta inflamatoria y favorecer la expresión de genes relacionados con la remodelación tisular; la caracterización de su mecanismo de acción y la propuesta de diferentes protocolos para su administración (en modelos *in vivo*) son necesarios para concretar al FILM como un inmunomodulador viable para el tratamiento de la LTME.

Hipótesis

La aplicación del Factor Inhibidor de Locomoción de Monocitos en dosis múltiples beneficiará la neuroprotección y recuperación motora en animales sometidos a un modelo de lesión traumática de la médula espinal al modificar la expresión de genes de fase aguda.

Objetivo general

Evaluar si la administración del FILM en diferentes dosis ejerce un efecto neuroprotector que favorezca la recuperación motora mediante la modificación en la expresión de genes de fase aguda involucrados en la protección de la médula espinal de ratas sometidas a una LTME.

Objetivos particulares

Comparar y evaluar grupos de ratas con LTME tratadas post-lesión con FILM con respecto a los grupos control (sin tratamiento, PBS y FILM dosis única):

1. Determinar la recuperación motora de ratas mediante la prueba de Basso, Beattie & Bresnahan (BBB) en ratas sometidas a una LTME con diferentes aplicaciones de FILM.
2. Determinar el perfil de expresión de genes durante una LTME en fase aguda y sub-aguda producido por la administración del pentapéptido utilizando microarreglos.
3. Validar los cambios de expresión de ciertos genes por PCR en Tiempo Real (qPCR).

Metodología

Consideraciones éticas

Durante la realización de este proyecto se tomaron en cuenta los lineamientos establecidos por el reglamento de la Ley general de salud en materia de investigación para la salud (Título séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación), la Norma Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NOM-062-Z00-1999) apartado 5.1 para roedores y la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (Ley General de Salud, México 1990).

Animales de estudio

Se utilizaron 75 ratas de la cepa Sprague Dawley hembras de 12 a 15 semanas de edad, con un peso de 200- 250 g, las cuales se alojaron en cajas de policarbonato de piso sólido con alimento y agua estéril *ad libitum*.

Lesión traumática de la médula espinal (LTME)

Las ratas fueron anestesiadas con clorhidrato de xilazina (10mg/kg) y ketamina (50mg/kg). Se realizó una laminectomía a nivel de la 9a vértebra torácica para exponer la médula espinal y se produjo una LTME moderada sobre el sitio expuesto utilizando un impactador de la Universidad de Nueva York, con un cilindro de 10 g a una altura de 25 mm (Basso *et al.*, 1995). La ejecución de este protocolo fue estrictamente supervisado por médicos veterinarios zootecnistas colaboradores.

Preparación y administración del (FILM)

El FILM fue adquirido de American Peptide Company Co., Sunnyvale, CA, USA. (>95% de pureza) y disuelto en PBS (4 µg/µl). Se aplicaron 200 µg (50 µl) de la solución de FILM sobre el sitio de lesión después del impacto y posteriormente la misma dosis por vía intraperitoneal de acuerdo al grupo experimental.

Estrategia experimental

Para realizar y lograr los objetivos particulares se emplearon los siguientes grupos (Tabla 1):

Tabla 1 – Descripción gráfica de los grupos de estudio

En la tabla se muestra a cada grupo en las filas de la izquierda y los procedimientos en las columnas, las estrellas representa el procedimiento aplicado a cada grupo. La primer aplicación de cada tratamiento se efectuó sobre el sitio de lesión expuesto al momento posterior a la contusión, las aplicaciones subsecuentes (de haberlas) se efectuaron por vía intra peritoneal.

Protocolo Grupo		Laminectomía	Contusión	FILM inmediato	FILM 2 dosis (1 c/24 hrs)	FILM 6 dosis (1 c/24 hrs)
		Sham	★			
1	PBS	★	★			
2	FILM _{inm}	★	★	★		
3	FILM _{3D}	★	★	★	★	
4	FILM _{7D}	★	★	★		★

Se consideró a un grupo Sham (únicamente la laminectomía), en donde los individuos conservan una evaluación de 21 en la escala de BBB, además de control de calidad de la cirugía; se extrajo el RNA total (RNAt) de la médula y fue utilizado para normalizar los datos de expresión durante su validación en qPCR; el grupo PBS fue considerado como un grupo control de lesión al cual se efectuó una laminectomía y una contusión moderada; finalmente, los grupos FILM a los que se les aplicó el factor en 3 protocolos de administración, es decir:

- a) Aplicación inmediata (Ina) – Aplicación de dosis única y directa sobre el sitio de lesión
- b) 3 aplicaciones o (3a) – Una aplicación directa sobre el sitio de lesión y dos dosis posteriores vía intraperitoneal, una cada 24hrs.
- c) 7 aplicaciones (7a) – Una aplicación directa sobre el sitio de lesión y seis dosis posteriores vía intraperitoneal, una cada 24hrs.

Los grupos descritos fueron empleados en dos diseños experimentales para evaluar dos periodos de tiempo diferentes, la fase aguda/sub-aguda y la fase crónica.

Diseño experimental 1

Se realizó un protocolo de lesión crónica para evaluar el efecto de la aplicación del FILM en 3 esquemas de aplicación después de una LTME en términos de recuperación motora comparados contra el grupo PBS.

Evaluación de la recuperación motora

Cada 7 días durante 8 semanas se evaluó la recuperación motora mediante la prueba de habilidad locomotora a campo abierto de Basso, Beattie & Bresnahan (Basso *et al.*, 1995) ó prueba “BBB” donde la recuperación se califica en una escala de 0 (parálisis completa) a 21 (movilidad completa) (Ver anexo 2). N= 40.

Diseño experimental 2

Se realizó un protocolo de lesión aguda (Ina) para evaluar mediante ensayos de microarreglos y PCR-Tiempo Real (qPCR) el cambio en la expresión de genes de fase aguda debida a la aplicación del FILM comparado contra el grupo PBS; y adicionalmente se consideraron a grupos de lesión sub-aguda (3a y 7a) para observar cambios en la expresión de genes dentro de los grupos FILM.

Obtención de RNA total (RNAt)

Tres horas posteriores a la última aplicación del tratamiento en cada grupo, se obtuvo 1 cm de la medula espinal concéntrico al sitio de lesión y se colocó en 1 ml de Trizol® (Invitrogen, life Technologies). El tejido fue disgregado utilizando un homogeneizador Bio-Gen PRO200 (Pro Scientific Inc., USA) y posteriormente el RNA total de (RNAt) se extrajo con cloroformo e isopropanol y su concentración se determinó utilizando un espectrofotómetro Epoch2® (BioTek Instruments, Inc., USA); su integridad se verificó en geles de agarosa al 1.5%.

Microarreglos

Con la intención de profundizar en los posibles mecanismos de neuroprotección del FILM, en un modelo *in vivo* de LTME, se optó por efectuar ensayos comparativos de microarreglos para resaltar la diferencia de expresión entre los grupos de aplicación del factor, principalmente el grupo Ina y el grupo control de lesión PBS.

Los microarreglos empleados fueron arreglos de 5,000 genes de rata en placa de vidrio (*Rattus norvegicus*; Rn5K) de un tamaño de 70-mer (library MWGBiotech Oligo) impresos por duplicado (Rat Array, Unidad de Microarreglos de DNA, Instituto de Fisiología Celular, UNAM). Se generó un pool de RNAt de 6 individuos por grupo para la hibridación; se tomaron 10 µl de la mezcla y el cDNA se sintetizó incorporando dUTP-Cy3 en el grupo control PBS y dUTP-Cy5 en los grupos FILM utilizando el kit CyScribe First-Strand cDNA labeling (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Mediante el uso de la solución de hibridación UniHyb (TeleChem International Inc., Sunnyvale, CA, USA), se hibridaron cantidades equivalentes de cDNA marcado en la placa Rn5K durante 14 hrs a 42°C. La

adquisición y análisis de las imágenes del arreglo se realizaron con el equipo y software ScanArray 4000.

Bioinformática

Los datos de microarreglos fueron analizados mediante el software libre genArise de la Unidad de Fisiología Celular, UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). Se identificaron genes diferencialmente expresados calculando un valor de Z a partir de los datos de intensidad de fluorescencia (z-score) y normalizados con spots vacíos y genes constitutivos. Los elementos con un Z-score > 1.5 fueron considerados como genes diferencialmente expresados.

Se elaboró un análisis de integración e intersección de grupo utilizando diagramas de Venn y el software libre Cluster 3.0 en el cual se efectuó un agrupamiento jerárquico con un alineamiento de promedios con un rango de grupo significativo (k-mean) de 5 a 15. Se utilizó el software libre Java TreeView para visualizar dendrograma y mapa de calor (<http://jtreeview.sourceforge.net/>).

El análisis de los datos obtenidos de los microarreglos de expresión se realizó utilizando herramientas bioinformáticas para la anotación, interpretación y asociación funcional en sistemas biológicos de grupos de genes alterados (Huang *et al.*, 2009):

- DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) Bioinformatics Resources 6.7 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) de la National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)
- WEBGestalt (WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit) (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>)
- PANTHER (Protein ANALysis THrough Evolutionary Relationships) Classification System Version 10.0 (<http://pantherdb.org/>).

Validación de expresión en PCR Tiempo-Real

De los genes alterados obtenidos por microarreglos se seleccionaron genes de interés para diseño de oligos para qPCR (Integrated DNA Technologies, Inc. USA). EL diseño se realizó utilizando el software libre OligoPerfecto® (ThermoFisher Scientific Inc, USA) y software Oligo Primer Analysis SoftwareV4.0 (Molecular Biology Insights). Se generó el cDNA utilizando el kit ThermoScrit® RT-PCR system (ThermoFisher Scientific Inc, USA) utilizando 1 µg de RNAt por reacción. Para la fase de PCR, se utilizaron oligos específicos para cada transcrito y al gen β-actina como referencia para su normalización; se utilizó un termociclador en tiempo real LightCycler 96 y el sistema de detección

SYBR Green Master Mix (ROCHE, Life Science) para la determinación de expresión diferencial de los genes, el protocolo de amplificación estandarizado consistió en una preincubación a 95°C 600s; 3 pasos de amplificación en 40 ciclos, (95°C 10s, 60°C 10s y 72°C 10s) con una adquisición simple en el último paso.

Método estadístico a aplicar en todo el estudio

Los datos de las determinaciones de escala BBB fueron analizados utilizando una Prueba de ANOVA de dos vías para datos repetidos (Scheff *et al.*, 2002) y un test de comparación múltiple Tukey con un valor crítico de $\alpha=0.05$ para considerar estadísticamente significativo.

Los valores de CQ (o CP; crossing point) de la amplificación en qPCR fueron normalizados de acuerdo al método de la doble Delta Ct (Delta Fold Change= $2^{-\Delta\Delta Ct}$); Livak & Schmittgen, 2001); se utilizó una Prueba de ANOVA de dos vías para datos no pareados y posterior a ello, un test de comparación múltiple Tukey con un valor crítico de $\alpha=0.05$.

Resultados

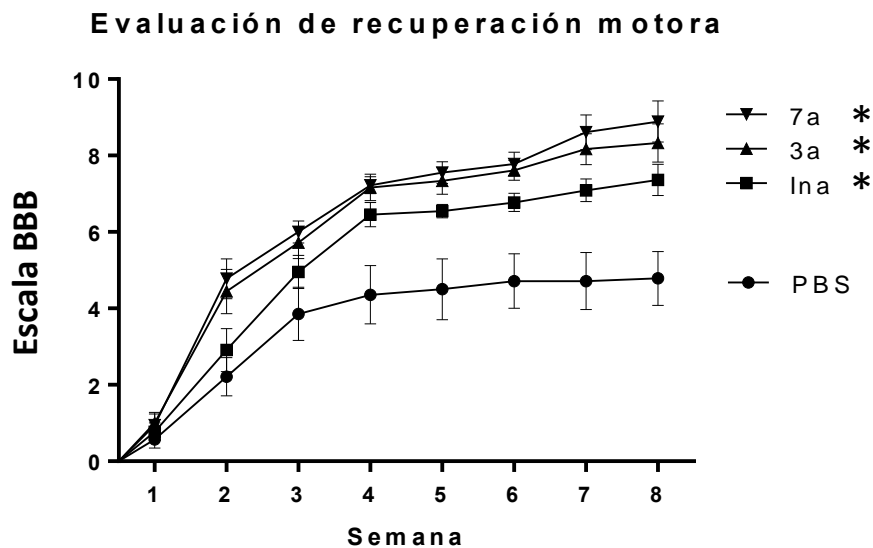
Como primer objetivo, se planteó determinar la recuperación motora de ratas mediante la prueba Basso, Beattie & Bresnahan (BBB) en ratas sometidas a una LTME con diferentes aplicaciones de FILM, utilizando el **diseño experimental 1** que consistió en la evaluación semanal de la recuperación motora durante 2 meses, utilizando un modelo de lesión medular moderada a nivel T9 se provocó pérdida motora de miembros traseros de ratas Sprague Dawley hembras e inmediatamente se comenzó la administración de los tratamientos, una dosis de 200 µl de FILM sobre el sitio de lesión después del impacto en el grupo Inmediato agudo (Ina) y administración inmediata seguida de 2 o 6 aplicaciones adicionales por vía intraperitoneal cada 24 horas en los grupos de 3 aplicaciones (3a) y 7 aplicaciones (7a) respectivamente. El grupo PBS fue administrado en el mismo esquema y fue utilizado como control de lesión “sin tratamiento” y un grupo Sham al cual solo se le practicó la laminectomía sin contusión (datos no mostrados).

Una vez cada semana durante dos meses y mediante la observación de dos evaluadores en ciego se determinó la recuperación motora de las ratas mediante la prueba a campo abierto de “BBB” la cual evalúa la fuerza y movimiento de cadera, rodilla y tobillo de ambas extremidades y las califica dentro de una escala del 0 a 21 en la que 0 representa una falta total de movimiento y 21 la normalidad (Anexo 2). Los datos fueron registrados y analizados utilizando una Prueba de ANOVA de dos vías para datos repetidos y una prueba *post hoc* Tukey con una confiabilidad de $\alpha=0.01$.

La administración de FILM promueve la recuperación motora de ratas con LTME

El grupo FILM Ina mostró una similitud estadística con el grupo PBS en las primeras 3 evaluaciones pero una diferencia significativa a partir de la cuarta evaluación, obteniendo un valor final de 7.36 en la escala BBB. Con respecto a 3a y 7a los valores fueron similares estadísticamente a PBS únicamente durante la primera semana, a partir de la segunda semana mostraron diferencias estadísticas obteniendo valores finales de 8.33 y 8.89 en la escala BBB. Entre el grupo Ina y 3a no existe diferencia significativa, al igual que ocurre entre 3a y 7a, aunque si la hay entre Ina y 7a, por lo que indica que 3a es precisamente la transición entre los dos tiempos.

En el análisis global, los grupos FILM muestran diferencias significativas con respecto al grupo control PBS, demostrando que su aplicación contribuye a la recuperación motora de las ratas con LTME (Figura 6).



	1	2	3	4	5	6	7	8
PBS	0.57	2.21	3.86	4.36	4.50	4.71	4.71	4.79
Ina	0.77	2.91	4.95	6.45	6.55	6.77	7.09	7.36
3a	1.00	4.44	5.72	7.17	7.33	7.61	8.17	8.33
7a	0.94	4.78	6.00	7.22	7.56	7.78	8.61	8.89

Figura 6– Evaluación de habilidad motora con prueba BBB a campo abierto

Durante 8 semanas se realizaron pruebas de habilidad motora, las ratas fueron evaluadas con la asesoría de dos observadores quienes desconocían de qué grupo se trataba (ciegos). En la tabla de la figura se muestra la media de calificaciones obtenidas semanalmente en los grupos. Los datos fueron analizados con una prueba de análisis de variancia (ANOVA) utilizando una significancia de $\alpha=0.01$, los grupos FILM muestran diferencias significativas con respecto al grupo control PBS, demostrando que el FILM contribuye a la recuperación motora de las ratas con LTME.

Estos resultados demostraron un cambio en la progresión de la lesión de médula que permitió a los individuos recuperar en mayor medida su capacidad motora, ya fuera como dosis única o como multidosis, el pentapéptido modificó el perfil de expresión de elementos que confieren protección al tejido contra el daño posterior al evento traumático, fue así que como segundo objetivo se estableció determinar el perfil de expresión de genes durante una LTME en fase aguda y sub-aguda, producido por la administración del factor, y se eligió la técnica de expresión en microarreglos debido a su capacidad de analizar de un gran número de genes de manera simultánea (Yang *et al.*, 2002).

Luego de realizar el protocolo del **diseño experimental 2**, se obtuvo 1 cm de la medula espinal concéntrico al sitio de lesión tres horas posteriores a la última aplicación del tratamiento en cada grupo y se colocó en 1 ml reactivo de Trizol® (Invitrogene, life Technologies). El tejido fue disgregado

y posteriormente se extrajo el RNAt mediante la técnica de TRIZOL. Se determinó su concentración utilizando un espectrofotómetro Epoch2® (BioTek Instruments, Inc., USA) y su integridad en geles de agarosa al 1.5% (Figura 7).

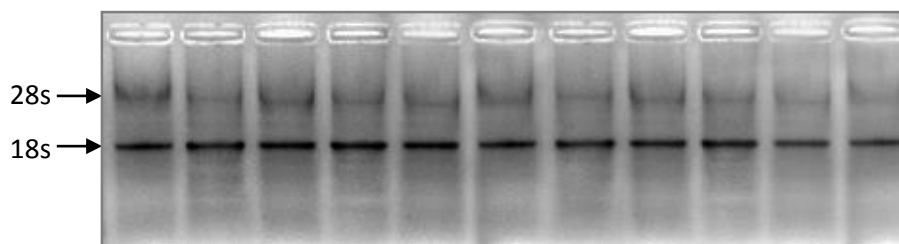


Figura 7 – Visualización de integridad de RNA en gel de agarosa

Para cada extracción de RNA total de médula espinal de ratas sometidas a un modelo de LTME se realizaron visualizaciones en cámara de electroforesis a 90 volts utilizando buffer de corrida TBE y geles de agarosa al 1.5%, en la imagen se muestra ejemplo de los geles elaborados

Para los ensayos de microarreglos se seleccionaron 6 muestras de RNAt de cada grupo y se elaboraron 2 mezclas de RNA en concentraciones iguales, mismas que fueron comparadas contra una mezcla única de RNA del grupo PBS posteriormente. Se evaluó la integridad de las mezclas “pool” elaboradas en un gel de agarosa al 1.5% (Figura 8).

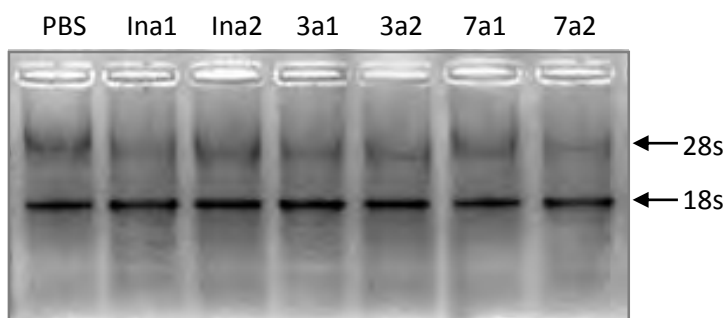


Figura 8 – Visualización de integridad pool en gel de agarosa

Se seleccionaron las muestras de RNA de cada grupo tomando en cuenta su integridad y concentración, se mezclaron 3 muestras de RNA en partes iguales por pool. Una vez generadas las mezclas se corroboró su preservación mediante electroforesis en gel de agarosa.

Una vez generadas las mezclas de cada grupo, se sintetizó cDNA con nucleótidos modificados a los cuales se marcó con Cy3 al grupo control (PBS) y con Cy5 a los grupos experimentales (FILM) y se hibridaron en un chip de 5000 genes de rata (*Rattus norvegicus*; Rn5K) diseñado en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM (Figura 9).

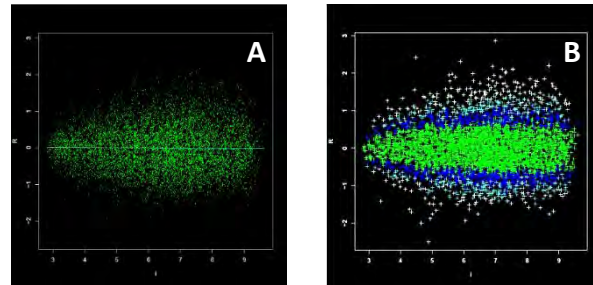


Figura 9 – Micoarreglos en placa

Se muestra el resultado de expresión del grupo PBS y del grupo de FILM Ina. Utilizando el software GenArise se compararon los datos de emisión de fluorescencia del grupo control (PBS) contra el grupo experimental (FILM) y se determinó la expresión diferencial entre cada gen en el arreglo.

En (A) se muestra un plot en el que se registra la intensidad de fluorescencia de las muestras.

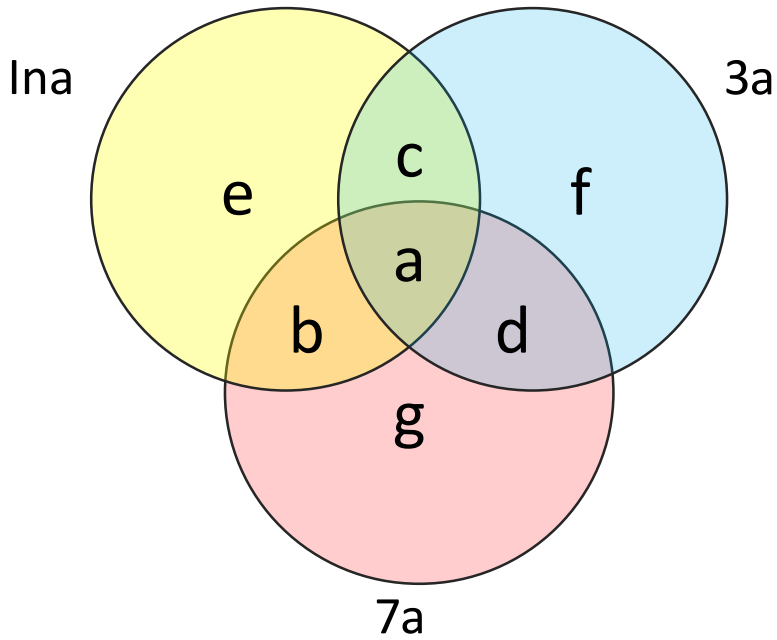
En (B) se muestra un plot después de una normalización y comparación con el grupo control, en la zona verde se ubican los genes expresados de manera similar, en azul oscuro los genes con un z-score de 1.5, en azul claro aquellos con un z-score de 2 y en blanco genes que exceden el score.



Una vez obtenidos los valores de intensidad de fluorescencia fueron analizados con el software GenArise (Figura 9A & 9B) de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular de acuerdo al protocolo desarrollado en el instituto (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/main.html>), se tomaron en consideración los genes con un Z-score > 1.5.

El análisis demostró que la administración de FILM en ratas sometidas a un modelo de LTME modifica la expresión de un total de 1227 genes, sobre/sub expresa 356/370 genes con el esquema de Ina, 369/361 en 3a y 405/370 en 7a (Figura 10).

A



subgrupo	descripción	genes regulados		
		↑ arriba	↓ abajo	
a	331 elementos comunes en "1na", "3a" and "7a"	173	158	Tabla Va
b	95 elementos comunes en "1na" and "7a"	44	51	Tabla Vb
c	95 elementos comunes en "1na" and "3a"	46	49	Tabla Vc
d	151 elementos comunes en "3a" and "7a"	83	68	Tabla Vd
e	205 elementos exclusivos de "1na"	93	112	Tabla Ve
f	153 elementos exclusivos de "3a"	67	86	Tabla Vf
g	197 elementos exclusivos de "7a"	104	93	Tabla Vg

B

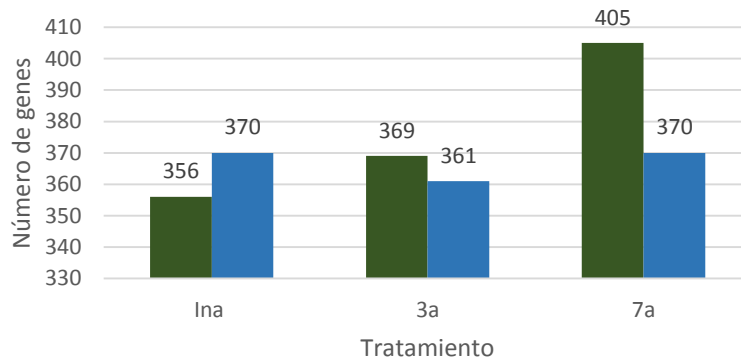


Figura 10 – Genes expresados diferencialmente por efecto del FILM en un modelo de LTME

Utilizando el software GenArise se compararon los valores de emisión de los grupos experimentales contra los controles.

(A) Diagrama de Venn y tabla representativa ilustrando el número de genes modificados y sus coincidencias entre grupos, ver Tablas Va – Vg en Anexo 4.

(B) Número de genes expresados diferencialmente en cada esquema de aplicación del FILM comparados con el grupo PBS tomando el valor crítico de Z mayor a 1.4 (modificados al menos 1.5 veces), en verde se muestran los genes sobre-expresados y en azul los genes sub-expresados.

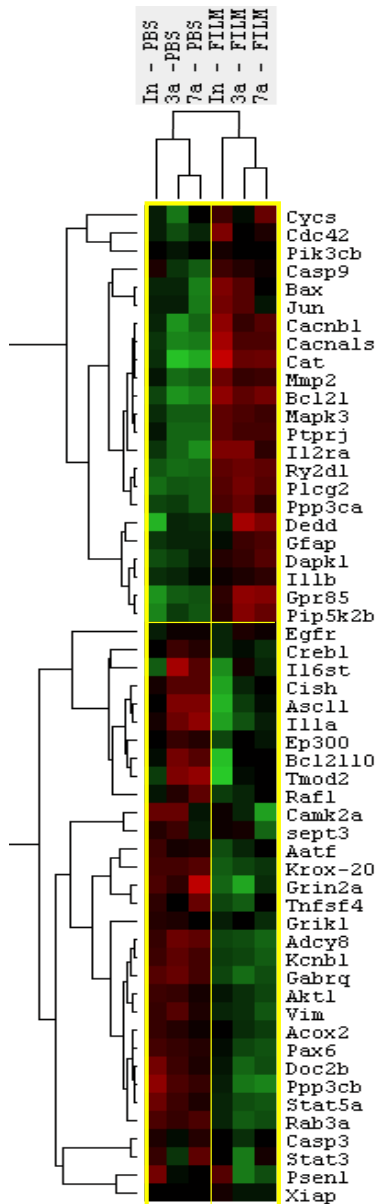


Figura 11 – Dendrograma y mapa de calor

Utilizando el software Cluster 3.0 se analizó a los 1227 genes expresados diferencialmente y se visualizó utilizando el software Java TreeView,; en la escala de color, el rojo representa sub-expresión, el verde sobre-expresión y en negro cuando no hay cambio. En la imagen se muestra un ejemplo de 55 genes de interés que se agrupan en sub-expresados (grupo superior) y sobre-expresados (grupo inferior) con respecto al grupo PBS. Los grupos FILM se ubican en el mismo grupo de similitud, siendo 3a y 7a los más parecidos.

Se elaboró un análisis de integración de grupo utilizando la plataforma Cluster 3.0 y para visualización el software Java TreeView donde se observó un cambio de expresión entre grupos consistente, el agrupamiento de similitud en el perfil de expresión muestra a los controles PBS en las reacciones de microarreglos como un grupo con una alta homología al igual que los grupos del factor; de igual manera el agrupamiento ubica a los genes en dos grandes conjuntos, genes sub-expresados y sobre-expresados. Al igual que en lo observado en las evaluaciones en la escala de recuperación motora, los grupos FILM 3a y 7a son similares (Figura 11).

Posterior a esto, los genes expresados diferencialmente fueron comparados en bases de datos de categorías funcionales, ontología y vías enzimáticas utilizando herramientas bioinformáticas (DAVID, WEB-Gestalt, PANTHER) para la anotación, interpretación y asociación funcional en sistemas biológicos.

[El FILM modifica la expresión de familias de genes implicados en la neuroprotección.](#)

Se realizó el análisis de cada grupo por separado y se encontró (Tabla 2) la relación de los genes sobre expresados obtenidos con procesos de formación y preservación de la integridad de la barrera hematoencefálica (Akt1, Cldn1, Mpdz, Myh13, Myh4, Myh8, Prkch, Ppp2cb), como se presume ocurre en un modelo de parasitemia, observado de manera anatómica (Galán-Salinas; 2016); efectos antioxidantes (Prdx1, Prdx2, Prdx4, Prdx6), lo cual resulta interesante pues la disrupción de esta barrera es un fenómeno común en padecimientos neurológicos como en la esclerosis amiotrófica lateral, esclerosis múltiple y en accidentes cerebro vascular debido al estrés oxidativo (Olmez & Ozyurt 2012;

Obermeier *et al.*, 2013; Liu & Chan 2014); procesos homeostáticos (Camk2a, Camk2, Cnn3, Myh4, Kcnn2, Kcnn3, Kcnn4) (Cerella *et al.*, 2010); y receptores antagonistas de NMDA (Gabra5, Gabrr1, Gabrq) con lo cual se infiere que se disminuya la excitotoxicidad directa o indirectamente en el sitio (Weber, 2004; Nehrt *et al.*, 2007). Se encontraron también agrupamientos para la sobre-expresión de genes relacionados a proteínas antiapoptóticas (BCL2, Bcl2l10, CEBPB, CD59, XIAP, AATF, GCLC, GNRH1, GNAQ, HTT, IL7, PRDX2, Psen1, PRKCI, STAT5A, TGFA, TNF, tp63, akt1) y así mismo la sub-expresión de genes proapoptóticos (DDAH1, DFFA, DFFB, FAIM, GATA6, Jun, Nae1, BAX, SLK, APBB1, CASP12, Casp9, CYCS, dedD, dapk3, IL2RA, Ngfr, Nup62, Prf1) en los tres protocolos.

Tabla 2 – Genes expresados diferencialmente entre los grupos FILM y PBS y funciones asociadas al efecto protector

Las listas de genes expresados diferencialmente entre los grupos FILM y PBS obtenidos como resultado de los ensayos de microarreglos fueron analizados en las plataformas DAVID 6.7, WEB-Gestalt y PANTHER, se obtuvieron resultados similares en la agrupación de los genes en diferentes grupos y subgrupos, en la tabla se muestran las coincidencias relacionadas con el posible mecanismo por el cual FILM ejerce su efecto protector, siendo la modulación de la muerte celular un elemento interesante para analizar. Se respetó el idioma del software al nombrar al grupo.

		Término	1a	3a	7a	Referencia
Sobrerregulados	Unión celular	Tight junction	Cldn1, Mpdz, Myh13, Myh8, Prkch, Ppp2cb	Akt1, Cldn1, Myh13, Myh8, Prkch, Ppp2cb	Cldn1, Myh13, Myh4, Myh8, Prkch, Ppp2cb	Fan <i>et al.</i> , 2008; Föster <i>et al.</i> , 2008; Nagasawa <i>et al.</i> , 2006; Zhao <i>et al.</i> , 2011
		Gap junction	Gnaq, Adcy8, Tubb3	Gnaq, Adcy8	Gnaq, Raf1, Adcy8, Plcb4	
		Cell junction	Cdc42bpb, Camk2a, Cldn1, Dll1, Mpdz, Parva, Pclo, Kcnc1, Pascin1, Ptk2, Rps6kb1	Cdc42bpb, Camk2a, Cldn1, Dll1, Parva, Pclo, Kcnc1, Kcnc1, Pascin1, Rps6kb1, Snap23, Syt2, Syt6, Syt7,	Ank3, Camk2a, Cdc42bpb, Cldn1, Dll1, Kcnc1, Pascin1, Parva, Pclo, Sept3, Snap23, Snca, Svop, Syt2, Syt7	
	Homeostasis	Antioxidant	Prdx2, Prdx4	Prdx1, Prdx2, Prdx6	Prdx2, Prdx4	Huang <i>et al.</i> , 2015; Zhao <i>et al.</i> , 2009; Olsen <i>et al.</i> , 2011; Woods <i>et al.</i> , 2005; Janumyan <i>et al.</i> , 2003; Liu <i>et al.</i> , 2012; Jun & Qing 2004
		GABA-A receptor activity	Gabra5, Gabrr1, Gabrq	Gabrq	Gabrq	
		Calmodulin-binding	Camk2a, Cnn3, Kcnn3, Kcnn4, Ppp3cb, Syt7	Camk2a, Kcnn2, Kcnn3, Kcnn4, Ppp3cb, Syt7	Camk2a, Camk2, Kcnn2, Kcnn4, Myh4, Ppp3cb, Syt7	
		anti-apoptosis	Bcl2, Bcl2l10, Stat3, Stat5a	Psen1	XIAP, Bcl2, Il7, Psen1, Stat5a	

Subregulados	cell migration	Col5a1, Icam1, Il12a, Itgb1, Lamc1, Ltb4r2, Mmp14, Myh9, Nr2f2, Cxcr4	Col5a1, Itgb1, Lamc1	Col5a1, Icam1, Il12a, Itgb1, Nr2f2	Gong <i>et al.</i> , 2006; Peng <i>et al.</i> , 2004; Loufrani <i>et al.</i> , 2008; Lu <i>et al.</i> , 2009; Cao <i>et al.</i> , 2002; Bleicken <i>et al.</i> , 2010; Schumacher <i>et al.</i> , 2002
	cell death	Apbb1, Bax, Cycs, Faim, Gata6, Il2ra, Jun, Nup62, RATCYTA, Stk2	Apbb1, Casp12, Casp9, Dedd, Dffa, Dffb, Faim, Il2ra, Nup62	Appbp1, Bax, Casp12, Casp9, Cycs, Il2ra, Ngfr, Nup62, Stk2	

Como último objetivo, se propuso la validación de genes de interés cuya expresión se vió modificada por la aplicación del FILM en los ensayos de microarreglos; se estableció la selección de genes cuyas modificaciones se relacionaran con el efecto directo o colateral de la modulación de la inflamación para la preservación del tejido neural, el cual se refleja en recuperación motora de las ratas con LTME.

Resultó de interés los cambios que produjo el pentapéptido sobre la expresión de genes moduladores de la muerte celular en este modelo, puesto a que la apoptosis como efecto colateral de la respuesta inflamatoria es un proceso muy importante que inicia principalmente durante la fase aguda en la LTME, la mayor parte de la materia gris está comprometida posterior a la lesión mecánica se pierde en gran medida durante las primeras horas (Ek *et al.*, 2012) y se continúa indefinidamente como un proceso neurodegenerativo (Gensel & Zang, 2015), es por ello que su regulación es crítica para la recuperación motora (Dumont *et al.*, 2001; McDonald & Sadowsky 2002; Donnelly & Popovich, 2008; Oyinbo, 2011; Nieto-Díaz *et al.*, 2014).

Validación por qPCR

Se seleccionaron 10 genes expresados diferencialmente relacionados con la regulación de la muerte celular para validar su cambio de expresión mediante PCR Tiempo Real, teniendo en cuenta su diferencia en la expresión a lo largo del tiempo de aplicación del FILM. Adicionalmente se eligieron 5 genes relacionados con los antecedentes directos del FILM (Bermeo *et al.*, 2013) (Tabla 3).

	GEN	Grupo
↑	AATF	1a
↑	Ascl1	1a, 3a
↓	Bcl2l	1a
↑	Bcl2l10	1a
↑	CREB1	3a
↓	Dapk3	3a
↓	Dedd	3a
↑	Egr2	1a, 3a, 7a
↑	Pax6	1a, 3a, 7a
↑	Psen1	3a, 7a
↑	XIAP	7a
↑	Vim	7a
↓	Casp3	esperado
↓	Cox2	esperado
↓	iNOS	esperado
=	B-act	Constitutivo

Tabla 3 – Selección de genes para pruebas confirmatorias

Se eligieron genes relacionados con la regulación de la muerte celular principalmente, y algunos reportados previamente, algunos de ellos fueron observados en un solo grupo mientras que otros fueron modificados en los tres tratamientos.

El diseño de los oligos para la qPCR se realizó mediante los programas libres OligoPerfect® (ThermoFisher) y Oligo Primer Analysis SoftwareV4.0 (Molecular Biology Insights), los primers obtenidos fueron validados en el Primer-BLAST del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tabla 4).

Tabla 4 – Diseño de oligos para el análisis de confirmación

Las secuencias de cada gen fueron obtenidas del NCBI y de acuerdo a numero de identificación indicado en la base de datos del microarreglo, como gen constitutivo se utilizó a la β -actina. Se trabajaron las muestras utilizadas para los microarreglos.

GEN	GeneBank	Forward	Reverse
AATF	NM_053720.1	gcagctggaacagttgttga	accttttgtcgggtgtccaag
Ascl1	NM_022384.1	catctcccccaactactcca	ctgcttccaaagtccattcc
Bcl2l10	NM_053733.1	cggatgagttgctctccaat	agcagtctcgtccagtagg
CREB1	NM_031017.1	tgttggtcaagctgcctctg	cctctctcttctcgtgctgct
Dapk3	NM_022546.1	ctggacgggtgccactacct	cgtgccaaagatgttcttga
Dedd	NM_031800.1	cacctacctcgacgcattct	ctgtcggcccagttcatagt
Egr2	AB032419.1	gcaaggacagcgaaaaagac	ttctagggccacagagtgtct
Pax6	NM_013001.2	ctcctttacatcgggttcca	cataactccgccattcact
Psen1	NM_019163.3	acccgagggaagaggagta	aaaatggcgagcaggagtaa
XIAP	NM_022231	ggccagactatgccattta	cgaagaagcagttgggaag

GEN	GeneBank	Forward	Reverse
Casp3	XM_006253130.3	agttggaccaccttgtgag	agtctgcagctcctccacat
Cox2	NM_017232.3	tgggtccgggtctgatgatgatg	ggttcaaaagcaggtctgggtcga
iNOS	XM_006246949.3	aagctggtggccgccaagct	atgtgaggggttgggggga
Vim	NM_031140.1	aatgcttctctggcacgtct	gctcctggatctcttcatcg
Bcl2l1	NM_001033672.1	agtgagcaggtgttttggac	tgttctcttcgacatcgcta
B-act	NM_031144.3	aaggccaaccgtgaaaag	gtggtacgaccagaggcatac

Se realizaron ampliificaciones de cada gen, por duplicado, para cada muestra utilizando un equipo termociclador LightCycler 96 y el sistema SYBR Green first-strand kit (ROCHE, Life Science), con el siguiente protocolo: preincubación 95°C 600s; 3 pasos de amplificación en 40 ciclos, 95°C 10s, 60°C 10s y 72°C 10s con una adquisición simple en el último paso (Figura 12).

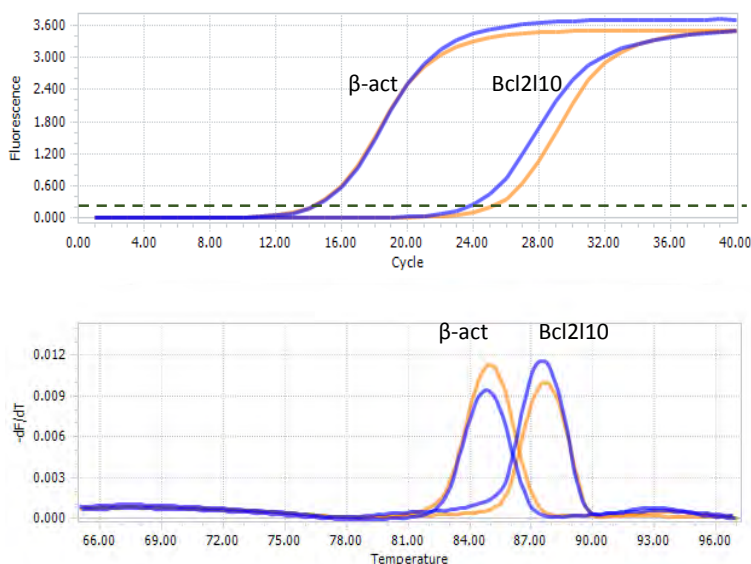


Figura 12 – Curva de amplificación representativa de qPCR

En la figura se muestra (superior) las curvas de amplificación del gen constitutivo β -act y Bcl2l10 del grupo PBS (naranja) y 3a (azul). Los valores de C_q (línea punteada) fueron utilizados para la normalización de los datos.

Se puede ver también (inferior) las curvas de metling, las cuales confirman la afinidad de los oligos por sus secuencias blanco, un solo pico indica que se obtuvo un amplicón de tamaño definido.

La administración de FILM modifica la expresión de iNOS, Bcl2l10, Egr2 y Vim.

La normalización de los datos se realizó con los datos del CQ de los genes de un grupo Sham y se hicieron dos comparaciones: PBS contra Ina, con el fin de evaluar la modificación que produce el factor en la fase más aguda de la progresión del daño de la lesión de médula; La comparación de los grupos FILM (Ina, 3a y 7a) para evaluar la progresión de la lesión al aplicar el tratamiento y determinar el protocolo de administración adecuada para emplear en trabajos posteriores.

La comparación de los grupos Ina y PBS muestran una diferencia estadística sobre la expresión del gen que codifica para la iNOS, siendo mayor en el grupo control de lesión; así mismo se observó su disminución de lo largo del periodo de aplicación del factor: a las 3 hrs, a los 3 días y a los 7 días, siendo los grupos 3a y 7a similares al grupo Sham. Por otra parte, la comparación de los protocolos de administración de FILM muestran la expresión significativa del Egr2 en el grupo Ina, y la sobreexpresión de los genes Bcl2l10 y Vim en 3a (Figura 13), estos genes están relacionados con la preservación de la integridad y la supervivencia celular como se argumenta en el apartado de discusión (página 30).

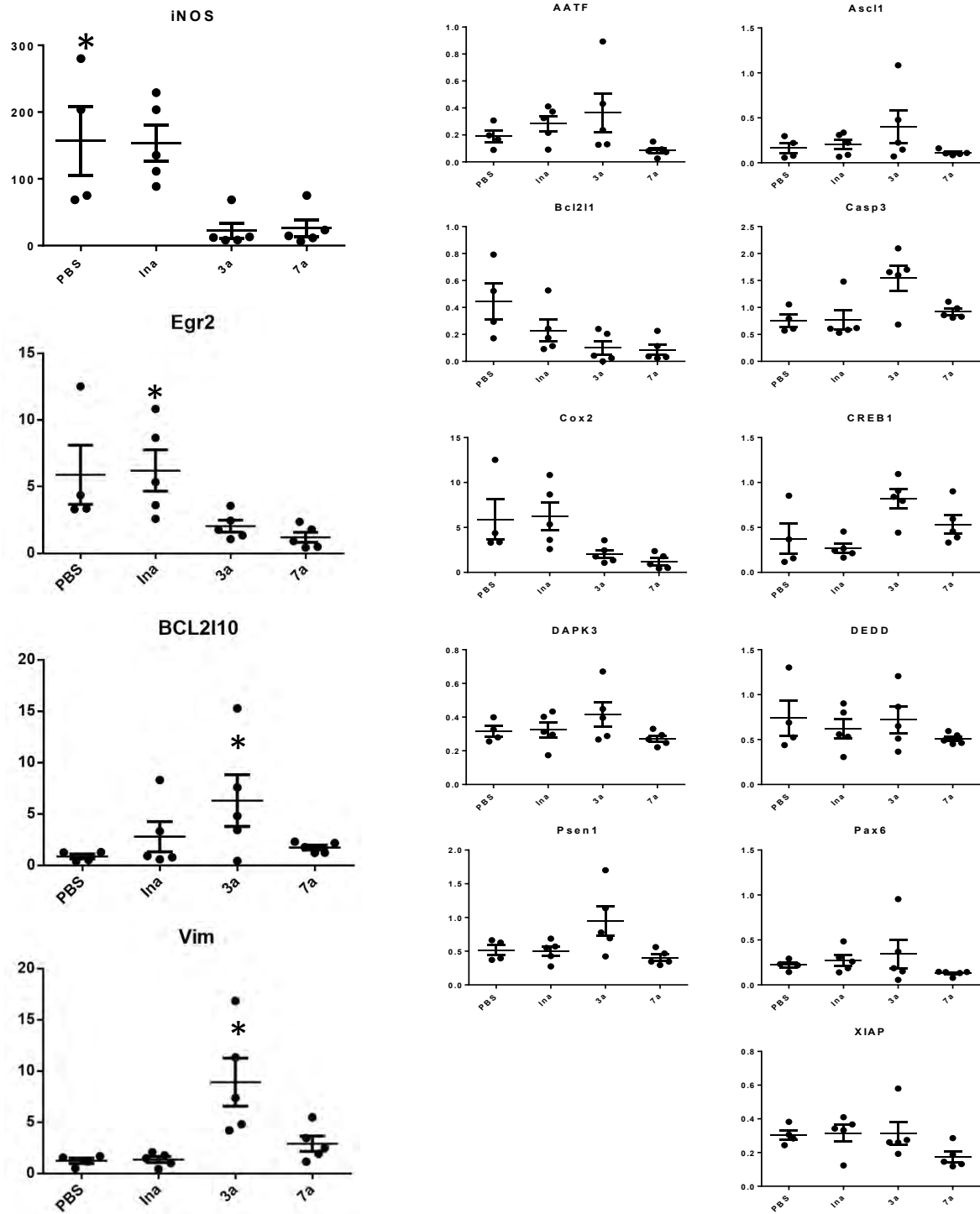


Figura 13 – Validación de expresión en qPCR

Se seleccionó un grupo de 15 genes de interés para ser evaluados mediante qPCR; La expresión de los genes en PCR en tiempo real coincide en gran medida con lo encontrado en los microarreglos, aunque no resulta significativo se observa la sobreexpresión de AATF, Ascl1, CREB1 y Psen1 en el protocolo 3a; así mismo coincide la subexpresión de Bcl2l1 y Cox2 como era esperado. iNOS, Bcl2l10, Egr2 y Vim presentaron diferencias estadísticas (*) al compararse a los grupos con su control ($\alpha=0.05$). Las muestras utilizadas para los microarreglos fueron utilizadas para este análisis.

Discusión

Se confirmó que el FILM ejerce un efecto protector sobre el tejido neural al aplicarlo como dosis única, lo que es observable mediante la recuperación motora de los animales de estudio, además el resultado es más evidente con múltiples administraciones como se anticipaba; la recuperación es progresiva desde el protocolo 1a hasta el 7a, es decir, de 3 hrs a 7 días, siendo el protocolo 3a similar para ambos, seguramente al ser la fase de transición entre las etapa aguda y sub-aguda (Rossignol *et al.*, 2007; Oyinbo 2011; Zhang *et al.*, 2012), estos resultados son comparables a los obtenidos con una estrategia combinatoria en un modelo de contusión similar, en donde se administró Rolipram® durante una semana utilizando una mini bomba osmótica subcutánea y posteriormente se implaron células Schwann recombinantes para la neurofina D15A embebidas en un matrigel (Flora *et al.*, 2013); sin embargo, cabe destacar las ventajas en la aplicación del péptido con respecto a este acercamiento: la facilidad y el periodo de administración, sin mencionar el costo del protocolo.

Con el fin de describir el mecanismo por el cual está confiriendo esta protección, se eligió el análisis de expresión en microarreglos, donde se esperaban la modificación de expresión de genes relacionados con la regulación de la quimiotaxis e inflamación a partir de los estudios *in vitro* de la aplicación del FILM en las líneas celulares U-937 y MRC-5 activadas con PMA (Silva *et al.*, 2008; 2011). Tras el análisis se observó la sub-expresión de genes relacionados con la migración celular, ICAM1 y CXCR-4 al igual que el antecedente, además de egfr, ESR2, Itgb1, IL12A, LAMC1 y MMP14, de acuerdo al Software de análisis DAVID 6.7 (<https://david.ncicrf.gov/home.jsp>). Con respecto a familias de genes relacionadas directamente con la modulación inflamación no se observaron cambios, cabe mencionar que la comparación de los grupos FILM se realizaron contra un control PBS obtenido durante la fase más aguda de la lesión, en la que la respuesta inflamatoria inicial es conducida principalmente por la microglia residente, la cual es capaz de mantener una respuesta inflamatoria aún sin la presencia de macrófagos periféricos (Miron *et al.*, 2013), además que no se ha descrito el efecto del FILM sobre este tipo celular; se infiere que el nivel de respuesta persiste en el sitio durante el periodo de evaluación, en otras palabras, permanece constante durante toda la evaluación sin observarse un incremento, lo cual es benéfico pues debo reiterar que, un proceso inflamatorio controlado es necesario para remover restos celulares y así permitir la resolución y reparación tisular, por lo que restringir en gran medida la inflamación tiene efectos adversos en la

recuperación de funciones en individuos con esta afección (Donnelly & Popovich, 2008; Beck *et al.*, 2010; David and Kroner, 2011).

De acuerdo al análisis bioinformático, es posible que el factor moldee el microambiente del sitio de lesión para favorecer la expresión de precursores que induzcan la restauración de la homeostasis celular y efectos antioxidantes (Woods *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2010; Cerella *et al.*, 2010), la reintegración de la barrera hematoencefálica (Nagasawa *et al.*, 2006; Förster *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011), y su preservación estructural (Liu *et al.*, 2010) y contribuir, posiblemente a la remielinización de axones (Nakagawa *et al.*, 2002; Sakayori *et al.*, 2012; Kipanyula *et al.*, 2013).

Resalta el efecto regulatorio sobre el proceso de activación de muerte celular programada en el que predominan las señales de supervivencia que contribuyen a la conservación de componentes neurales (Czabotar *et al.*, 2014), como fue observado previamente tras determinar la preservación de motoneuronas rubroespinales con Ina (Bermeo *et al.*, 2013), mismo que ocurre seguramente con los grupos 3a y 7a y explicaría lo observado en las pruebas de campo abierto en donde los grupos FILM obtuvieron una mejor recuperación motora, por lo que se determinó la validación en qPCR de genes relacionados con este mecanismo y se observó una tendencia similar a lo observado en microarreglos; a pesar de encontrar estadísticos no significativos creemos que el efecto biológico en la regulación de los genes seleccionados tiene un impacto suficiente para obtener la recuperación motora observada en los grupos de evaluación crónica, es probable que la modificación de la dosis administrada, así como del tamaño de muestra e incluso la vía o sistema de administración seguramente definirá con mayor exactitud el comportamiento de dichos genes.

Estadísticamente se encontró el cambio significativo en la expresión del gen que codifica para la enzima iNOS, la cual es una isoforma de eNOS que después de una lesión de médula espinal produce óxido nítrico en células inmunitarias activadas, en altas concentraciones se asocia a la formación de intermediarios neurotóxicos como peroxinitrito que puede producir daños por degradación de componentes celulares cuando supera la capacidad del tejido para contrarrestar la oxidación (Kwak *et al.*, 2005); en el grupo PBS se expresa en una proporción mayor que en Ina como se anticipaba, ya que, la determinación de nitritos en trabajos previos reflejó una disminución con la aplicación de FILM en una dosis (Bermeo *et al.*, 2013), posteriormente se evaluó entre los grupos FILM y se encontró que la expresión de iNOS disminuye significativamente con los protocolos de administración 3a y 7a, recuperando un nivel de expresión similar al control Sham, con lo cual significa la normalización en la expresión de este gen a niveles fisiológicos. Aunado a esto se observó

el cambio en la expresión de factores de crecimiento y de estimulación a la supervivencia celular; uno de los genes evaluados fue el de respuesta temprana al crecimiento 2 (Egr2 o Krox-20), evidente en Ina durante la validación, tiene un efecto sobre la formación de mielina en células de Schwann en conjunto con CREB1 (sobrexpresado en microarreglos), los cuales son dependientes de cAMP y se expresan con Atf1 (su homólogo Atf2 fue encontrado en Ina y 3a), en conjunto Egr2 y CREB1 pueden influir en la remielinización de axones, lo cual influye en la función motora de las ratas (Ross & Pawlina, 2011). Cabe mencionar que en estudios en paralelo hemos detectado una mayor cantidad de axones mielinizados cuando los animales son tratados con FILM y otros péptidos (Parra Villamar, comunicación personal); el Bcl2l10 (DIVA), miembro antiapoptótico de la familia Bcl2, se encontró sobre expresado en el grupo 3a tratado con FILM, la proteína que codifica este gen confiere resistencia al estrés y previene la permeabilización de la membrana mitocondrial en respuesta al estrés oxidativo y citotoxicidad aunque su papel es poco estudiado, se menciona que su expresión atiende a un tejido en específico, de manera que su expresión en este modelo puede ser de suma importancia y uno de los primeros reportes de su papel funcional (Liu *et al.*, 2012); de igual manera, en el grupo 3a se observó la sobreexpresión del gen codificante para Vimentina (Vim) que es un constituyente de filamentos intermedios que junto a los microfilamentos y microtúbulos de actina forman el citoesqueleto que mantiene la integridad celular, funciona como organizador de proteínas involucradas en el anclaje, migración y vías de señalización (Ross & Pawlina, 2011), se reporta que la hipoxia provoca cambios en la distribución de la red de filamentos intermediarios de vimentina pero es contrarrestado por la actividad de HSP27 encontrado en Ina y 3a; el hallazgo de Vim, HSP27 y Tubb4 (en los 3 tratamientos) sugiere la preservación estructural y funcional de las neuronas en el sitio de lesión (Liu *et al.*, 2010).

Debido a los resultados positivos en la recuperación funcional de las ratas con los grupos 3a y 7a, se propone la comparación de los grupos multidosis FILM con sus controles de tiempo adecuados para resaltar la modificación de estos y otros genes implicados en la neuroprotección.

En resumen, el cambio en la expresión de iNOS, Bcl2l10/DIVA, Egr2 y Vim indica que el FILM ejerce un efecto neuroprotector al disminuir un estímulo oxidativo y beneficiar la preservación mediante la expresión de factores de supervivencia, crecimiento y estabilidad celular predominante sobre todo con el protocolo 3a, por lo que en futuros trabajos se propone a este tratamiento como el indicado para el seguimiento del efecto del factor en este y otros modelos biológicos no solo con características de lesión sino procesos neurodegenerativos.

Conclusiones

Los protocolos de administración de FILM 3a y 7a mejoran la recuperación motora de ratas con una LTME en comparación a la aplicación de FILM en dosis única.

La diferencia no significativa entre los grupos 3a y 7a nos indica que bastan tres dosis para tener una respuesta neuroprotectora en la LTME, proponiendo esta dosis para estudios posteriores.

FILM ejerce sus efecto protector al promover la expresión de familias de genes relacionados con la modulación de la inflamación, formación de uniones celulares, preservación estructural, remielinización de axones y control de apoptosis.

El factor promueve la sub expresión de iNOS y la sobre regulación de Bcl2l10, Egr2 y Vim.

Literatura Citada

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M. Roberts, K., Waltery, P. (2014). "Molecular Biology of the Cell" (6^a ed.), Garland Publishing, New York

Alcivar, A., Hu, S., Tang, J., & Yang, X. (2003). DEDD and DEDD2 associate with caspase-8/10 and signal cell death. *Oncogene*, 22(2), 291-297.

An, Y., Belevych, N., Wang, Y., Zhang, H., Herschman, H., Chen, Q., Quan, N. (2014). Neuronal and nonneuronal COX-2 expression confers neurotoxic and neuroprotective phenotypes in response to excitotoxin challenge. *J Neurosci Res*. 92(4):486-95.

Bao, F., Chen, Y., Dekaban, G.A., Weaver, L.C., (2004). Early anti-inflammatory treatment reduces lipid peroxidation and protein nitration after spinal cord injury in rats," *Journal of Neurochemistry*. 88(6): 1335–1344.

Bao, Q., & Shi, Y. (2007). Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ*, 14(1), 56-65.

Baptiste, D. C., & Fehlings, M. G. (2007). Update on the treatment of spinal cord injury. 161, 217-233.

Baruch, K., Kertser, A., Porat, Z., & Schwartz, M. (2015). Cerebral nitric oxide represses choroid plexus NFκB-dependent gateway activity for leukocyte trafficking. *The EMBO Journal*, 34(13), 1816–1828.

Basso, D.M., Beattie, M.S. & Bresnahan, J.C. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma*; 12: 1-21

Beck, K. D., Nguyen, H. X., Galvan, M. D., Salazar, D. L., Woodruff, T. M., & Anderson, A. J. (2010). Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain*, 133(Pt 2), 433-447.

Beril Gok, H., Solaroglu, I., Okutan, O., Cimen, B., Kaptanoglu, E., & Palaoglu, S. (2007). Metoprolol treatment decreases tissue myeloperoxidase activity after spinal cord injury in rats. *Journal of Clinical Neuroscience*, 14(2), 138-142.

Bermeo, G., Ibarra, A., Garcia, E., Flores-Romero, A., Rico-Rosillo, G., Marroquin, R., Mestre, H., Flores, C., Blanco-Favela, F. Silva-Garcia, R. (2013). Monocyte locomotion inhibitory factor produced by E. histolytica improves motor recovery and develops neuroprotection after traumatic injury to the spinal cord. *Biomed Res Int*, 2013, 340727.

- Bethea, J.R., Nagashima, H., Acosta, M.C., Briceno, C., Gomez, F., Marcillo, A.E., Loor, K., Green, J., Dietrich, W.D. (1999). Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*; 16: 851–863.
- Blancas, S., Fado, R., Rodriguez-Alvarez, J., & Moran, J. (2014). Endogenous XIAP, but not other members of the inhibitory apoptosis protein family modulates cerebellar granule neurons survival. *Int J Dev Neurosci*, 37, 26-35.
- Bleicken, S., Classen, M., Padmavathi, P. V. L., Ishikawa, T., Zeth, K., Steinhoff, H.-J., & Bordignon, E. (2010). Molecular Details of Bax Activation, Oligomerization, and Membrane Insertion. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(9), 6636–6647.
- Campagnolo, D.I., Bartlett, J.A., Keller, S.E. (2000). Influence of neurological level on immune function following spinal cord injury: a review. *J Spinal Cord Med* 23:121–128.
- Cao, G., Luo, Y., Nagayama, T., Pei, W., Stetler, R. A., Graham, S. H., & Chen, J. (2002). Cloning and Characterization of Rat Caspase-9: Implications for a Role in Mediating Caspase-3 Activation and Hippocampal Cell Death after Transient Cerebral Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 22(5), 534-546.
- Cerella, C., Diederich, M., & Ghibelli, L. (2010). The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival. *Int J Cell Biol*, 2010, 546163.
- Chen, B. P. C., Li, M., & Asaithamby. (2012). A. New insights into the roles of ATM and DNA-PKcs in the cellular response to oxidative stress. *Cancer Letters*, 327(1), 103-110.
- Cui Dongmei, Daley William, Fratkin Jonathan D, Haines Duane E, Lynch James C. 2010. *Atlas of Histology: With Function and Clinical Correlations*. Lippincott Williams & Wilkins. Pp 115-133.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(1), 49-63.
- David, S., Kroner, A. (2011). Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 12:388 –399.
- Donnelly, D. J., & Popovich, P. G. (2008). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 209(2), 378-388.
- Dudoit, S., Yang, Y., Callow, M., & Speed, T. (2002). Statistical methods for identifying genes with differential expression in replicated cDNA microarray experiments *Statistica Sinica*, 12(1), 111-139.

- Dumont, R. J., Okonkwo, D. O., Verma, S., Hurlbert, R. J., Boulos, P. T., Ellegala, D. B., & Dumont, A. S. (2001). Acute Spinal Cord Injury, Part I: Pathophysiologic Mechanisms. *Clinical Neuropharmacology*, 24(5), 11.
- Ek, J., Habgood, M. D., Dennis, R., Dziegielewska, K. M., Mallard, C., Wheaton, B., & Saunders, N. R. (2012). Pathological changes in the white matter after spinal contusion injury in the rat. *PLoS One*, 7(8), e43484.
- Estrada-Mondaca Sandino, Carreón-Rodríguez, Alfonso, Parra-Cid María del Carmen, Ibarra-Ponce de León Clemente, Velasquillo-Martínez Cristina, Vacanti Charles A., & Belkind-Gerson Jaime. (2007). Lesión de médula espinal y medicina regenerativa. *Salud Pública de México*, 49(6), 437-444.
- Fado, R., Moubarak, R. S., Minano-Molina, A. J., Barneda-Zahonero, B., Valero, J., Saura, C. A., . . . Rodríguez-Alvarez, J. (2013). X-linked inhibitor of apoptosis protein negatively regulates neuronal differentiation through interaction with cRAF and Trk. *Sci Rep*, 3, 2397.
- Fan, Y.-M., Pang, C.-P., Harvey, A. R., & Cui, Q. (2008). Marked effect of RhoA-specific shRNA-producing plasmids on neurite growth in PC12 cells. *Neurosci Lett*, 440(2), 170-175.
- Flora, G., Joseph, G., Patel, S., Singh, A., Bleicher, D., Barakat, D. J., Jack Louro, Stephanie Fenton, Maneesh Garg, Mary Bartlett Bunge, Pearse, D. D. (2013). Combining neurotrophin-transduced schwann cells and rolipram to promote functional recovery from subacute spinal cord injury. *Cell Transplant*, 22(12), 2203-2217.
- Förster C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease *en Histochemistry and Cell Biology*,. 130(1): 55–70.
- Fujimoto, T., Nakamura, T., Ikeda, T., Taoka, Y., & Takagi, K. (2000). Effects of EPC-K1 on Lipid Peroxidation in Experimental Spinal Cord Injury. *Spine*, 25(1), 24.
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., Samali, A. (2010) Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int. J. Cell Biol.* 2010, 214074.
- Furmanski, O., Gajavelli, S., Lee, J. W., Collado, M. E., Jergova, S. and Sagen, J. (2009) Combined extrinsic and intrinsic manipulations exert complementary neuronal enrichment in embryonic rat neural precursor cultures: An in vitro and in vivo analysis. *J. Comp. Neurol.*, 515: 56–71.
- Galán-Salinas, A. (2016). Estudio del efecto del Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM), en un modelo de malaria cerebral. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
- Gass, P., & Riva, M. A. (2007). CREB, neurogenesis and depression. *Bioessays*, 29(10), 957-961.

- Genovese, T., Melani, A., Esposito, E., Paterniti, I., Mazzon, E., Di Paola, R., Bramanti, P., Linden, J., Pedata, F., Cuzzocrea, S. (2010). Selective adenosine A(2a) receptor agonists reduce the apoptosis in an experimental model of spinal cord trauma. *J Biol Regul Homeost Agents*, 24(1), 73-86.
- Gensel, J. C., & Zhang, B. (2015). Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res*, 1619, 1-11. doi: 10.1016/j.brainres.2014.12.045
- Ghosh, S., & Hui, S. P. (2016). Regeneration of Zebrafish CNS: Adult Neurogenesis. *Neural Plast*, 2016, 5815439.
- Gimenez Scherer, J. A., Rico, G., Fernandez-Diez, J., & Kretschmer, R. R. (1997). Inhibition of contact cutaneous delayed hypersensitivity reactions to DNBC in guinea pigs by the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res*, 28 Spec No, 237-238.
- Giménez-Scherer, J. A., Arenas, E., Díaz, L., Rico, G., Fernández, J., & Kretschmer, R. Effect of the Monocyte Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) Produced by *Entamoeba histolytica* on the Expression of Cell Adhesion Molecules (CAMs) in the Skin of Guinea Pigs. *Arch Med Res*, 31(4), S92-S93.
- Gorgulu, A., Kiris, T., Unal, F., Turkoglu, U., Kucuk, M., & Cobanoglu, S. (2000). Superoxide dismutase activity and the effects of NBQX and CPP on lipid peroxidation in experimental spinal cord injury. *Res Exp Med (Berl)*, 199(5), 285-293.
- Graham, S. H., & Hickey, R. W. (2003). Cyclooxygenases in central nervous system diseases: a special role for cyclooxygenase 2 in neuronal cell death. *Arch Neurol*, 60(4), 628-630.
- Guerrero, A. R., Uchida, K., Nakajima, H., Watanabe, S., Nakamura, M., Johnson, W. E., & Baba, H. (2012). Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *J Neuroinflammation*, 9, 40.
- Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ed. Academia Nacional de Medicina, México, 1999.
- Huang da, W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 4(1), 44-57.
- Huang, S., Liu, X., Zhang, J., Bao, G., Xu, G., Sun, Y., Shen, Q., Lian, M., Huang, Y., Cui, Z. (2015). Expression of Peroxiredoxin 1 After Traumatic Spinal Cord Injury in Rats. *Cell Mol Neurobiol*, 35(8), 1217-1226.
- Hurlbert, R. J., & Hamilton, M. G. (2008). Methylprednisolone for acute spinal cord injury: 5-year practice reversal. *Can J Neurol Sci*, 35(1), 41-45.
- Ibarra, A., & Martinon, S. (2009). Pharmacological approaches to induce neuroregeneration in spinal cord injury: an overview. *Curr Drug Discov Technol*, 6(2), 82-90.

- Ishigaki, S., Fonseca, S. G., Osowski, C. M., Jurczyk, A., Shearstone, J. R., Zhu, L. J., Permutt, M. A., Greiner, D. L., Bortell, R., Urano, F. (2010). AATF mediates an antiapoptotic effect of the unfolded protein response through transcriptional regulation of AKT1. *Cell Death Differ*, 17(5), 774-786.
- Janumyan, Y. M., Sansam, C. G., Chattopadhyay, A., Cheng, N., Soucie, E. L., Penn, L. Z., Andrews, D., Knudson, C.M., Yang, E. (2003). Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *EMBO J*, 22(20), 5459-5470.
- Kipanyula, M. J., Woodhoo, A., Rahman, M., Payne, D., Jessen, K. R., & Mirsky, R. (2013). Calcineurin-nuclear factor of activated T cells regulation of Krox-20 expression in Schwann cells requires elevation of intracellular cyclic AMP. *J Neurosci Res*, 91(1), 105-115.
- Kobayashi, S., Sasaki, T., Katayama, T., Hasegawa, T., Nagano, A., & Sato, K. (2010). Temporal-spatial expression of presenilin 1 and the production of amyloid-beta after acute spinal cord injury in adult rat. *Neurochem Int*, 56(3), 387-393.
- Kovacic, P., & Somanathan, R. (2012). Redox processes in neurodegenerative disease involving reactive oxygen species. *Curr Neuropharmacol*, 10(4), 289-302.
- Kretschmer, R. R., Rico, G., & Gimenez, J. A. (2001). A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*, 112(2), 201-209.
- Kwak, E. K., Kim, J. W., Kang, Ku Seong, Lee, Yoon Hee, Hua, Quan Hong, Park, Tae In, Park, Ji Young, Sohn, Yoon Kyung. (2005). The Role of Inducible Nitric Oxide Synthase Following Spinal Cord Injury in Rat. *Journal of Korean Medical Science*, 20(4), 663-669.
- Lee, B. Y., Al-Waili, N., & Butler, G. (2011). The effect of adrenergic β 2 receptor agonist on paraplegia following clamping of abdominal aorta. *Archives of Medical Science : AMS*, 7(4), 597-603.
- Ley General de Salud. Título Séptimo: De la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación. Editorial Porrúa, 6ª de México, D.F. 1990.
- Li, S., & Tator, C. H. (2000). Action of locally administered NMDA and AMPA/kainate receptor antagonists in spinal cord injury. *Neurol Res*, 22(2), 171-180.
- Liu, D., Ling, X., Wen, J., & Liu, J. (2000). The role of reactive nitrogen species in secondary spinal cord injury: formation of nitric oxide, peroxynitrite, and nitrated protein. *J Neurochem*, 75(5), 2144-2154.
- Liu, L., & Chan, C. (2014). The role of inflammasome in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, 15, 6-15.

Liu, N. S., Du, X., Lu, J., & He, B. P. (2012). Diva Reduces Cell Death in Response to Oxidative Stress and Cytotoxicity. *PLoS One*, 7((8):e43180.).

Liu, N. S., Du, X., Lu, J., & He, B. P. (2012). Diva Reduces Cell Death in Response to Oxidative Stress and Cytotoxicity. *PLoS One*, 7((8):e43180.)

Liu, T., Guevara, O. E., Warburton, R. R., Hill, N. S., Gaestel, M., & Kayyali, U. S. (2010). Regulation of vimentin intermediate filaments in endothelial cells by hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol*, 299(2), C363-373.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

Liverman, T.C., Altevogt, M.B., Joy, E.J., Johnson, T.R. (2005) Spinal cord injury: progress, promise, and priorities. National Academy of Sciences. N.W. Washington, DC.

Loane, D. J., & Faden, A. I. (2010). Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci*, 31(12), 596-604.

Loufrani, L., Retailleau, K., Bocquet, A., Dumont, O., Danker, K., Louis, H., Lacolley, P., Henrion, D. (2008). Key role of alpha(1)beta(1)-integrin in the activation of PI3-kinase-Akt by flow (shear stress) in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294(4), H1906-1913. doi: 10.1152/ajpheart.00966.2006

Lu, H., Shi, J. X., Zhang, D. M., Shen, J., Lin, Y. X., Hang, C. H., & Yin, H. X. (2009). Hemolysate-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 expression in cultured brain microvascular endothelial cells via through ROS-dependent NF-kappaB pathways. *Cell Mol Neurobiol*, 29(1), 87-95.

Lukáš, R., Zýková, I., Barsa, P., Srám, J. (2011). [Current role of methylprednisolone in the treatment of acute spinal cord injury]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*, 78(4), 305-313.

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 alphaD: a potential new anti-inflammatory treatment. *Exp Neurol*, 166(1), 52-64.

McDonald, J. W., & Sadowsky, C. (2002). Spinal-cord injury. *The Lancet*, 359(9304), 417-425.

Mestre, H., Ramirez, M., Garcia, E., Martinon, S., Cruz, Y., Campos, M. G., & Ibarra, A. (2015). Lewis, Fischer 344, and sprague-dawley rats display differences in lipid peroxidation, motor recovery, and rubrospinal tract preservation after spinal cord injury. *Front Neurol*, 6, 108.

Minghetti, Lisa. 2004. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Inflammatory and Degenerative Brain Diseases. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 63 (9): 901 - 910.

Miron, V. E., Boyd, A., Zhao, J. W., Yuen, T. J., Ruckh, J. M., Shadrach, J. L., van Wijngaarden, P., Wagers, A. J., Williams, A., Franklin, R. J., French-Constant, C. (2013). M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci*, 16(9), 1211-1218. doi: 10.1038/nn.3469

Muralidharan, S., & Mandrekar, P. (2013). Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. *J Leukoc Biol*, 94(6), 1167-1184.

Nagasawa, K., Chiba, H., Fujita, H., Kojima, T., Saito, T., Endo, T., & Sawada, N. (2006). Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells. *J Cell Physiol*, 208(1), 123-132.

Nakagawa, S., Kim, J. E., Lee, R., Malberg, J. E., Chen, J., Steffen, C., . . . Duman, R. S. (2002). Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci*, 22(9), 3673-3682.

Nehrt, A., Rodgers, R., Shapiro, S., Borgens, R., & Shi, R. (2007). The critical role of voltage-dependent calcium channel in axonal repair following mechanical trauma. *Neuroscience*, 146(4), 1504-1512.

Nieto-Diaz, M., Esteban, F. J., Reigada, D., Munoz-Galdeano, T., Yunta, M., Caballero-Lopez, M., . . . Maza, R. M. (2014). MicroRNA dysregulation in spinal cord injury: causes, consequences and therapeutics. *Front Cell Neurosci*, 8, 53.

Nikoletopoulou, V., Plachta, N., Allen, N. D., Pinto, L., Gotz, M., & Barde, Y. A. (2007). Neurotrophin receptor-mediated death of misspecified neurons generated from embryonic stem cells lacking Pax6. *Cell Stem Cell*, 1(5), 529-540.

Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. NOM. 062-Z00-1999.

Novak, M. L., & Koh, T. J. (2013). Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. *Am J Pathol*, 183(5), 1352-1363.

Obermeier, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*, 19(12), 1584-1596.

Okada, S., Nakamura, M., Mikami, Y., Shimazaki, T., Mihara, M., Ohsugi, Y., . . . Okano, H. (2004). Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J Neurosci Res*, 76(2), 265-276.

Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.

Olmez, I., Ozyurt, H. (2012). Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. *Neurochemistry International*, 60:208–212.

Olsen, R. W., & Li, G.-D. GABAA receptors as molecular targets of general anesthetics: identification of binding sites provides clues to allosteric modulation. *Canadian Journal of Anaesthesia*. 2011. 58(2), 206–215.

Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K., Maekawa, M. (2008). Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells* 26, 1663–1672.

Oyinbo, C. A. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp*, 71, 18.

Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 87(1), 315-424.

Pardini C. Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal. In: Secretaría de Salubridad y Asistencia, México, 1998.

Park, S., Park, K., Lee, Y., Chang, K. T., & Hong, Y. (2013). New Prophylactic and Therapeutic Strategies for Spinal Cord Injury. *J Lifestyle Med*, 3(1), 34-40.

Peng, H., Huang, Y., Rose, J., Erichsen, D., Herek, S., Fujii, N., . . . Zheng, J. (2004). Stromal cell-derived factor 1-mediated CXCR4 signaling in rat and human cortical neural progenitor cells. *J Neurosci Res*, 76(1), 35-50.

Pérez, Galicia, Pardini, Ibarra, Renan. Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal de 1993 a 1997. Tesis de postgrado en Medicina de Rehabilitación. Secretaría de Salud. 1998.

Ransohoff, R. M., & Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 12(9), 623-635.

Raposo, C., Graubardt, N., Cohen, M., Eitan, C., London, A., Berkutzki, T., & Schwartz, M. (2014). CNS repair requires both effector and regulatory T cells with distinct temporal and spatial profiles. *J Neurosci*, 34(31), 10141-10155.

Ray, S.K., Dixon, C.E., & Banik, N.L. (2002). Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Histol Histopathol* 17: 1137–1152.

Rico, G., Diaz-Guerra, O., Gimenez-Scherer, J. A., & Kretschmer, R. R. (1992). Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leukocytes. *Arch Med Res*, 23(2), 157-159.

Rico, G., Leandro, E., Rojas, S., Gimenez, J. A., & Kretschmer, R. R. (2003). The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitol Res*, 90(4), 264-267.

Ross Michael H, Pawlina Wojciech. (2011). *Histology- A text and atlas with correlated cell and molecular biology*. 6 ed. Lippincott. 101, 352.

Rosignol, S., Schwab, M., Schwartz, M., Fehlings, G. (2007). Spinal Cord Injury: Time to Move?. *J Neurosci*, 27: 11782–11792.

Sadowsky, C., Volshteyn, O., Schultz, L., & McDonald, J. W. (2002). Spinal cord injury. *Disability and Rehabilitation*, 24(13), 680-687.

Sakayori, N., Kikkawa, T., & Osumi, N. (2012). Reduced proliferation and excess astrogenesis of Pax6 heterozygous neural stem/progenitor cells. *Neurosci Res*, 74(2), 116-121.

Scheff S. W., Saucier D. A., Cain M. E, "A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score," *Journal of Neurotrauma*, vol. 19, no. 10, pp. 1251–1260, 2002.

Schumacher, A. M., Velentza, A. V., Watterson, D. M., & Dresios, J. (2006). Death-associated protein kinase phosphorylates mammalian ribosomal protein S6 and reduces protein synthesis. *Biochemistry*, 45(45), 13614-13621.

Schumacher, A. M., Velentza, A. V., Watterson, D. M., & Wainwright, M. S. (2002). DAPK catalytic activity in the hippocampus increases during the recovery phase in an animal model of brain hypoxic-ischemic injury. *Biochim Biophys Acta*, 1600(1-2), 128-137.

Selassie, A.W., Varma, A., Saunders, L.L., Welldaregay, W. (2013). Determinants of in-hospital death after acute spinal cord injury: a population-based study. *Spinal Cord*, 51(1), 48-54.

Sharma, H. S. (2010). A combination of tumor necrosis factor-alpha and neuronal nitric oxide synthase antibodies applied topically over the traumatized spinal cord enhances neuroprotection and functional recovery in the rat. *Ann N Y Acad Sci*, 1199, 175-185.

Silva-Garcia, R., & Rico-Rosillo, G. (2011). Anti-inflammatory defense mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *Inflamm Res*, 60(2), 111-117.

Silva-Garcia, R., Estrada-Garcia, I., Ramos-Payan, R., Torres-Salazar, A., Morales-Martinez, M. E., Arenas-Aranda, D., Gimenez-Scherer, J. A., Blanco-Favela, F., Rico-Rosillo, M. G. (2008). The effect of an anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica* on gene expression in the U-937 monocytic cell line. *Inflamm Res*, 57(4), 145-150.

Silva-García, R., Morales-Martínez, M. E., Blanco-Favela, F., Torres-Salazar, A., Ríos-Olvera, J., Garrido-Ortega, M. R., Tesoro-Cruz, E., Rico-Rosillo, G. (2012). The Monocyte Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) Produced by *Entamoeba histolytica* Alters the Expression of Genes Related to the Wound-Healing Process. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 18(4), 391-401.

Simonishvili, S., Jain, M. R., Li, H., Levison, S. W., & Wood, T. L. (2013). Identification of Bax-interacting proteins in oligodendrocyte progenitors during glutamate excitotoxicity and perinatal hypoxia-ischemia. *ASN Neuro*, 5(5), e00131.

Snell Richard S. *Neuroanatomía Clínica*. 2014 pp540 Lippincott. 7a Ed.

Tanhoffer, R. A., Yamazaki, R. K., Nunes, E. A., Pchevozniki, A. I., Pchevozniki, A. M., Nogata, C., Aikawa J, Bonatto, J.S., Brito, G., Fernandes, L. C. (2007). Glutamine concentration and immune response of spinal cord-injured rats. *J Spinal Cord Med*, 30(2), 140-146. Fernandes CL (2007

Thuret, S., Moon, L.D., Gage, F.H. (2006). Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*, 7: 628-43.

Tian, D. S., Xie, M. J., Yu, Z. Y., Zhang, Q., Wang, Y. H., Chen, B., Chen, C., Wang, W. (2007). Cell cycle inhibition attenuates microglia induced inflammatory response and alleviates neuronal cell death after spinal cord injury in rats. *Brain Res*, 1135(1), 177-185.

Titsworth, W. L., Liu, N. K., & Xu, X. M. (2008). Role of secretory phospholipase a(2) in CNS inflammation: implications in traumatic spinal cord injury. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 7(3), 254-269.

Utrera-Barillas, D., Velazquez, J. R., Enciso, A., Cruz, S. M., Rico, G., Curiel-Quesada, E., Teran, L. M., Kretschmer, R. R. (2003). An anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica* down-regulates the expression of pro-inflammatory chemokines. *Parasite Immunol*, 25(10), 475-482.

Velazquez, J. R. (2011). The Monocyte Locomotion Inhibitory Factor an anti-inflammatory peptide; therapeutics originating from amebic abscess of the Liver. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, 5, 6.

Weber, J. T. (2004). Ca²⁺ homeostasis following traumatic neuronal injury. *Curr. Neurovasc. Res.* 1, 151–171.

Whalley, K., O'Neill, P., & Ferretti, P. (2006). Changes in response to spinal cord injury with development: vascularization, hemorrhage and apoptosis. *Neuroscience*, 137(3), 821-832.

Wilson, J. R., & Fehlings, M. G. (2014). Riluzole for acute traumatic spinal cord injury: a promising neuroprotective treatment strategy. *World Neurosurg*, 81(5-6), 825-829.

Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M., Carling, D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab*, 2(1), 21-33.

Wu, B., Ren, X. (2009). Promoting axonal myelination for improving neurological recovery in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 26: 1847–1856.

Xie, J., & Guo, Q. (2004). AATF protects neural cells against oxidative damage induced by amyloid beta-peptide. *Neurobiol Dis*, 16(1), 150-157.

Xie, J., & Guo, Q. (2004). AATF protects neural cells against oxidative damage induced by amyloid beta-peptide. *Neurobiol Dis*, 16(1), 150-157.

Yang, Y. H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D. M., Peng, V., Ngai, J., & Speed, T. P. (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust compositemethod addressing single andmultiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Research*, 30(4).

Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.J., Wu, Y.P.W., Chen, W.S. (2012). Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. *Indian J Med Res*, 135.

Zhao, H., Zhang, Q., Xue, Y., Chen, X., & Haun, R. S. (2011). Effects of hyperbaric oxygen on the expression of claudins after cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Exp Brain Res*, 212(1), 109-117.

Zhao, W., Fan, G. C., Zhang, Z. G., Bandyopadhyay, A., Zhou, X., & Kranias, E. G. (2009). Protection of peroxiredoxin II on oxidative stress-induced cardiomyocyte death and apoptosis. *Basic Res Cardiol*, 104(4), 377-389.

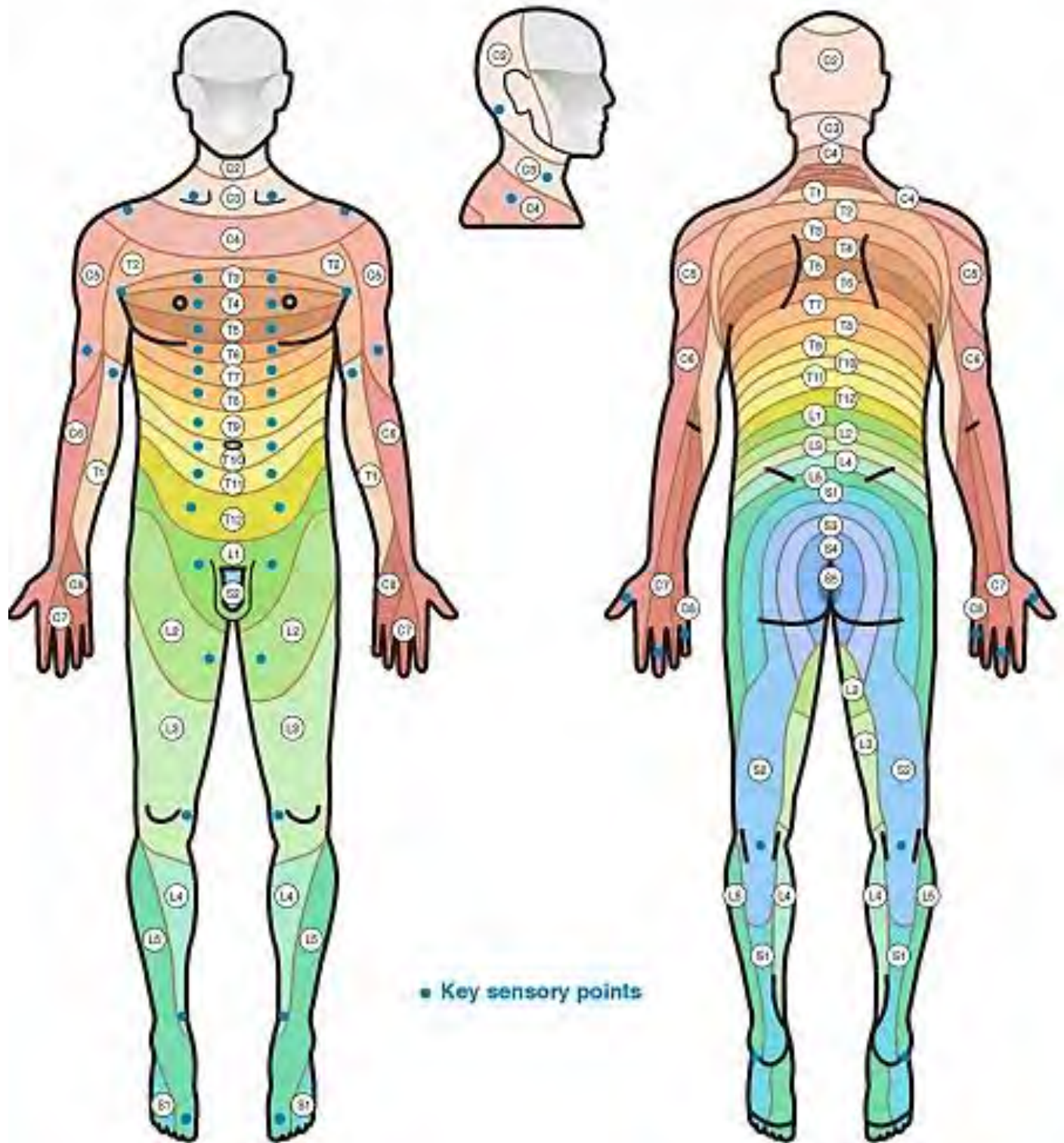
Zhou, Z., Peng, X., Insolera, R., Fink, D. J., & Mata, M. (2009). IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury. *Exp Neurol*, 220(1), 183-190.

Zhu, Y., Soderblom, C., Krishnan, V., Ashbaugh, J., Bethea, J. R., & Lee, J. K. (2015). Hematogenous macrophage depletion reduces the fibrotic scar and increases axonal growth after spinal cord injury. *Neurobiol Dis*, 74, 114-125.

Anexos

Anexo 1 – Carta dermatomo

<http://www.spinalhub.com.au/what-is-a-spinal-cord-injury/what-happens-to-the-spinal-cord-after-injury/spinal-nerves-up-close>



Anexo 2 – Escala BBB

Se evalúa la amplitud de movimiento como amplio, limitado y ausente, en las articulaciones tobillo, rodilla y cadera de acuerdo a la escala descrita por Basso, Beat

0.- No se observa movimiento en patas traseras (PT).

1. Movimiento limitado (arco < 50%) de una o dos articulaciones, usualmente cadera y/o rodilla.
2. Movimiento amplio (arco > 50%) de una articulación con o sin movimiento limitado de la otra.
3. Movimiento amplio de dos articulaciones.
4. Movimiento limitado de las tres articulaciones de PT (cadera, rodilla y tobillo).
5. Movimiento limitado de dos articulaciones y amplio de la tercera.
6. Movimiento amplio de dos articulaciones y limitado de la tercera.
7. Movimiento amplio de las tres articulaciones de PT (cadera, rodilla y tobillo).
8. Movimiento rítmico (coordinado) de ambas PT sin soporte de peso o colocación de la planta pero sin soportar peso.
9. Colocación plantar con soporte de peso, no está caminando, pasos ocasionales (< ó = al 50%), frecuentes (51% a 94%), o constantes (95% a 100%), con soporte de peso dorsal, sin apoyo plantar.
10. Pasos ocasionales con soporte de peso plantar, sin coordinación entre patas delanteras (PD) y PT.
11. Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar, sin coordinación entre PD y PT.
12. Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar y coordinación ocasional entre PD y PT.
13. Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar y coordinación frecuente entre PD y PT.
14. Constantemente da pasos con soporte de peso plantar, coordinación constante entre PD y PT, y hay rotación interna o externa de la pata, principalmente al hacer contacto con el piso o al despegar. También pasos plantares frecuentes, coordinación constante entre PD y PT y pasos dorsales ocasionales.
15. Pasos plantares y coordinación entre PD y PT constantes. No separa los dedos o solo ocasionalmente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predominio la alineación paralela de la pata al cuerpo.
16. Pasos plantares y coordinación entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre frecuentemente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predominio la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero la rota al levantarla.
17. Lo mismo (núm. 16) pero al levantar la pata la mantiene alineada (sin rotar).
18. La separación de los dedos es constante durante la marcha. Al hacer contacto con el piso predominio la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero la rota al levantarla.
19. Pasos plantares y coordinación entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre constantemente durante la marcha. Al hacer contacto con el piso y levantar, predominio la alineación paralela de la pata al cuerpo. Arrastra la cola parte o todo el tiempo.
20. Pasos plantares, marcha coordinada y separación de dedos constantes. Al hacer contacto con el piso y levantar, predominio la alineación paralela de la pata al cuerpo, cola levantada constantemente e inestabilidad del tronco.
21. Igual pero tronco constantemente estable.

Anexo 3 – Listas de genes modificados en microarreglos

Tabla A1.1 – Genes del grupo Ina sobre-expresados en microarreglos

Abcb6	Cnn3	Gck	Kcnk6	Myh13	Preb	Sncb
Acaa	Col3a1	Gcnt1	Kcnn3	Myh8	Prkch	Snf1lk
Acaa2	Crfg	Gdf8	Kcnn4	N5	Prlph	Snx1
Acadm	Crhr2	Gdi3	Kif1b	Nbn	Prlpk	Spag5
Acadvl	Crn	Glcl	Kif2	Ncoa3	Prlpl	Spin2b
Acatn	Csda	Gira1	Kl	Nefh	Pros1	Spnb1
Acrp30	Cspg6	Glul	Klrc1	Neo1	Prss11	Spnr
Actr3	Ctcf	Gmeb2	km23	Npgpr	Pscd3	Srm
Adcy8	Ctsk	Gmpr	Kpna2	Nppa	Psg4	Ssb
Adk	Cyp4b1	Gnaq	Kzf1	Nppb	Psma2	Ssg1
Adnp	Dat1	Gpm6b	Laptm5	Nr1h4	PSMD1	Ssr3
Aes	Dck	Gria1	LI5	Nt5	Ptger1	Sstr2
AF095927	Ddb1	Grid2	LOC170927	Nudt6	Ptk2	Stat3
Ak2	Ddr2	Grin2a	LOC171057	NVP-2	Ptprf	Stat5a
Alb	Ded	Gro1	LOC171552	NX-17	Ptprz1	Stx4a
Aldh1a3	Dll1	Grp-Ca	Loc192269	Oas1	Rab3a	Stx7
Amy1	Dnase1	GstYb4	LOC192649	Obp-1f	Rab4b	Sult1a2
Aox1	Doc2b	Gtf2ird1	LOC207125	Ol1	rACH	Sult2a1
Ap1g1	Dpep1	Gtrap3-18	LOC245923	Pacsin1	Rgs19	SVCT2
Aqp3	Dpp6	Hfb2	LOC245926	Pai1	Rhoip3	Sycp1
Arntl	Drd1a	HIBADH	LOC246120	Papin	Roaz	Sycp3
Ascl1	Drg11	Hist4	LOC246172	Parva	Robo1	Syt13
Ascl3	Drpla	Hmgb1	LOC246281	Past-A	Rok1	Syt2
Avil	Dspp	Hnmt	Loc259269	Pax4	Rpl29	Syt7
b5&b5R	Ecac1	Hnrpm	LOC60627	Pax6	Rpl37	Sytv
Bambi	Ecm2	Hpgd	LOC60660	Pclo	Rpl4	Tat
Barhl2	Ecd7	Hsd17b2	LOC63849	Pcsk4	Rps24	Tcam1
Bcl2	Eef1d	Hspb2	LOC63880	Pctk1	Rps27a	Tcp1
Bcl2l10	Egr2	Hspb3	Loc65027	Pdc	Rps6kb1	Tgfa
Bin1	Ehd3	Ick	LOC66030	Pdcd4	Rtn1	Tlbp
Bmp1	Els1	Idh3g	Lpl	Pde4b	Ruvbl1	Tmf1
Cacna1g	Entpd6	Ieda	Lrrc3	Pde4d	Sc65	Tmod2
Camk2a	Ep300	Ighmbp2	Lsamp	Pde6g	Scdgb	Tnfsf10
Cav2	F10	Igsf6	Lxn	Pdhal	Scg2	Tnfsf4
Cckar	Fabp1	Il15	Lypla1	PDRP	Scn11a	Tpx1
Ccnh	Fbln5	Il18	Lyst	Pfkfb1	Scn3a	Trdn
Cdc42bpb	Fcna	Il1a	Lyz	Pigm	Scnn1b	Trip15
Cdc5l	Fgfr2	Il1r2	Mafk	pips	Scyc1	Trrp2
Centa1	Flg	Il5	Map3k8	Pkcl	Sfrs10	Trrp6
Cgm1	Fmo4	Il6st	Matr1	Pla2g2a	Sgpl58	Tslpr
Chm-1	Fxyd1	Irs1	Mbl2	Plp	Sh3d2a	Tubb3
Chrna7	Fxyd5	Itga2	Mefv	Plscr1	Si	Tubb4
Chrna9	Fzd9	Itgb7	Mfn1	Pmch	Sirt2	Txn
Chrnd	Gab2	Jdp1	Mllt3	Pmf31	Skd3	Ua20
Chx4	GABABL	Jwa	Mmp11	Ppal	Slc27a2	Uchl3
Cish	Gabra5	KChIP4	Mmp12	Ppap2a	Slc30a4	Vegfc
Cktsf1b1	Gabrq	Kcnb1	Mpdz	Ppp2cb	Slc6a5	Vsp45a
Clcnk1	Gabbr1	Kcnc1	Mre11a	Ppp3cb	Slc9a3r2	Wisp2
Cldn1	Gabt4	Kcne3	Msra	Ppy	Slc9a5	Wt1
Cml5	Galgt1	Kcnj15	Muc5ac	Prdx2	Smgb	Xdh
Cncg4	Gasz	Kcnk3	Mvp	Prdx4	Snap23	

Tabla A1.2 – Genes del grupo Ina sub-expresados en microarreglos

5Ht-2	Cacng6	Egfr	Hsd17b1	Mertk	Prei3	Slc34a1
A5D3	Calcyon	Eif2b2	Hsf1	Mfge8	Prelp	Slc3a2
Abca2	Cap2	Emd	Hsp27	Mgat1	Prkcl1	Slc8a3
Abcc6	Capns1	Epas1	Hspbp1	Mgat2	Prot	Sifn4
Acads	Cat	Epim	Hspt70	Mgp	Prpg2	Snrpb
Acp5	Cblb	Erbp2	Htr1a	Mln51	Prx	Snrpn
Acta1	Cck	Evl	Htr1b	Mmp14	Pscd2	Spna2
Actg2	Ccnl	Expi	Htr6	Mmp24	Ptger4	Spr
Adra1d	Cd3d	F13a	Icam1	Mox2	Ptgis	Src
Agt	Cd8b	Faim	Igf2r	Mpst	Ptk2b	Srrp86
Ahcy	Cdc37	Fbxl2	Igfbp	Mras	Ptpn9	St14
Ak1	Cdc42	Fhl2	Il12a	Mucdhl	Ptprj	Stk17b
Akap	Cdrap	Fn1	Il2ra	Munc13-4	Pts	Stk2
Alcam	Celsr3	Fth1	Insl3	Mybbp1a	Pv1	Stnl
Aldh2	Chp	Fuca	Itgb1	Myh3	Pvrl1	Stx2
Aldoc	Clns1a	Fut1	Itpkb	Myh9	Pxmp2	Syk
Alox12	Cltc	Fxyd2	Jun	Myo1b	Qscn6	Syn3
Ank	Cnr2	Fxyd4	Kcna2	NCAML1	Rab38	Syng2
Anx1	Cntnap1	Gabbr1	Kcnh3	Nedd8	Rab3d	Syt5
Apbb1	Coil	Gabrp	Kcnk12	Ninj2	Rabac1	T2R3
Apoa2	Col1a2	Gabbr2	Kcnk2	Notch3	Rad50	Tap1
Araf1	Col5a1	Galr3	KIAA1536	Npff	Ragb	Tef
Arf1	Comp	Gap43	Klf15	Nptxr	RATCYTA	Temo
Arf5	Cox8a	Gata6	Klk1	Nr1h2	Retnla	Tf
Arg1	Cox8h	Gc	Lamc1	Nr2f2	Rnd2	Tff3
Arl4	Cript	Gcdp	Lhx1	Nrn	Rnh1	Tg
Arnt2	Crmp1	Gcs1-	Lin10	Nucb	Rph3al	Thbd
Arsb	Csh1v	pending	LOC170824	Nup62	Rpo1-2	Thop1
Asic4	Csnk1d	Gfi1	Loc192280	Okl38	Rps14	Tnni1
Aspa	Cst6	Gfra1	Loc192352	Olfm1	Rps27	Tpi1
Atf2	Cst8	Ggh	LOC245919	Omp	RS21-C6	Tpm4
Atp1a3	Ctrb	Gja4	LOC246325	Opn1sw	Ry2d1	Tst
Atp2b3	Cxcr4	Gjb1	LOC252855	Opn4	Sacm2l	Ttgn1
Atp4b	Cycs	glb	LOC252882	Oxt	Sarcosin	Txn2
Atp5a1	Cyp11a	Glp1r	LOC252960	P2ry6	SC2	U83883
Atp5o	Cyp17	Gp38	LOC259228	Pal	Scamp2	U91561
Atp6s14	Cyp2c22	Gpc1	LOC56826	Par3	Scd2	Ube2i
B2m	Cyslt2	Gpr30	LOC60383	Pcscl	Scn5a	Uchl1
Bach	Dagk	Gpr54	LOC64027	Pcsk2	Scp2	Ugt1a6
Bax	Dbnl	Gpr83	Loc65042	Pde1c	Sdc2	Ugt1a7
Bcl2l	Dcc	Gpr85	LOC78973	Pkfb4	Sdf1	Upa
BEGAIN	Dctn4	Grin1	Ltb4r2	Phkg1	Sepp1	Vamp3
Bfsp1	Ddc	Grm2	Lu	Pht2	Serpina1	Vamp5
Bmp3	Ddxl	Grpr	Madh5	Pip5k2b	Shbg	Wbp2
Bok	Den	Gstt1	Map2	Pitx1	Siat1	Wbscr14
Btg2	Dgkg	Hamp	Mapk3	Pitx2	Six3	Wispl
Bzrp	Dig1	Hdac3	Mapk8ip	Pitx3	Slc18a3	Wmp1
C4	Dio3	Hhex	Marta1	Plcg2	Slc19a1	Xt1
Ca5a	Dlc2	Hig1	Mbp	Plec1	Slc20a2	Ywhah
Cacna1b	Dusp6	Hmgcl	Mcpt1	Plod	Slc21a5	Zfp103
Cacna1s	Dvl1	Hnf3b	Mdhl	Pomc2	Slc21a9	Zfp36
Cacnb1	Echs1	Hoxa2	Mdk	Pou2f1	Slc25a1	Zhx1
Cacng1	Edg5	Hrg	Meox2	Pr	Slc2a8	Zyx

Tabla A2.1 – Genes del grupo 3a sobre-expresados en microarreglos

Abcb6	Coro1a	Fxyd5	Irs1	Mvp	Preb	Smpd3
Acaa2	Cox5a	Fzd9	Kcnb1	Myh13	Prim1	Smstr2
Acadm	Cox5b	G10	Kcnc1	Myh8	Prkch	Snap23
Acatn	Creb1	G22p1	Kcnj1	Myr4	Prlpi	Snca
Adcy8	Crhr2	Gab2	Kcnj3	Nbn	Pros1	Sncb
Adk	Crn	GABABL	Kcnj5	Ncoa3	Prss11	Sncg
Adora3	Csda	Gabrq	Kcnk1	Nefh	Psen1	Snx1
Aes	Csp	Gabt4	Kcnk3	Nf1	Psma2	Sost
Afar	Cspg6	Galnt7	Kcnk6	Nfya	Psmb8	Spnb1
Agc1	Csrp1	Gck	Kcnn2	Nme1	Psmc1	Srm
Ak2	Ctcf	Gdf8	Kcnn3	Nmt1	Ptger1	Ssb
Akt1	Ctf1	Gdi3	Kcnn4	Npgpr	Pthlh	Ssg1
Aldh1a3	Ctsj	Ggta1	Kif1b	Npl4	Ptprf	Ssr3
Amacr	Ctxn	Glul	Kl	Nppa	Ptprz1	Sstr2
Amy1	Cyp4b1	Gmeb2	Klrc1	Nppb	Rab3a	Stat5a
Andpro	Cyp7b1	Gmpr	ksGC	Nr1h4	Rab4b	Sts
Anpep	Dctn1	Gnaq	Laptm5	Nr2f1	Rab5a	Stx7
Ant2	Ddah1	Gnb2l1	Lepr	Nrd1	rACH	Sult2a1
Aox1	Ddb1	Gnrh1	Lgals2	Nsf	Rbp2	SVCT2
Ap1g1	Ddr1	Gp5	Lisch7	Nt5	Rcvrn	Svs4
Arntl	Dlad	Gpc3	LI5	Nudt6	Ret	Syt2
Ascl1	Dll1	Gpm6b	LOC170927	NVP-2	Rhoip3	Syt6
Ascl3	Dlm1	Grid2	LOC192649	Nxph3	Rln1	Syt7
Atp5f1	Dnase1	Grin2a	LOC207121	Oas1	Rnase4	Sytv
Avil	Doc2b	Grin1a	LOC245923	Obp-1f	Roaz	Tcam1
b5&b5R	Dpep1	Grs2	LOC245926	Ol1	Robo1	TCEB2
Bace	Dpp6	Gtf2ird1	LOC246120	P2rx4	Rpl28	Tcp1
Barhl2	Dspp	Gtrap3-18	LOC246172	Pacsin1	Rpl29	Tdag
Bet1	Ecac1	Gusb	LOC54410	Pah	Rpl37	Tgfa
Bin1	Ecm2	Gzmc	LOC59313	Pai1	Rpl4	Tlbp
Bmp1	Edg7	Hdgfrp2	LOC60428	PAIHC3	Rps24	Tmod2
Bmp4	Ednra	Hdh	LOC60591	Papin	Rps27a	Tnfsf10
bsnd	Eef1d	Hk1	LOC60660	Parva	Rps6kb1	Tnfsf4
Cacna1g	Egr2	Hmgb1	LOC63880	Past-A	Rsn	Tp63
Cacna1i	Ela2	Hnmt	Loc65027	Pax6	Rtn1	Tpm3
Cacng2	Els1	Hnrpm	Lpl	Pax8	Ruvbl1	Tpx1
Calcb	Ensa	Hpgd	Lta	Pclo	Sacm11	Trdn
Calm2	Ephb2	Hspb2	Ly49i2	Pcsk4	Scg2	Trrp6
Camk2a	Eya2	Hspb3	Lyst	Pctk1	Scn3a	Tslpr
Ccnh	F10	Ick	Maf	Pdc	Scnn1b	Tubb4
Cd36l1	Fabp1	Idh3g	Map3k8	Pdcd4	Scyc1	Ua20
Cd59	Fabp7	Idi1	Matr1	Pde4d	Sdfr1	Ube2d3
Cdc42bpb	Facl6	Ieda	Mbl2	Pik3c3	Secp43	Ubqln1
Cds2	Fbln5	Igbp1	Mcpt9	pips	Serpini1	Uchl3
Cebpb	Fcna	Ighmbp2	Mmp11	Plscr1	Sfrs10	Unc5h2
Chm-1	Fgf17	Igsf6	Mmp12	Por	Sh3d2a	Vcsa1
Chrna10	Fgf3	Il12b	Mor1	Pou3f1	Skd3	Vof16
Chrna7	Fgfr2	Il15	Mpp3	Ppap2a	Slc11a1	Vsp45a
Chrnd	Fgfr3	Il1a	Mre11a	Ppp2cb	Slc13a3	Wt1
Cish	Fhit	Il1r2	Ms4a1	Ppp3cb	Slc30a4	Ykt6-
Cktsf1b1	Flg	Il5	Msh2	Prdx1	Slc4a4	pending
Cldn1	Fut2	Il6st	Msra	Prdx2	Slc7a2	Znf148
Cncg4	Fxyd1	Inhbc	Muc5ac	Prdx6	Slc9a5	

Tabla A2.2 – Genes del grupo 3a sub-expresados en microarreglos

5Ht-2	Calcyon	E2f5	Hsd3b1	Mic2l1	Pnma1	Slc29a2
Abca2	Capn3	Edg5	Hsf1	Mmp13	Pomc2	Slc2a8
Abcb9	Capn6	Egfr	Hsp27	Mmp24	Pou2f1	Slc34a1
Abcc6	Capns1	Eif2b2	Hspbp1	Mox2	Ppp3ca	Slc3a2
Abp1	Casp12	Emd	Htr1a	Mpst	Pr	Slc4a2
Acads	Casp9	Epim	Htr4	Mras	Prelp	Slc8a1
Acp5	Cat	Erbp2	Il11ra1	Msn	Prkcl1	Slc8a3
Actc1	Cblb	Esr2	Il2ra	Mte1	Prmt3	Slc9a2
Actg2	Cbs	Evl	Insl3	Munc13-4	Prot	Slc9a3
Ada	Ccnl	Expi	Itgb1	Myo1b	Pscd2	Smoh
Adam1	Cd3d	Fads1	Kcnab1	Nbl1	Psmc1	Snrpb
Adra1d	Cd8b	Faim	Kcnh3	Nfix	Psmc1	SP22
Akap	Cdc42	Fbxl2	Kcnj6	Ninj2	Psme2	Spin2c
Alcam	Cdh14	Fgf11	Kcnk4	NOR-2	Ptger2	Spna2
Aldh2	Cdk7	Fgr	KIAA1536	Npff	Ptger4	Spnb3
Aldoa	Cdrap	Fhl2	Klf15	Nptxr	Ptgis	Spr
Alk7	Ceacam1	Fmo1	Klk1	Nr1d1	Ptpn9	Srrp86
Ank	Celsr3	Fn1	Lamc1	Nr1h2	Ptprj	St14
Anx5	Chad	Fnta	Ldhd	Nr1i2	Pts	Stx2
Apbb1	Chp	Folh1	Lin10	Nr1i3	Pv1	Stxbp2
Arf1	Clns1a	Fut1	Lipe	Nr4a1	Qscn6	Svs5
Arf5	Cltc	Fxyd4	Litaf	Nr5a2	Rab3d	Syng1
Arf6	CMR1	Gabarap	LOC171412	Nucb	Rabac1	Syng2
Arg1	Cnr2	Gapds	Loc192280	Nup62	Rad50	Syt10
Asic4	Col1a2	Gatm	Loc192352	Nupr1	Retnla	Syt12
Aspa	Col5a1	Gc	LOC245919	Ocln	Rgs19ip1	Syt4
Atf2	Cpn1	Gcdp	LOC246325	Okl38	Rnpep	Syt5
Atic	Cript	Gcs1-	LOC252853	Omp	RNU28927	T2R3
Atp1a3	Crmp1	pending	LOC259228	Opn1sw	Rph3al	Tacstd1
Atp2b3	Crygd	Ggh	LOC259245	Opn4	Rpo1-2	Temo
Atp6l	Cs	Gja4	LOC60329	Oprm1	Rps27	Tf
Atp6s14	Cspg2	Gjb4	LOC60383	Oxt	Rps9	Tff3
Atp9a	Cst8	Gjb6	LOC60452	P29	RS21-C6	Tgfb1
Avpr2	Ctrb	glb	LOC64027	P2rx1	Ry2d1	Tgm2
Baalc	Cyp17	Glp1r	LOC64038	P2ry6	S100a10	Thbd
Bach	Cyp2a3a	Gna15	Lrp2	Pcscl	Sardh	Thop1
Bcl10	Cyp2c39	Gpr30	Madh5	Pcsk2	Scd2	Timm10
Bcl2l	Cyslt2	Gpr54	Mag	Pcsk5	Scn5a	Timp2
BEGAIN	Dapkl	Gpr66	Map1a	Pctp	Sdf1	Txn2
Bin1b	Dcc	Gpr85	Mapk3	Penk-rs	Sec22a	U83883
Bzrp	Dctn4	Gps1	Mapk8ip	Pex6	Sepp1	U91561
C1qbp	Ddc	Grik4	Mapre1	Pfkfb4	Serpina1	Ube2i
C2ta	Ddx25	Grin1	Mbp	Phkg1	Siahbp1	Ucp2
C4	Dedd	Grm2	Mbpa	Pht2	Sirt6	Ugt1a6
Ca5a	Des	Grpr	Mcpt1	Pim3	Slc16a10	Vamp3
Cacna1c	Dffa	Gucy2e	Mdhl	Pip5k2b	Slc16a8	Vdup1
Cacna1s	Dffb	Hcn3	Mdk	Pitx1	Slc19a1	Wisp1
Cacnb1	Dgkg	Hdac3	Mertk	Pitx2	Slc20a2	Ywhah
Cacnb2	Dig1	Hhex	Mfge8	Plcg2	Slc21a12	Zfp103
Cacng1	Drd5	Hoxa1	Mfn2	Plin	Slc21a5	Zhx1
Cacng6	Dusp6	Hsd11b1	Mgat1	Plod	Slc25a1	
Calcr	Dyrk	Hsd17b1	Mgat3	Pnli1prp1	Slc29a1	

Tabla A3.1 – Genes del grupo 7a sobre-expresados en microarreglos

Abcb6	Cir12	Fzd1	Il7	Muc5ac	Ppp2cb	Spnb1
Acaa2	Cir13	Fzd9	Imp13	Mvp	Ppp3cb	Srm
Acadm	Clcnk1	G10	Inhbc	Myh13	Prdx2	Ssb
Acatn	Cldn1	G22p1	Irs1	Myh4	Prdx4	Ssg1
Acrp30	Cml1	Gab2	Jag1	Myh8	Preb	Ssr3
Acvr1	Cox6a2	GABABL	Jam1	Myr4	Prkch	Sstr2
Adamts4	Crn	Gabrq	Jdp1	N5	Prlpd	Stat5a
Adcy8	Csda	Gabt4	Jwa	Nat2	Prlpl	Stk3
Adk	Csp	Galnt7	KChIP4	Nbn	Prlpm	Stx3a
Aes	Cspg6	Gasz	Kcnb1	Ncoa3	Prosl	Stx4a
Afar	Csrp1	Gck	Kcnc1	Nefh	Prss11	Stx7
Agtr1	Cst11	Gcnt1	Kcne3	Nell1	Psen1	Sult1a2
Aldh1a3	Ctcf	Gdf8	Kcnj15	Nf1	Psmb8	Sult2a1
Ank3	Ctsj	Gdi3	Kcnj3	Nfya	Psme1	SVCT2
Ant2	Ctsk	Ggta1	Kcnj5	Nifs	Ptprz1	Svop
Aox1	Ctxn	Ggtp	Kcnk3	Nmt1	Rab3a	Svs4
Ap1g1	Cutl1	Gja6	Kcnk6	Npgpr	Rab4b	Syt2
Ap2m1	Cyp2c23	Glc1c	Kcnn2	Npl4	rACH	Syt7
Api3	Dctn1	Gmcb2	Kcnn4	Nr1h4	Raf1	Tat
Aqp3	Ddr1	Gmpr	Kidins220	Nr2f1	Ramp2	Tcam1
Arha2	Ddr2	Gnaq	Kif1b	Nrd1	Rbbp9	TCEB2
Arhgef9	Dlad	Gnb2l1	Kl	Nsf	Rb2	Tcf8
Arntl	Dll1	Gnrh1	Kpna2	Nt5	Rdc1	Tcp1
Ascl3	Dlm1	Gp5	Lgals2	Nudt6	Rgs3	Tfpt
Asgr2	Dnase1	Gpc3	Lmnb1	NVP-2	Rnase4	Thbs4
Atp5f1	Doc2b	Gpm6b	LOC170927	NX-17	Roaz	Tlbp
Avil	Dpep1	Grf2	LOC171552	Oas1	Rp58	Tmf1
b5&b5R	Dpp6	Grid2	LOC192254	Oazi	Rpl37	Tmod2
Bace	Dpys	Grik1	LOC192649	Ol1	Rpl4	Tnfsf10
Barhl2	Drd1a	Grin2a	LOC245923	Oprs1	Rps15a	Tnfsf4
Bbs2	Drip78	Grin2b	LOC245926	P2rx4	Rps21	Tnp2
Bcl2	Dspp	Grs2	LOC246172	Pacsin1	Rps24	Tp63
Bet1	Dyt1	GstYb4	LOC56764	PAIHC3	Rsca3	Tpm3
Bin1	Ecac1	Gtrap3-18	LOC59313	Papin	Rtn1	Tpx1
Bmp1	Edg7	Hdgfrp2	LOC60591	Parva	Scdgb	Trdn
Bmp4	Ednra	Hdh	LOC63880	Pax4	Scn3a	Trif-
bsnd	Eef1d	Hfb2	LOC81022	Pax6	Scnn1b	pending
C1s	Egr2	Hip1r	Lpl	Pclo	Scya22	Trip15
C3	Ela2	Hmgb1	Lrrc3	Pcsk4	Scyc1	Trrp2
Cacna1g	Enpep	Hmgb2	Lta	Pctk1	Sec14I2	Trrp6
Cacna1i	Ensa	Hmgcr	Ly49i2	Pdc	Sept3	Tslpr
Calcb	Ep300	Hri	Ly68	Pdcd4	Serpini1	Tubb4
Calm2	Esdn	Hsd17b2	Lypla1	Pde3b	Sfrs10	Ua20
Camk2a	Eya2	Hspb2	Lyz	Pde4d	Sh3d2a	Ube2d3
Camkk2	Fabp1	Hspb3	Madcam1	Pdhal	Skd3	Ubqln1
Ccnh	Fabp3	IAG2	Madh4	Pdi2	Slc13a3	Uchl3
Cd36l1	Fbln5	ldh3g	Maf	Pdi4	Slc22a7	Unc13h1
Cd59	Fbxo6b	leda	Matr1	Pdyn	Slc30a4	Usf1
Cdc42bpb	Fcer1a	lfnb1	Mbl2	Pfkfb3	Slc39a1	Vim
Cdh22	Fcna	lgbp1	Mcpt9	Pigm	Slc7a2	Vipr1
Cdk5r	Fdx1	lghmbp2	Mefv	Pik3cb	Slc9a5	Vof16
Cds2	Fgf17	lgsf6	Mmp10	pips	Smpd3	Vsp45a
Cetn3	Fgf18	ll15	Mmp11	Pkm2	Snap23	Wisp2
Cgi-94	Fgfr2	ll18	Mmp12	Plcb4	Snca	Wt1
Cgm1	Flg	ll1a	Mpp3	Plscr1	Sncb	Xylt2
Chm-1	Fut2	ll1r2	Mre11a	Pmch	Sncg	Znf148
Chrna10	Fxyd1	ll5	Ms4a1	Podxl	Snx1	Zp1
Chrna9	Fxyd5	ll6st	Msra	Ppap2a	Sost	

Tabla A3.2 – Genes del grupo 7a sub-expresados en microarreglos

5Ht-2	Calb3	Dusp6	Hes2	Meox2	Ppp1r14a	Slc16a8
A5D3	Calcr1	Dvl1	Hhex	Mertk	Ppp3ca	Slc19a1
Abca2	Calcyon	E2f5	Hrg	Mfn2	Pr	Slc20a1
Abcb9	Capns1	Edg5	Hrh3	Mgat1	Prelp	Slc20a2
Abcc6	Casp12	Ephx2	Hrh4	Mln51	Prklc1	Slc21a5
Acads	Casp9	Epim	Hsd11b1	Mmp24	Prot	Slc21a9
Acat1	Cat	Erbp2	Hsd17b1	Mpst	Prsc1	Slc22a3
Actg2	Cbs	Esr1	Hsf1	Mras	Pscd2	Slc25a1
Adam15	Ccnl	Esr2	Hspbp1	Mte1	Psme2	Slc27a1
Adra1d	Cd3d	Evl	Htr1a	Munc13-4	Ptgdr2	Slc28a2
AF092207	Cd8b	Expi	Htr3a	Myl3	Ptger4	Slc29a2
Akap	Cdc20	Fabp2	Icam1	Nckap1	Ptgis	Slc2a8
Alcam	Cdc37	Fads1	Igfbp1	Nedd8	Ptk2b	Slc3a2
Aldh2	Cdc42	Fbxl2	Igfbp3	Ngfr	Ptprj	Slc4a2
Aldoa	Cdh2	Fgl2	Ii11	Ninj2	Pts	Slc5a7
Anp32	Cdrap	Fhl1	Ii12a	Nkg7	Pvrl1	Slc8a3
Anx5	Chp	Fn1	Ii2ra	Nkrp2	Qscn6	SP22
Appbp1	Chrn2	Fnta	Ii9r	NOR-2	Rab26	Spna2
Araf1	Cish1	Fstl3	Itgb1	Notch3	Rab29	Sqle
Arf5	Cln2	Fut1	Kcnh3	Nptxr	Rab3b	Srrp86
Arnt2	Clns1a	Fxyd2	Kcnj16	Nr1h2	Rab3d	St14
Arpc1a	Cltc	Fxyd4	Kcnj6	Nr1i3	Rabac1	Stk2
Arsb	Cmklr1	G3bp	Kcnn1	Nr2f2	Rad50	Stx6
Asic4	Cnr2	Gabarap	KIAA1536	Nucb	Rb2	Stxbp2
Aspa	Cntnap1	Gabrp	Klf15	Nup62	Retnla	Syng2
Atp1a3	Col5a1	Gabbr2	Klk1	Okl38	Rgs19ip1	Syt12
Atp2b3	Comp	Gale	Ldhd	Omp	Rh	Syt5
Atp4b	Cox6c	Galnt1	Lin10	Opn1sw	Rnh1	T2R3
Atp6s14	Cox8a	Galnt5	LOC170824	Opn4	Rnpep	Tao2
Bach	CPG2	Galr3	LOC171412	Optn	Rph3al	Tap2
Bax	Cpn1	Gc	Loc192280	Oxt	Rpl10	Tcn2p
Bche	Cpz	Gcdp	Loc192352	P2ry6	Rpo1-2	Temo
Bcl10	Cript	Gcs1-	LOC207126	Pcscl	Rps14	Tf
Bcl2l	Crmf1	pending	LOC245960	Pcsk1n	Rps17	Tff2
Bcl2l2	Crygd	Ggh	LOC252853	Pcsk5	Rps27	Tg
BEGAIN	Csnk1d	gis5	LOC252882	Pde1c	RS21-C6	Tgm2
Bfsp1	Cspg2	Gja4	LOC252929	Pde4a	Ry2d1	Thop1
Bin1b	Cst8	glb	LOC259228	Pdk2	S100a10	Timm10
Blr1	Cstb	Glp1r	LOC259245	Penk-rs	Scamp3	Titf1
Bmp15	Ctrb	Glrx1	LOC56826	Pex6	Scamp5	Tnni1
Bmp3	Cybb	Gpam	LOC60329	Pfkfb4	Scn2a1	Tpm4
Bnip3	Cycs	Gpc1	LOC60383	Pht2	Scn5a	Trela
Bzrp	Cyp11a	Gpr30	LOC60452	Pim3	Scp2	Tspan-2
C1qbp	Cyp2a3a	Gpr54	LOC64038	Pip5k2b	Sdf1	U83883
C2ta	Cyp2c22	Gpr83	Lrp2	Pitx1	Sec22a	U91561
Cacna1b	Cyp2c39	Gpr85	Luzp1	Pitx2	Serk2	Ucp2
Cacna1c	Cyslt2	Grik4	Madh5	Plcg2	Serpina1	Ugt1a6
Cacna1s	Dcc	Grin1	Mag	Plin	Siahbp1	Ugt1a7
Cacnb1	Dctn4	Grm2	Map1a	Plod	Sip2-28	Upa
Cacnb2	Ddc	Gstm3	Mbp	Pmpcb	Sirt6	Wmp1
Cacng1	Des	Gucy2e	Mbpa	Pnma1	Six3	Ywhah
Cacng4	Dgkg	Hcrt	Mcpt1	Pomc2	Slc11a2	Zfp103
Cacng6	Drd5	Hdac3	Mdhl	Pou2f1	Slc16a10	Zfp36

Anexo 4 – Descripción de contenido de grupos y subgrupos de diagrama de Venn

Tabla Va – Subgrupo “a”; 331 elementos comunes en "1a", "3a" and "7a"

Sobre-regulados	Gabrq	Nbn	Snx1	Bzrp	Grm2	Pr
	Gabt4	Ncoa3	Spnb1	Cacna1s	Hdac3	Prelp
Abcb6	Gck	Nefh	Srm	Cacnb1	Hhex	Prkcl1
Acaa2	Gdf8	Npgpr	Ssb	Cacng1	Hsd17b1	Prot
Acadm	Gdi3	Nr1h4	Ssg1	Cacng6	Hsf1	Pscd2
Acatn	Gmeb2	Nt5	Ssr3	Calcyon	Hspbp1	Ptger4
Adcy8	Gmpr	Nudt6	Sstr2	Capns1	Htr1a	Ptgis
Adk	Gnaq	NVP-2	Stat5a	Cat	Il2ra	Ptprj
Aes	Gpm6b	Oas1	Stx7	Ccnl	Itgb1	Pts
Aldh1a3	Grid2	Oli1	Sult2a1	Cd3d	Kcnh3	Qscn6
Aox1	Grin2a	Pacsin1	SVCT2	Cd8b	KIAA1536	Rab3d
Ap1g1	Gtrap3-18	Papin	Syt2	Cdc42	Klf15	Rabac1
Arntl	Hmgb1	Parva	Syt7	Cdrap	Klk1	Rad50
Ascl3	Hspb2	Pax6	Tcam1	Chp	Lin10	Retnla
Avil	Hspb3	Pclo	Tcp1	Clns1a	Loc192280	Rph3a1
b5&b5R	ldh3g	Pcsk4	Tlbp	Cltc	Loc192352	Rpo1-2
Barhl2	leda	Pctk1	Tmod2	Cnr2	LOC259228	Rps27
Bin1	lghmbp2	Pdc	Tnfsf10	Col5a1	LOC60383	RS21-C6
Bmp1	lgsf6	Pdcd4	Tnfsf4	Cript	Madh5	Ry2d1
Cacna1g	Il15	Pde4d	Tpx1	Crmp1	Mbp	Scn5a
Camk2a	Il1a	pips	Trdn	Cst8	Mcpt1	Sdf1
Ccnh	Il1r2	Plscr1	Trrp6	Ctrb	Mdhl	Serpina1
Cdc42bpb	Il5	Ppap2a	Tslpr	Cysl2	Mertk	Slc19a1
Chm-1	Il6st	Ppp2cb	Tubb4	Dcc	Mgat1	Slc20a2
Cldn1	Irs1	Ppp3cb	Ua20	Dctn4	Mmp24	Slc21a5
Crn	Kcnb1	Prdx2	Uchl3	Ddc	Mpst	Slc25a1
Csda	Kcnc1	Preb	Vsp45a	Dgkg	Mras	Slc2a8
Cspg6	Kcnk3	Prkch	Wt1	Dusp6	Munc13-4	Slc3a2
Ctcf	Kcnk6	Pros1		Edg5	Ninj2	Slc8a3
Dll1	Kcnn4	Prss11	Sub-regulados	Epim	Nptxr	Spna2
Dnase1	Kif1b	Ptprz1	5Ht-2	Erbp2	Nr1h2	Srrp86
Doc2b	Kl	Rab3a	Abca2	Evl	Nucb	St14
Dpep1	LOC170927	Rab4b	Abcc6	Expi	Nup62	Syng2
Dpp6	LOC192649	rACH	Abcc6	Fbxl2	Okl38	Syt5
Dspp	LOC245923	Roaz	Acads	Fn1	Omp	T2R3
Ecac1	LOC245926	Rpl37	Actg2	Fut1	Opn1sw	Temo
Edg7	LOC246172	Rpl4	Adra1d	Fxyd4	Opn4	Tf
Eef1d	LOC63880	Rps24	Akap	Gc	Oxt	Thop1
Egr2	Lpl	Rtn1	Alcam	Gcdp	P2ry6	U83883
Fabp1	Matr1	Scn3a	Aldh2	Gcs1-	Pcsc1	U91561
Fbln5	Mbl2	Scnn1b	Arf5	pending	Pfkfb4	Ugt1a6
Fcna	Mmp11	Scyc1	Asic4	Ggh	Pht2	Ywhah
Fgfr2	Mmp12	Sfrs10	Aspa	Gja4	Pip5k2b	Zfp103
Flg	Mre11a	Sh3d2a	Atp1a3	glb	Pitx1	
Fxyd1	Msra	Skd3	Atp2b3	Glp1r	Pitx2	
Fxyd5	Muc5ac	Slc30a4	Atp6s14	Gpr30	Plcg2	
Fzd9	Mvp	Slc9a5	Bach	Gpr54	Plod	
Gab2	Myh13	Snap23	Bcl2l	Gpr85	Pomc2	
GABABL	Myh8	Sncb	BEGAIN	Grin1	Pou2f1	

Tabla Vb – Subgrupo “b”; 95 elementos comunes en "Ina" and "7a"

Sobre-regulados	GstYb4	N5	Wisp2	Comp	Il12a	Six3
	Hfb2	NX-17		Cox8a	LOC170824	Slc21a9
Acrp30	Hsd17b2	Pax4	Sub-regulados	Csnk1d	LOC252882	Stk2
Aqp3	Il18	Pdhal		Cycs	LOC56826	Tg
Bcl2	Jdp1	Pigm	A5D3	Cyp11a	Meox2	Tnni1
Cgm1	Jwa	Pmch	Araf1	Cyp2c22	Mln51	Tpm4
Chrna9	KChIP4	Prdx4	Arnt2	Dvl1	Nedd8	Ugt1a7
Clcnk1	Kcne3	Prlpl	Arsb	Fxyd2	Notch3	Upa
Ctsk	Kcnj15	Scdgbf	Atp4b	Gabrp	Nr2f2	Wmp1
Ddr2	Kpna2	Stx4a	Bax	Gabrr2	Pde1c	Zfp36
Drd1a	LOC171552	Sult1a2	Bfsp1	Galr3	Ptk2b	
Ep300	Lrrc3	Tat	Bmp3	Gpc1	Pvrl1	
Gasz	Lypla1	Tmf1	Cacna1b	Gpr83	Rnh1	
Gcnt1	Lyz	Trip15	Cdc37	Hrg	Rps14	
Glcl	Mefv	Trrp2	Cntnap1	Icam1	Scp2	

Tabla Vc – Subgrupo “c”; 95 elementos comunes en "Ina" and "3a"

Sobre-regulados	F10	Map3k8	Scg2	Celsr3	LOC64027	Snrpb
	Glul	Nppa	Sydv	Col1a2	Mapk3	Spr
Ak2	Gtf2ird1	Nppb	Tgfa	Cyp17	Mapk8ip	Stx2
Amy1	Hnmt	Obp-1f		Dig1	Mdk	Tff3
Ascl1	Hnrpm	Pai1	Sub-regulados	Egfr	Mfge8	Thbd
Chrna7	Hpgd	Past-A		Eif2b2	Mox2	Txn2
Chrnd	Ick	Psm2	Acp5	Emd	Myo1b	Ube2i
Cish	Kcnn3	Ptger1	Ank	Faim	Npff	Vamp3
Cktsf1b1	Klrc1	Ptprf	Apbb1	Fhl2	Pcsk2	Wisp1
Cncg4	Laptm5	Rhoip3	Arf1	Grpr	Phkg1	Zhx1
Crhr2	LI5	Robo1	Arg1	Hsp27	Ptpn9	
Cyp4b1	LOC246120	Rpl29	Atf2	Ins3	Pv1	
Ddb1	LOC60660	Rps27a	C4	Lamc1	Scd2	
Ecm2	Loc65027	Rps6kb1	Ca5a	LOC245919	Sepp1	
Els1	Lyst	Ruvbl1	Cblb	LOC246325	Slc34a1	

Tabla Vd – Subgrupo “d”; 151 elementos comunes en "3a" and "7a"

Sobre-regulados	Dlm1	Lgals2	Rnase4	Bin1b	Kcnj6	Psme2
	Ednra	LOC59313	Serpini1	C1qbp	Ldhd	Ptgd2
Afar	Ela2	LOC60591	Slc13a3	C2ta	LOC171412	Rgs19ip1
Ant2	Ensa	Lta	Slc7a2	Cacna1c	LOC252853	Rnpep
Atp5f1	Eya2	Ly49i2	Smpd3	Cacnb2	LOC259245	S100a10
Bace	Fgf17	Maf	Sncg	Casp12	LOC60329	Sec22a
Bet1	Fut2	Mcpt9	Sncg	Casp9	LOC60452	Siahbp1
Bmp4	G10	Mpp3	Sost	Cbs	LOC64038	Sirt6
bsnd	G22p1	Ms4a1	Svs4	Cpn1	Lrp2	Slc16a10
Cacna1i	Galnt7	Myr4	TCEB2	Crygd	Mag	Slc16a8
Calcb	Ggta1	Nf1	Tp63	Cspg2	Map1a	Slc29a2
Calm2	Gnb2l1	Nfya	Tpm3	Cyp2a3a	Mbpa	Slc4a2
Cd36l1	Gnrh1	Nmt1	Ube2d3	Cyp2c39	Mfn2	SP22
Cd59	Gp5	Npl4	Ubqln1	Des	Mte1	Stxbp2
Cds2	Gpc3	Nr2f1	Vof16	Drd5	NOR-2	Syt12
Chrna10	Grs2	Nrd1	Znf148	E2f5	Nr1i3	Tgm2
Csp	Hdgfrp2	Nsf		Esr2	Pcsk5	Timm10
Csrp1	Hdh	P2rx4	Sub-regulados	Fads1	Penk-rs	Ucp2
Ctsj	Igfbp1	PAIHC3		Fnta	Pex6	
Ctxn	Inhbc	Psен1	Abcb9	Gabarap	Pim3	
Dctn1	Kcnj3	Psmb8	Aldoa	Grik4	Plin	
Ddr1	Kcnj5	Psme1	Anx5	Gucy2e	Pnma1	
Dlad	Kcnn2	Rbp2	Bcl10	Hsd11b1	Ppp3ca	

Tabla Ve – Subgrupo “e”; 205 elementos exclusivos de "Ina"

Sobre-regulados	Gira1	Pkcl	Syt13	Dbnl	Kcna2	Rab38
	Gria1	Pla2g2a	Tubb3	Ddxl	Kcnk12	Ragb
Acaa	Gro1	Plp	Txn	Den	Kcnk2	RATCYTA
Acadvl	Grp-Ca	Pmf31	Vegfc	Dio3	Lhx1	Rnd2
Actr3	HIBADH	Ppal	Xdh	Dlc2	LOC252855	Sacm2l
Adnp	Hist4	Ppy		Echs1	LOC252960	Sarcosin
AF095927	Itga2	Prlph	Sub-regulados	Epas1	Loc65042	SC2
Alb	Itgb7	Prlpk		F13a	LOC78973	Scamp2
Bambi	Kif2	Pscd3	Acta1	Fth1	Ltb4r2	Sdc2
Bcl2l10	km23	Psg4	Agt	Fuca	Lu	Shbg
Cav2	Kzf1	PSMD1	Ahcy	Gabbr1	Map2	Siat1
Cckar	LOC171057	Ptk2	Ak1	Gap43	Marta1	Slc18a3
Cdc5l	Loc192269	Rgs19	Aldoc	Gata6	Mgat2	Slfn4
Centa1	LOC207125	Rok1	Alox12	Gfi1	Mgp	Snrpn
Chx4	LOC246281	Sc65	Anx1	Gfra1	Mmp14	Src
Cml5	Loc259269	Scn11a	Apoa2	Gjb1	Mucdhl	Stk17b
Cnn3	LOC60627	Sgp158	Arl4	Gp38	Mybbp1a	Stnl
Col3a1	LOC63849	Si	Atp5a1	Gstt1	Myh3	Syk
Crfg	LOC66030	Sirt2	Atp5o	Hamp	Myh9	Syn3
Dat1	Lsamp	Slc27a2	B2m	Hig1	NCAML1	Tap1
Dck	Lxn	Slc6a5	Bok	Hmgcl	Nrn	Tef
Ded	Mafk	Slc9a3r2	Btg2	Hnf3b	Olfm1	Tpi1
Drg11	Mfn1	Smbg	Cap2	Hoxa2	Pal	Tst
Drpla	Mllt3	Snf1lk	Cck	Hspt70	Par3	Ttgn1
Ehd3	Mpdz	Spag5	Coil	Htr1b	Pitx3	Uchl1
Entpd6	Neo1	Spin2b	Cox8h	Htr6	Plec1	Vamp5
Fmo4	Pde4b	Spnr	Csh1v	Igf2r	Prei3	Wbp2
Gabra5	Pde6g	Stat3	Cst6	Igfbp	Prpg2	Wbscr14
Gabbr1	PDRP	Sycp1	Cxcr4	Itpkb	Prx	Xt1
Galgt1	Pfkfb1	Sycp3	Dagk	Jun	Pxmp2	Zyx

Tabla Vf – Subgrupo “f”; 153 elementos exclusivos de "3a"

Sobre-regulados	Grin1a	Prdx1	Sub-regulados	Ddx25	Lipe	RNU28927
	Gusb	Prdx6		Dedd	Litaf	Rps9
Adora3	Gzmc	Prim1	Abp1	Dffa	Mapre1	Sardh
Agc1	Hk1	Prlpi	Actc1	Dffb	Mgat3	Slc21a12
Akt1	Idi1	Pthlh	Ada	Dyrk	Mic2l1	Slc29a1
Amacr	Il12b	Rab5a	Adam1	Fgf11	Mmp13	Slc8a1
Andpro	Kcnj1	Rcvrn	Alk7	Fgr	Msn	Slc9a2
Anpep	Kcnk1	Ret	Arf6	Fmo1	Nbl1	Slc9a3
Cacng2	ksGC	Rln1	Atic	Folh1	Nfix	Smoh
Cebpb	Lepr	Rpl28	Atp6l	Gapds	Nr1d1	Spin2c
Coro1a	Lisch7	Rsn	Atp9a	Gatm	Nr1i2	Spnb3
Cox5a	LOC207121	Sacm1l	Avpr2	Gjb4	Nr4a1	Svs5
Cox5b	LOC54410	Sdfr1	Baalc	Gjb6	Nr5a2	Syng1
Creb1	LOC60428	Secp43	Calcr	Gna15	Nupr1	Syt10
Ctf1	Mor1	Slc11a1	Capn3	Gpr66	Ocln	Syt4
Cyp7b1	Msh2	Slc4a4	Capn6	Gps1	Oprm1	Tacstd1
Ddah1	Nme1	Smstr2	Cdh14	Hcn3	P29	Tgfb1
Ephb2	Nxph3	Sts	Cdk7	Hoxa1	P2rx1	Timp2
Fabp7	Pah	Syt6	Ceacam1	Hsd3b1	Pctp	Vdup1
Fac16	Pax8	Tdag	Chad	Htr4	Pnliplr1	
Fgf3	Pik3c3	Unc5h2	CMR1	Il11ra1	Prmt3	
Fgfr3	Por	Vcsa1	Cs	Kcnab1	Psmc1	
Fhit	Pou3f1	Ykt6	Dapkl	Kcnk4		

Tabla Vf – Subgrupo "f"; 153 elementos exclusivos de "3a"

Sobre-regulados	Enpep	Madcam1	Scya22	Bcl2l2	Glr1	Prsc1
	Esdn	Madh4	Sec14l2	Blr1	Gpam	Rab26
Acvr1	Fabp3	Mmp10	Sept3	Bmp15	Gstm3	Rab29
Adamts4	Fbxo6b	Myh4	Slc22a7	Bnip3	Hcrt	Rab3b
Agtr1	Fcer1a	Nat2	Slc39a1	Cacng4	Hes2	Rb2
Ank3	Fdx1	Nell1	Stk3	Calb3	Hrh3	Rh
Ap2m1	Fgf18	Nifs	Stx3a	Calcl	Hrh4	Rpl10
Api3	Fzd1	Oazi	Svop	Cdc20	Htr3a	Rps17
Arha2	Ggtp	Oprs1	Tcf8	Cdh2	Igfbp1	Scamp3
Arhgef9	Gja6	Pde3b	Tfpt	Chrn2	Igfbp3	Scamp5
Asgr2	Grf2	Pdi2	Thbs4	Cish1	Il11	Scn2a1
Bbs2	Grik1	Pdi4	Tnp2	Cln2	Il9r	Serk2
C1s	Grin2b	Pdyn	Trif	Cmklr1	Kcnj16	Sip2-28
C3	Hip1r	Pfkfb3	Unc13h1	Cox6c	Kcnn1	Slc11a2
Camkk2	Hmgb2	Pik3cb	Usf1	CPG2	LOC207126	Slc20a1
Cdh22	Hmgcr	Pkm2	Vim	Cpz	LOC245960	Slc22a3
Cdk5r	Hri	Plcb4	Vipr1	Cstb	LOC252929	Slc27a1
Cetn3	IAG2	Podxl	Xylt2	Cybb	Luzp1	Slc28a2
Cgi-94	Ifnb1	Prlpd	Zp1	Ephx2	Myl3	Slc5a7
Cirl2	Il7	Prlpm		Esr1	Nckap1	Sqle
Cirl3	Imp13	Raf1	Sub-regulados	Fabp2	Ngfr	Stx6
Cml1	Jag1	Ramp2	Acat1	Fgl2	Nkg7	Tao2
Cox6a2	Jam1	Rbbp9	Adam15	Fhl1	Nkrp2	Tap2
Cst11	Kidins220	Rdc1	AF092207	Fstl3	Optn	Tcn2p
Cutl1	Lmnb1	Rgs3	Anp32	G3bp	Pcsk1n	Tff2
Cyp2c23	LOC192254	Rp58	Appbp1	Gale	Pde4a	Titf1
Dpys	LOC56764	Rps15a	Arpc1a	Galnt1	Pdk2	Trela
Drip78	LOC81022	Rps21	Bche	Galnt5	Pmpcb	Tspan-
Dyt1	Ly68	Rsc3		gis5	Ppp1r14a	