



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PETRÓLEOS MEXICANOS

SUBDIRECCIÓN DE SERVICIOS DE SALUD

GERENCIA DE SERVICIOS MÉDICOS

HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CHETOMIN SOBRE LAS
CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS EN UN MODELO MURINO DE
LESIÓN MEDULAR AGUDA.”**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO ESPECIALISTA EN NEUROCIROLOGÍA

PRESENTA

DR. JOSÉ RAÚL GUERRA MORA

TUTORES:

DR. ULISES GARCIA GONZALEZ

DR. CARLOS CESAR BRAVO REYNA

Ciudad de México, Julio 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres y hermanas por su compañía y apoyo durante este largo recorrido.

A mi novia, Jessica Frías Guillén por su apoyo incondicional y sincero.

A mi maestro y amigo, el Dr. Carlos Cesar Bravo Reyna por siempre confiar en mí y por su apoyo en la realización de este trabajo.

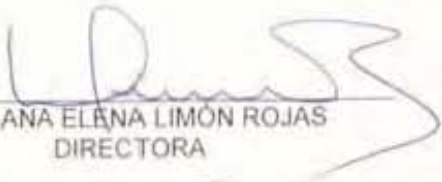
Al Dr. Julio M. Cacho Salazar, jefe de la subdivisión de educación continua de la sección de posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México. Sin conocerme me apoyó de manera amable en un paso muy importante. Ejemplo de servicio al prójimo, humildad y compromiso con su comunidad universitaria.


A los pacientes neuroquirúrgicos por su nobleza, optimismo y valentía. Fuente de aprendizaje, inspiración y motivación inagotable para continuar de la mejor manera este camino que decidí emprender.


'Invocación a la médula'

*Médula, circula
hacia la vida,
deja pasar el tiempo
fluido de lo móvil.
Tú posees el fuego, enfócalo hacia el mundo
y que ardan los nervios,
enteros,
gloriosamente.*

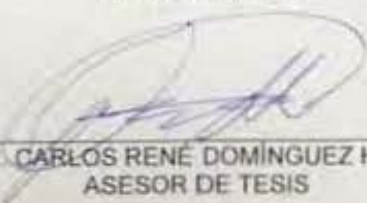
Poema de Antonio Cabrera.
Actualmente cuadripléjico por lesión medular postraumática.


DRA. ANA ELENA LIMÓN ROJAS
DIRECTORA


DR. JESUS REYNA FIGUEROA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
Y ASESOR DE TESIS


DR. ULISES GARCÍA GONZÁLEZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO Y TUTOR DE TESIS


DR. CARLOS CESAR BRAVO REYNA
TUTOR DE TESIS


DR. CARLOS RENÉ DOMÍNGUEZ HERZ
ASESOR DE TESIS


DRA. ROSA MARIA VICUNA GONZÁLEZ
ASESORA DE TESIS


DRA. MARIA IRENE RIVERA SALGADO
ASESORA DE TESIS

ÍNDICE

I.PORTADA.....	1
II.PARTICIPANTES.....	2
III.DEDICATORIA.....	3
IV.INDICE.....	4
1.TÍTULO.....	5
2.RESUMEN.....	5
3.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
4.INTRODUCCIÓN.....	7
5.MARCO TEÓRICO.....	8
6.PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	15
7.JUSTIFICACIÓN.....	15
8.OBJETIVOS.....	16
9.HIPÓTESIS.....	16
10.MATERIALES Y MÉTODO.....	16
11.ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24
12.RESULTADOS.....	24
13.DISCUSIÓN.....	30
14.CONCLUSIONES.....	34
15.ANEXOS.....	35
16.REFERENCIAS.....	39

1. Título

Evaluación del efecto del Chetomin sobre las características histopatológicas en un modelo murino de lesión medular aguda.

2. Resumen

Introducción: El uso de fármacos que puedan disminuir el proceso inflamatorio postraumático en la medula espinal puede ser de gran utilidad. El chetomin es una molécula que podría aminorar el proceso inflamatorio en la lesión medular aguda, resultando en una atenuación del daño estructural medular apreciado por histopatología.

Objetivo: Evaluar el efecto del chetomin sobre las características histopatológicas en un modelo murino de lesión medular aguda.

Material y métodos: Se utilizaron 21 ratas Wistar machos. Se realizó lesión medular aguda experimental mediante el modelo de clipaje transitorio. Grupos: Control (n=7), lesión medular aguda sin tratamiento (n=7), lesión medular aguda con tratamiento con chetomin (n=7). Se administró el fármaco una hora posterior a clipaje medular, se sacrificaron y extrajeron los segmentos medulares afectados a las 4 horas de la administración del fármaco. Se analizaron las características histopatológicas.

Resultados: Existió menor puntaje total de daño histopatológico de manera estadísticamente significativa en el grupo con lesión medular aguda tratado con chetomin comparado con el grupo con lesión medular aguda sin tratamiento.

Conclusión: El grupo tratado con chetomin presentó menor daño histopatológico en puntuación total de manera estadísticamente significativa respecto al grupo con lesión medular aguda sin tratamiento.

3. Planteamiento del problema

Los principales eventos fisiopatológicos que intervienen en la lesión medular aguda secundaria son la producción de citocinas inflamatorias y de especies reactivas de oxígeno, lo cual lleva a cambios histopatológicos indicadores de daño y viabilidad del tejido medular. El chetomin es una molécula que podría atenuar el proceso inflamatorio en la lesión medular aguda, interviniendo en la inhibición de factores de transcripción de citocinas proinflamatorias, a su vez disminuyendo la producción de radicales libres y el edema medular, resultando en atenuación del daño estructural medular apreciado por histopatología. **Figura 1.** Existen estudios en los cuales, moléculas con mecanismo de acción similar han demostrado disminuir el daño por isquemia-reperfusión en tejido cerebral (1, 2). No hay estudios precedentes reportados en la literatura médica referentes al uso del chetomin o algún otro modulador del HIF-1 α en lesión medular aguda.

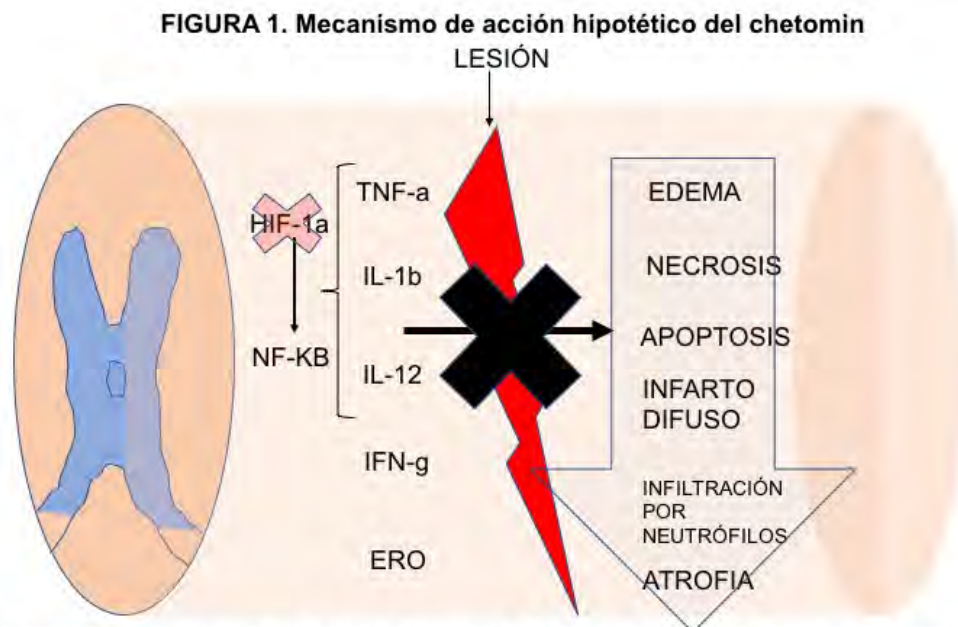


Figura 1. Ilustración del planteamiento del problema. Al modular la expresión del HIF-1 a, de manera consecuente se debe de disminuir la producción de mediadores proinflamatorios y de esta manera atenuar el daño por lesión medular secundaria. HIF-1 a: Factor de transcripción inducible por hipoxia alfa, NF-KB: Factor de transcripción nuclear kappa b, TNF-a: factor de necrosis tumoral alfa, IL-1b: Interleucina 1 beta, IL-12: Interleucina 12, IFN-g: Interferón gama, ERO: especies reactivas de oxígeno

4. Introducción

La lesión medular aguda es un padecimiento catastrófico, que en la gran mayoría de los casos cursa con una alta morbilidad y mortalidad. Se estima que en la actualidad existen alrededor de 270,000 casos anuales en los Estados Unidos de América (3) y se calcula que en el 2015 existieron 2.5 millones de personas con secuelas relacionadas a este padecimiento a nivel mundial (4). A pesar de que se realiza investigación de manera exhaustiva no se han implementado estrategias que mejoren de manera importante la calidad de vida o que disminuyan la morbilidad y la mortalidad en este tipo de pacientes (5, 6).

La principal causa de lesión medular aguda actualmente son los accidentes automovilísticos, afectando principalmente a personas jóvenes (7). Se debe realizar un manejo cuidadoso desde el sitio del trauma y su transporte a un centro hospitalario, siendo fundamental el tiempo que pasa desde el traumatismo a la atención medico-quirúrgica, lo cual aporta mayores beneficios de manera estadísticamente significativa cuando se realiza dentro de las primeras 24 horas (8) y siendo ideal dentro de las primeras 8 horas (9). En ocasiones se requiere tratamiento quirúrgico para una descompresión medular y disminución del daño medular, sin embargo el resultado funcional, la mayoría de las ocasiones es poco alentador y esta directamente relacionado con el periodo de tiempo en realizarse la descompresión (10).

El uso de alternativas farmacológicas que puedan disminuir el proceso inflamatorio postraumático en la medula espinal pueden ser de gran utilidad para la disminución

de la morbilidad y mortalidad en estos pacientes, así como, para aportar nuevos conocimientos en ciencia básica respecto a la fisiopatología de la lesión medular aguda. El único fármaco que se utiliza de manera rutinaria en algunos servicios hospitalarios a nivel mundial es la metilprednisolona, con modestos efectos demostrados en estudios experimentales (11, 12) y clínicos (13), así como múltiples efectos adversos (14, 15). Hasta el momento, no se ha encontrado algún fármaco que disminuya de manera estadísticamente significativa el daño medular agudo de manera clínica y la opción con la que el médico cuenta es la descompresión medular quirúrgica sin poder ofrecer más al paciente que padece este devastador padecimiento.

5. Marco teórico

5.1 Lesión medular aguda

5.1.1 Daño por lesión medular aguda

El daño neurológico agudo que resulta del traumatismo directo a la medula espinal se le denomina **lesión medular primaria**, ésta destruye directamente múltiples elementos del tejido y ocasiona muerte neuronal (8). La lesión medular primaria provoca una serie de eventos bioquímicos y celulares que llevan a la expansión de la lesión días o hasta meses posterior a la lesión inicial, a este proceso se le llama **lesión medular secundaria** y se caracteriza por tres procesos de muerte celular y daño tisular irreversible: necrosis, apoptosis y atrofia (16). **Figura 2.**

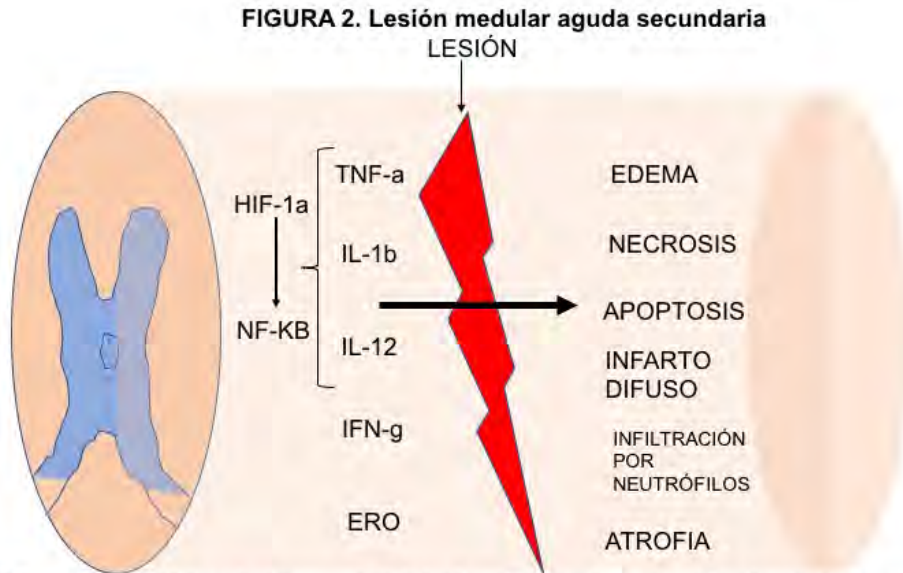


Figura 2. Ilustración de médula espinal al momento de la lesión medular aguda. Se ejemplifican los principales mediadores proinflamatorios que se producen en la lesión medular secundaria secundarios a la activación del HIF-1a y el daño en el que resulta. HIF-1 a: Factor de transcripción inducible por hipoxia alfa, NF-KB: Factor de transcripción nuclear kappa b, TNF-a: factor de necrosis tumoral alfa, IL-1b: Interleucina 1 beta, IL-12: Interleucina 12, IFN-g: Interferón gama, ERO: especies reactivas de oxígeno

5.1.2 Inflamación en lesión medular aguda secundaria

Una vez que se progresa a la lesión medular secundaria, se da un aumento en la producción local y sistémica de citocinas proinflamatorias, mismas que pueden ser detectadas con niveles elevados en líquido cefalorraquídeo de minutos a horas después de la lesión (17). Existen diferentes vías moleculares de daño:

Se ha demostrado que el $TNF\alpha$ y la $IL-1\beta$ ocasionan muerte de los oligodendrocitos inhibiendo transportadores de glutamato en los astrocitos, por lo tanto exponiendo a los oligodendrocitos a mayor cantidad de dicho neurotransmisor, ocasionando exitotoxicidad (18).

El $TNF\alpha$ ocasiona exitotoxicidad a través de una serie de mecanismos deletéreos interconectados. En primer lugar la liberación de esta citocina por parte de la

microglia ocasiona liberación de glutamato (19), que a su vez produce mayor producción de $TNF\alpha$ por parte de la microglia. Por último el aumento en el radio excitador/inhibidor ocasiona niveles de calcio excesivos ocasionando muerte neuronal por apoptosis (20). A su vez, existe también quimiotaxis con infiltrado por neutrófilos en estadios agudos del daño medular.

Además del daño por exitotoxicidad mediado por glutamato producido directamente por las neuronas, de manera más importante se origina daño tisular por el fenómeno de **isquemia reperusión**. Al existir compresión medular se condiciona isquemia, la misma que al descomprimir la médula desaparece para dar lugar a la reperusión con consecuente formación de especies reactivas de oxígeno por lipoperoxidación de las membranas celulares, expresión de citocinas proinflamatorias mediadas por inmunidad innata y regulación a la alta de genes proinflamatorios (IL-1 β , $TNF\alpha$, IL-6, IL-12). Éste daño por isquemia reperusión se puede observar en prácticamente todos los tejidos, siendo más susceptible el tejido nervioso. Existen fármacos que han mostrado aminorar el daño por isquemia reperusión en tejido pulmonar o renal como los inhibidores de la 5-fosfodiesterasa con resultados alentadores (21), sin embargo en tejido nervioso no han tenido éxito por su baja biodisponibilidad.

Como se ha expuesto antes, la producción de citocinas proinflamatorias juega un rol fundamental en la fisiopatología de la lesión medular secundaria en la lesión medular aguda. Existen diferentes vías por las cuales se aumenta su producción, siendo la mas importante de manera cuantitativa, la que está ligada a la expresión

del factor de transcripción NF- κ B. El factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α) es un factor de transcripción el cual regula la expresión del gen NF- κ B, el cual a su vez regula la expresión de TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, entre otras citocinas proinflamatorias. La expresión del gen NF- κ B en las primeras horas posterior al clipaje medular se encuentra aumentada, con ello perpetuando el daño por isquemia reperusión fomentado la expresión de genes que codifican para citocinas proinflamatorias (22). **Figura 2.** Se ha demostrado que la administración de moduladores o inhibidores de su expresión en diversos tejidos, incluido el cerebro, atenúan la respuesta inflamatoria secundaria a isquemia-reperusión (2, 23, 24), sin embargo en tejido medular se desconoce.

5.1.3 Producción de especies reactivas de oxígeno en lesión medular aguda

La disrupción microvascular, el desbalance iónico los niveles de calcio intracelular aumentados, la exitotoxicidad por glutamato, la disfunción mitocondrial, el rompimiento del ácido araquidónico resultante de la expresión de citocinas proinflamatorias y la activación de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) contribuye a la formación de especies reactivas de oxígeno (25).

Se ha demostrado lipoperoxidación postraumática temprana a los 5 minutos posterior de la lesión medular. La lipoperoxidación es un mecanismo que disrumpe la estructura y función normal de la bicapa de lípidos que rodean los organelos, la especie reactiva de oxígeno mas relacionada es el peroxinitrito.

El sistema nervioso central es particularmente sensible a la lipoperoxidación lipídica

debido a su estructura. Considerando el tiempo en el que ocurre la lesión, el daño oxidativo al DNA y lípidos, así como la nitración de proteínas se observa dentro de la primera semana de la lesión (26, 27).

5.2 Cambios histopatológicos en lesión medular aguda

El resultado del daño tisular provocado por los mecanismos de lesión antes descritos se puede observar mediante la revisión histopatológica del tejido medular sometido a lesión aguda. Las características que se relacionan a la intensidad del daño agudo posterior a la compresión medular son: edema, hemorragia, picnosis, presencia y/o extensión de áreas de infarto, infiltración por neutrófilos (28). Dichas características se pueden evaluar con tinción de hematoxilina eosina. El edema medular se da por eventos inflamatorios así como por disrupción de la barrera hematoencefálica, la hemorragia parenquimatosa medular tiene relación estrecha a la intensidad del trauma y el área de infarto posterior (29), la picnosis, que es la contracción del núcleo y condensación de la cromatina, tiene relación con muerte celular, la presencia y/o extensión de las áreas de infarto tienen relación directa con el tejido medular viable, la infiltración por neutrófilos se da principalmente por quimiotaxis de moléculas proinflamatorias al sitio lesionado durante las 4 a 8 horas posterior a la lesión (30).

La manipulación farmacológica de moléculas involucradas en la regulación las vías de daño mencionadas anteriormente, podría ayudar a disminuir los efectos deletéreos del daño tisular en el tejido medular, sobre todo las implicadas en la vía del factor de transcripción NF- κ B (18).

5.3. Chetomin

5.3.1 Farmacodinamia

La dithiodiketopiperacina (chetomin) es un metabolito obtenido del hongo *Chaetomium* con efectos antimicrobianos (31), este inhibe la actividad transcripcional del HIF-1 α de manera indirecta. Dentro de sus propiedades bioquímicas el chetomin es un heterodimero indol-alcaloide, el cual refleja una estructura dimérica asimétrica unida en el C3-N1' y es acoplada por dos fragmentos de triptófano. Esta molécula totalmente funcional contiene 5 carbonos de tipo tetra-substituidos y 6 centros estereogénicos, además posee en su estructura dos anillos de dithiodiketopiperacina lo cual le confiere la característica de oxidación y reducción en condiciones ácidas (32). **Figura 3.**

FIGURA 3. Estructura molecular del Chetomin

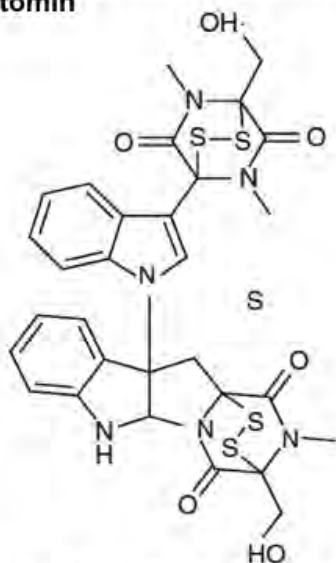


Figura 3. Estructura molecular del chetomin. Se puede apreciar su estructura dimérica asimétrica unida en el C3-N1' y es acoplada por dos fragmentos de triptófano. Contiene 5 carbonos de tipo tetra-substituidos y 6 centros estereogénicos, además posee en su estructura dos anillos de dithiodiketopiperacina lo cual le confiere la característica de oxidación y reducción en condiciones ácidas

Esta molécula es capaz de interrumpir la interacción del HIF-1 α con el co-activador p300 (33). A nivel molecular el chetomin se liga e interrumpe la estructura terciaria del dominio CH1 del co-activador p300 impidiendo su interacción con el HIF-1 α , de este modo se atenúa la transcripción inducida por la hipoxia y su relación con el HIF-1 α . En resultados preliminares de trabajos realizados en nuestro laboratorio (publicación pendiente), se ha observado que la administración de chetomin inhibe de manera indirecta la expresión del Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en un modelo experimental de trasplante pulmonar, lo cual sugiere un rol antiinflamatorio.

5.3.2 Farmacocinética

El chetomin tiene una vida media de 4 horas, coincidiendo con el pico máximo de concentración intratumoral (33). Existe evidencia de que el chetomin penetra la barrera hematoencefálica y es activo en tejido nervioso (33). No se ha estudiado el efecto del chetomin en lesión medular aguda y así mismo, de ser efectivo, se desconoce el tiempo del trauma a la administración del fármaco al que se observarían mayores efectos en cuanto a disminución del daño histopatológico se refiere, es probable que al existir un traumatismo medular directo con disrupción de la barrera hematoencefálica, la cantidad de chetomin en tejido medular sea mayor que en el tejido sin lesión. En estudios preclínicos, se ha reportado el uso del chetomin en el tratamiento de tumores en modelos murinos para inhibir la transcripción del HIF1- α utilizando dosis suprafisiológicas de 2 mg/kg vía endovenosa, dando como resultado una actividad antitumoral sin la presentación de

efectos colaterales después de tres semanas de tratamiento continuo, se ha observado un efecto farmacológico a dosis de 0.5 mg/kg sin efectos deletéreos en ratas (33).

6. Pregunta de investigación

Con lo mencionado anteriormente se formuló la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto del chetomin sobre las características histopatológicas en un modelo murino de lesión medular aguda?

7. Justificación.

La lesión medular aguda es una causa importante de morbilidad y mortalidad en todos los sectores de la población, siendo una causa común de discapacidad permanente y mortalidad en población joven, los costos en su atención médica son elevados y se requieren durante toda la vida del enfermo, lo cual confiere una disminución importante de la calidad de vida.

No existen estudios con base en el chetomin en lesión medular aguda, la investigación de moléculas que puedan ayudar a disminuir este daño, en este caso el chetomin, es de gran importancia ya que aporta nuevos conocimientos a la ciencia básica y en este caso con probabilidad de trascender a la medicina clínica en humanos. No hay estudios precedentes que estudien inhibidores o moduladores del HIF-1 α en la lesión medular aguda.

8. Objetivos

8.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del chetomin sobre las características histopatológicas en un modelo murino de lesión medular aguda.

8.2 Objetivos específicos

1.- Estandarizar un modelo murino de lesión medular aguda por compresión mediante clipaje transitorio.

2.- Evaluar las características histopatológicas en médula espinal posterior al tratamiento con chetomin administrado una hora posterior al traumatismo medular agudo en un modelo murino de lesión medular aguda.

9. Hipótesis.

Hipótesis alterna: La administración de chetomin disminuirá el daño histopatológico en un modelo murino de lesión medular aguda

Hipótesis nula: La administración de chetomin no disminuirá el daño histopatológico en un modelo murino de lesión medular aguda

10. Materiales y método.

10.1 Tipo de estudio

Estudio experimental en modelo animal

10.2 Animales de experimentación

Se utilizaron 21 ratas Wistar machos con peso de 250-350 gr, clínicamente sanas.

10.3 Manejo de los animales

Las ratas permanecieron en un bioterio bajo condiciones de calor y humedad adecuadas, con ventilación y limpieza diaria por personal capacitado, se manejaron con adecuados ciclos de sueño vigilia, con alimentación especial para roedores y agua a libre demanda. El presente trabajo fue autorizado por el Comité de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ) con la clave CEX-1914-18-18-1 (**Anexo 1**) y por el comité de ética del Hospital central sur de alta especialidad de PEMEX (**Anexo 2**), con el protocolo autorizado número HCSAE-805-78550-INV-154/2018 (**Anexo 3**). El manejo de los animales se realizó de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 con referencia al uso y cuidado de los animales de laboratorio.

10.4 Tamaño de la muestra.

Se calculó una muestra de 7 sujetos de experimentación por grupo de acuerdo a la fórmula para cálculo de muestra en estudios experimentales de la siguiente manera:

$$X=N/(A/100 \times B/100 \times C/100)$$

Donde X= Número total de animales

N= Cantidad mínima de animales necesaria para poder obtener resultados estadísticamente significativos

A= Mortalidad esperada en el procedimiento en grupo 1

B= Mortalidad esperada en el procedimiento en grupo 2

C= Mortalidad esperada en el procedimiento en grupo 3

Se obtuvo un valor de $X= 6.25$, lo cual en números absolutos de debe de tomar en cuenta como 7 sujetos de experimentación al recomendarse tomar los decimales hacia el número inmediato superior.

10.5 Descripción de grupos experimentales

Grupo Control (n=7). El animal fue sacrificado para la extracción medular una hora posterior a realizar procedimiento quirúrgico sin ocasionar lesión medular aguda

Grupo Lesión medular aguda sin tratamiento (n=7). Administración de 0.1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) al 5% vía intravenosa (IV) una hora posterior a la lesión medular aguda, el animal fue sacrificado 4 horas después de su administración para la extracción del segmento medular afectado.

Grupo Lesión medular aguda con tratamiento con Chetomin (n=7). Tratamiento con chetomin (2mg/kg; IV) disuelto en DMSO una hora posterior a la lesión espinal aguda, el animal fue sacrificado a las 4 horas después de su administración para la extracción del segmento medular afectado.

Se explica distribución y manejo de grupos en la **figura 4**.

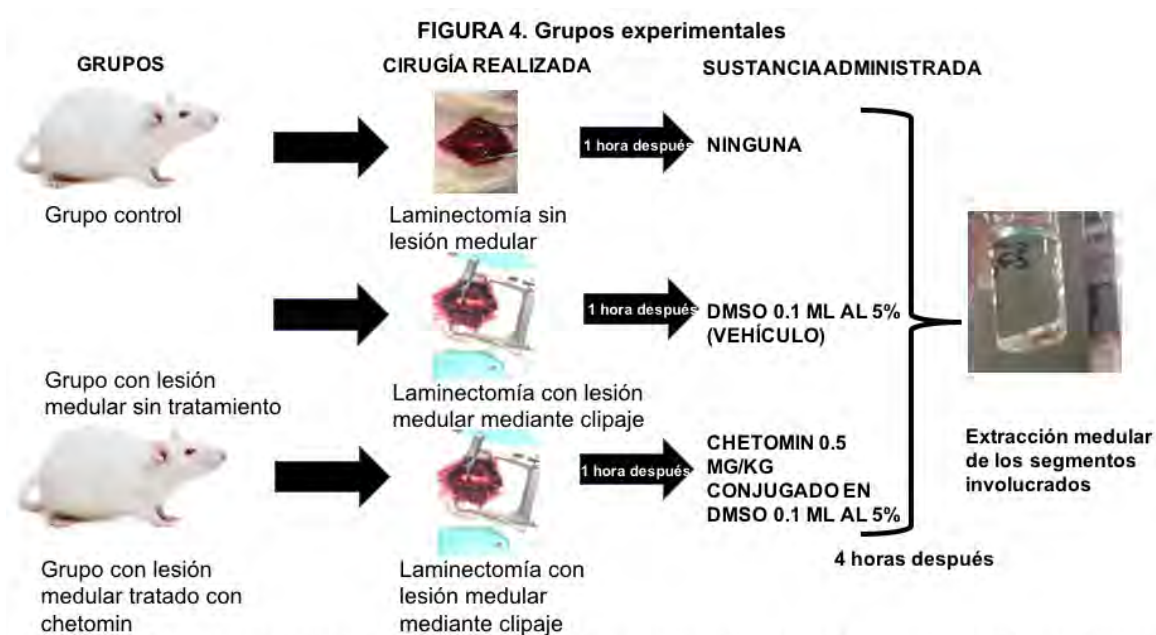


Figura 4. Diagrama en el cual se explica la distribución en grupos de los sujetos de experimentación, así como las intervenciones realizadas.

10.6 Descripción de variables a evaluar

Variables independientes:

Grupo Control*

Grupo con lesión medular sin tratamiento*

Grupo Lesión medular aguda con tratamiento con chetomin*

*Observar características en apartado 10.5

Variables dependientes:

Edema: Líquido en parénquima medular observado por campo en laminillas de tejido medular focal o difusa, donde fue evaluado con una la siguiente escala:

ausente, leve, moderado y severo

Hemorragia: Extravasación de sangre al parénquima medular focal o difusa donde fue evaluado con la siguiente escala: ausente, leve, moderado y severo

Picnosis: Contracción nuclear y condensación de cromatina focal o difusa, donde fue evaluado con la siguiente escala: ausente, leve, moderado y severo

Infarto: Extensión de áreas de necrosis focal o difusa donde fue evaluado con la siguiente escala: evaluado como ausente, leve, moderado y severo

Infiltración del parénquima medular por neutrófilos: Presencia de neutrófilos en parénquima medular focal o difusa donde fue evaluado con la siguiente escala: evaluado como ausente, leve, moderado y severo.

Puntaje total de daño histopatológico: Sumatoria de el puntaje obtenido de las variables dependientes antes señaladas, otorgando el siguiente puntaje: Ausente (0 puntos), leve (1 punto), moderado (2 puntos), severo (3 puntos). Por lo tanto una muestra con daño puede presentar un máximo de puntaje total de 15 puntos.

10.7 Descripción de procedimientos.

10.7.1 Técnica quirúrgica

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/Kg) por vía intraperitoneal, se inyectó tramadol (5mg/kg) como analgésico vía IM, se administró enrofloxacin 10 mg/Kg vía intramuscular como antibiótico profiláctico. Acto seguido se realizó intubación orotraqueal con un catéter # 16 G y se conectó a un ventilador para roedores (Kent Scientific™ RSP 1002), se manejó un volumen corriente de 6-8 ml/ kg, una presión positiva al final de la espiración de 2-2.5 cm de H₂O y una frecuencia respiratoria de 60 ventilaciones por minuto. **Figura 5 A.**

Se realizó tricotomía de región vertebral toracolumbar (T5-L2) y región del cuello y tórax anterior, posteriormente se colocó al animal en decúbito ventral con fijación de extremidades, se realizó asepsia con yodopovidona/clorhexidina en dichas regiones. Se realizó pinzamiento en patas traseras para comprobar anestesia, en caso de que el sujeto de experimentación presentara movimiento se administró una dosis extra de 20 mg/kg de pentobarbital sódico vía intraperitoneal. Se realizó incisión en línea media posterior por planos hasta llegar a fascia toracolumbar, se disecó espacio paravertebral de manera subperióstica hasta llegar a línea espinolaminar y posteriormente hasta apófisis transversa de ambos lados, se realizó hemostasia con compresión. Con apoyo de microscopio quirúrgico (Carl Zeiss™, OPMI-1) se realizó laminectomía a nivel de T8, T9, T10 (**Figura 5 B,C**). Una vez expuesta la médula con la duramadre íntegra, se realizó clipaje transitorio medular extradural durante un minuto mediante clip vascular con presión a 30 gramos (**Figura 5 D**) utilizando uno nuevo para cada grupo, se verificó previamente la presión de presión por

personal biomédico. El modelo de lesión medular aguda por compresión mencionado previamente esta validado en la literatura y es el modelo más aceptado para lesión medular aguda por compresión (34, 35). Se suturó fascia toracolumbar con sutura absorbible multifilamento 3-0 y piel con un patrón de surgete continuo con sutura no absorbible monofilamento 3-0. Se colocó al sujeto de experimentación con agua y alimento a libre demanda, con adecuada exposición a la luz que permita ciclos fisiológicos de sueño vigilia. Los animales que lo requirieron fueron auxiliados con drenaje vesical manual mediante compresión abdominopélvica.

Figura 5. Intervención quirúrgica en los sujetos de experimentación

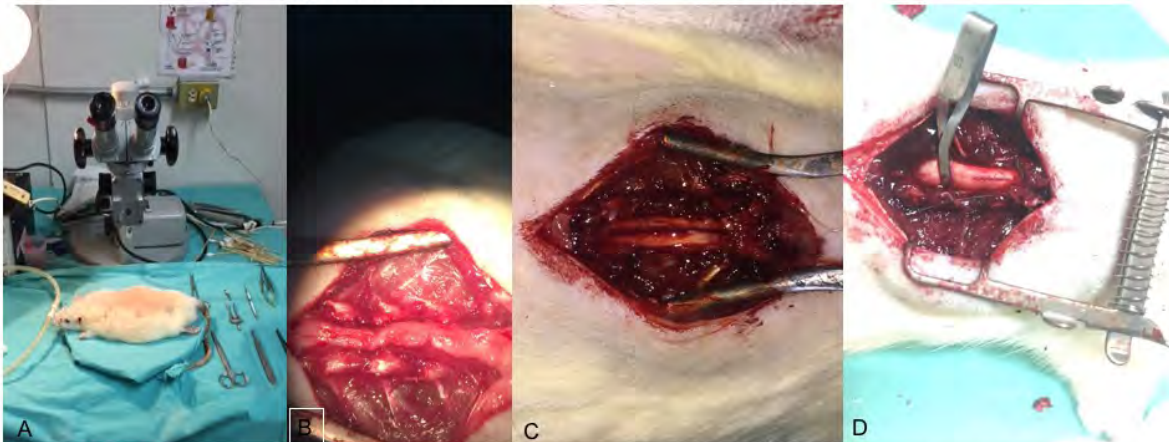


Figura 5. A. Se observa área de tricotomía en rata Wistar colocada en decúbito prono, permanece anestesiada, intubada y con soporte ventilatorio mecánico. **B.** Se pueden apreciar las láminas espinales de los niveles a resear. **C.** Se observa la medula espinal posterior a laminectomía. **D.** Clipaje medular transitorio de un minuto con clip vascular.

10.7.2 Administración del fármaco

En el grupo con lesión medular aguda sin tratamiento, se administró DMSO al 5% 0.1mL vía intravenosa en la vena lateral de la cola de la rata una hora posterior a la lesión medular aguda.

En el grupo con lesión medular aguda tratado con Chetomin, el fármaco administrado fue obtenido por la marca Sygma™, USA, a una dosis de 0.5 mg/kg, se conjugó con DMSO al 5% 0.1 mL como vehículo. Fue administrado en la vena lateral de la cola de la rata una hora posterior a la lesión medular aguda.

10.7.3 Toma de muestras

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/Kg, vía intraperitoneal). Se colocó al animal en decúbito supino, se realizó esternotomía para infusión intracardiaca por ventrículo izquierdo de 150 mL de formaldehído al 4% con la finalidad de fijar el tejido; posteriormente se realizó reapertura de incisión previa nivel de línea media posterior, se extrajo la médula espinal en bloque comprendiendo segmentos de T8 a T10. Las muestras se almacenaron en frascos de vidrio de 10 cc de capacidad para su transporte en formaldehido al 10% en proporción 10:1 al volumen del tejido. **Figura 4, 6 A.** Se etiquetaron con información respecto al grupo que pertenecen y número de sujeto de experimentación con número y letra en orden ascendente respectivamente.

10.7.4 Histopatología

Las muestras fijadas en formol buffer al 10% fueron seccionadas para su estudio en cortes axiales en 3 porciones; rostral a la lesión, epicentro de lesión y caudal a la lesión. **Figura 6 B.** Posteriormente se procesaron por el método de parafina. **Figura 6C.** Se realizaron cortes con micrótopo de 5 micras tomando tejido medular de las porciones previamente señaladas. Se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina

de todos los cortes. Las muestras fueron valoradas de manera ciega por un neuropatólogo experimentado en microscopio óptico a 10x y 40x. **Figura 6D, 7.** Se evaluó la lesión medular con las siguientes variables: edema, hemorragia, picnosis, infarto, infiltración del parénquima medular por neutrófilos y el puntaje total de daño histopatológico. Las variables previas fueron evaluadas con puntajes del 0 al 3, obteniendo 0 cuando dicha característica no se encontraba en la muestra, 1 cuando se encontró de manera focal en un corte, 2 cuando se encontró de manera focal en 2 o más cortes y 3 cuando se encontró de manera difusa (28). Se llenó una hoja de recolección de datos de cada sujeto de experimentación (**Anexo 4**) y posteriormente se llenó una hoja de cálculo en Excel (Microsoft™, 2017) con dicha información.

Figura 6. Manejo de la muestra de medula espinal para su estudio

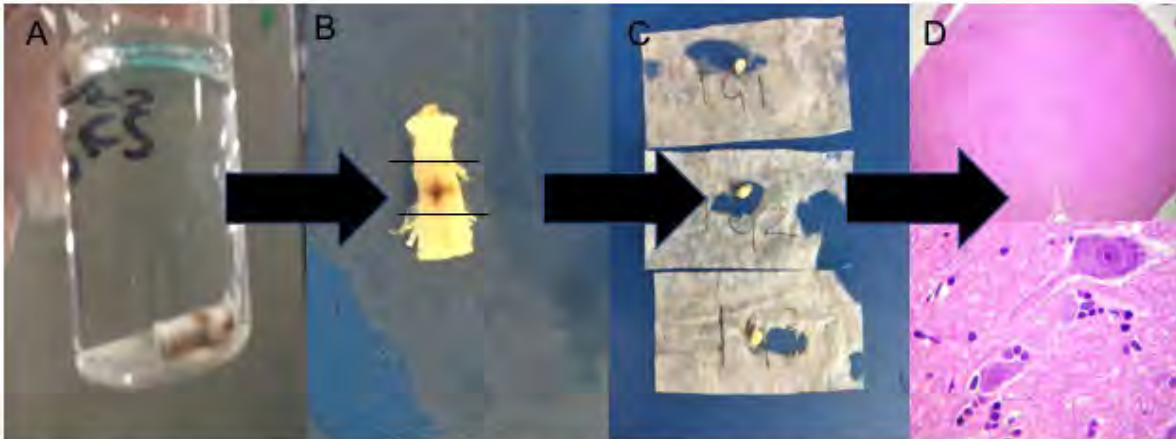


Figura 6. A. Almacenamiento de segmento medular a estudiar en formaldehído al 10%, **B.** posteriormente se realizaron secciones en sus porciones de epicentro de la lesión (observable por hematoma postclipaje), rostral a epicentro, caudal a epicentro según las líneas trazadas, tomando en cuenta para su división la raíz nerviosa del segmento correspondiente. **C.** Se procesaron fragmentos mediante inclusión en parafina. **D.** Se realizó evaluación del tejido por un neuropatólogo experimentado.

11. Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva expresada en media \pm Error estándar (EE). Se realizó estadística inferencial para comparar las medias de las variables previamente expuestas entre los grupos mediante análisis de varianza (ANOVA) y prueba post hoc de Tukey. Se tomó como estadísticamente significativo un valor menor o igual de $p= 0.05$. Se utilizó el programa estadístico SPSS v20.0 (IBM™ statistics).

12. Resultados

Se realizaron en total 21 cirugías en 21 ratas conforme a lo planeado sin presentar mortalidad hasta el término del estudio.

Se evaluaron cortes histopatológicos de las médulas espinales con lesión y tratamiento de acuerdo al grupo. Se muestran imágenes representativas de la histopatología observada por microscopía óptica. **Figura 7.**

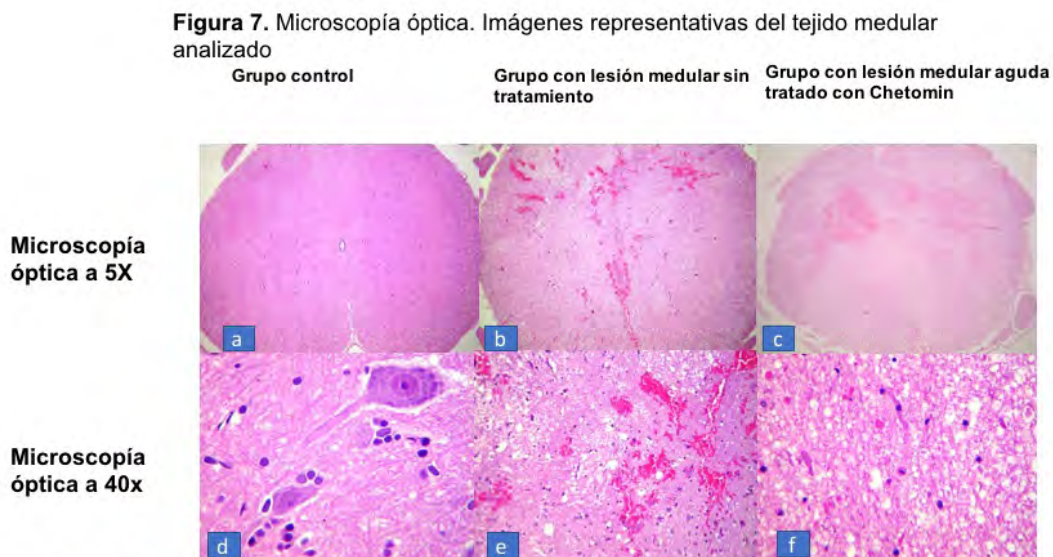
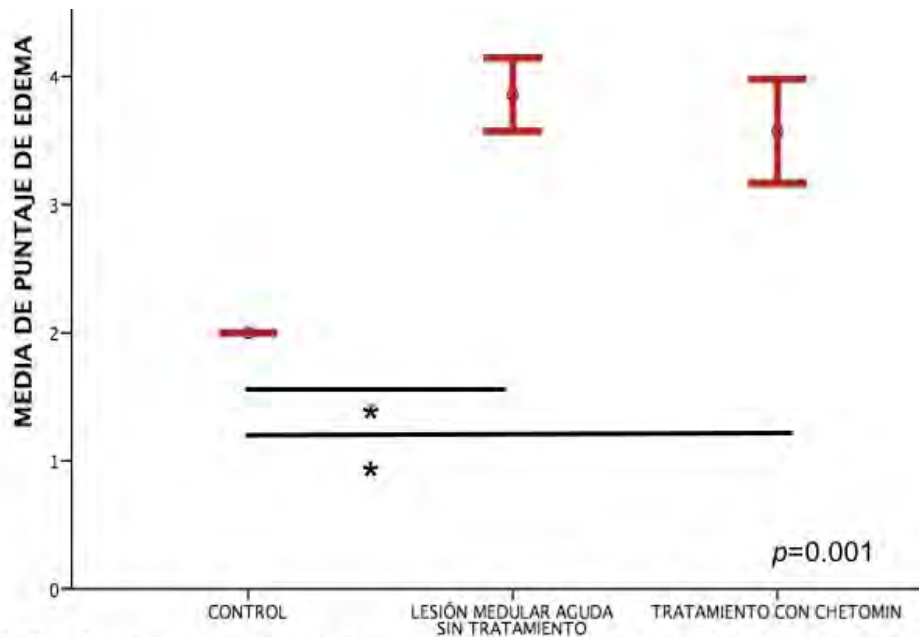


Figura 7. a, b y c) Vistas panorámicas de las médulas espinales de un ejemplo de los tres grupos. Se observan áreas de hemorragia en los grupos con lesión medular con y sin tratamiento con chetomin. d) Histología normal de la sustancia gris medular que muestra neuronas y células de la glía satélites en un caso del grupo control. e) Edema y áreas de hemorragia reciente en un caso con lesión medular sin tratamiento. f) Edema y una neurona con degeneración eosinófila secundaria a isquemia en un caso con lesión medular aguda tratado con chetomin.

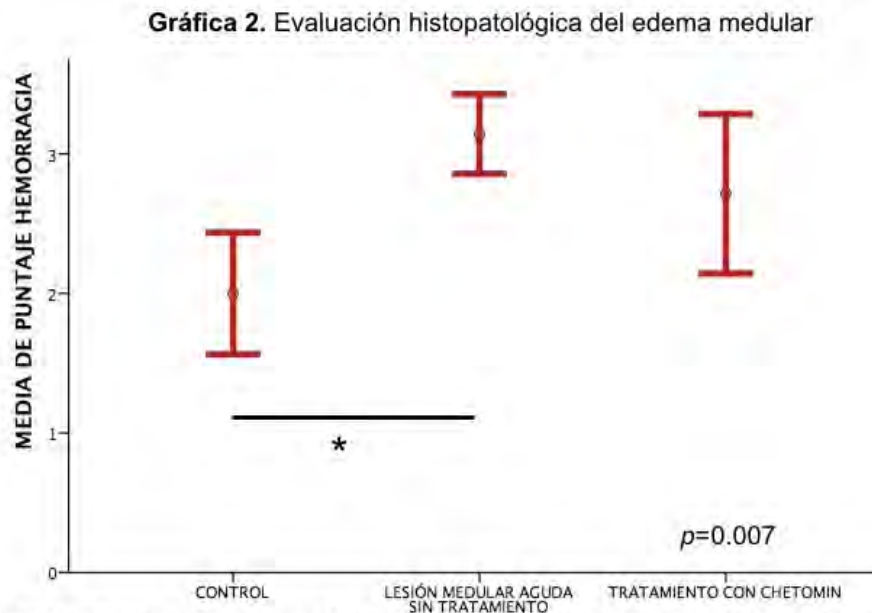
En cuanto a la evaluación histopatológica del edema medular (media \pm EE), se observó que existió una diferencia significativa con una $p= 0.001$ entre el grupo control (2.0 ± 0) y el grupo con lesión medular aguda sin tratamiento (3.86 ± 0.37) y el grupo con tratamiento con chetomin (3.57 ± 0.53). **Gráfica 1.**



Gráfica 1. Se observa que el grupo control mostró menor edema de manera estadísticamente significativa en comparación de los otros dos grupos. El grupo tratado con chetomin mostró menor edema en comparación al grupo con lesión medular aguda, sin embargo no existió diferencia estadísticamente significativa. *= diferencia estadísticamente significativa

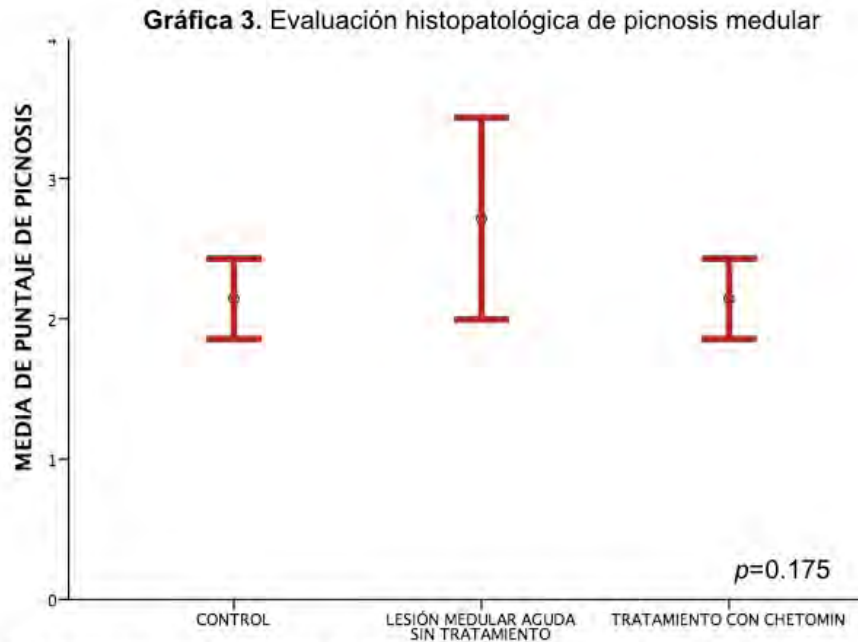
En cuanto a la evaluación histopatológica de hemorragia medular (media \pm EE), se observó que existió una diferencia significativa con una $p= 0.007$ entre el grupo control (2.0 ± 0.57) y el grupo con lesión medular aguda sin tratamiento (3.14 ± 0.37),

sin embargo no existió diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo tratado con chetomin (2.71 ± 0.75). **Gráfica 2.**



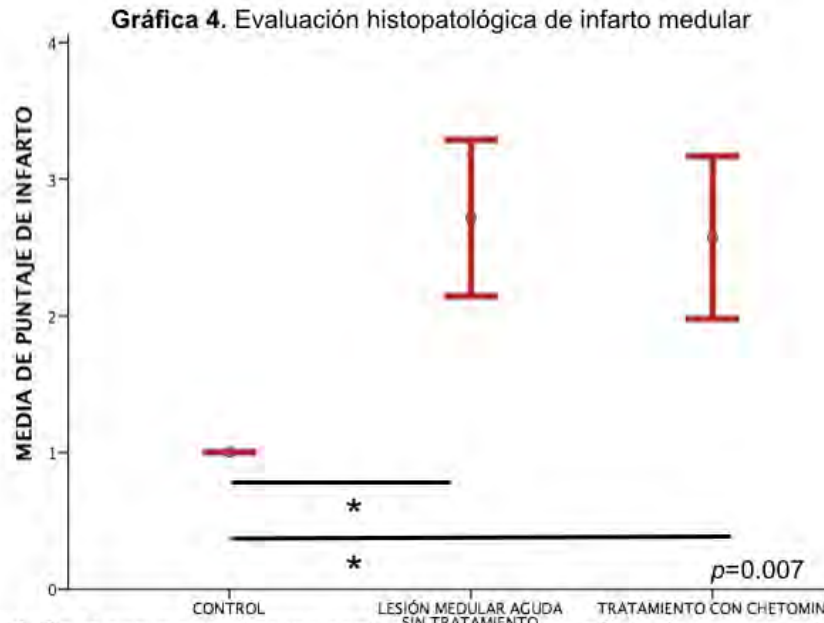
Gráfica 2. Se observa que el grupo control mostró menor hemorragia de manera estadísticamente significativa en comparación con el grupo de lesión medular aguda sin tratamiento. El grupo tratado con chetomin mostró menor hemorragia en comparación con el grupo con lesión medular aguda, sin embargo no existió diferencia estadísticamente significativa. *= diferencia estadísticamente significativa

En cuanto a la evaluación histopatológica de picnosis de acuerdo al puntaje otorgado (media \pm EE), se observó que existió una diferencia no estadísticamente significativa con una $p= 0.175$ entre todos los grupos. El grupo control (2.14 ± 0.37), el grupo con lesión medular aguda sin tratamiento (2.71 ± 0.95) y el grupo con tratamiento con chetomin (2.14 ± 0.37). **Gráfica 3.**



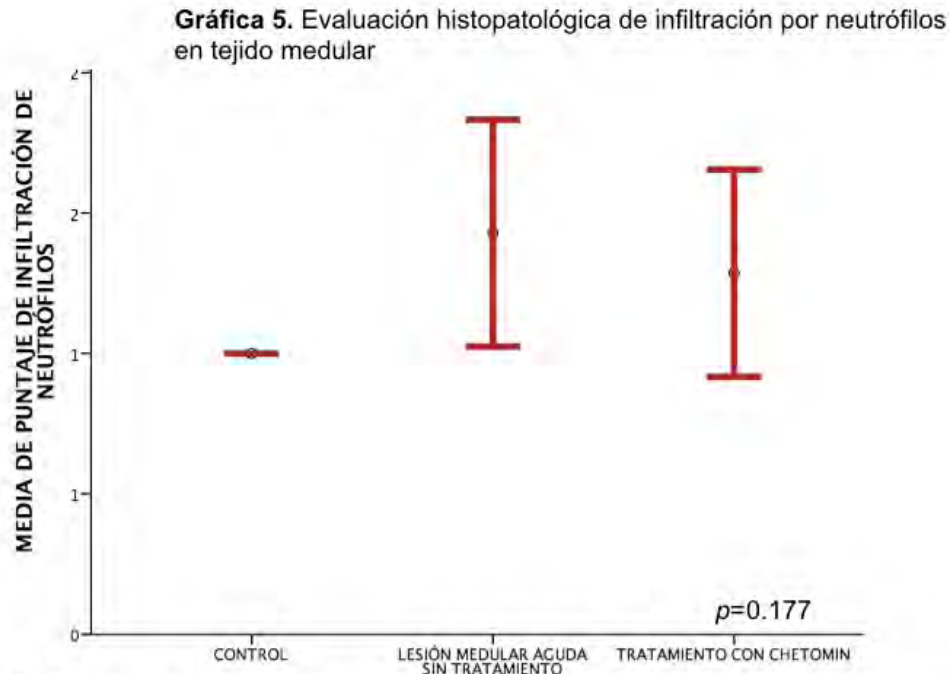
Gráfica 3. Se observa que el grupo de lesión medular aguda presentó mayor picnosis; sin embargo, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

En cuanto a la evaluación histopatológica de zonas de infarto medular, (media \pm EE), se observó que existió una diferencia significativa con una $p= 0.001$ entre el grupo control (1.0 ± 0.0) y el grupo con lesión medular aguda sin tratamiento (2.71 ± 0.75), así como con el grupo tratado con chetomin (2.57 ± 0.78). **Gráfica 4.**



Gráfica 4. Se observa que el grupo control mostró menos infarto de manera estadísticamente significativa en comparación de los otros dos grupos. El grupo tratado con chetomin mostró menos infarto en comparación al grupo con lesión medular aguda, sin embargo no existió diferencia estadísticamente significativa. *= diferencia estadísticamente significativa

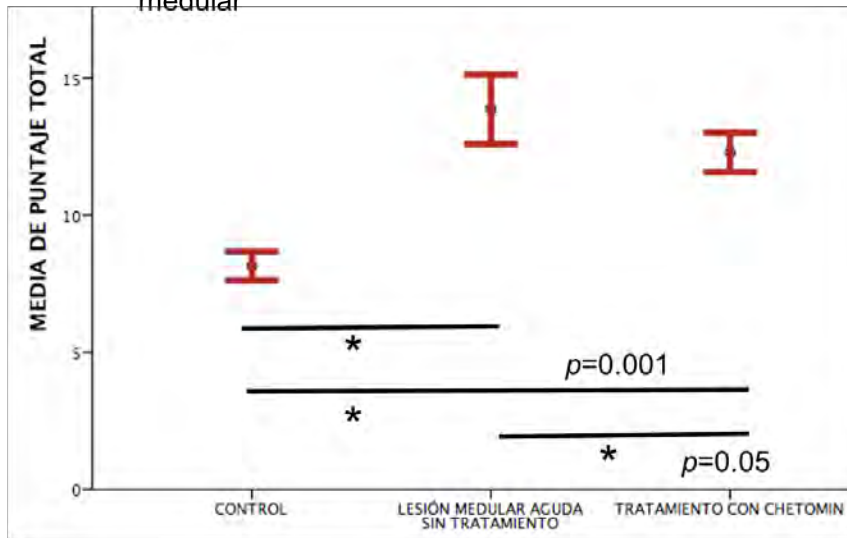
En cuanto a la evaluación histopatológica de infiltración por neutrófilos (media \pm EE), se observó que existió una diferencia no estadísticamente significativa con una $p= 0.177$. El grupo control (1.0 ± 0), el grupo con lesión medular aguda sin tratamiento (1.43 ± 0.53) y el grupo con tratamiento con chetomin (1.29 ± 0.48). **Gráfica 5.**



Gráfica 5. Se observa que el grupo control presentó menor infiltración por neutrófilos; sin embargo, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Se realizó la sumatoria del puntaje de la evaluación de las diferentes características histopatológicas para obtener un puntaje total. Se observó que existió una diferencia significativa con una $p= 0.001$ entre el grupo control (8.14 ± 0.69) y el grupo con lesión medular aguda sin tratamiento (13.86 ± 1.67), así como con el grupo tratado con chetomin (12.29 ± 0.95); Así mismo existió una diferencia estadísticamente significativa con una $p=0.05$, observando menor daño en el grupo tratado con chetomin en comparación con el grupo de lesión medular aguda sin tratamiento. **Gráfica 6.**

Gráfica 6. Evaluación del puntaje total de daño histopatológico en tejido medular



Gráfica 6. Se observa que el grupo control mostró menor daño histopatológico por puntaje total de manera estadísticamente significativa en comparación de los otros dos grupos. El grupo tratado con chetomin mostro menor edema en comparación al grupo con lesión medular aguda de manera estadísticamente significativa. *= diferencia estadísticamente significativa

13. Discusión

La lesión medular aguda es una causa importante de discapacidad permanente y de mortalidad en pacientes adultos jóvenes. Desde hace 30 años se han intentado diferentes maniobras farmacológicas con la finalidad de disminuir el daño por lesión medular aguda con resultados poco satisfactorios en el campo clínico (8). La lesión medular primaria es producto mecánico del traumatismo sobre el tejido medular, la cual solo se puede evitar con prevención primaria. Las medidas de seguridad que se han implementado en los autos, así como en centros de trabajo en los cuales los trabajadores están expuestos a sufrir caídas o de alguna manera presentar traumatismo espinal, han contribuido a la disminución de ésta entidad; sin embargo, cuando hay progresión a lesión medular secundaria no existen tratamientos eficaces. Aunque de manera relativa se ha mostrado que el uso de

metilprednisolona a dosis altas en las primeras horas del trauma puede disminuir las secuelas a largo plazo, es controversial su uso debido a los efectos adversos que se pueden presentar y se ha documentado en algunos trabajos aumento de la mortalidad a corto plazo (14). Se ha intentado, de manera experimental, encontrar un fármaco que disminuya la lesión medular secundaria y que sea inocuo posterior a su administración, sin embargo no se ha tenido éxito hasta la fecha al introducirlo al campo clínico.

Se ha experimentado con minociclina por su efecto antiinflamatorio en tejido nervioso (36), nimodipino por disminuir la apoptosis (37), inhibidores de la 5 fosfodiesterasa por disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias y de la óxido nítrico sintasa inducible (38), inhibidores de leucotrienos y otros esteroides diferentes a la metilprednisolona por sus efectos antiinflamatorios(12), diferentes moléculas inhibidoras de las proteínas de choque térmico (2), entre otras. Todas las moléculas antes propuestas han mostrado en diferentes grados disminuir el daño por lesión medular secundaria en estudios experimentales; sin embargo, debido a las dosis en las que se deben manejar, su limitada ventana terapéutica y que no han mostrado mayor eficacia que la metilprednisolona, no se han realizado estudios clínicos hasta la fecha y su utilidad en un escenario clínico queda en entredicho.

En el presente trabajo se evaluó un fármaco que modula la activación del HIF-1 α , factor de transcripción que se expresa en condiciones de hipoxia que actúa principalmente por dos vías moleculares: activar la transcripción del VEGF y de esta manera producir angiogénesis, lo cual en el momento de la reparación medular, días después de la lesión, podría contribuir a una reparación tisular, sin embargo en el

momento agudo de la lesión (primeras 8 horas) perpetúa la cascada proinflamatoria al inducir la transcripción de genes que codifican para citocinas proinflamatorias(39). Por otro lado el HIF-1 α , también activa la transcripción del NF- κ B, factor de transcripción que esta involucrado en la activación de genes proinflamatorios. Nosotros creemos que la modulación de la activación del HIF-1 α podría estar ligada a la disminución del daño por lesión medular secundaria al inhibir las vías proinflamatorias antes propuestas.

En el presente trabajo se observó que en la evaluación histopatológica de médulas espinales sometidas a lesión medular aguda, a las 4 horas posteriores al tratamiento con chetomin, existió una disminución en la presencia y extensión del edema, hemorragia, picnosis, áreas de infarto, así como la infiltración por neutrófilos respecto al grupo con lesión medular aguda sin tratamiento; sin embargo, no existió una diferencia estadísticamente significativa. El grupo control, como era esperado, fue el que menos daño presentó. Se observó diferencia estadísticamente significativa en comparación con los grupos de lesión medular sin tratamiento y el tratado con chetomin en todas las variables a excepción de la presencia y extensión de hemorragia, en la cual no se observó diferencia estadísticamente significativa con el grupo tratado con chetomin. Se realizó la sumatoria del puntaje asignado a todas las variables y se comparó entre los grupos. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y ambos grupos lesionados, con y sin tratamiento; Sin embargo, de manera interesante también se observó un puntaje menor de manera estadísticamente significativa del grupo tratado con chetomin respecto al grupo de lesión medular aguda sin tratamiento. Existen

estudios en la literatura en los cuales a pesar de no encontrar resultados con diferencias estadísticamente significativas en la histopatología, al realizar estudios más específicos sobre la respuesta inflamatoria se han encontrado resultados que apoyan el efecto benéfico en la lesión medular aguda con el empleo de diferentes terapéuticas (40); en este caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el puntaje total de daño histopatológico comparando al grupo tratado con chetomin respecto al grupo de lesión medular aguda sin tratamiento. El menor daño histopatológico en el grupo tratado con chetomin, evidenciado por menor formación de edema, hemorragia, picnosis e infarto se puede atribuir a su efecto antiinflamatorio hipotético antes mencionado. La infiltración por neutrófilos se tiene que evaluar de manera adecuada con grupos de experimentación que se observen por más de 8 horas posterior a la lesión medular, ya que es el tiempo en el que se da dicho fenómeno con mayor intensidad (30). No existen estudios publicados precedentes en cuanto al estudio del chetomin con la finalidad de disminuir el daño por lesión medular aguda. Dentro del mismo proyecto al que pertenece éste trabajo, se realizará determinación de la expresión de factores de transcripción involucrados en respuesta proinflamatoria, así como la producción de especies reactivas de oxígeno, dichos estudios son necesarios para concluir la efectividad del chetomin para disminuir el daño por lesión medular aguda y de obtener resultados positivos plantear estudios funcionales experimentales y posteriormente clínicos. Así mismo es necesario incluir grupos tratados con chetomin que cursen con mayor tiempo posterior a la lesión para poder analizar el daño histológico con más horas de evolución.

14. Conclusiones

Existió menor puntaje total de daño histopatológico de manera estadísticamente significativa en el grupo con lesión medular aguda tratado con chetomin comparado con el grupo con lesión medular aguda sin tratamiento, a pesar de no observarse diferencias estadísticamente significativas en los puntajes por separado de las diferentes variables analizadas entre los mismos grupos.

Se requiere el análisis de manera específica de la expresión de moléculas proinflamatorias mencionadas a lo largo de este trabajo, así como la formación de especies reactivas de oxígeno y agregar más grupos de experimentación para poder observar el efecto del fármaco en dichas variables en un periodo más prolongado de tiempo; de encontrar resultados positivos se tendrán que desarrollar estudios experimentales funcionales.

15. Anexos.

Anexo 1. Dictamen de aprobación por el comité de investigación en animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 23 de Abril de 2018

Dr. Carlos Cesar Bravo Reyna
INVESTIGADOR(A) PRINCIPAL
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”
AV. VASCO DE QUIROGA NO. 15
COL. BELISARIO DOMÍNGUEZ SECCIÓN XVI
MÉXICO, D.F., C.P. 14080
PRESENTE

Por este medio, nos permitimos informarle que La Comisión de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, ha revisado y dictaminado como **APROBADO** el Protocolo de Investigación Experimental, titulado

Evaluación del efecto del Chetomin sobre las características histopatológicas en un modelo de lesión medular aguda en rata Wistar.

Con clave de protocolo **CEX-1914-18-18-1**


La vigencia de la aprobación termina el día **23-12-2018**. Si la duración del estudio es mayor tendrá que solicitar la re-aprobación anual del mismo, informando sobre los avances y resultados parciales de su investigación e incluyendo todos los datos sobresalientes y conclusiones.

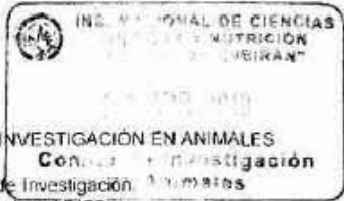
Comentarios:

Se recomienda asesorarse con un patólogo, se aprueba el uso de 35 ratas Wistar macho

Sin más por el momento quedamos de usted.

ASENTAMENTE,


DRA. NORMA BOBADILLA SANDOVAL
COORDINADORA DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN EN ANIMALES

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación, 
c.c.p. MVZ. Marelis Contreras Escamilla, Jefa del DIEB.

Anexo 2. Dictamen de aprobación emitido por el comité de ética del Hospital Central Sur de Alta especialidad. PEMEX



		Memorandum
		Fecha: Ciudad de México a 11 de junio del 2018
		Número: HOSAE-805-78960-046 (07/0018)
		Número de expediente:
Remite:	DIRECCIÓN CORPORATIVA DE ADMINISTRACIÓN Y SERVICIOS SUBDIRECCIÓN DE SERVICIOS DE SALUD HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN	
Destinatario:	Dr. José Raúl Guerra Mora Dr. Ulises García González Servicio de Neurología Presente	

Después de revisar el Proyecto de Investigación 49/17 titulado "Evaluación del efecto del Chetomin sobre las características histopatológicas en un modelo murino de lesión medular aguda", que se sometió a consideración para evaluación en este Comité de Ética en Investigación, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con los requerimientos de Ética en la Investigación por lo que el dictamen es:

A P R O B A D O.

La aprobación de su protocolo estará vigente a partir de la fecha y por un periodo de 12 meses de acuerdo al cronograma propuesto por usted.

Para conocer el seguimiento de esta investigación, le solicitamos un informe trimestral, además hacemos de su conocimiento que su investigación puede ser objeto de auditoría en cualquier momento.

Espero que pueda llevar a buen término la citada investigación y cuando esto ocurra esperamos nos envíe una copia del o los artículos o la copia de la carátula y resumen de la tesis generada.

Sin más por el momento, me despido de usted.


Atentamente



Dra. Xóchitl Ramírez Machuca
Secretaría Técnica del Comité de Ética en Investigación



C.C.O. - C. I. Isabel Reyna Piquero - Jefe de Depósito Específico e Investigación
Dr. Juan María Márquez Espiella - Presidente del Comité de Investigación

Atentamente  T

Anexo 3. Dictamen de aceptación de protocolo del presente trabajo emitido por jefatura de enseñanza del Hospital Central Sur de Alta especialidad. PEMEX



Memorándum

Remitente: DIRECCION CORPORATIVA DE ADMINISTRACIÓN Y SERVICIOS
SUBDIRECCIÓN DE SERVICIOS DE SALUD
HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD
DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

Fecha: Ciudad de México a 19 de junio de 2015

Asunto: HCSAE-809-7500-8/W-154 / 2015

Número de expediente

Destinatario: Dr. José Raúl Guerra Mora
Neurología
Presente

Después de que el Proyecto de Investigación 49/17 titulado "Evaluación del efecto del Chetomin sobre las características histopatológicas en un modelo murino de lesión medular aguda," ha sido Aceptado por el Comité de Investigación y el Comité de Ética en Investigación, le informamos que está autorizado para dar inicio a dicho Protocolo.

Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

DR. JESUS REYNA FIGUEROA
Jefe del Depto. de Enseñanza e Investigación

Anexo 4. Hoja de recolección de datos de características histopatológicas.

Hoja de captura de datos.

Evaluación del efecto del Chetomin sobre las características histopatológicas en un modelo murino de lesión medular aguda

Instrucciones: Marcar con una "X" la opción a la que corresponda cada ítem, escribir observaciones en el apartado pertinente solo en caso de que corresponda.

Fecha: _____

Grupo: Sham (), Control (), Chetomin 1 hora (), Chetomin 8 horas (), Chetomin 24 horas ().

Número de sujeto de experimentación: _____

Observaciones durante administración de medicamentos, cirugía, postquirúrgico y fijación de muestra:

Histopatología:

Picnosis nuclear: leve (), moderado (), severo ()

Edema: leve (), moderado (), severo ()

Infarto: leve (), moderado (), severo ()

Infiltración del parénquima medular por neutrófilos: leve (), moderado (), severo ()

Observaciones durante realización de laminillas, tinciones y observación de histopatología:

Otros:

15. Referencias

1. Giffard RG, Xu L, Zhao H, Carrico W, Ouyang Y, Qiao Y, et al. Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *J Exp Biol.* 2004;207(Pt 18):3213-20.
2. Kwon HM, Kim Y, Yang SI, Kim YJ, Lee SH, Yoon BW. Geldanamycin protects rat brain through overexpression of HSP70 and reducing brain edema after cerebral focal ischemia. *Neurol Res.* 2008;30(7):740-5.
3. Forner S, Andrade EL, Martini AC, Bento AF, Medeiros R, Koepp J, et al. Effects of kinin B(1) and B(2) receptor antagonists on overactive urinary bladder syndrome induced by spinal cord injury in rats. *Br J Pharmacol.* 2012;167(8):1737-52.
4. Fakhoury M. Spinal cord injury: overview of experimental approaches used to restore locomotor activity. *Rev Neurosci.* 2015;26(4):397-405.
5. Maegele M, Riess P, Sauerland S, Bouillon B, Hess S, McIntosh TK, et al. Characterization of a new rat model of experimental combined neurotrauma. *Shock.* 2005;23(5):476-81.
6. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg.* 1991;75(1):15-26.
7. Bobinski F, Martins DF, Bratti T, Mazzardo-Martins L, Winkelmann-Duarte EC, Guglielmo LG, et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. *Neuroscience.* 2011;194:337-48.
8. Rogers WK, Todd M. Acute spinal cord injury. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2016;30(1):27-39.
9. Piazza M, Schuster J. Timing of Surgery After Spinal Cord Injury. *Neurosurg Clin N Am.* 2017;28(1):31-9.

10. Skeers P, Battistuzzo CR, Clark JM, Bernard S, Freeman BJC, Batchelor PE. Acute Thoracolumbar Spinal Cord Injury: Relationship of Cord Compression to Neurological Outcome. *J Bone Joint Surg Am.* 2018;100(4):305-15.
11. Samano C, Kaur J, Nistri A. A study of methylprednisolone neuroprotection against acute injury to the rat spinal cord in vitro. *Neuroscience.* 2016;315:136-49.
12. Cavus G, Altas M, Aras M, Ozgur T, Serarslan Y, Yilmaz N, et al. Effects of montelukast and methylprednisolone on experimental spinal cord injury in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(12):1770-7.
13. Hall ED. Methylprednisolone for the Treatment of Patients with Acute Spinal Cord Injuries: A Propensity Score-Matched Cohort Study from a Canadian Multi-Center Spinal Cord Injury Registry. *J Neurotrauma.* 2016;33(10):972-4.
14. Karsy M, Hawryluk G. Pharmacologic Management of Acute Spinal Cord Injury. *Neurosurg Clin N Am.* 2017;28(1):49-62.
15. Nesathurai S. Steroids and spinal cord injury: revisiting the NASCIS 2 and NASCIS 3 trials. *J Trauma.* 1998;45(6):1088-93.
16. Hilton BJ, Moulson AJ, Tetzlaff W. Neuroprotection and secondary damage following spinal cord injury: concepts and methods. *Neurosci Lett.* 2017;652:3-10.
17. Rodrigues LF, Moura-Neto V, TCLS ES. Biomarkers in Spinal Cord Injury: from Prognosis to Treatment. *Mol Neurobiol.* 2018.
18. Bowes AL, Yip PK. Modulating inflammatory cell responses to spinal cord injury: all in good time. *J Neurotrauma.* 2014;31(21):1753-66.
19. Mazzone GL, Veeraraghavan P, Gonzalez-Inchauspe C, Nistri A, Uchitel OD. ASIC channel inhibition enhances excitotoxic neuronal death in an in vitro model of spinal cord injury. *Neuroscience.* 2017;343:398-410.

20. Olmos G, Llado J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:861231.
21. Guerra-Mora JR, Perales-Caldera E, Aguilar-Leon D, Nava-Sanchez C, Diaz-Cruz A, Diaz-Martinez NE, et al. Effects of Sildenafil and Tadalafil on Edema and Reactive Oxygen Species Production in an Experimental Model of Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplant Proc.* 2017;49(6):1461-6.
22. Chamankhah M, Eftekharpour E, Karimi-Abdolrezaee S, Boutros PC, San-Marina S, Fehlings MG. Genome-wide gene expression profiling of stress response in a spinal cord clip compression injury model. *BMC Genomics.* 2013;14:583.
23. Kwon HM, Kim YJ, Ryu S, Yang SI, Lee SH, Yoon BW. Differential expression of HSP70 mRNA in the mouse brain after treatment with geldanamycin. *Neurol Res.* 2009;31(5):541-4.
24. Xiong MP, Yanez JA, Remsberg CM, Ohgami Y, Kwon GS, Davies NM, et al. Formulation of a geldanamycin prodrug in mPEG-b-PCL micelles greatly enhances tolerability and pharmacokinetics in rats. *J Control Release.* 2008;129(1):33-40.
25. Wang JF, Li Y, Song JN, Pang HG. Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury. *Neurochem Int.* 2014;64:37-47.
26. Banes AJ, Tsuzaki M, Yamamoto J, Fischer T, Brigman B, Brown T, et al. Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem Cell Biol.* 1995;73(7-8):349-65.
27. Liu D, Ling X, Wen J, Liu J. The role of reactive nitrogen species in secondary spinal cord injury: formation of nitric oxide, peroxynitrite, and nitrated protein. *J Neurochem.* 2000;75(5):2144-54.
28. Mao L, Wang HD, Wang XL, Tian L, Xu JY. Disruption of Nrf2 exacerbated the damage after spinal cord injury in mice. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;72(1):189-98.

29. Losey P, Young C, Krimholtz E, Bordet R, Anthony DC. The role of hemorrhage following spinal-cord injury. *Brain Res.* 2014;1569:9-18.
30. Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, Wilson J, Kwon B, Harrop J, et al. Traumatic Spinal Cord Injury-Repair and Regeneration. *Neurosurgery.* 2017;80(3S):S9-S22.
31. Xia Y, Choi HK, Lee K. Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2012;49:24-40.
32. Welch TR, Williams RM. Studies on the Biosynthesis of Chetomin: Enantiospecific Synthesis of a Putative, Late-Stage Biosynthetic Intermediate. *Tetrahedron.* 2013;69(2):770-3.
33. Kung AL, Zabludoff SD, France DS, Freedman SJ, Tanner EA, Vieira A, et al. Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. *Cancer Cell.* 2004;6(1):33-43.
34. Wilcox JT, Satkunendrarajah K, Nasirzadeh Y, Laliberte AM, Lip A, Cadotte DW, et al. Generating level-dependent models of cervical and thoracic spinal cord injury: Exploring the interplay of neuroanatomy, physiology, and function. *Neurobiol Dis.* 2017.
35. Sharif-Alhoseini M, Khormali M, Rezaei M, Safdarian M, Hajighadery A, Khalatbari MM, et al. Animal models of spinal cord injury: a systematic review. *Spinal Cord.* 2017;55(8):714-21.
36. Aras M, Altas M, Motor S, Dokuyucu R, Yilmaz A, Ozgiray E, et al. Protective effects of minocycline on experimental spinal cord injury in rats. *Injury.* 2015;46(8):1471-4.
37. Jia YF, Gao HL, Ma LJ, Li J. Effect of nimodipine on rat spinal cord injury. *Genet Mol Res.* 2015;14(1):1269-76.
38. Serarslan Y, Yonden Z, Ozgiray E, Oktar S, Guven EO, Sogut S, et al. Protective effects of tadalafil on experimental spinal cord injury in rats. *J Clin Neurosci.* 2010;17(3):349-52.
39. Kim JH, Kim JY, Mun CH, Suh M, Lee JE. Agmatine Modulates the Phenotype of Macrophage Acute Phase after Spinal Cord Injury in Rats. *Exp Neurobiol.* 2017;26(5):278-86.

40. Yaman O, Yaman B, Aydin F, Var A, Temiz C. Hyperbaric oxygen treatment in the experimental spinal cord injury model. *Spine J.* 2014;14(9):2184-94.