

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE LA PUNCIÓN SECA SOBRE LA
ESPASTICIDAD MUSCULAR DESPUÉS DE LA LESIÓN CRÓNICA
DE LA MÉDULA ESPINAL**

TESIS

PRESENTA:

Josué Francisco Ceballos Zavala

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Médico Veterinario Zootecnista

DIRECTOR DE TESIS:

MVZ. Dra. Edna Elisa García Vences

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2018



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.

DEDICATORIA

*A las generaciones venideras interesadas en
el desarrollo de nuevo conocimiento.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme prestado vida para llegar a este punto.

A mi familia. A mi madre, por el apoyo incondicional que me brindó durante toda mi formación académica. A mi padre por impulsarme a desafiar nuevos retos. A Estefanía por compartir ese valioso tiempo junto a mí en esta nueva etapa de mi vida y acompañarme en esas horas de desvelo

A mi tutora por guiarme durante la realización de este proyecto y adoptarme en su equipo de trabajo. Por su infinita paciencia y las bondades que me ha brindado.

A todos aquellos involucrados en la realización de este proyecto.

Muchas gracias

CONTENIDO

		Página
1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCIÓN	2
2.1	Marco Teórico	2
2.1.1	Generalidades de la Lesión de Médula Espinal (LME)	2
2.1.1.1	Anatomía y fisiología de la médula espinal	2
2.1.1.2	Epidemiología	3
2.1.1.3	Modelos de estudio	4
2.1.1.4	Fisiopatología de la LME	5
2.1.1.5	Mecanismos autodestructivos en la LME	7
2.1.1.5.1	Despolarización de membrana	7
2.1.1.5.2	Calcio y excitotoxicidad por glutamato	7
2.1.1.5.3	Respuesta inflamatoria	8
2.1.1.6	Daño al SNP después de una LME	9
2.1.2	Fisiología neuromuscular	10
2.1.2.1	Las unidades motoras	11
2.1.2.2	La placa neuromuscular	11
2.1.2.3	Acoplamiento excitación-contracción	13
2.1.2.4	Espasticidad	13
2.1.2.4.1	Fisiopatología de la espasticidad	15

2.1.2.4.2	Respuesta inflamatoria en la espasticidad	17
2.1.2.4.3	Actividad eléctrica en un músculo espástico	19
2.1.2.4.4	Tratamientos para la espasticidad	20
2.1.3	Punción Seca	22
2.1.3.1	Punción seca después de la LME	24
2.2	Planteamiento del problema y justificación	25
2.3	Objetivo general	26
2.3.1	Objetivos particulares	26
3	MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1	Diseño experimental	26
3.2	Características de la muestra	27
3.3	Consideraciones éticas	28
3.4	Técnicas utilizadas	28
3.4.1	Lesión Traumática de Médula Espinal	28
3.4.2	Cuidados postquirúrgicos	29
3.4.3	Evaluación locomotora (escala BBB)	29
3.4.4	Punción Seca	31
3.4.5	Evaluación de espasticidad muscular	32
3.4.5.1	Electromiografía	32
3.4.6	Análisis de expresión génica RT-PCR	34
3.4.6.1	Obtención de RNA	34
3.4.6.2	Retrotranscripción	35
3.4.6.3	Diseño de cebadores	35
3.4.6.4	PCR tiempo real	35

3.5	Análisis estadístico	36
4	RESULTADOS	37
5	DISCUSIÓN	47
6	CONCLUSIONES	53
7	REFERENCIAS	54
8	FIGURAS	
	Figura 1. Factores que desencadenan hipertensión.	14
	Figura 2. Hipótesis gráfica de los efectos de la punción seca sobre la espasticidad ocasionada por la LME en diversos métodos de valoración.	25
	Figura 3. Esquema de los componentes del sistema de electrodiagnóstico digital en la valoración del músculo gastrocnemio en rata.	33
	Figura 4. Registro de la actividad eléctrica del músculo antes de realizar el registro electromiográfico.	34
	Figura 5. Resultados de la escala de evaluación locomotora a campo abierto BBB, n=5.	37
	Figura 6. Resultados de la escala de evaluación locomotora a campo abierto BBB, n=3.	38
	Figura 7. Ejemplo representativo de la electromiografía antes y después (3 horas y 7 días) de la punción seca.	39
	Figura 8. Resultados del análisis de la amplitud y latencia antes y después del tratamiento.	41
	Figura 9. Análisis de la expresión de iNOS después de la punción seca.	42
	Figura 10. Análisis de la expresión de TNF α después de la punción seca.	43
	Figura 11. Análisis de la expresión de IL-1 β después de la punción seca.	44

	Figura 12. Análisis de la expresión de COX-2 después de la punción seca.	44
	Figura 13. Análisis de la expresión de IL-4 después de la punción seca.	45
	Figura 14. Análisis de la expresión de IL-10 después de la punción seca.	46
	Figura 15. Análisis de la expresión de acetilcolinesterasa después de la punción seca.	46
9	CUADROS	
	Cuadro 1. Síntomas del síndrome de neurona motora alta.	15
	Cuadro 2. Comparativo de los tratamientos de mayor uso por mecanismo de acción.	22
	Cuadro 3. Distribución de animales en cada experimento.	27
	Cuadro 4. Escala de evaluación locomotora a campo abierto BBB.	29

1. RESUMEN

CEBALLOS ZAVALA JOSUÉ FRANCISCO. Análisis de los efectos de la punción seca sobre la espasticidad muscular después de la lesión crónica de la médula espinal (bajo la dirección de: MVZ, Dra. Edna Elisa García Vences).

La lesión de médula espinal es una condición que presenta diversas comorbilidades, entre ellas, la más frecuente es la espasticidad. Esta se desencadena por la denervación periférica, cambios intrínsecos musculares y la inhibición de los mecanismos de excitación, teniendo como consecuencia la atrofia muscular y dolor en los pacientes que la padecen.

A pesar de que existen diversos tratamientos para la espasticidad, aún se producen reacciones adversas en el individuo; por lo que este proyecto se dio a la tarea de evaluar los efectos que la técnica de la punción seca ocasiona sobre la espasticidad, analizando aspectos clínicos, neurofisiológicos y moleculares después de una lesión crónica de médula espinal, encontrándose mejoría en la locomoción, disminución de la hiperexcitabilidad de las neuronas motoras e inmunomodulación de la respuesta inflamatoria a los siete días después de la punción seca.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Marco teórico

2.1.1 Generalidades de la Lesión de Médula Espinal

2.1.1.1 Anatomía y fisiología de la médula espinal

El tejido nervioso comprendido de aproximadamente 10^{12} neuronas forma el intrincado sistema de comunicación del cuerpo; cabe mencionar que no sólo existen neuronas en este tejido; sino que se encuentran otras células como lo son los oligodendrocitos, astrocitos y la microglía que llevan a cabo funciones determinadas de sostén, mielinización, regulación del metabolismo y defensa inmunológica. Además, el tejido nervioso posee un sistema de receptores que responden a diferentes tipos de estímulos (mecánicos, químicos y térmicos) que son transducidos en impulsos nerviosos (1,2).

Anatómicamente, la médula espinal forma parte del sistema nervioso central (SNC) siendo un conjunto de segmentos funcionales con conexiones aferente-eferentes para determinada parte del organismo, lo que comprende el sistema nervioso periférico (SNP). Se encuentra protegida por tres estructuras: la columna vertebral, las meninges y el líquido cefalorraquídeo (3).

La médula espinal es la vía conductora de impulsos que van y vienen del cerebro (2,3). Sus principales funciones son las de transportar información entre los nervios espinales y el cerebro, controlar reacciones automáticas o reflejas y transmitir impulsos nerviosos a los músculos, vasos sanguíneos y glándulas (4-6).

Funcionalmente podemos describir a la médula espinal en las llamadas vías ascendentes y descendentes. La propiocepción, el tacto fino y los cambios en la presión mecánica son estímulos externos que son captados por receptores sensoriales y son llevados por medio de fibras nerviosas hasta el cerebro, las llamadas “vías ascendentes” (2, 3, 6).

Por otro lado, tenemos a las “vías descendentes”, las cuales se originan en la corteza cerebral y se dirigen hacia la médula para controlar a las neuronas

motoras bajas y así poder llevar el estímulo necesario hasta su destino final, como un músculo, una glándula u otra célula no neural (2, 3, 6, 7).

De acuerdo a la histología de la médula espinal la podemos distinguir en dos áreas bien definidas, hacia la periferia se constituye la sustancia blanca que está compuesta por axones de neuronas aferentes o eferentes y en la porción central encontramos la sustancia gris, la cual concentra los somas neuronales con una forma característica de “H” (1).

2.1.1.2 Epidemiología

La Lesión de Médula Espinal (LME) es una de las condiciones clínicas devastadoras e irreversibles con mayor índice de secuelas que impiden llevar a cabo la vida productiva del paciente o que conllevan a la muerte del mismo (8,9). Esta lesión afecta drásticamente la calidad de vida no solo del paciente, sino también de su familia de manera emocional, social y financiera (10,11).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) no existen datos fiables sobre la prevalencia mundial; sin embargo, hay reportes de que radica entre 236 y 1 298 por cada millón de habitantes (11-13), con una incidencia mundial anual de entre 40 y 80 casos por millón de habitantes. La población de mayor riesgo son los adultos jóvenes (20-29 años) y los ancianos (70 o más). El 90% de las lesiones es por alguna de las siguientes causas traumáticas: accidentes de tránsito, caídas o actos de violencia (14).

En México, a pesar de que no existen registros epidemiológicos suficientes; en 1998, Pérez y cols., reportaron una incidencia de 18.1 lesionados por cada millón de habitantes al año; siendo la causa más frecuente la caída de altura hasta en el 34.5% de los casos, seguida de herida por arma de fuego o accidente automovilístico. En cuanto a la proporción hombre:mujer fue de 6 a 1; con una media para la edad de 30.1 años (15,16).

Para el 2010, había 3 346 000 habitantes con algún tipo de discapacidad motriz (17); calculando una incidencia anual de lesión de médula espinal de 18.1 por cada millón de habitantes, obedeciendo a los parámetros mundiales, ya que la

edad promedio oscila entre los 16 y los 35 años de edad (18), siendo predominantemente en varones que en mujeres 3.2:1 (16).

La LME representa un problema de salud pública ya que afecta a individuos en edad productiva y demanda recursos financieros provenientes de los pacientes, sus familiares y del gobierno (19). Anualmente el derroche económico asociado a LME en Estados Unidos de América y Europa se estima entre \$50,000 y \$100,000 dólares (20); esto, contemplando los costos directos e indirectos, que van desde las infecciones postraumáticas, las consultas médicas, los servicios de los cuidadores y la rehabilitación, etc. (21,22).

La mortalidad y comorbilidades son muy variables y directamente proporcionales con la localización y la gravedad de la lesión (14).

La lesión en los segmentos T3 a S3 de la médula espinal, provoca desórdenes en el control de los movimientos voluntarios y de sensación de los miembros por debajo del sitio de lesión; esto, debido a la interrupción de las vías ascendentes y descendentes, teniendo como resultado la presencia de ataxia, paraparesia o paraplegia, con o sin pérdida de la continencia fecal y/o urinaria y pérdida de la sensación de dolor (23).

2.1.1.3 Modelos de estudio

Los modelos animales son métodos de investigación *in vivo* empleados para el análisis de eventos bajo condiciones controladas.

Debido a la necesidad por la búsqueda de opciones terapéuticas para el manejo de pacientes con lesión traumática de médula espinal; se comenzó a estandarizar el uso de modelos animales para lograr el entendimiento de la fisiopatología y así dar pie al desarrollo de terapias (24).

Si bien uno de los primeros modelos animales en que se realizó la lesión LME fue en perros (25), existen muchos otros modelos en los que se ha experimentado, como lo son los roedores, gatos, porcinos, tíes y primates no humanos (24,26,27). De estos, los roedores son la especie más utilizada hasta en un 92%

de las ocasiones, debido a las facilidades que representa el bajo costo de manutención, el amplio conocimiento de su anatomía, la baja frecuencia de infecciones postquirúrgicas y el desarrollo de técnicas de análisis funcional bien establecidas (28). La rata participa en modelos de Lesión Traumática de Médula Espinal (LTME) en el 70% de las ocasiones (26).

Para el estudio de LME están descritos diferentes modelos de lesión, que difieren entre ellos por su mecanismo de lesión; además de los cambios morfológicos que presentan; éstos son los de tipo mecánico (contusión, transección, compresión, distracción/dislocación y aspiración) o no mecánico (isquemia, excitotóxico, fotoquímico y electrolítico) (24,26 ,28-31).

Cada uno de estos modelos, están descritos en función de los posibles objetivos que pudiesen tener los proyectos de investigación. Un claro ejemplo de esto son los modelos de transección, los cuales son usados en investigaciones sobre regeneración, degeneración, neuroplasticidad y estrategias de ingeniería de tejidos (24,26).

No obstante, los estudios en modelos murinos; no deben ser concluyentes para estudios preliminares debido a las diferencias genéticas, biológicas y fisiológicas; por lo que es necesario escalar la experimentación hacia primates no humanos antes de generalizar los hallazgos y proceder a estudios clínicos (24).

2.1.1.4 Fisiopatología de la LME

La LME desde el punto de vista fisiopatológico puede ser dividida en dos fases, la primaria y la secundaria. La lesión primaria se produce de manera inmediata, de segundos a minutos, provocando daño celular y extracelular ocasionado por el mecanismo de lesión, ya sea mecánico o no mecánico. Ésta sirve como origen para desencadenar la lesión secundaria constituida por los mecanismos de daño, los cuales involucran eventos vasculares, celulares y bioquímicos que ocasionan daño a las células residentes que sobrevivieron al daño inicial, la cual se llevará a cabo en minutos a semanas. Existen aproximadamente veinticinco mecanismos secundarios de daño (20, 32, 33).

Es posible clasificar a la lesión primaria por su morfología como sigue: impacto más compresión persistente, impacto más compresión transitoria, distracción y laceración o transección (20,34).

Por su temporalidad, la LME se divide principalmente en tres fases: la fase aguda, la fase secundaria o sub-aguda y la fase crónica. En cada fase se involucran diversos grupos de células y moléculas del sistema nervioso (SN), inmune y vascular (32,33).

La fase aguda ocurre por el daño directo del traumatismo, provocando alteraciones celulares, físicas y bioquímicas de manera tanto local como sistémica. Estas reacciones son desencadenadas por la hemorragia, la destrucción de la barrera hematomedular y la infiltración de células inflamatorias ocasionando hipotensión sistémica, choque espinal, vasoespasmo, isquemia, compromiso de la membrana plasmática, trastornos en la homeostasis iónica y acumulación de neurotransmisores (32,35).

La fase secundaria o sub-aguda se lleva a cabo minutos después de la lesión, perdurando por semanas o meses. En esta fase continúan algunos de los eventos de la fase aguda (alteración iónica, edema y muerte celular por necrosis) lo que generará incremento notorio en el área del traumatismo. Además, se llevan a cabo nuevos eventos, como la formación de radicales libres, entrada retardada de calcio, lipoperoxidación, desmielinización y muerte celular por apoptosis (32,33). Estos mecanismos de daño están interconectados, funcionando como un ciclo que se auto-propaga, y se perpetúan una vez iniciado el traumatismo, ya que debido a la vulnerabilidad del SNC después de un daño, la activación del sistema inmune no cesa y contribuye a que otros mecanismos autodestructivos secundarios continúen con el daño al tejido neural (36).

La fase crónica se caracteriza por la formación de la cicatriz glial y cavidad quística alrededor del epicentro de la lesión medular en los 28-42 días posteriores a la lesión (32).

2.1.1.5 Mecanismos autodestructivos en la LME

2.1.1.5.1 Despolarización de membrana

Una vez lesionada la médula espinal se lleva a cabo la despolarización de membrana de las neuronas ocasionada por los cambios en el balance iónico, debido a la entrada masiva de iones de sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}) al interior de la célula y la consecuente disminución de la concentración de potasio (K^+) y magnesio (Mg^{2+}) (41).

Estas alteraciones provocan cambios que empeoran las condiciones del medio favoreciendo aún más la permeabilidad, la conductancia y las concentraciones iónicas, ya que pueden presentarse edema y la liberación excesiva de neurotransmisores excitatorios (33).

2.1.1.5.2 Calcio y excitotoxicidad por glutamato

Podríamos considerar que el desbalance electrolítico de mayor importancia es el acúmulo excesivo de Ca^{2+} intracelular que provoca la sobre-estimulación de los receptores de glutamato, el cual es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC, llevándose a cabo la liberación desproporcionada de éste. Este acúmulo excesivo de Ca^{2+} es el responsable de la destrucción de neurofilamentos, desestabilización de proteínas encargadas del sostén celular y la liberación de radicales libres resultando en la activación de vías de señalización responsables de la muerte celular. A este fenómeno se le conoce como excitotoxicidad por glutamato (33,41).

La excitotoxicidad afecta principalmente a células del SNC como los astrocitos, los oligodendrocitos y la microglía. Las neuronas y los oligodendrocitos son particularmente vulnerables a la excitotoxicidad por glutamato debido a la gran cantidad de receptores con los que cuentan. Son tan vulnerables que este proceso culmina en la desmielinización de los axones y la pérdida de neuronas alrededor del sitio de daño (33) provocando marcada reducción o falta completa de la transmisión axonal, también llamado bloqueo de conducción; clínicamente, estos eventos impiden la posibilidad de mejoría en el individuo (42).

2.1.1.5.3 Respuesta inflamatoria

La respuesta inmune en la LME comienza en la fase aguda, efectuando respuestas celulares y moleculares que conllevan al desarrollo de la respuesta inflamatoria, que tiene un papel importante en los eventos en cascada provocados por la lesión secundaria (34).

De manera fisiológica uno de los objetivos de cualquier proceso inflamatorio es el fagocitar los restos celulares en el sitio de lesión; no obstante, al ser el SNC un órgano inmunoprivilegiado, se desencadena una respuesta descontrolada y exacerbada, que provoca daño al tejido sano adyacente al sitio de lesión, por lo que su papel pareciera ser perjudicial más que beneficioso (37,38).

En éste proceso inflamatorio se distinguen principalmente cuatro categorías de células inmunes: los neutrófilos, los monocitos, la microglía y los linfocitos T. (39) Los neutrófilos son los primeros en arribar al sitio de lesión y su llegada se da por reclutamiento del sistema circulatorio mediante la expresión de moléculas de adhesión en sus membranas, llamadas quimiocinas. Los neutrófilos serán los encargados en primera instancia de la remoción de restos tisulares; además de liberar citocinas, proteasas y radicales libres. Esto activa otras células de la cascada de inflamación, desencadenando daño y muerte neuronal (37).

Poco después de la llegada de los neutrófilos, los monocitos, se infiltran a la médula espinal diferenciándose en macrófagos y adquiriendo un fenotipo proinflamatorio contribuyendo a la producción de radicales libres y citocinas proinflamatorias como lo son interleucina-8 (IL-8)¹, IL-1 β y el factor de necrosis tumoral alpha (del inglés Tumor Necrosis Factor alpha) (TNF α) (37).

Los radicales libres y las citocinas proinflamatorias contribuyen a la expansión de la lesión, empeorando el impacto del daño, esto debido a que los radicales libres derivados de nitrógeno y de oxígeno pueden formar compuestos altamente neurotóxicos como el peroxinitrito y desencadenar el fenómeno de

¹ Se abreviará IL para referirse a interleucina, seguida de un guion y el número de la clase a la que pertenezca.

lipoperoxidación y la subsecuente desmielinización axonal, perdiéndose la conductibilidad eléctrica por debajo del sitio de lesión (37, 39, 40).

Por otra parte la microglía conforma las células inmunes innatas del SNC, siendo las primeras células en adquirir un fenotipo inflamatorio, junto a los macrófagos, cuando se daña al mismo (1).

El papel que desempeñan los linfocitos en la LME es controversial, debido a que pueden ser activados por antígenos neurales como la proteína básica de la mielina y considerarse linfocitos T autoreactivos que presentan propiedades autodestructivas e inflamatorias, ya que las citocinas producidas por estos promueven la respuesta inflamatoria y con ello la desmielinización, provocando la pérdida de la función de las conexiones neuronales con el SNP (40).

2.1.1.6 Daño al SNP después de una LME

Como ya se explicó, a causa de la LME se provoca una “desconexión” en el SN, causando la interrupción de los factores necesarios para su adecuada función. Dependiendo del sitio de lesión habrá distintas poblaciones neuronales afectadas, y la neurona motora se volverá inexcitable, provocando denervación periférica; esto aunado a la respuesta inflamatoria exacerbada, la desmielinización y el incremento de la excitotoxicidad por el acúmulo de neurotransmisores originados después de la LME, se afectará directamente la placa neuromuscular de los miembros implicados, pudiendo ocasionar distrofia muscular irreversible (38, 41, 44).

Si la lesión se localiza en neuronas que conectaban el encéfalo y la médula espinal, se provoca el síndrome de neurona motora alta (SNMA); mientras que, si ocurre en la sustancia gris de la médula espinal o algún nervio periférico, se le denomina síndrome de neurona motora baja (SNMB) (43).

Al interrumpirse la continuidad del SNC en la neurona motora alta (NMA), se está ocasionado daño en las vías piramidales y extrapiramidales, lo cual repercute en la condición incapacitante más frecuente de los pacientes con LME, la espasticidad (45).

2.1.2 Fisiología Neuromuscular

Para que un individuo pueda ejecutar una acción motora, el SN trabaja y se comunica continuamente con el sistema músculo-esquelético; bajo una estricta organización y jerarquía. El SN se encarga de procesar la información sensorial y dar las órdenes; mientras tanto, el músculo ejecuta la acción motora (1,2). El SN ejecuta control sobre los músculos esqueléticos por dos mecanismos:

a) Control neuromotor:

Es aquel mediante el cual la contracción muscular es iniciada por impulsos nerviosos generados en la corteza motora o en el tallo cerebral, la despolarización del sarcolema y el acoplamiento electromecánico.

b) Control neurotrófico:

Éste es independiente de la actividad eléctrica de las neuronas motoras y depende de la liberación de factores solubles de las terminaciones nerviosas de las neuronas motoras a la unión neuromuscular (38).

El SN envía señales para la locomoción a través de diferentes vías, la NMA y la neurona motora baja (NMB). En términos generales, la NMA comienza desde la corteza cerebral, sigue su recorrido por la decusación piramidal, y termina en las astas ventrales² de la médula espinal.

Posteriormente la señal llega a las interneuronas para continuarse con la NMB, la cual inerva la gran parte de los órganos del cuerpo, incluyendo a los músculos esqueléticos (42).

Las vías supraespinales incluyen: las vías corticoespinales (o piramidales) y las vías cortico-troncoespinales (1). Las fibras nerviosas corticoespinales actúan sobre las neuronas motoras bajas, tanto alpha (α) como gamma (γ), principalmente a través de interneuronas. Así, las vías descendentes influyen en la función motora espinal de dos maneras: 1) comandar la actividad de las neuronas

² En el texto se manejará como dorsal o ventral para referirse a las astas de la médula espinal de acuerdo a la anatomía topográfica veterinaria, mientras que en humanos sería posterior o anterior respectivamente.

motoras bajas para la realización de movimientos voluntarios y 2) facilitar o inhibir los circuitos reflejos espinales (50).

La acción sobre las neuronas motoras γ ayuda en el mantenimiento de la actividad excitatoria de los receptores en los husos musculares, contribuyendo a la excitación de las neuronas motoras α , por la vía del bucle γ -motor, en la producción del tono muscular (47,48).

2.1.2.1 Las unidades motoras

Los músculos esqueléticos son caracterizados por una respuesta de contracción precisa y rápida de una o grupos de fibras inervadas por una neurona motora común, a este conjunto se le llama “unidad motora”. Las fibras musculares inervadas por una unidad motora deben ser activadas independientemente de las fibras musculares en otras unidades motoras (48).

Para que un músculo esquelético pueda contraerse se necesita que un estímulo eléctrico cause un potencial de acción y sea transformado en señal química, dicha transformación se lleva a cabo en la unión o placa neuromuscular, que es la unión entre el axón de una neurona y la fibra muscular (49).

El grado de contracción muscular se debe al número y tipo de unidad motora que se activen al mismo tiempo (45). Reclutando primero unidades motoras pequeñas, las cuales inervan pocas fibras musculares, pero si se necesita mayor fuerza se tendrán que reclutar unidades motoras más grandes y por lo tanto más fibras musculares.

2.1.2.2 La placa neuromuscular

Los componentes y funciones de los elementos que conforman la placa neuromuscular son (1, 38):

- Neurona motora baja: Su soma se localiza en las astas ventrales de la médula espinal, mientras que su axón recorre el nervio periférico.

- Terminal presináptica: Constituye el botón axónico amielínico y se pone en contacto con el órgano efector.
- Espacio o hendidura sináptica: es una separación de aproximadamente 50 nm de ancho, contiene líquido extracelular y moléculas para la adhesión sináptica entre la neurona y el músculo (38,48).
- Terminal postsináptica: formada por la membrana celular de las fibras musculares estriadas esqueléticas, presenta invaginaciones o pliegues de unión que aumentan la superficie de contacto, dichos pliegues contienen receptores para acetilcolina (ACh), siendo este el neurotransmisor implicado en esta sinapsis (1, 38, 50).

La señal eléctrica que llega a la NMB se transmite por conducción ortodrómica hasta la terminal presináptica, que es donde se provocará la activación de los canales de Ca^{2+} voltaje dependiente por potencial de acción. Una vez abiertos estos canales, se facilita la entrada masiva de Ca^{2+} a la terminal presináptica provocando la liberación de vesículas por medio de exocitosis, las cuales contienen ACh. La ACh se unirá a los receptores nicotínicos ubicados en la terminal postsináptica en la superficie de la membrana del músculo, esta unión es de apenas unos milisegundos (ms) y va a permitir la activación de canales de calcio dependientes de voltaje presentes en el sarcolema (1,47).

Con la liberación del Ca^{2+} , desde el retículo sarcoplásmico, se activarán las proteínas como la actina y la miosina, las cuales son necesarias para la contracción muscular (1).

Ya que la ACh es liberada, se degrada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Los productos de degradación son el acetato y la colina, esta última es reciclada para ser usada posteriormente en la formación de nuevas moléculas de ACh (48,51).

Estos eventos culminan con el retorno de la membrana postsináptica al potencial de reposo y así iniciar este ciclo para una nueva contracción muscular (1, 38, 47).

Se conoce que el potencial de membrana en reposo del músculo estriado es de entre -80 a -90 milivolts (mV), mientras que el de la NMB es de -70 mV (1, 51, 52).

2.1.2.3 Acoplamiento excitación-contracción

Las células del músculo esquelético presentan un característico potencial de reposo de la membrana, el cual, en presencia de un estímulo de despolarización ocasiona la contracción del músculo (38).

Cuando el músculo se encuentra en reposo, los iones Ca^{2+} se encuentran dentro del retículo sarcoplásmico. Para que los iones de Ca^{2+} sean liberados se necesita de la llegada de un potencial de acción, llevado por los túbulos T, al retículo sarcoplásmico.

Los iones de Ca^{2+} liberados al sarcoplasma (citoplasma de la célula muscular) se unen al sarcómero, el cual es la unidad contráctil básica de la fibra muscular, éste se acorta y se provoca la contracción muscular. Una vez transmitido el potencial de acción se vuelve a bombear el Ca^{2+} al interior del retículo sarcoplásmico y así se produce la relajación muscular (52,53).

2.1.2.4 Espasticidad

Clásicamente se ha descrito a la espasticidad como un desorden del movimiento voluntario en los músculos implicados por debajo del sitio de lesión, donde existe incremento tónico dependiente de la velocidad en los reflejos de estiramiento (54). Este incremento se debe al daño en las señales inhibitorias supraespinales, presentándose así la hiperexcitabilidad de los reflejos miotáticos espinales como un componente del SNMA (55-57).

La espasticidad se presenta hasta en el 70% de los pacientes que sufren LME crónica (47,48,55); siendo los músculos antigravitatorios, por debajo del sitio de lesión de la médula espinal, los más afectados (55).

Para el mejor entendimiento de la espasticidad; es necesaria la descripción de algunos otros términos como lo es la hipertonía, la cual es entendida como la resistencia al movimiento pasivo de una extremidad, que se presenta en pacientes

con lesiones de la NMA. En el SNMA, la hipertonia la podemos dividir en dos componentes: 1) la mediada por reflejos, que corresponde a la espasticidad y 2) la debida a cambios del tejido, también llamada hipertonia no refleja o intrínseca (Figura 1) (57).

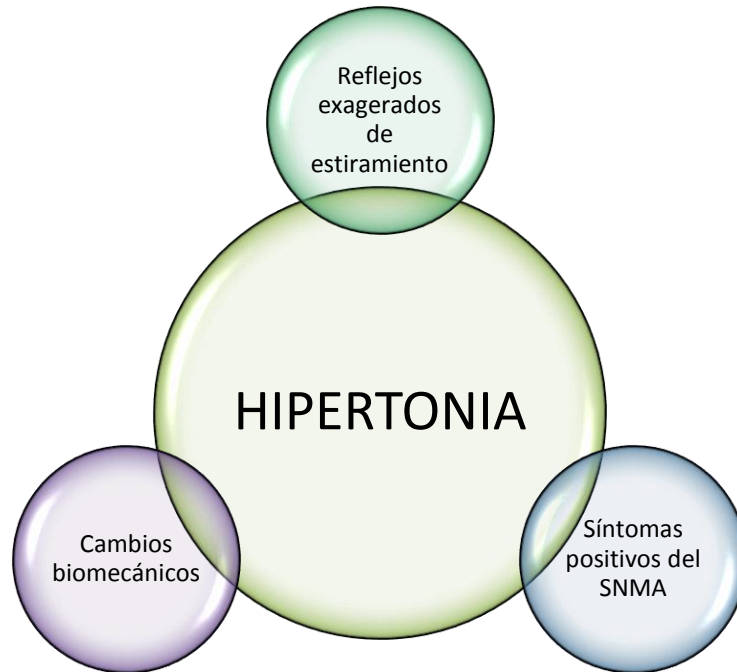


Figura 1. Factores que desencadenan hipertonia. Figura que muestra las diversas causas de hipertonia; aquí se mencionan las correspondientes a la LME.

Como consecuencia de ello, se producirá espasticidad y cambios en las propiedades viscoelásticas del músculo; que en conjunto ocasionará contracciones musculares sostenidas (63).

La espasticidad, a grandes rasgos, está compuesta de síntomas positivos y negativos. Los síntomas positivos se deben a la liberación de circuitos excitadores mientras que los negativos reflejan la disfunción de los haces corticoespinales presentándose como hipotonía y pérdida (o reducción) de los reflejos profundos de los tendones (Cuadro 1); de los cuales los síntomas positivos son más sencillos de identificar y tratar que los negativos (64).

Síntomas positivos en el SNMA:	Síntomas negativos en el SNMA:
Clonus	Paresia
Espasmos flexores	Pérdida de la destreza
Distonía	Fatiga rápida
Hiperreactividad de reflejos cutáneos y autónomos	Debilidad
Anomalías posturales	Alodinia

Cuadro 1. Síntomas del Síndrome de Neurona Motora Alta (SNMA). En éste cuadro se puede diferenciar entre los síntomas característicos positivos y negativos del SNMA.

Actualmente se han hecho algunas adiciones a esta definición con la finalidad de cubrir todos los signos y síntomas que se presentan en esta patología tan heterogénea; cuyo abordaje debe ser multidisciplinario (58,59), por lo que existen diversos autores que proponen la inclusión de evaluaciones tanto objetivas como subjetivas para la valoración de la espasticidad tónica, espasticidad fásica, espasmos involuntarios y calidad de vida; para poder ofrecer la terapia más adecuada al paciente (59-62).

Otra de las consecuencias de la LME, son los cambios biomecánicos, que corresponden al aumento en la rigidez articular; esto, como producto de alguna de las siguientes tres causas: rigidez muscular pasiva, rigidez refleja mediada neuralmente, rigidez del músculo activo (65).

2.1.2.4.1 Fisiopatología de la espasticidad

Inmediatamente después de la LME, se presenta parálisis flácida con duración de uno a tres días o hasta algunas semanas; que eventualmente conllevará a la espasticidad (48).

Semanas después comienzan a presentarse los signos de la espasticidad, como la hiperreflexia, el incremento del tono muscular y los espasmos (38,45).

Este incremento se debe al daño en las señales inhibitorias supraespinales que ejercen las interneuronas, las cuales funcionan como centros de integración de las órdenes supraespinales, es decir, como centros de integración premotoneuronal. Éstas ejercen su acción a través de la liberación de neurotransmisores, como el ácido gamma amino butírico (GABA), capaces de modular el potencial de acción (47,48); pero, durante la LME; pierden su capacidad de inhibición, presentándose así la hiperexcitabilidad de los reflejos de estiramiento (55,56). Esto, aunado a los cambios secundarios del tejido blando de los miembros paralizados provoca la resistencia al movimiento pasivo, signo característico de los pacientes con LME (66).

Retomando el desbalance iónico que se lleva a cabo en la LME; se debe enfatizar que éste no se da únicamente a nivel de las dendritas o la hendidura sináptica del SNC, sino que también puede presentarse en los botones sinápticos y uniones neuromusculares, induciendo con ello una contracción sostenida involuntaria causada por la ATPasa dependiente de Ca^+ , desencadenando a su vez la producción de una serie de mecanismos lesivos para el organismo como la liberación de neurotransmisores como ACh y la producción de radicales libres como óxido nítrico (del en inglés nitric oxide o NO) por las sintasas constitutivas, la activación de caspasas, lipasas y fosfolipasas (todas estas dependientes de Ca^{2+}) provocando la inevitable muerte neuronal y muscular en las zonas afectadas (54,69,70).

Debido a la alta demanda de la ATPasa dependiente de Ca^+ , se consumen grandes cantidades de adenosín trifosfato (del inglés adenosine triphosphate o ATP). El ATP, de manera fisiológica, es liberado a la matriz extracelular gracias a la activación de los canales de panexina 1 (Panx1) (71-73); ya en este lugar facilita la acción de ACh (74), incrementa la actividad del receptor de ACh (AChR) (75), activa los canales de K^+ (76) e inhibe los canales de cloruro (Cl^-) a través de la activación de los receptores purinérgicos P2Y_1 (77).

Durante la LME se lleva a cabo la sobreexpresión de Panx1 y la expresión de receptores purinérgicos ionotrópicos (P2X₇Rs) y conexinas (Cxs) para cubrir las necesidades de la ATPasa dependiente de Ca²⁺; provocando entre otras cosas que los niveles tan elevados de ATP fuera del sarcolema causen incremento en la permeabilidad de membrana a iones y moléculas pequeñas (78).

A pesar de los esfuerzos por mantener la contracción muscular debido a la espasticidad, los requerimientos de ATP no se logran cubrir; siendo una de las consecuencias la activación de otras vías metabólicas, como la de ubiquitina-proteosoma y así obtener una fuente adicional de energía, por lo que se consumirán las proteínas de los músculos comprometidos, evento que provocará la atrofia de los mismos (38).

2.1.2.4.2 Respuesta inflamatoria en la espasticidad

Gracias a novedosos descubrimientos, se ha llegado al entendimiento de que las células musculares son células de tipo no inmunológico que ante un estímulo inflamatorio actúan como recurso de mediadores y llevan a cabo la expresión de una gran variedad de citocinas proinflamatorias, también llamadas miocinas; quimiocinas y moléculas de superficie; lo que contribuye al sostén y amplificación de la inflamación local (79,80).

Como en todo proceso inflamatorio, una vez que es identificado el daño, se inicia la respuesta innata con el arribo de células como los neutrófilos y macrófagos, cuyo objetivo principal es fagocitar los detritos necróticos y establecer la periferia del área lesionada. Estas células secretan citocinas que incrementan la extensión de la inflamación (38).

Mediante diversas técnicas de biología molecular, se ha logrado identificar que, en el estado proinflamatorio de las miofibrillas, se lleva a cabo la expresión de factores como IL-8, IL-1 β , TNF- α , IL-1- α , IL-6, IL-2, interferón gamma (IFN- γ), la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (del inglés monocyte chemotactic protein 1 o MCP-1) y RANTES (del inglés Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted), además de la infiltración de leucocitos y células

endoteliales (81). De igual manera se han identificado citocinas antiinflamatorias como IL-4, el factor de crecimiento transformante (del inglés transforming growth factor- β o TGF- β) e IL-10 (82).

Se debe resaltar la función que desempeñan algunas de estas citocinas; por ejemplo, IL-8, está presente en el proceso tanto agudo como crónico de la lesión y es un potente quimioatrayente de neutrófilos (83).

IL-6 también es único en su función ya que guía la transición de la fase aguda hacia la crónica modificando el fenotipo de las células (38, 80, 84).

IL-1 β es capaz de producir inflamación sistémica a través de la activación de la vía de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) con la consecuente formación de prostaglandinas (PGE-2) que tienen su efecto en el hipotálamo anterior. Es bien sabido que durante los procesos inflamatorios se producen radicales libres que son perjudiciales; sin embargo, existen sus excepciones ya que la producción de NO en grandes cantidades y por tiempo prolongado, a partir del estímulo que ejerce IL-1 β sobre la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (del inglés inducible nitric oxide synthase o iNOS) en células inmunes como macrófagos y neutrófilos, siendo el NO potente vasodilatador de los vasos sanguíneos circundantes, lo que facilita la llegada de más células al sitio; además del incremento en la oxigenación (85).

Particularmente en el músculo esquelético inervado se produce el factor neurotrófico ciliar (del inglés ciliary neurotrophic factor o CNTF), el cual proviene de la superfamilia de las IL-6, quien desencadena una gran cantidad de respuestas inflamatorias induciendo efectos caquéticos, fiebre sistémica y respuesta proteica hepática de fase aguda (38,80).

Otra de las moléculas presentes en las miopatías es la molécula de adhesión intercelular-1 (del inglés intercellular adhesion molecule-1 o ICAM-1), la cual es expresada no sólo en el endotelio de las arteriolas y vénulas; sino también en las fibras musculares, sobre todo en las no necróticas, que se encuentran invadidas de células mononucleares. Esto sugiere que esta molécula está implicada en la

interacción de los leucocitos con el endotelio y en procesos citotóxicos; lo cual contribuye al proceso de limpieza del área comprometida (80, 86-88).

No es la excepción que en la LME estos mecanismos proinflamatorios desencadenados en la médula espinal contribuyan en gran parte a la apoptosis y posterior atrofia muscular debido a la activación del factor de transcripción NF- κ B (del inglés nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells) (78, 80).

2.1.2.4.3 Actividad eléctrica en un músculo espástico

El cronometraje de la actividad muscular es un método analítico utilizado para el entendimiento del control del SN sobre el movimiento (89), siendo el método más utilizado la electromiografía (EMG), la cual añade un contexto fisiológico a los patrones de movimiento observados en un individuo o eventos anómalos específicos durante el movimiento (90).

La EMG se refiere a los métodos de estudio de la actividad eléctrica del músculo y clásicamente se evalúan tres parámetros: la amplitud, la frecuencia y el tiempo. Éstos nos ayudarán a discernir si la actividad espontánea presentada es normal o patológica de acuerdo a las características de los potenciales; se entiende como actividad espontánea a aquella actividad eléctrica que puede ser registrada a partir de un músculo completamente relajado después del cese de la actividad inducida y cuando el electrodo no está siendo movido (91).

Como ya se había mencionado, los déficits en los mecanismos o vías de control motor como la excitabilidad de la neurona motora α , la inhibición presináptica, la inhibición recíproca, la inhibición recurrente y los cambios polisinápticos son responsables de la espasticidad (92,93) y pueden ser registrados gracias a la EMG.

Dentro de las pruebas establecidas para la evaluación mediante EMG de la espasticidad, se encuentra la determinación de la onda M, la cual se refiere a un potencial de acción compuesto evocado de un músculo como resultado de un estímulo eléctrico simple a su nervio motor, por convenio la onda M, ocasionada

por la estimulación supramáxima es usada para estudios de conducción nerviosa-motora (94).

Para su análisis se determinan latencia y amplitud; la latencia, normalmente denominada latencia motora, es la duración expresada en ms al inicio de la primera fase, ya sea positiva o negativa, de la onda M; esto describe al intervalo de tiempo entre el inicio del estímulo y de su respuesta, se nombra también latencia de inicio. En términos fisiológicos representa tres eventos; el tiempo que toma el impulso en viajar a lo largo de las fibras nerviosas y su arborización terminal a partir del punto de estimulación, el retraso que ocurre a la unión neuromuscular antes de que las fibras musculares sean excitadas, el cual es de aproximadamente 1 ms, y el tiempo que toma el impulso en viajar a lo largo de las fibras musculares a la zona de lectura del electrodo de registro (95,96).

Entretanto la amplitud expresada en mV corresponde a la amplitud del pico en relación a la basal durante la primera fase negativa a menos que se especifique lo contrario (97), esto relaciona al número de fibras activadas, la distribución de sus velocidades de conducción, la distancia entre los electrodos de registro y estimulación y la distancia del nervio a los electrodos de registro (94).

En aquellos pacientes que padecen SNMA se han evidenciado anomalías en la EMG, traducidas en la alteración del reclutamiento de las unidades motoras, alteraciones en el orden de reclutamiento y cambios en los patrones de descarga de unidades motoras (98).

Cabe mencionar que el voltaje promedio de amplitud aumenta en pacientes que presentan espasticidad debido a la hiperexcitabilidad neuronal que presentan (91). En las fases aguda y crónica en la LME se ha descrito que hay presencia de actividad espontánea anormal (43).

2.1.2.4.4 Tratamiento para la espasticidad

El manejo óptimo del paciente con espasticidad va a depender del entendimiento de la fisiopatología y conciencia de la historia natural de la enfermedad (99); así como de las ventajas y desventajas que cada uno de los modelos de tratamiento

provee. Dentro de las características clínicas a evaluar se encuentra la distribución de la espasticidad, ya sea localizada o generalizada. Si bien no resulta una decisión sencilla, se debe evaluar la respuesta del tono muscular y de su efecto en el sistema músculo esquelético (96, 99).

En la práctica médica existen muchas opciones para disminuir la espasticidad, que van desde las no invasivas como la medicación con fármacos antiespásticos y la fisioterapia hasta el uso de técnicas invasivas como lo es la cirugía (45, 100).

Actualmente es posible clasificar los tratamientos farmacológicos en tres grupos principales (63,95):

1. Fármacos sistémicos: Ej. baclofeno, dantroleno, tizanidina, diacepam, cloracepato dipotásico, clonacepam y clonidina.
DESVENTAJAS DE SU USO: Estos fármacos no son selectivos y pueden causar pérdida de la función; tolerancia al cabo de pocos meses; provoca la disminución de la fuerza en músculos normales.
Cabe resaltar que ninguno es lo suficientemente efectivo para disminuir la espasticidad.
2. Neurolisis química: Se basa en la inyección de algún alcohol, como el fenol, para el bloqueo nervioso y de los puntos motores.
DESVENTAJAS DE SU USO: Ocasiona pérdida de la sensibilidad en la piel y disestesia o síndrome de dolor regional complejo; además de generar tolerancia con el uso prolongado.
3. Inyección de toxina botulínica tipo A (BTX-A): Se fundamenta en la inhibición de la liberación de acetilcolina en la hendidura sináptica.
Ha mostrado ser un agente antiespástico efectivo y causa efectos adversos menores como erupciones cutáneas, síntomas de ataque al estado general y debilidad en los músculos tratados.
Debido a su gran valor terapéutico, es la terapia farmacológica más empleada.

Dentro de la rama de la fisioterapia, existe una técnica denominada punción seca profunda (PSP) en el tratamiento de Puntos Gatillo Miofasciales (PGM) (96).

A continuación, se contrasta el tratamiento con BTX-A contra la punción seca (PS) de los puntos gatillo (PG) (Cuadro 2):

Técnica	Zona de efecto	Mecanismo de acción	Efectos
BTX-A	Placa motora	Química	Inhibe los receptores de acetilcolina
PS-PG	Placa motora	Mecánica	Ruptura de la placa motora disfuncional

Cuadro 2. Comparativo de los tratamientos de mayor uso por mecanismo de acción. Se contrastan los tratamientos BTX-A y PS de los PG).

2.1.3 Punción Seca

La PS es una técnica terapéutica practicada por muchas disciplinas, tales como la fisioterapia, la medicina, incluyendo la veterinaria y la odontología (101).

El objetivo de la técnica se basa en el tratamiento del dolor y la disfunción en diferentes tejidos corporales mediante la introducción de un filamento sólido a través de la piel sin la introducción de algún fármaco, de ahí el nombre de la técnica, considerándose de invasión mínima, de bajo riesgo para el paciente, de bajo costo y fácil de aprender (102).

La PS se puede clasificar en punción seca superficial (PSS) y PSP o punción seca de los puntos gatillo (PSPG) atravesando diferentes planos anatómicos según la variación utilizada (101). Esta técnica fue originalmente descrita por Travell y Bobb para la inyección de los PGM (104).

La técnica consta en insertar y retirar, de manera rápida, la aguja en múltiples direcciones para encontrar un sitio sensible en una región del PGM. Se prefiere que se haga de manera rápida la inserción y retiro ya que de esta forma se evita un daño causado a la fibra tisular durante una inserción lenta o por la respuesta de

espasmo local provocada por la punción. De esta manera, el dolor causado por el PGM puede ser eliminado completamente de manera inmediata después de haber puncionado estos múltiples sitios sensibles (111,112). La multipunción generalmente provee efectos mejores y más rápidos para el control inmediato del dolor (101).

Para que la terapia sea efectiva, se busca la respuesta de espasmo local (REL) que es la contracción súbita de las fibras musculares pertenecientes a una banda tensa; estas contracciones son producto de los reflejos de la médula espinal inducidos por la estimulación de la zona sensitiva en la región del PG, lo que indica que la aguja fue introducida de manera precisa (113, 114).

Existen diversos mecanismos benéficos a raíz de la PS; inicialmente se observa la destrucción de la placa motora disfuncional que causa un PGM, así como del acortamiento de los miocitos, y sus sarcómeras, relacionados con dicha placa motora, esto debido a que el tamaño de la aguja va de los 160 a 450 μm de diámetro, mientras que el diámetro de un miocito es de 20 a 60 μm (101). Este mecanismo abre paso a la remodelación tisular al provocar la polarización eléctrica del músculo y del tejido conjuntivo con transformación del estímulo mecánico en actividad eléctrica (115).

De manera fisiológica, los músculos poseen muchos tipos de nociceptores que pueden ser activados a través de diversos procesos de carácter mecánico y químico (103); por lo que en esta terapia se lleva a cabo la ruptura mecánica de las placas motoras terminales disfuncionales, provocando una REL, que promueven la persistencia de la placa motora disfuncional (96).

De acuerdo con Simons y cols. un PG es una zona hiperirritable localizada en una banda tensa de algunas fibras de un músculo esquelético que tienen origen endógeno con independencia de la actividad electrogénica (104); que generan alodinia e hiperalgesia a la compresión, la distensión, la sobrecarga o la contracción del tejido, que generalmente responde con dolor referido que es percibido en una zona alejada de la original (105).

Los PG pueden provocar disfunciones motoras, por ejemplo, debilidad muscular, incremento de la irritabilidad motora, espasmo, desequilibrio muscular y alteraciones en el reclutamiento motor (106).

Entorno a los PG, existen acumulaciones de sustancias que estarán promoviendo la formación de zonas hiperirritables. De estas sustancias podemos mencionar neurotransmisores, como la ACh; y citocinas proinflamatorias como la IL-6, IL1 β , TNF α ; además de bradicinina y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (del inglés calcitonin gene related peptide o CGRP), el cual amplifica la liberación de la ACh e inhibe a la AChE, lo que alimenta el círculo vicioso para mantener los PG (107,108).

De manera característica, los PG presentan su microambiente con bajas concentraciones de oxígeno debido a la contracción muscular sostenida, lo que provoca un descenso en el pH por debajo de 5, lo que es suficiente para activar a los nociceptores musculares (109,110).

El pH bajo reduce la cantidad de AChE en la unión neuromuscular y desencadena la respuesta inflamatoria muscular disminuyendo el umbral mecánico y la activación de los receptores nociceptivos periféricos (101).

2.1.3.1 Punción seca después de la LME

De manera simultánea se ha observado disminución inmediata en las concentraciones de varios neurotransmisores, incluyendo el CGRP y la sustancia P, así como de las diversas citocinas e interleucinas, antes mencionadas, en el líquido extracelular del entorno local del PG; a pesar de ello, no logran alcanzar las concentraciones normales en músculo (116). La disminución de las concentraciones de estos compuestos puede deberse al incremento local del flujo sanguíneo, a la interferencia con los canales de membrana o bien a la alteración de los mecanismos de transporte en relación con la aparición de una respuesta inflamatoria brevemente potenciada (117). Sin embargo, el efecto locomotor, molecular y eléctrico que puede tener la PS sobre la espasticidad muscular, así como el momento en el cual es mejor emplearla no ha sido caracterizado.

2.2 Planteamiento del problema y justificación

La espasticidad es una secuela frecuente después de la lesión crónica de la médula espinal y tiene repercusiones negativas en la calidad de vida del paciente. Actualmente existen tratamientos invasivos y no invasivos. Dentro de los tratamientos poco invasivos para disminuir la espasticidad podemos mencionar la PS, una técnica novedosa con un gran éxito en la práctica clínica, sin embargo, aún no se aclaran los mecanismos que se llevan a cabo después de su utilización en pacientes con lesión medular. Es por eso que con esta investigación se pretende conocer los cambios que ocurren a nivel motor, eléctrico y molecular para poder aportar datos para elaborar planes de tratamiento más acertados (Figura 2).

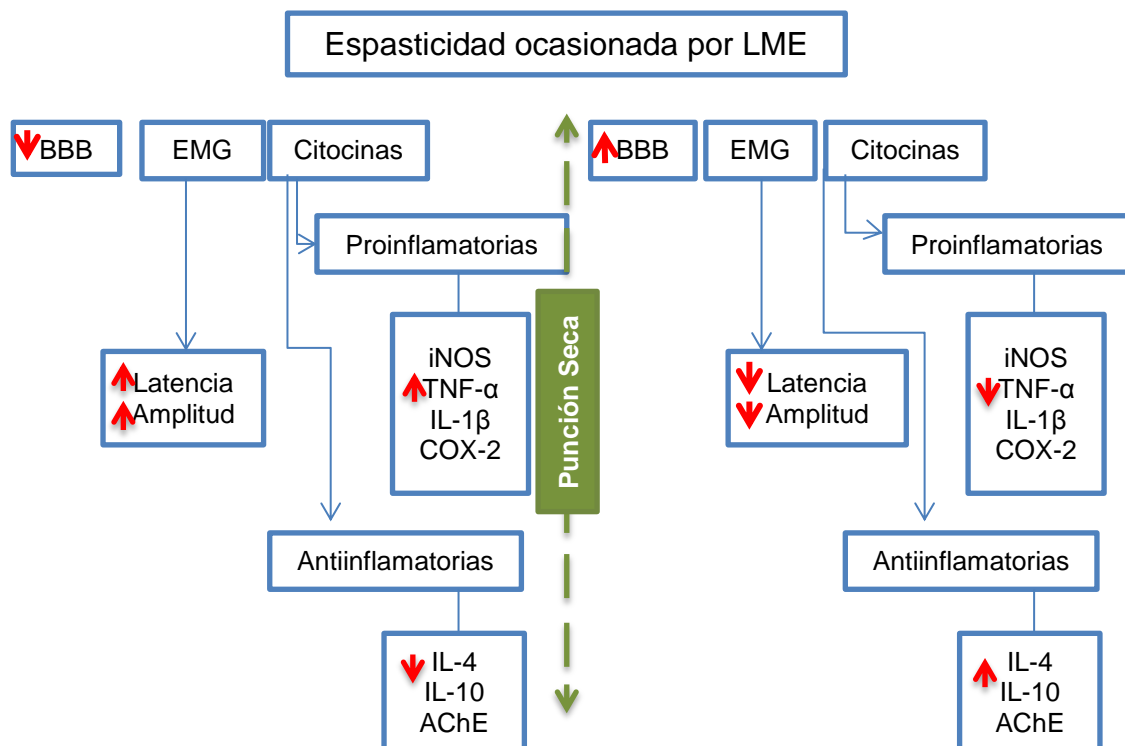


Figura 2. Hipótesis gráfica de los efectos de la punción seca sobre la espasticidad ocasionada por la LME en diferentes métodos de valoración. Nótese que los términos de medición son la escala de locomoción a campo abierto de Basso, Beattie y Bresnahan (BBB), EMG y la medición de citocinas tanto proinflamatorias y antiinflamatorias mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (del inglés reverse transcription polymerase chain reaction o RT-PCR).

2.3 Objetivo general

Evaluar la espasticidad muscular y la expresión génica de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en los músculos gastrocnemios de ratas con LTME crónica con y sin punción seca.

2.3.1 Objetivos particulares

- 1) Evaluar la función motora mediante la escala BBB en ratas con LTME crónica a nivel de T9 con y sin punción seca.
- 2) Evaluar la espasticidad del músculo gastrocnemio mediante la técnica de EMG en ratas con LTME crónica a nivel de T9 con y sin punción seca.
- 3) Analizar la expresión génica de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , iNOS y COX-2) en el músculo gastrocnemio de ratas con LTME crónica a nivel de T9 con y sin punción seca.
- 4) Analizar la expresión génica de citocinas antiinflamatorias (IL-4 e IL-10) en el músculo gastrocnemio de ratas con LTME crónica a nivel de T9 con y sin punción seca.
- 5) Analizar la expresión génica de AChE en el músculo gastrocnemio de ratas con LTME crónica a nivel de T9 con y sin punción seca.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño experimental

Se realizaron dos experimentos, siendo la variante el tiempo de análisis después de la punción seca (3 horas y 7 días), en cada uno de ellos se formaron 2 grupos:

Grupo 1: Ratas con LTME con punción seca

Grupo 2: Ratas con LTME sin punción seca

Nota: Se usaron 5 animales como control de la espasticidad para todos los experimentos, los cuales no fueron sometidos a LTME.

3.2. Características de la muestra

Se utilizaron 24 ratas hembras *Sprague Dawley* (resistentes a desarrollar encefalomiелitis alérgica experimental o EAE) de un peso de 270-300 g, provistas por el Instituto Camina A.C.

Para llevar a cabo la evaluación de la espasticidad muscular y el análisis de expresión de iNOS, COX-2, IL-1 β , TNF α , IL-10, IL-4 y AChE; se realizó un estudio longitudinal llevando a cabo las pruebas hasta los 30 días después de la LTME a nivel de T9, los animales fueron evaluados para analizar la recuperación motora (escala BBB) cada 7 días. La espasticidad muscular se evaluó mediante electromiografía, una vez transcurridos los 20 días después de la LTME, tiempo en el cual se realizó la punción seca a 10 animales, con la previa localización del punto gatillo en el músculo gastrocnemio. Tres horas y 7 días después de la punción seca, se evaluaron los animales con la escala BBB y electromiografía para analizar su efecto sobre la espasticidad muscular.

Una vez que se realizó la evaluación, en cada uno de los tiempos previamente mencionados, se llevó a cabo el análisis de expresión génica, formando para tal efecto 2 grupos (sin punción seca, con punción seca) / tiempo con 5 animales al azar, obteniendo RNA (del inglés ribonucleic acid) total del músculo implicado en la punción y analizándolo por RT-PCR (Cuadro 3).

Grupo / Tiempo (30 días)	RT-PCR	
	N° animales	
	3 hrs	7 días
1. LTME con punción seca	5	5
2. LTME sin punción seca	5	5
Control	2	2
TOTAL	24	

Cuadro 3. Distribución de animales en cada experimento

3.3. Consideraciones éticas

Para la realización del proyecto se tomaron en cuenta los lineamientos establecidos por el Reglamento para el uso y cuidado de los animales en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia aprobado por el H. Consejo Técnico el 23 de marzo de 1988 y lo establecido en la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Cabe mencionar que cada uno de los procedimientos, técnicas, intervenciones y cuidados empleados en los animales, están estandarizados y aceptados a nivel internacional, teniendo como principal objetivo un diseño aprobado para generar el mínimo sufrimiento animal.

3.4. Técnicas utilizadas

3.4.1 Lesión Traumática de Médula Espinal

Las ratas se anestesiaron mediante la inyección intraperitoneal de mezcla de clorhidrato de xilacina (10 mg/kg) y ketamina (90 mg/kg). Diez minutos después de la inyección se evaluó la profundidad de la anestesia; mediante la observación de pérdida de reflejos, p. Ej el reflejo podal, para iniciar la cirugía. Previa asepsia de la región toraco-lumbar, se realizó un corte longitudinal y se ejecutó la laminectomía a nivel de la 9ª vértebra torácica hasta exponer la médula espinal. La sección completa de la médula espinal se realizó mediante bisturí, incidiendo las meninges en forma longitudinal cuidando de no dañar la médula espinal. Con una pinza de disección con dientes de ratón para microcirugía se separaron las meninges y con tijera de microcirugía se realizó la lesión de médula espinal de un solo corte transversal, verificando posteriormente que se hubiera cortado en su totalidad la médula mediante un gancho para microcirugía. Finalmente se suturaron las meninges con sutura absorbible calibre 10-0 con un punto en X.

Posteriormente se suturaron los músculos y la piel para llevar a cabo la asepsia correspondiente en el sitio de lesión y los cuidados postoperatorios a continuación descritos.

3.4.2 Cuidados postquirúrgicos

Inmediato al término de la cirugía se administró ketoprofeno como analgésico vía subcutánea (SC) a dosis de 5 mg/kg/día durante 5 días, enrofloxacin como antibiótico vía SC a dosis de 64 mg/kg/día durante 7 días y solución salina al 0.9% como terapia de líquidos vía intraperitoneal (IP). Los animales se alojaron en cajas de policarbonato con cama de viruta estéril y se les proporcionó alimento especial para roedor y agua purificada, ambos *ad libitum*. De haber sido necesario se les administró alimentación por suplementación mediante cánula oral a aquellos animales que dejaron de consumir alimento. Para el vaciamiento de la vejiga, se les realizó masaje vesical tres veces al día durante los primeros 14 días post-quirúrgicos, además de dar masaje en el colon para estimular la defecación.

3.4.3 Evaluación locomotora (escala BBB)

Para evaluar los procesos de recuperación motora y funcional se llevó a cabo la escala cualitativa de locomoción a campo abierto BBB a doble ciego, donde se le dio una calificación al movimiento voluntario de las extremidades posteriores en las articulaciones de cadera, rodilla y tobillo.

La escala consta de 22 puntos, donde “0” representa ausencia de movimiento y progresivamente va incrementando la calificación con el movimiento de las articulaciones hasta llegar a “21”, nivel que refleja una marcha normal (Cuadro 4) (119).

ESCALA BBB	
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
- 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 cuando no está caminando o pasos ocasionales ($\leq 50\%$), frecuentes (51-94%) o constantes (95-100%), 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 de 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 (número 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 |

Cuadro 4. Escala de evaluación locomotora a campo abierto BBB. Esta escala fue desarrollada por Basso DM, Beattie MS, Bresnahan y consta de 22 puntos, lo cual describe el movimiento de las articulaciones de los miembros posteriores (tobillo, rodilla, cadera) (67).

3.4.4 Punción Seca

Antes de realizar la PS se palpó de manera cuidadosa el PGM del miembro pélvico izquierdo, en la región del muslo en su parte posterior, en la cabeza lateral del músculo gastrocnemio; utilizando como referencia anatómica el vientre muscular del mismo.

Para realizar la técnica de asepsia del sitio de punción se inmovilizó al animal con una franela. Se rasuraron 2 cm alrededor del PGM y se aplicó solución de alcohol al 70%.

Se colocó al animal en posición decúbito ventral para así poder sujetar su miembro pélvico con una inclinación paralela con respecto al piso. Se utilizó una aguja de plata de acupuntura facial (38 G x 0.25") la cual fue introducida no más de 5 mm en el PGM con un movimiento relativamente lento pero continuo hacia adentro y hacia afuera del músculo, en lo que se considera la técnica de punción dinámica (118) hasta percibir una REL en la banda muscular asociada.

De manera inmediata al retiro de la aguja se ejerció presión con una torunda hemedecida con solución de alcohol al 70% en el área puncionada por unos segundos para evitar sangrado e infección del sitio de punción.

3.4.5 Evaluación de espasticidad muscular

Con el fin de determinar la eficacia del tratamiento sobre la espasticidad se evaluó la actividad eléctrica de los de músculos espásticos mediante electromiografía.

3.4.5.1 Electromiografía

La EMG constituye un método de electrodiagnóstico en el estudio de la función motriz. Su valor diagnóstico se basa en ser una técnica objetiva (cuantitativa), debido a que señala la magnitud de la lesión (diagnóstico anatomopatológico) así como el nivel de la misma (diagnóstico topográfico).

Para registrar la EMG se insertaron de manera percutánea dos electrodos de aguja de plata de acupuntura facial (distancia entre electrodos = 1cm) en el músculo gastrocnemio. Un par de agujas se insertaron, por la parte caudal al miembro posterior, muy cercanas al nervio ciático, las cuales estimularon eléctricamente al mismo. Una aguja más se insertó de manera independiente en la base de la cola, la cual aterrizó el circuito eléctrico. Los electrodos se conectaron a un pre amplificador (HS4 fiber optic Biocamp Headstage, WPI) y a un amplificador (DB4 fiber optic amplifier, WPI) para aumentar los registros eléctricos capturados (Figura 3).

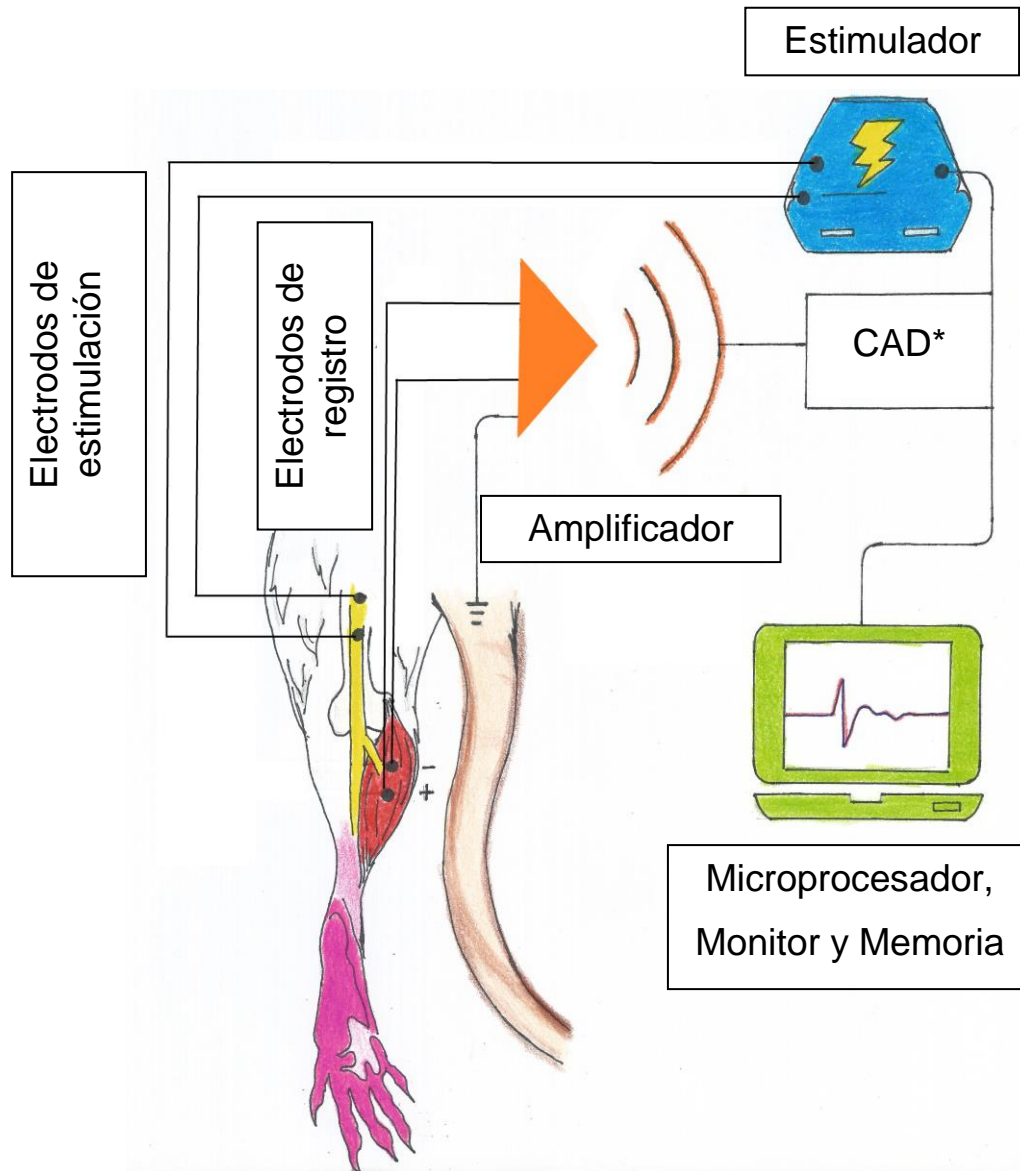


Figura 3. Esquema de los componentes del sistema electrodiagnóstico digital en la valoración del músculo gastrocnemio en rata. Entiéndase que la estimulación se lleva a cabo sobre el nervio ciático cuya rama, el gastrocnemius, inerva al músculo gastrocnemio que recibirá el estímulo mediante un par de electrodos, positivo y negativo. La señal de registro es amplificada 500 veces, esto con la finalidad de volver más amigable su trazo y convertirla a digital para su visualización en el monitor del equipo.

*Convertidor de señal análoga a digital

Los registros de la EMG se realizaron antes, durante y después de la aplicación de la PS del músculo gastrocnemio designado. La señal registrada se digitalizó (Instrunet Model 100 Network A/D) y almacenó en PC para el posterior análisis de la amplitud en milivolts y la latencia en milisegundos.

Antes de realizar el registro electromiográfico se corroboró que no existiera interferencia eléctrica externa a la actividad eléctrica del músculo, como se muestra en la imagen (Figura 4).

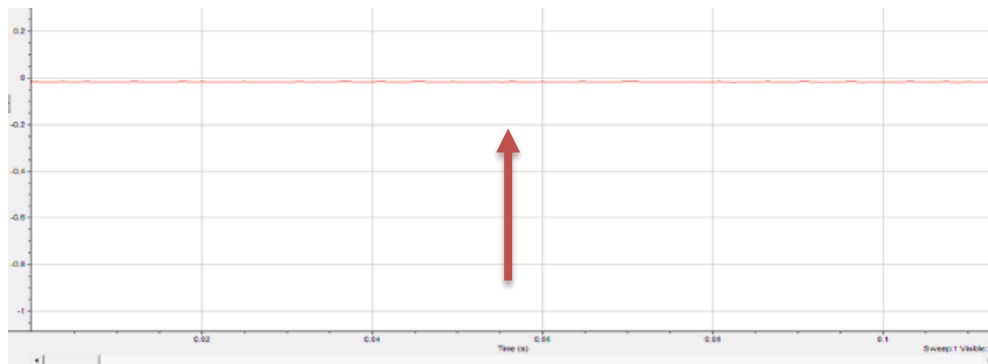


Figura 4. Registro de la actividad eléctrica del músculo antes de realizar el registro electromiográfico. Este procedimiento forma parte de la calibración previo a la evaluación de cada animal. La flecha señala una línea sin variaciones, lo que indica que no existe energía externa que cause variaciones en el voltaje, también llamado ruido.

3.4.6 Análisis de expresión génica RT-PCR

3.4.6.1 Obtención de RNA

Tres horas y 7 días después de haber efectuado la PS se aplicó pentobarbital a dosis letal (120 mg/kg) por vía IP a las ratas del grupo experimental y control. Se obtuvo RNA total a partir de 100 µg del músculo gastrocnemio del miembro tratado por medio de TRIzol (Invitrogen, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La cuantificación de RNA total en μg y la pureza se determinaron por espectrofotometría (UV) leyendo a una longitud de onda de 260 nm y obteniendo la relación 260/280 nm. Si una muestra estaba fuera del rango 1.8 a 2.0 se descartaba para la preparación de DNA complementario (del inglés complementary desoxyribonucleic acid o cDNA).

3.4.6.2 Retrotranscripción

Se retrotranscribieron 2 μg de RNA total de cada muestra usando el Kit Transcriptor cDNA (Roche) y se procesó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.4.6.3 Diseño de cebadores

Para el análisis de los genes se diseñaron cebadores a partir de la secuencia del cDNA de genes de rata reportados en el GENE BANK del NCBI. Los criterios del diseño son los siguientes: un tamaño máximo de 20 nucleótidos, que incluya una secuencia de unión exónica, con una temperatura de fusión (del inglés temperatura melting o T_m) de 60 a 61°C, equilibrio de bases AT y GC, con secuencias que no sean complementarias entre sí y que no forman estructuras secundarias, que amplifiquen fragmentos de 110 a 300 pares de bases (lo que puede permitirnos realizar PCR tiempo real).

3.4.6.4 PCR tiempo real

La PCR tiempo real (RT-PCR por sus siglas en inglés) se llevó a cabo por medio del protocolo Syber Green DNA Master Plus de Roche. Para la amplificación de cada gen se procesó 1 μl de cDNA total en el equipo Light Cycler 2.0 de Roche tomando para cada muestra el valor de CP (del inglés Cross Point), verificando que cada gen tuviera la misma melting curve, que garantiza la especificidad de amplificación del producto. El valor del punto de cruzamiento (del inglés crossing point o CP) de cada gen se utilizó para obtener la normalización por delta 1 y delta 2.

3.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de normalidad para el comportamiento de los datos. Para la BBB y EMG se llevó a cabo una Kruskal Wallis seguida por una U de Mann Withney. Para el análisis de expresión génica debido a que los datos fueron paramétricos se realizó una t de Student, considerando significancia estadística una $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 BBB

Después de la LTME a nivel de T9 los animales presentaron calificaciones alrededor de uno, manteniendo esta puntuación hasta la segunda semana, no obstante, para la tercera semana algunos de los animales de los grupos con punción y sin punción 7 días comenzaron a tener puntuación alrededor de 2, $n=5$. (Figura 5). Para tal efecto se excluyeron a los animales que estaban teniendo una calificación mayor antes de aplicar la terapia, $n=3$ (Figura 6). A pesar de ello a los 28 días, los animales que recibieron la punción seca mostraron un aumento significativo en la recuperación motora ($n=3$, $p \leq 0.05$).

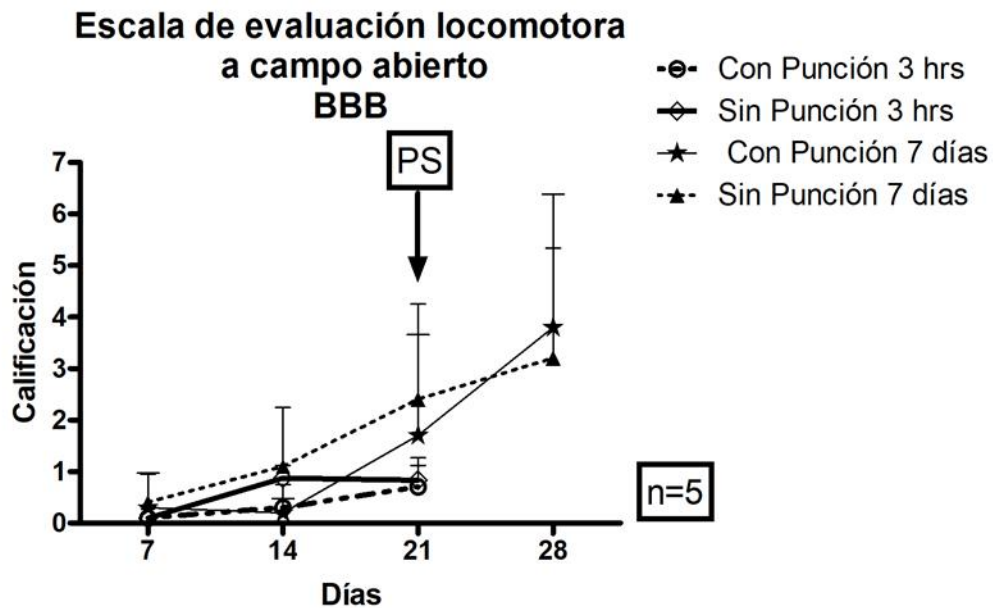


Figura 5. Resultados de la escala de evaluación locomotora a campo abierto BBB, $n=5$. Esta valoración se realizó a lo largo de 28 días. Se registra media y desviación estándar de cada grupo experimental y su control respectivo. Nótese que en el día 21 se aplica el tratamiento de punción seca. Se considera $n=5$, $p \geq 0.05$. Prueba estadística U de Mann-Whitney.

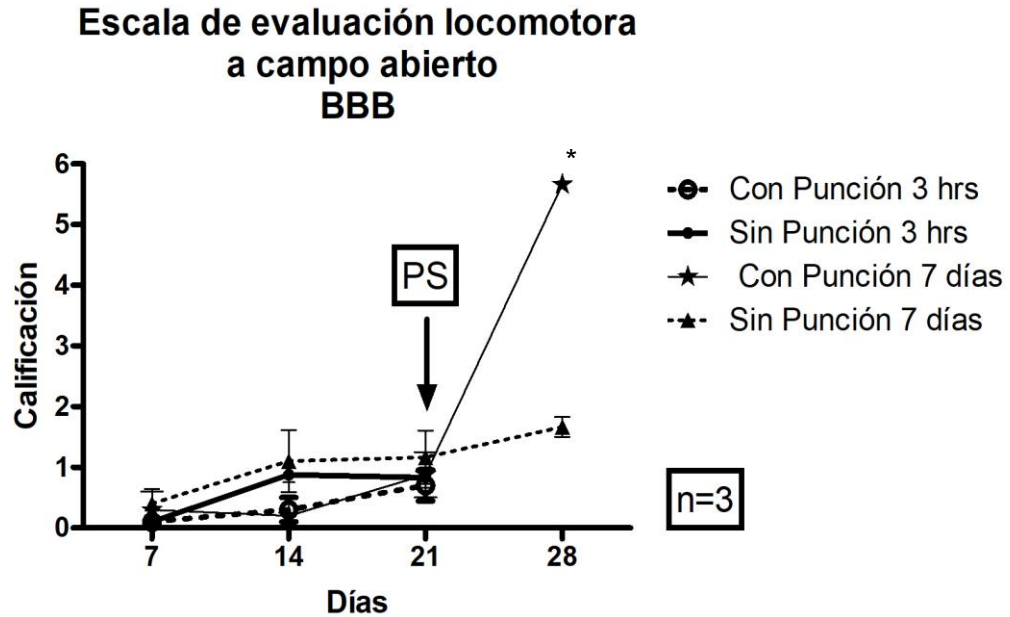


Figura 6. Resultados de la escala de evaluación locomotora a campo abierto BBB. Esta valoración se realizó a lo largo de 28 días. Se registra media y desviación estándar de cada grupo experimental y su control respectivo. Nótese que en el día 21 se aplica el tratamiento de punción seca. Se consideró una $n=3$, $p<0.05$, prueba de U de Mann-Whitney.

4.2 Electromiografía

Veinte días después a la LTME se llevaron a cabo las lecturas de la actividad eléctrica muscular antes y después (3 hrs y 7 días) de aplicar la técnica de punción seca (Figura 7).

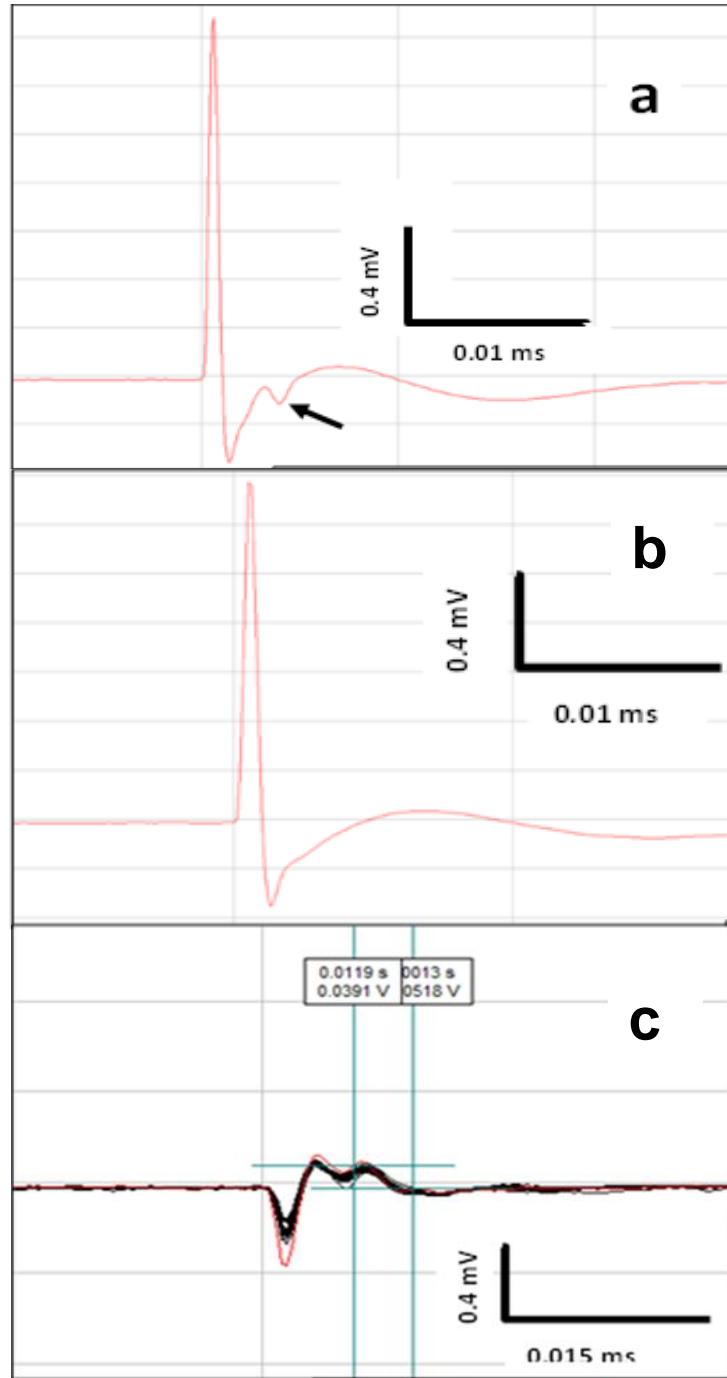


Figura 7. Ejemplo representativo de la EMG antes y después (3 hrs y 7 días) de la punción seca. En la imagen a) se puede observar una curva monofásica negativa con una amplitud de 0.01 mV y una latencia 0.001 ms, en la b) deja de existir un registro de la actividad inmediato al tratamiento; mientras que a los siete días c) vuelve a aparecer la curva monofásica, pero con menor amplitud.

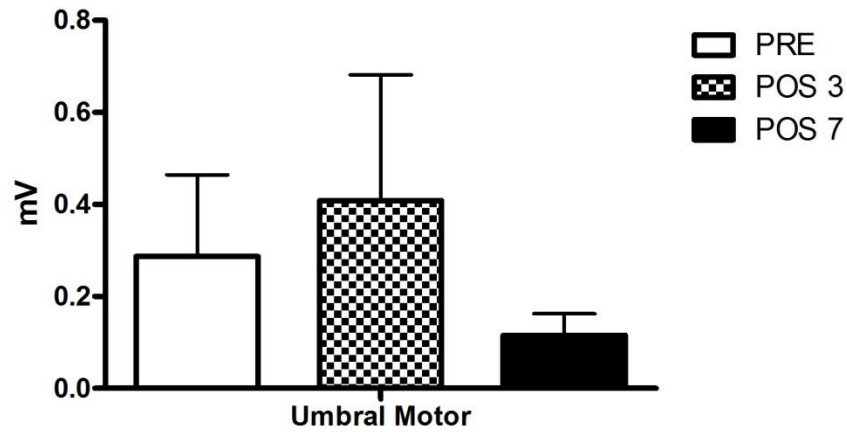
4.2.1 Amplitud

El grupo evaluado pos punción 3 horas mostró en la EMG del umbral motor (UM) una media (μ) de 0.41 con desviación estándar (DE) de ± 0.27 que comparado con el grupo pre punción, el cual obtuvo una $\mu=0.29$ (DE ± 0.18), se encuentra diferencia entre medias de 0.13 mV (45%); sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo ($p=0.18$, prueba de los rangos con signo de Wilcoxon). En comparación con el grupo pre punción el grupo pos punción 7 días después del tratamiento presentó una $\mu=0.12$ (DE ± 0.047) lo que demuestra disminución de 0.17 mV (58.6%) sin ser significativo ($p=0.16$, prueba U de Mann Whitney) (Figura 8).

4.2.2 Latencia

El grupo pos punción 3 horas en la intensidad UM mostró una $\mu=0.0024$ (DE ± 0.00026) que comparado con el grupo pre punción, el cual obtuvo una $\mu=0.006$ (DE ± 0.003), evidenciando diferencia entre medias de 0.0036 ms (60%); siendo esta disminución estadísticamente significativa ($p=0.034$, prueba U de Mann Whitney). En comparación con el grupo pre punción el grupo pos punción 7 días después del tratamiento presentó una $\mu=0.003$ (DE ± 0.0011) lo que demuestra disminución de 0.003 ms (50%) sin ser significativa ($p=0.64$, prueba U de Mann Whitney) (Figura 8).

Análisis de la amplitud antes y después de la punción seca



Análisis de la latencia antes y después de la punción seca

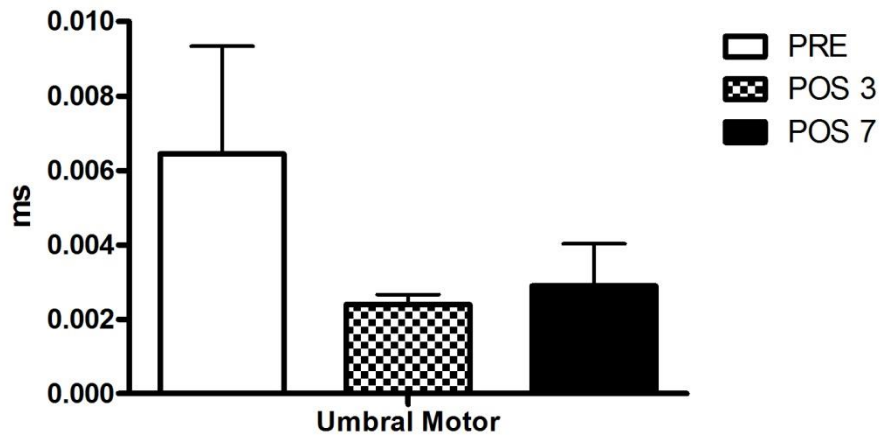


Figura 8. Resultados del análisis de la amplitud y latencia antes y después del tratamiento. Se obtuvo un registro de la actividad durante el umbral motor por cada grupo experimental y se registra su media y desviación estándar, considerándose una $p < 0.05$.

4.3 PCR tiempo real

Los resultados de la expresión génica se dividieron en proinflamatorios y antiinflamatorios en cada uno de los tiempos analizados después de la punción seca (3 horas y 7 días).

4.3.1 Factores proinflamatorios

A) iNOS

Los animales con punción seca después de la LME presentaron efecto significativo en la expresión de iNOS a las 3 hrs y a los 7 días (Figura 9).

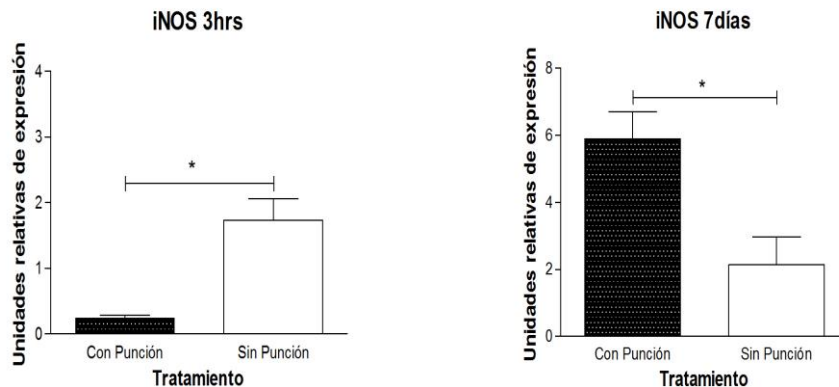


Figura 9. Análisis de la expresión de iNOS después de la punción seca.

Gráfica de barras donde se muestra la expresión de iNOS en los grupos con y sin punción seca en ratas con LME a las 3 horas y a los 7 días, donde se observa que existió disminución estadísticamente significativa a las 3 horas después de la punción ($p < 0.05$, prueba t de Student), sin embargo, a los 7 días los animales a los que se les realizó la punción seca presentaron aumento estadísticamente significativo en comparación con su control ($p < 0.05$, prueba t de Student).

B) TNF α

Los animales con punción seca después de la LME no presentaron efecto significativo en la expresión de TNF α a las 3 horas ni a los 7 días (Figura 10).

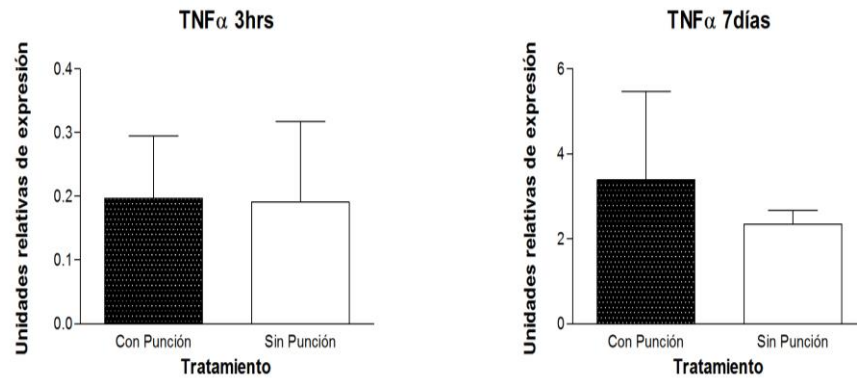


Figura 10. Análisis de la expresión de TNF α después de la punción seca.

Gráfica de barras donde se muestra la expresión de TNF α en los grupos con y sin punción seca en ratas con LME a las 3 horas y 7 días. Como se puede observar existió una tendencia al aumento en la expresión de TNF α , sin embargo, este no fue estadísticamente significativo a las 3 horas ni a los 7 días después de la punción ($p < 0.05$, prueba t de Student).

C) IL-1 β

Los animales con punción seca después de la LME no presentaron efecto significativo en la expresión de IL-1 β a las 3 horas ni a los 7 días (Figura 11).

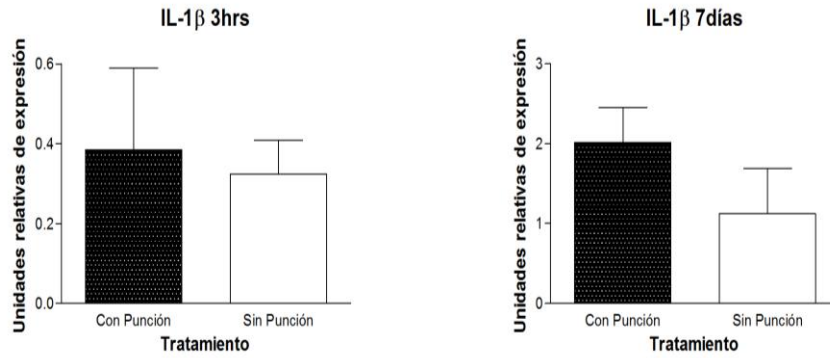


Figura 11. Análisis de la expresión de IL-1 β después de la punción seca. Gráfica de barras donde se muestra la expresión de IL-1 β en los grupos con y sin punción seca en ratas con LME a las 3 horas y a los 7 días, donde se observa que existió tendencia al aumento sin ser estadísticamente significativo a las 3 horas después de la punción, así como a los 7 días ($p < 0.05$, prueba t de Student).

D) COX-2

Los animales con punción seca después de la LME presentaron efecto significativo a las 3 horas y a los 7 días (Figura 12).

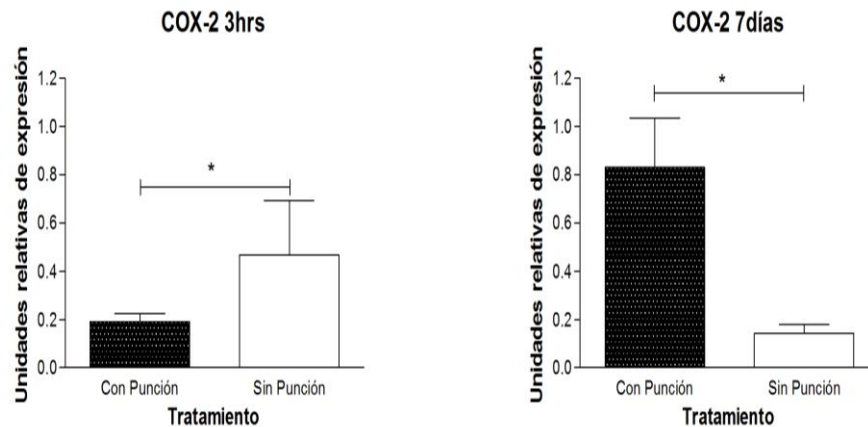


Figura 12. Análisis de la expresión de COX-2 después de la punción seca. Gráfica de barras donde se muestra la expresión de COX-2 en los grupos con y sin punción seca en ratas con LME a las 3 horas y a los 7 días, donde se observa que existió disminución estadísticamente significativa a las 3 horas después de la punción ($p < 0.05$, prueba t de Student), mientras que, a los 7 días en el grupo con

punción se muestra aumento estadísticamente significativo en comparación con el grupo sin punción ($p < 0.05$, prueba t de Student).

4.3.2 Factores antiinflamatorios

A) IL-4

Los animales con punción seca después de la LME no presentaron efecto significativo en la expresión de IL-4 a las 3 horas ni a los 7 días (Figura 13).

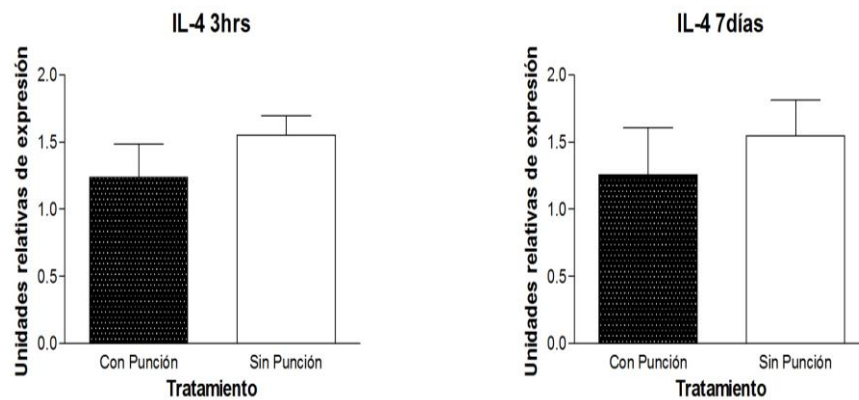


Figura 13. Análisis de la expresión de IL-4 después de la punción seca.

Gráfica de barras donde se muestra la expresión de IL-4 en los grupos con y sin punción seca en ratas con LME a las 3 horas y a los 7 días, donde se observa tendencia no significativa a la disminución de la expresión de IL-4 en el grupo con punción a las 3 horas y a los 7 días aumento no significativo ($p < 0.05$, prueba t de Student).

B) IL-10

Los animales con punción seca después de la LME presentaron efecto significativo en la expresión de IL-10 a las 3 horas, pero no a los 7 días (Figura 14).

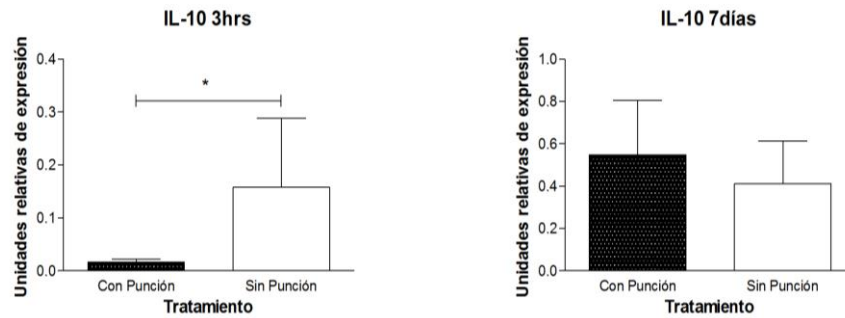


Figura 14. Análisis de la expresión de IL-10 después de la punción seca. Gráfica de barras donde se muestra la expresión de IL-10 en los grupos con y sin punción seca en ratas con LME a las 3 horas y a los 7 días, donde se observa que existió disminución estadísticamente significativa a las 3 horas después de la punción ($p < 0.05$, prueba t de Student), mientras que a los 7 días en el grupo con punción hubo tendencia no significativa al aumento en la expresión de IL-10 ($p < 0.05$, prueba t de Student).

C) Acetilcolinesterasa

Los animales con punción seca después de la LME presentaron efecto significativo en la expresión de AChE las 3 horas y a los 7 días (Figura 15).

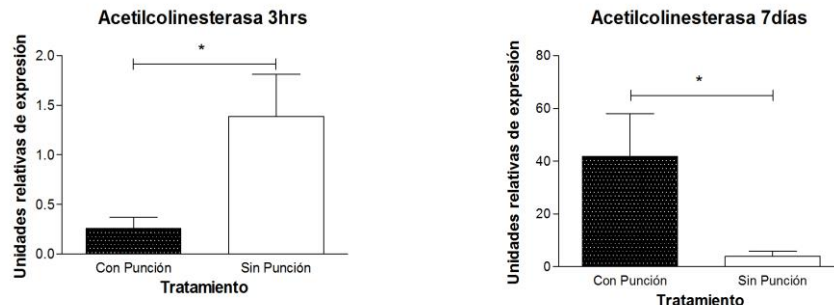


Figura 15. Análisis de la expresión de acetilcolinesterasa después de la punción seca. Gráfica de barras donde se muestra la expresión de AChE en los grupos con y sin punción seca en ratas con LME a las 3 horas y a los 7 días, donde se observa que existió disminución estadísticamente significativa en la expresión de AChE a las 3 horas después de la punción ($p < 0.05$, prueba t de Student), mientras que a los 7 días se muestra aumento estadísticamente significativo en el grupo con punción en la expresión de AChE ($p < 0.05$, prueba t de Student).

5. DISCUSIÓN

Es la primera vez que se realiza un estudio donde se involucran tan diversas técnicas de análisis para evaluar la efectividad de la terapia de PS; esto nos brinda una visión más amplia de cómo ésta técnica, que se utiliza en la clínica para el tratamiento de la espasticidad ocasionada por patologías como el evento vascular cerebral (EVC) y la esclerosis múltiple, realmente mejora esta condición.

A pesar de que existe gran variación en los resultados, se puede observar que los animales con tratamiento a los siete días muestran tendencia al incremento de la puntuación de la evaluación locomotora a campo abierto BBB, lo que habla de que el movimiento en los miembros posteriores mejoraba, esto sin significancia estadística, pudiendo deberse a que el análisis de la recuperación motora necesita llevarse a cabo hasta dos meses después de la intervención para obtener la repercusión de la PS sobre la recuperación paulatina a lo largo del tiempo, como se ha hecho en otros estudios con tratamientos inmunomoduladores. (120, 121)

Mediante la prueba de locomoción a campo abierto BBB, hicimos un análisis indirecto de la espasticidad al evaluar el movimiento de las articulaciones de los miembros posteriores, tal y como lo hacen las evaluaciones clínicas como la escala de Ashworth y Tardieu; sin embargo debido a que estas escalas fueron diseñadas para humanos, su aplicación en animales es imposible debido a la anatomía y fisiología de la locomoción que presenta el modelo animal (124), por lo que el diseño y seguimiento de esta terapia requiere ser atendido en futuras investigaciones y se dé la oportunidad de lograr registros más concluyentes.

En cuanto a la valoración que se realizó por EMG se encontró que, en la búsqueda para provocar el umbral motor, en cada animal, se requería un voltaje distinto lo que llevó a que existiera gran variabilidad de los datos, expresada en DE.

Sin embargo, en los resultados obtenidos en el grupo pos punción a las 3 horas, se mostró aumento en la amplitud, lo que sugiere aumento en el número de

neuronas motoras estimuladas, mientras que en la medición a los siete días se muestra una disminución. Resultado alentador que demuestra que la excitabilidad de las neuronas motoras α disminuyó en comparación antes e inmediato al tratamiento, apoyando a otros estudios (122).

Respecto a la latencia, la tendencia a disminuir en el tiempo es evidente, nunca alcanzando los valores iniciales antes del tratamiento, sin embargo esto demuestra cierta mejoría en la conductibilidad eléctrica perdida después de una LME, pudiendo requerirse de una segunda intervención o del análisis a más tiempo (más de 7 días), para completar el análisis del efecto de la punción seca sobre la regeneración funcional del musculo. (123, 124)

Son varias las limitaciones de los estudios de conducción nerviosa convencional: como 1) la velocidad de conducción, la cual es fácilmente medible en las fibras de conducción más rápidas del nervio y los valores se refieren únicamente a esta subpoblación de fibras, por consecuencia en aquellas enfermedades que afectan principalmente a fibras pequeñas no son evaluadas, especialmente en etapas tempranas de la enfermedad. 2) Los estudios de conducción sensorial fallan en determinar la función de receptores sensitivos o de las porciones más distales de axones sensitivos, siendo estas las regiones más comúnmente afectadas en ciertas neuropatías (129), más aún en presencia de espasticidad están limitaciones son más evidentes, sin embargo la electromiografía es la primera herramienta para tener una medición indirecta de la funcionalidad muscular a nivel eléctrico.

La presencia de espasticidad está respaldada por muchos estudios electrofisiológicos empleando la medición del reflejo de Hoffmann (125), llamado también reflejo H, el cual está descrito como un reflejo monosináptico que en términos generales evalúa la integridad y el buen funcionamiento del arco reflejo (93), lo que brinda objetividad a la prueba para la evaluación de la neurona motora correspondiente al segmento espinal en estudio (126,127). Esta técnica se produce aplicando de manera transcutánea un estímulo eléctrico que es capaz de estimular únicamente las fibras 1A, activando la neurona motora del nervio cuya

respuesta es llamada reflejo H. Puede ser utilizada para evaluar los músculos gastrocnemios, soleo o en el flexor radial del carpo (126). Esta medición no fue contemplada en este estudio, lo que da pie a su análisis en proyectos posteriores, reforzando lo observado en este estudio con la electromiografía.

Todos estos resultados se complementan con un análisis más objetivo de menor riesgo al sesgo, mediante la evaluación RT-PCR de citocinas partícipes en el proceso inflamatorio propio del evento. Se debe resaltar que posterior a la punción seca se ejecuta un mecanismo de destrucción de placas motoras, provocando daño *per se*, lo que genera la producción de citocinas proinflamatorias. Inicialmente se confirma la liberación de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, e IL-6 , las cuales son secretadas por células inmunes locales e infiltradas; además de la liberación consecuente de radicales libres generados por la mieloperoxidasa e iNOS, los cuales provocarán daño a las membranas de las células musculares. (80)

Otros partícipes son los DAMPs (del inglés damage-associated molecular patterns) que son liberados inmediatamente después de iniciado el daño. Estos patrones provocan la liberación de mediadores inmunes y moleculares para amplificar la inflamación, dentro de los cuales se encuentran los derivados del ácido araquidónico como COX-2, prostaglandinas y leucotrienos. (130).

En este análisis las citocinas proinflamatorias $\text{IL-1}\beta$ y $\text{TNF}\alpha$, en los grupos con punción mostraron tendencia al aumento de su expresión a las tres horas en comparación con los grupos sin punción; manteniendo este aumento a los siete días en comparación con el grupo no tratado. El aumento inicial de $\text{IL-1}\beta$ y $\text{TNF}\alpha$ confirma que la punción seca provoca una respuesta inflamatoria la cual no se autolimita y se mantiene hasta los 7 días.

Este comportamiento puede encontrar explicación en que una vez que se forma el microambiente proinflamatorio, se estimula la producción de citocinas como la $\text{IL-1}\beta$ e IL-18 , las cuales favorecen el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos, quienes a la vez demandan mayores cantidades de ATP, por su efecto quimiotático y producción de otras citocinas características de estas células; la

llegada al sitio de liberación de estas citocinas, lo que representa que exista un aumento en la secreción de citocinas inflamatorias, promoviendo la activación del inflamosoma (133); lo que podría explicar el fenómeno en los resultado del mantenimiento de estas citocinas proinflamatorias hasta los 7 días después de la intervención.

Por otra parte, se sabe que la liberación de radicales libres de oxígeno tienen efecto vasodilatador (131), lo que pudiera llevar a la reoxigenación muscular. Otro mecanismo que lleva a la reoxigenación, es la eliminación, debido a la PS, de nudos de contracción en el músculo espástico (132). La reoxigenación favorece la fagocitosis por parte de los neutrófilos, lo que de manera indirecta pudiera estar favoreciendo la regeneración celular; apoyado por el efecto importante de los radicales libres en la mejoría del metabolismo de las células no dañadas (129,131).

La iNOS y COX-2 mostraron comportamiento similar. En los grupos tratados a las tres horas existe disminución estadísticamente significativa en comparación con los grupos no tratados; pero a los 7 días ambas mostraron aumento significativo en comparación con el grupo control, por lo que este fenómeno pueda deberse a que al causar respuesta inflamatoria por la PS y esta ser controlada, la producción de radicales de nitrógeno como el NO por iNOS permita la reoxigenación del músculo, en estos primeros estadios, más que la destrucción del mismo por un proceso proinflamatorio, se requieren otros estudios histológicos y metabólicos para conocer el verdadero efecto de estas enzimas y su aumento con la intervención.

Otra de las células que participan de manera importante en el proceso inflamatorio son los macrófagos, ya que favorecen la regeneración tisular mediante la secreción de moléculas promovedoras de crecimiento. Esto lo logran a través de sus dos tipos de fenotipo, M1 y M2 (134). En las etapas tempranas de daño (3 horas después de la lesión) promueven un ambiente inflamatorio produciendo citocinas como TNF α e IL-1 β , pero después, mediante la activación del fenotipo M2 por IL-4 e IL-10 y la fagocitosis, participan en la autolimitación de la

inflamación, la inducción de angiogénesis y secreción de factores de crecimiento (134,136), tal como lo apoya nuestro estudio al observar una tendencia al aumento en la expresión de IL-10

En cuanto a IL-4 e IL-10, éstas disminuyeron a las tres horas después de la PS, manteniendo esta disminución en la expresión siete días después para el caso de la IL-4, si bien no ocurrió lo mismo para el caso de IL-10 la cual aumentó. La expresión de IL-4 habría que estudiarse a un mayor tiempo de análisis esperando encontrar eventualmente un aumento, para hacerlo coincidir en lo teórico.

La AChE se modificó de manera estadísticamente significativa, tanto a las 3 horas como a los siete días, presentando disminución en el grupo puncionado a las 3 horas, mientras que a los 7 días aumentó la expresión en el grupo puncionado. Esto indicaría que el aumento de AChE, favorecerá el lavado de ACh, con el cese de la liberación excesiva de Ca^{2+} , evitando el de daño sobre la membrana, por la contracción sostenida y los mecanismos de destrucción celular desencadenados por Ca^{2+} . En el caso de la AChE nos orienta a que estaría favoreciendo la degradación de ACh, lo que provocaría que el músculo pierda el estado de contracción sostenida, favoreciendo su movilidad, esto apoyado con el aumento del puntaje en la evaluación a campo abierto. Por lo que la fibra muscular podría relajarse sin existir destrucción de las miofibrillas y con ello evitar la pérdida de células musculares y la consecuente atrofia muscular observada después de un evento espástico. (78)

Otro de los mecanismos que pudieran ser favorecidos por la PS es la regeneración y el crecimiento muscular. De manera fisiológica, en los músculos existen poblaciones de células madre llamadas "células satélite" las cuales se encuentran en estado inactivo hasta que se provoca daño o sobrecarga en el músculo. Una vez activadas proliferan y entran en etapa de diferenciación para formar células musculares (137). De esta manera se apoya la teoría de la destrucción de las placas motoras disfuncionales mediante la punción seca, podría favorecer un ambiente proinflamatorio limitado en donde se presente la activación de dichas células en estado de reposo y así poder generar nuevas células

musculares, uno de los resultados que pueden apoyar este fenómeno es que a los siete días, además de que se presentó aumento de las citocinas proinflamatorias, también se presentó aumento de IL10 y AChE lo que demuestra que este proceso inflamatorio está controlado por la presencia de estas últimas y pudiera activar las células satélite y estar llevando a cabo el proceso de remodelación tisular. Sin embargo, debido a que esta tendencia no fue significativa y no se observaron cambios en la expresión de IL4, por lo que se sugiere prolongar el tiempo de estudio, para poder describir el efecto de una respuesta antiinflamatoria. Hasta ahora el principal mecanismo terapéutico ejercido por la PS a los 7 días después de una LME crónica es el aumento de expresión de AChE.

Estos resultados son alentadores, ya que dan pie a nuevas investigaciones; que involucren el empleo de otras técnicas de imagen, por ejemplo, el ultrasonido o la resonancia magnética para la localización precisa de los PGM o técnicas histológicas para corroborar la destrucción y regeneración de nuevas células musculares, a su vez la caracterización celular y molecular a nivel de la placa neuromuscular, a diferentes tiempos después de la PS en LME crónica.

6. CONCLUSIONES

- Existe mejoría sobre la locomoción de los miembros posteriores de aquellos animales tratados con la técnica de la PS.
- Después de la PS desaparecen los cambios característicos de la espasticidad en la EMG.
- La PS autolimita el estado crónico de inflamación de los puntos gatillo en la espasticidad.
- La PS induce la expresión de AChE a los 7 días, favoreciendo la relajación y protección de la fibra muscular, dato que se refuerza con la tendencia a la recuperación motora a este tiempo.

7. REFERENCIAS

1. Gartner LP. Hiatt JL. Tejido nervioso. En: Gartner LP. Hiatt JL, editors. Texto Atlas de Histología. China: Mc Graw Hill; 2007. p 185-218. ISBN: 978-1-4160-2945-8.
2. Snell RS. Médula espinal y vías ascendentes y descendentes. En: Snell RS, editor. Neuroanatomía clínica. Barcelona, España: Wolters Klumer; 2010: 132-185.
3. Ehsan Dowlati. Spinal cord anatomy, pain and spinal cord stimulation mechanisms. *Seminars in Spine Surgery*. 29(3); 2017: 136-146.
4. Klein BG. Cunningham JG. Introducción al sistema nervioso. En: Cunningham JG, Klein BG, editores. Fisiología Veterinaria. Barcelona, España: Elsevier Saunders; 2009. p. 60-65. ISBN: 978-84-8086-391-9
5. Neurofisiología. La médula espinal. [Internet]. [Citado 26 de agosto de 2017]. Disponible en: <https://neurofisiologia10.jimdo.com/sistema-nervioso/partes-del-sistema-nervioso/la-m%C3%A9dula-espinal/>
6. Ramón G. Procesadores Intermedios: Médula espinal. [Internet]. [Colombia]: Universidad de Antioquia; 2008. [Citado 28 de febrero de 2017]. Disponible en: http://viref.udea.edu.co/contenido/menu_alterno/apuntes/ac17-medula.pdf
7. Allan RH. Principios de neurología. McGraw Hill/Interamericana Editores. Ciudad de México. 10 ed. 2016. ISBN: 0071794794.
8. American Spinal Injury Association: International Standards For Neurological Classification of Spinal Cord Injury, revised 2016. Chicago, ASIA; 2011.
9. Ma VY, Chan L, Carruthers KJ. The Incidence, Prevalence, Costs and Impact on Disability of Common Conditions Requiring Rehabilitation in the US: Stroke, Spinal Cord Injury, Traumatic Brain Injury, Multiple Sclerosis, Osteoarthritis, Rheumatoid Arthritis, Limb Loss, and Back Pain. *Arch Phys Med Rehabil*. 2014 May; 95(5): 986-995. el. doi: 10.1016/j.apmr.10.032.

10. Krueger H, Noonan VK, Trenaman LM, Joshi P, Rivers CS. The economic burden of traumatic spinal cord injury in Canada. *Chronic Dis Inj Can*. 2013;33(3):113–122.
11. Furlan J, Sakakibara BM, Miller WC, Krassioukov AV. Global Incidence and Prevalence of Traumatic Spinal Cord Injury. *Can J Neurol Sci*. 2013 Jul; 40(4): 456-64.
12. Cripps RA, Lee BB, Wing P, Weerts E, Mackay J, Brown D. A global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: towards a living data repository for injury prevention. *Spinal Cord*. 2011;49(4): 493–501.
13. Ma VY, Chan L, Carruthers KJ. The Incidence, Prevalence, Costs and Impact on Disability of Common Conditions Requiring Rehabilitation in the US: Stroke, Spinal Cord Injury, Traumatic Brain Injury, Multiple Sclerosis, Osteoarthritis, Rheumatoid Arthritis, Limb Loss, and Back Pain. *Arch Phys Med Rehabil*. 2014 May; 95(5): 986-995. doi: 10.1016/j.apmr.10.032.
14. OMS. Nota descriptiva 384: Lesiones medulares. [Internet]. Organización Mundial de la Salud; 2013. [Citado 9 Febrero 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs384/es/>
15. Pérez, Galicia, Pardini, Ibarra, Renan. Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal de 1993 a 1997. Tesis de posgrado en Medicina de Rehabilitación. Secretaría de Salud 1998.
16. Pérez R, Martín del Campo S, Renán S, Durán-Ortiz S. Aspectos epidemiológicos de la lesión medular de la población del Centro Nacional de Rehabilitación. *Rev Mex Med Fis Rehab* 2008; 20(3-4): 74-82
17. Discapacidad en México. [Internet] INEGI. 2010. [Citado en Noviembre de 2016]. Disponible en: <http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/discapacidad.aspx?tema=P>
18. Estrada-Mondaca S, Carreón-Rodríguez A, Parra-Cid MC, Ibarra-Ponce de León C, Velasquillo-Martínez C, Vacanti CA, et al. Lesión de médula espinal y medicina regenerativa. *Salud Pública Mex* 2007; 49: 437-444.

19. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001; 26(24): S2–S12.
20. Martin A, Aleksanderek I, Fehlings M. (2015). Diagnosis and Acute Management of Spinal Cord Injury: Current Best Practices and Emerging Therapies. *Current Trauma Reports*. 2015; 1(3): 169-181. <http://dx.doi.org/10.1007/s40719-015-0020-0>
21. Ma VY, Chan L, Carruthers KJ. The Incidence, Prevalence, Costs and Impact on Disability of Common Conditions Requiring Rehabilitation in the US: Stroke, Spinal Cord Injury, Traumatic Brain Injury, Multiple Sclerosis, Osteoarthritis, Rheumatoid Arthritis, Limb Loss, and Back Pain. *Arch Phys Med Rehabil*. 2014 May; 95(5): 986-995. doi: 10.1016/j.apmr.10.032.
22. Krueger H, Noonan VK, Trenaman LM, Joshi P, Rivers CS. The economic burden of traumatic spinal cord injury in Canada. *Chronic Dis Inj Can*. 2013;33(3):113–122.
23. Grager, N., Carwardine, D., Acute Spinal Cord Injury Tetraplegia and paraplegia in Small Animals. *Vet Clin Small Anim* 2014; 44: 1131-1136. doi: 10.16/j.cvsm.2014.07.013
24. Nardone R, Florea C, Höller Y, Brigo F, Versace V, et al. Rodent, large animal and non-human primate models of spinal cord injury. *Zoology (Jena)*. 2017; 123: 101-114. doi: 10.1016/j.zool.2017.06.004
25. Allen A.R. 1911. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. A preliminary report. *J. Am. Med. Assoc*. 1911; 57: 878–880.
26. Sharif-Alhoseini, et al. Animal models of spinal cord injury: a systematic review. *Spinal Cord* 2017: 1-8 doi: 10.1038/sc.2016.187
27. Kwon BK, Streijger F, Hill CE, Anderson AJ, Bacon M, et al. Large animal and primate models of spinal cord injury for the testing of novel therapies. *Experimental Neurology*. 2015; 269: 154-168

28. Zhang N. Fang M. Chen H. Gou F. Ding M. Evaluation of spinal cord injury animal models. *Neural Regen Res.* 2014; 9(22); 2008-2012.
29. Bunge RP. Puckett WR. Becerra JL. Marcillo A. Quencer RM. Observations on the pathology of human spinal cord injury: a review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Adv. Neurol.* 1993; 59: 75–89.
30. Bunge RP. Puckett WR. Hiester ED. Observations on the pathology of several types of human spinal cord injury, with emphasis on the astrocyte response to penetrating injuries. *Adv. Neurol.* 1997; 72: 305–315.
31. Young, W., 2002. Spinal cord contusion models. *Prog. Brain Res.* 137, 231–255.
32. Mataliotakis GI. Tsirikos AI. Spinal cord trauma: pathophysiology, classification of spinal cord injury syndromes, treatment principles and controversies. *Orthopaedics and trauma.* 2016; 30 (5): 440-449 doi: 10.1016/j.mporth.2016.07.006
33. Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: A nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp.* 2011; 71: 281–299 (2011).
34. Tashiro S. Nakamura M. Okano H. The prospects of regenerative medicine combined with rehabilitative approaches for chronic spinal cord injury animal models. *Neural Regen Res.* 2017; 12(1): 43–46. doi: 10.4103/1673-5374.198972
35. Witiw CD. Fehlings MG. Acute spinal cord injury. *J Spinal Disord Tech* 2015; 28: 202e10.
36. Tator CH. Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 1991; 75: 15e26.

37. Gadani SP. Walsh JT. Lukens JR. Kipnis J. Dealing with Danger in the CNS: The Response of the Immune System to Injury. *Neuron*, 2015; 87(1): 47–62. doi:10.1016/j.neuron.2015.05.019.
38. Cisterna BA. Cardozo C. Sáez JC. Neuronal involvement in muscular atrophy. *Front Cell Neurosci* 2014; 8(405):1-11 doi: 10.3389/fncel.2014.00405
39. Carlson SL. Parrish ME. Springer JE. Doty K. Dossett L. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol* 1998; 151: 77e88.
40. Donnelly DJ. Popovich PG. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2008; 209: 378e88.
41. Dumont RJ. Okonkwo DO. Verma S. Hurlbert RJ. Boulos PT. et al. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin Neuropharmacol*. 2001; 24(5): 254-64
42. Lee J. Thumbikat P. Pathophysiology, presentation and management of spinal cord injury. *Surg*.2015;33(6):238–47.
43. Tankisi H. Pugdahl K. Rasmussen MM. Clemmensen D. Rawashdeh YF. et al. Peripheral Nervous System involvement in Chronic Spinal Cord Injury. 2015; 52: 1016-1022. doi: 10.1002/mus.24644
44. Benecke R. Berthold A. Conrad B. Denervation activity in the EMG of patients with upper motor neuron lesions: time course, local distribution and pathogenetic aspects. *J Neurol* 1983; 230:143–151.
45. Elbasiouny SM. Moroz D. Bakr MM. Mushahwar VK. Management of spasticity after spinal cord injury: current techniques and future directions. *Neurorehabil Neural Repair*. 2010; 24(1): 23-33. doi: 10.1177/1545968309343213. Epub 2009.
46. Gilman S. Fibras de los nervios espinales. En: Gilman S. Newman SW. *Neuroanatomía y neurofisiología clínicas de MANTER Y GATZ*. Manual Moderno. 2003. p 27-31

47. Rekand T. Hagen EM. Gronning M. Spasticity following spinal cord injury. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2012; 132(8):970-973. doi: 10.4045/tidsskr.10.0872.
48. Adams MM. Hicks AL. Spasticity after spinal cord injury. *Nature. Spinal Cord.* 2005; 43: 577-586 doi: 10.1038/sj.sc.3101757
49. Dennis M. J. Ziskind-Conhaim L. Harris A. J. Development of neuromuscular junctions in rat embryos. *Dev. Biol.* 1981; 81: 266–279. doi: 10.1016/0012-1606(81)90290-6
50. Neurology. Muscle diseases. En: Goldman L. Schafer AI. *Goldman-Cecil Medicine*
51. Organización del Sistema nervioso, funciones básicas de las sinapsis y neurotransmisores. En: Hall JE. *Tratado de fisiología médica.* Elsevier. 12 ed. Barcelona, España. 2011: 543-557
52. Potenciales de membrana y potenciales de acción. En: Hall JE. *Tratado de fisiología médica.* Elsevier. 12 ed. Barcelona, España. 2011: 57-70
53. El sistema nervioso: C. Neurofisiología motora e integradora. En: Hall JE. *Tratado de fisiología médica.* Elsevier. 12 ed. Barcelona, España. 2011: 655-666
54. Lance JW. Pathophysiology of spasticity and clinical experience with baclofen. In: Feldman RG, Young RR, Koella WP, eds. *Spasticity: disordered motor control.* London: Year Book Medical Publishers 1980: 185-204
55. Rushworth G. Spasticity and rigidity: an experimental study and review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1960; 23:99–118.
56. Bethoux F. Spasticity management after stroke. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2015; 26 625-639. doi: 10.1016/j.pmr.2015.07.003
57. Navarro X. Udina E. Neurofisiología de la espasticidad. En: *Evaluación clínica y tratamiento de la espasticidad.* Ed. Médica Panamericana. España. 2009: 1-15
58. Walker HW. Hon AJ. Kirshblum S. Spasticity due to disease of the spinal cord: Pathophysiology, epidemiology and treatment. En: Brashear A.

- Elovic E. Spasticity: Diagnosis and Management. 2ed. New York: Demos Medical. 2016: 351-381. ISBN: 9781617052422
59. Priebe M. Assessment of Spinal Cord Injury Spasticity in Clinical Trials. Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation: Winter. 2006; 11(3): 69-77.
60. Benz EN. Hornby TG. Bode RK. Scheidt RA. Schmit BD. A physiologically based clinical measure for spastic reflexes in spinal cord injury. Arch Phys Med Rehabil. 2005; 86(1):52–59.
61. Pandyan AD. Gregoric M. Barnes MP. Wood D. Van Wijck F. et al. Spasticity: clinical perceptions, neurological realities and meaningful measurement. Disabil Rehabil. 2005; 27:2–6.
62. Hsieh JT. Wolfe DL. Miller WC. Curt A. SCIRE Research Team. Spasticity outcome measures in spinal cord injury: psychometric properties and clinical utility. Spinal Cord. 2008;46(2):86–95.
63. Herrero Gallego P. Mayoral del Moral O. A Case Study Looking at the Effectiveness of Deep Dry Needling for the Management of Hypertonia. J Musculoske Pain. 2007; 15(2): 55-60. doi: 10.1300/J094v15n02_09
64. Kirshblum S. Treatment alternatives for spinal cord injury related spasticity. J Spinal Cord Med. 1999; 22(3):199–217.
65. Lieber RL. Steinman S. Barash IA. Chambers H. Structural and functional changes in spastic skeletal muscle. Muscle Nerve. 2004; 29(5):615-27
66. Trompetto C. Marinelli L. Mori L. Pelosin E. Currá A. et al. Pathophysiology of Spasticity: Implications for Neurorehabilitation Hindawi BioMed Res Int. 2014; 2014 (2014): 8 pp doi: 10.1155/2014/354906
67. Kaelan C. Jacobsen PF. Kakulas BA. An investigation of possible transynaptic neural degeneration in human spinal cord injury. J Neurol Sci. 1988; 86 (2-3):231-7
68. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for openfield testing in rats. *Journal of Neurotrauma*. 1995. 12, 1-21.

69. Siu PM. Alway SE. Mitochondria-associated apoptotic signalling in denervated rat skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 2005; 565:309–23. doi: 10.1113/jphysiol.2004.081083
70. Tews DS. Apoptosis and muscle fibre loss in neuromuscular disorders. *Neuromuscular Disorders*. 2002; 12(7-8):613-622. doi: 10.1016./S0960-8966(02)00030-5
71. Bao L. Locovei S. Dahl G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett*. 2004; 572: 65–68. doi:10.1016/j.febslet.2004.07.009
72. Kang J. Kang N. Lovatt D. Torres A. Zhao Z. et al. Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J. Neurosci*. 2008; 28: 4702–4711. doi:10.1523/JNEUROSCI.5048-07.2008
73. Riquelme MA. Cea LA. Vega JL. Boric MP. Monyer H. et al. The ATP required for potentiation of skeletal muscle contraction is released via pannexin hemichannels. *Neuropharmacology*. 2013; 75: 594–603. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.03.022
74. Ribeiro JA. Potentiation of postjunctional cholinergic sensitivity of rat diaphragm muscle by high-energy-phosphate adenine nucleotides. *J Membr Biol*. 1977; 33:401–402. doi:10.1007/bf01869526
75. Lu Z. Smith DO. Adenosine 50-triphosphate increases acetyl-choline channel opening frequency in rat skeletal muscle. *J. Physiol*. 1991; 436:45–56.
76. Thomas SA. Hume RI. Single potassium channel currents activated by extracellular ATP in developing chick skeletal muscle: a role for second messengers. *J. Neurophysiol*. 1993; 69:1556–1566.
77. Voss AA. Extracellular ATP inhibits chloride channels in mature mammalian skeletal muscle by activating P2Y₁ receptors. *J Physiol*. 2009; 587 (23):5739-5752. doi: 10.1113/jphysiol.2009.179275
78. Cea LA. Cisterna BA. Puebla C. Frank M. Figueroa XF. et al. De novo expression of connexin hemichannels in denervated fast skeletal

- muscles leads to atrophy. *Proc Natl Acad Sci*. 2013; 110:16229–16234. doi:10.1073/pnas.1312331110
79. Pedersen BK. Akerstrom TC. Nielsen AR. Fisher CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol* 2007; 103:1093–1098.
80. Marino M. Scuderi F. Provenzano C. Bartoccioni E. Skeletal muscle cells: from local inflammatory response to active immunity. *Gene Therapy*. 2011; 18: 109-116. doi:10.1038/gt.2010.124
81. Figarella-Branger D. Civatte M. Bartoli C. Pellissier JF. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 2003; 28:659–682.
82. Wiendl H. Hohlfeld R. Kieseier BC. Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment. *Trends Immunol* 2005; 26:373–380.
83. Remick DG. Interleukin-8. *Crit Care Med* 2005; 33: S466–S467.
84. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N et al. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 2001; 14: 705–714.
85. Barros de Oliveira CM. Sakata RK. Machada Issy A. Roberto Gerola L. Salomao R. Citocinas y dolor. *Rev Bras Anesthesiol*. 2011; 61(2):137-142
86. De Rossi M. Bernasconi P. Baggi F. de Waal Malefyt R. Mantegazza R. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *Int Immunol* 2000; 12: 1329–1335.
87. Bartoccioni E. Gallucci S. Scuderi F. Ricci E. Servidei S. et al. MHC class I, MHC class II and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in inflammatory myopathies. *Clin Exp Immunol* 1994; 95: 166–172.
88. Tews DS. Goebel HH. Expression of cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *J Neuroimmunol* 1995; 59: 185–194.

89. Tenan MS. Tweedell AJ. Haynes CA. Analysis of statistical and standard algorithms for detecting muscle onset with surface electromyography. PLoS ONE. 2017; 12(5): e0177312. doi:10.1371/journal.pone.0177312
90. Sutherland DH. The evolution of clinical gait analysis part I: kinesiological EMG. Gait Posture. 2001; 14 (1):61-70.
91. Aminoff M. Electrodiagnostic methods for the study of nerve and muscle. En: Aminoff M. Electromyography in clinical practice. Churchill Livingstone. 3rd ed. UK. 1998. pp: 2-7
92. Grow JL. Liu YQ. Barks JD. Can lateralizing sensorimotor deficits be identified after neonatal cerebral hypoxia-ischemia in rats? Dev Neurosci 2003; 25(6):394–402.
93. Guang-Xia S. Chun-Yan Y. Meng-Meng W. Li-Ping G. Lin-Peng W. et al. Muscle hypertonia after permanent focal cerebral ischemia in rats: a qualitative and quantitative behavioral and electrophysiological study. International Journal of Neuroscience. 2013; 123(8): 575-581
94. Ibarra JI, Pérez E. Fernández C. Electromiografía clínica. Rehabilitación. 2005; 39(6): 265-76
95. Aminoff M. Nerve conduction studies: Basic principles and pathologic correlation. En: Aminoff M. Electromyography in clinical practice. Churchill Livingstone. 3rd ed. UK. 1998. pp: 113-145
96. Voerman GE. Gregoric M. Hermens HJ. Neurophysiological methods for the assessment of spasticity: the Hoffmann reflex, the tendon reflex, and the stretch reflex. Disability and Rehabilitation. 2005; 27(1-2):33-68
97. Kimura J. Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle principles and practice. Oxford. 4th ed. USA. 2013. pp 1177. ISBN: 978-0-19-973868-7
98. Aminoff M. Motor neuron disorders. En: Aminoff M. Electromyography in clinical practice. Churchill Livingstone. 3rd ed. UK. 1998. pp: 255-275
99. Thompson AJ. Jarrett L. Lockley L. Marsden J. Stevenson VL. Clinical management of spasticity. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2005; 76(4):459-63. doi:10.1136/jnnp.2004.035972

100. Gonkova MI. Ilieva EM. Ferrieroc G. Chavdarov I. Effect of radial shock wave therapy on muscle spasticity in children with cerebral palsy. *Int J Rehabil Res.* 2013; 36(3):284-90. doi: 10.1097/MRR.0b013e328360e51d.
101. Dommerholt J. Fernández C. Punción seca de los puntos gatillo una estrategia clínica basada en la evidencia. Elsevier. Barcelona, España. 2013. pp: 264
102. Yuan-Ting H. Choo-Aun N. Shun-Yuan L. Hon-Yi S. Comparisons of Prediction Models of Myofascial Pain Control after Dry Needling: A Prospective Study. *Hindawi.* 2013; 2013: pp. 8. doi: 10.1155/2013/478202
103. Mense S. Muscle pain: mechanisms and clinical significance. *Dtsch Arztebl Int.* 2008; 105:214-219
104. Simons DG. Mense S. Understanding and measurement of muscle tone as related to clinical muscle pain. *Pain.* 1998; 75: 1-17
105. Simons DG. Travell JG. Simons LS. Travell and Simons myofascial pain and dysfunction; the trigger point manual. William & Wilkins. Baltimore. 1999
106. Lucas K. Rich PA. Polus BI. Muscle activation patterns in the scapular positioning muscles during loaded scapular plane elevation: the effects of latent myofascial trigger points. *Clin Biomech.* 2010; 25:765-770
107. Gerwin RD. Dommerholt J. Shah J. An expansion on Simons integrated hypothesis of trigger point formation. *Curr Pain Headache Rep.* 2004; 8:468-475.
108. Gerwin RD. The taut band and other mysteries of the trigger point: An examination of the mechanisms relevant to the development and maintenance of the trigger point. *J. Musculoskeletal Pain.* 2008; 16:115-121.

109. Sahlin K. Harris RC. Nylin B. Hultman E. Lactate content and pH in muscle obtained after dynamic exercise. *Eur J Physiol.* 1976; 367:143-149
110. Gautam M. Benson CJ. Sluka KA. Increased response of muscle sensory neurons to decreases in pH after muscle inflammation. *Neuroscience.* 2010; 170:893-900
111. Calvo S. Quintero I. Herrero P. Effects of dry needling (DNHS technique) on the contractile properties of spastic muscles in a patient with stroke: a case report. *Int J Rehabil Res.* 2016 Dec;39 (4):372-376
112. Domingo A. Mayoral O. Monterde S. Santafé M. Neuromuscular damage and repair after Dr Needling in mice. 2013. doi: 10.1155/2013/260806
113. Hong CZ. Torigoe Y. Yu J. The localized twitch responses in responsive bands of rabbit skeletal muscle fibers are related to the reflexes at spinal cord level. *J Musculoskeletal Pain.* 1995; 3: 15-33.
114. Hong CZ. Torigoe Y. Electro-physiologic characteristics of localized twitch responses in responsive bands of rabbits skeletal muscle fibers. *J Musculoskeletal Pain.* 1994; 2:17-43
115. Liboff AR. Bioelectromagnetic fields and acupuncture. *J Altern Complement Med.* 1997; 3:S77-S87
116. Shah JP. Phillips TM. Danoff JV. Gerber LH. An in-vivo microanalytical technique for measuring the local biomechanical milieu of human skeletal muscle. *J Appl Physio.* 2005; 99:1977-1984
117. Shah JP. Danoff JV. Desai MJ. Biochemical associated with pain and inflammation are elevated in site near to and remote from active myofascial trigger points. *Arch Phys Med Rehabil.* 2008; 89:16-23
118. Dommerholt J. Mayoral O. Gröbli C. Trigger point dry needling. *J Manual Manipulative Ther.* 2006; 14:e70-e87
119. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma.* 1995; 12:1-21.

120. Rodríguez R, et al. Immunization with neural derived peptides plus scar removal induces a permissive microenvironment, and improves locomotor recovery after chronic spinal cord injury. *BMC Neurosci.* 2017; 18: 7.
121. Bermeo G, et al. 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; 2013: 340727.
122. Fakhari z, et al. A single group, pretest-posttest clinical trial for the effects of dry needling on wrist flexors spasticity after stroke. *NeuroRehabilitation.* 2017; 40(3):325-336. doi: 10.3233/NRE-161420.
123. De Meulemeester K, et al. Surface Electromyographic Activity of the Upper Trapezius Before and After a Single Dry Needling Session in Female Office Workers With Trapezius Myalgia. *Am J Phys Med Rehabil.* 2017 Dec; 96(12):861-868. doi: 10.1097/PHM.0000000000000761.
124. Abbaszadeh-Amirdehi M, et al. Neurophysiological and clinical effects of dry needling in patients with upper trapezius myofascial trigger points. *J Bodyw Mov Ther.* 2017 Jan;21(1):48-52. doi: 10.1016/j.jbmt.2016.04.014.
125. Voerman GE. Gregoric M. Hermens HJ. Neurophysiological methods for the assessment of spasticity: the Hoffmann reflex, the tendon reflex, and the stretch reflex. *Disabil Rehabil* 2005; 27(1–2):33–68
126. Matthews DJ. Balaban B. Management of spasticity in children with cerebral palsy. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2009; 43(2):81-6. doi: 10.3944/AOTT.2009.081.
127. Hong CZ. Imamura M. Climent Bardera JM. Needling Therapy for Myofascial Pain Control. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013:946597. doi: 10.1155/2013/946597
128. Bolaños-Jiménez R. Arizmendi-Vargas J. Calderón-Álvarez Tostado JL. Carrillo-Ruiz JD. Rivera-Silva G. et al. Espasticidad, conceptos

- fisiológicos y fisiopatológicos aplicados a la clínica. *Rev Mex Neuroci.* 2011; 12(3):141-148
129. Kakinohana O. Hefferan MP. Nakamura S. Development of GABA-sensitive spasticity and rigidity in rats after transient spinal cord ischemia: a qualitative and quantitative electrophysiological and histopathological study. *Neuroscience* 2006; 141(3):1569–83.
130. Amulic B. Cazalet C. Hayes GL. Metzler KD. Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual review of immunology.* 2012; 30:459–489.
131. Deng B. et al. Interleukin-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote growth and regeneration. *J. Immunol.* 2012; 189(9): 3669-80.
132. Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends in pharmacological sciences.* 2007; 28:465–472.
133. Epelman S. Lavine KJ. Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity.* 2014; 41:21–35.
134. Gadani SP. Walsh JT. Lukens JR. Kipnis J. Dealing with danger in the CNS: The response of the immune system to injury. *Neuron.* 2015; 87(1): 47-62.
135. Ransohoff RM. Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *The Journal of clinical investigation.* 2012; 122:1164–1171.
136. Arnold L. Henry A. Poron F. Baba-Amer Y. van Rooijen N. et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007; 204(5):1057-69.
137. Collins CA. Partridge TA. Self-renewal of the adult skeletal muscle satellite cell. *Cell Cycle.* 2005; 4(10):1338-41