

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DEL EFECTO CHETOMIN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS  
HISTOPATOLÓGICAS EN UN MODELO DE LESIÓN MEDULAR AGUDA EN  
RATA WISTAR

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

ARANGO MORALES DAVID

ASESOR:

M.C. MVZ CARLOS CÉSAR BRAVO REYNA

CIUDAD DE MÉXICO

2021



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.

## Dedicatorias

A mis padres y mi hermana que sin su apoyo este sueño no se habría hecho realidad. Muchas Gracias.

## Agradecimientos

A mi familia, amigos, compañeros y el personal del departamento de cirugía experimental del INCMNSZ por el apoyo y la confianza para poder cumplir con mis metas.

## Índice

|  |        |
|--|--------|
| RESUMEN .....  | - 1 -  |
| 1. Introducción .....  | - 2 -  |
| 2. Anatomía de la médula espinal .....                                   | - 4 -  |
| 3. Lesión medular aguda .....  | - 7 -  |
| 3.1 Lesión medular primaria .....  | - 8 -  |
| 3.2 Lesión medular secundaria .....                                      | - 9 -  |
| 3.3 Lesión vascular .....  | - 10 - |
| 3.4 Daño por excitotoxicidad, desbalance iónico y estrés oxidativo ..... | - 11 - |
| 3.5 Respuesta inmunológica .....   | - 13 - |
| 3.6 Muerte celular por apoptosis y necrosis .....                        | - 14 - |
| 4. Factor inductor de hipoxia-1 (HIF-1) .....                            | - 17 - |
| Tratamientos .....   | - 18 - |
| 4. Dimetil sulfoxido (DMSO) .....  | - 18 - |
| 6. Metilprednisolona .....   | - 19 - |
| 7. Justificación .....   | - 20 - |
| 8. Objetivo .....  | - 21 - |
| 9. Objetivos específicos .....   | - 22 - |
| 10. Hipótesis .....  | - 22 - |
| 11. Modelo de experimentación .....                                      | - 22 - |
| 12. Tamaño de la muestra .....   | - 23 - |
| 13. Descripción de grupos experimentales .....                           | - 24 - |
| 14. Técnica quirúrgica .....   | - 26 - |
| 15. Administración de fármacos .....                                     | - 27 - |
| 16. Toma de muestra .....  | - 28 - |
| 17. Evaluación histopatológica .....                                     | - 29 - |
| 18. Análisis estadístico .....   | - 30 - |
| 19. Resultados .....   | - 30 - |
| 20. Discusión .....  | - 39 - |
| 21. Conclusión .....   | - 41 - |
| 22. Referencias .....  | - 42 - |

## RESUMEN

Se realizó un estudio de lesión medular aguda en ratas Wistar para conocer el comportamiento que tuvo el fármaco Chetomin sobre la médula espinal después de que se le realizó una compresión por medio de un clip. El tiempo en que el órgano estuvo sujeto al daño por compresión constó de 1 y 8 horas, al finalizar esos tiempos a los modelos de experimentación se les administró por vía intravenosa el fármaco Chetomin. El tiempo que estuvo en el sistema del modelo de experimentación fue de 4 horas y posteriormente se aplicó la eutanasia con pentobarbital (120 mg/Kg); los cuerpos fueron perfundidos con paraformaldehído a 5% para poder extraer la porción lesionada de médula espinal sin alterarla. Los fragmentos de la médula espinal donde se encontró la lesión fueron tomados para estudio de histopatología, donde no se observó diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control; sin embargo, se requieren más estudios con este fármaco ya que no se tiene un antecedente en lesiones medulares. Este trabajo podría ayudar como base para otras investigaciones.

## 1. Introducción

La lesión medular aguda es un padecimiento catastrófico tanto para los humanos como para los animales de compañía provocando alta morbilidad y mortalidad. En el caso de humanos, anualmente se estiman en Norte América 12,500 casos nuevos de daño en médula espinal, según informa el "Injury Statistical Center". Cerca del 90 % de los casos que se presentan por daño medular se asocian a accidentes automovilísticos, violencia, deporte y caídas. Se ha revelado que existe una relación 2:1 entre hombres y mujeres, así como una incidencia mayor en hombres desde los 30 hasta los 80 años, mientras que en las mujeres va desde los 15 hasta los 19 años y hasta los 70 años. Se calcula que en el 2015 hubo 2.5 millones de personas con secuelas relacionadas con este padecimiento a nivel mundial (1). En medicina veterinaria no se tienen datos actuales de su incidencia, aunque se estima que en perros cerca del 2 % son generados por enfermedades de discos intervertebrales (EDI), 60 % son generados por traumatismos, y solamente el 5 % desarrolla lesión medular, otras causas que producen una lesión medular son embolia fibrocartilaginosa y espondilomielopatía cervical (2). En el caso de los gatos, de 205 casos revisados, los traumatismos por medios externos tuvieron una prevalencia de 7 %, EDI 4 % entre vértebra torácica 12 (T12) a vértebra lumbar 1 (L1) y entre vértebra lumbar 4 (L4) y vértebra lumbar 6 (L6), así como heridas penetrantes 2 % (3). Cabe mencionar que estos datos no son propios de nuestro país, ya que no se ha podido estimar la incidencia de los casos por lesión medular aguda por la falta de reportes clínicos y datos epidemiológicos fidedignos. Se ha realizado investigación de manera exhaustiva y tanto en

medicina veterinaria como en medicina humana, se han implementado tratamientos contra la afección en médula espinal (2), pero aún no se han implementado estrategias que mejoren la recuperación neuronal para promover una mejor calidad de vida, o que disminuyan la morbilidad y mortalidad en este tipo de pacientes.

Se sabe que un manejo cuidadoso debe realizarse desde el sitio donde ocurrió el evento traumático o accidente, hasta el transporte a un centro hospitalario, siendo fundamental el tiempo que pasa desde el traumatismo a la atención médico-quirúrgica, lo cual aporta mayores beneficios cuando se realiza dentro de las primeras 24 horas, siendo ideal dentro de las primeras 8 horas (4). En ocasiones se requiere tratamiento quirúrgico para una descompresión medular y disminución del daño, sin embargo, el resultado es poco alentador y está directamente relacionado con el periodo de tiempo en que se realiza la descompresión (4).

El único fármaco que se utiliza de manera rutinaria en la mayoría de los servicios hospitalarios a nivel mundial es el succinato de metilprednisolona tanto en humanos como en animales de compañía, con modestos efectos demostrados en estudios experimentales y clínicos, así como múltiples efectos adversos (5). Hasta el momento, no se ha encontrado un fármaco que disminuya de manera significativa el daño medular agudo de manera clínica, la opción con la que el médico cuenta es la descompresión medular por medio de una laminectomía o hemilaminectomía (6). El uso de alternativas farmacológicas que puedan disminuir el proceso inflamatorio postraumático en la médula espinal con la finalidad de disminuir la morbilidad y mortalidad en los pacientes, así como, aportar nuevos

conocimientos en ciencia básica respecto a la fisiopatología de la lesión medular aguda serán de gran ayuda para los clínicos ampliando sus opciones y tener una mejor terapia química para este tipo de lesión.

Como antecedentes han habido diferentes estudios utilizando diferentes fármacos para tratar la lesión medular, sin embargo, aún no se ha podido encontrar un fármaco que disminuya la lesión medular secundaria, por ejemplo, algunos AINES (Ibuprofeno, Indomethacin, Naproxeno y Ketorolaco) que ayudan a bloquear la molécula RhoA postulando que pudiera presentarse la neuroregeneración (7); otros fármacos son Naloxone opioide antagonista, Nimodipine L bloqueador de canales de calcio, mesilato de Tirilazad que atenúa en la peroxidación de las membranas neuronales (6), entre otros, sin el éxito deseado. En investigaciones relacionadas con el HIF-1 $\alpha$  existe evidencia de que investigadores han trabajado con la sobreexpresión del factor para inactivar la apoptosis, activar la autofagia y promoviendo la regeneración axonal de los microtúbulos en un periodo de 28 días teniendo resultados favorables pero que aún deben ser investigados (8).

## 2. Anatomía de la médula espinal

La médula espinal pertenece al sistema nervioso central (SNC), se encuentra protegida por la columna vertebral que va a lo largo de la médula espinal y su función principal es proteger la médula espinal y darle soporte al cuerpo, siendo su eje principal. La columna vertebral en la mayoría de los mamíferos está compuesta por 7 vértebras cervicales, 13 vértebras torácicas, 6 lumbares, entre 3-5 sacras, y en cuanto a las vértebras coccígeas dependerá de la especie y en ocasiones de la raza (9). Estos huesos que protegen a la médula espinal son

huesos irregulares conformados por un cuerpo vertebral que le da soporte a la vertebra, un arco vertebral posterior o dorsal que forma las paredes del foramen vertebral que al unirse todas las vértebras dan origen al conducto vertebral; cuenta con apófisis que sirven para que músculos y articulaciones de vértebras adyacentes puedan insertarse (9).

La médula espinal se encuentra a lo largo del conducto vertebral, revestida por tres membranas: la duramadre, la aracnoides y la piamadre; está dividida en 3 segmentos teniendo la porción cervical, la porción torácica y la porción lumbar, en esta última, en la mayoría de las especies termina la médula espinal, y entre las vértebras lumbares 6 y 7 encontraríamos el final en forma de cono llamado cono medular que está rodeado de los nervios espinales sacros que salen por los forámenes intervertebrales; esta formación de raíces nerviosas da origen a la llamada cauda equina (10). La médula espinal está compuesta de materia blanca y materia gris, que al contrario del encéfalo la materia gris se encuentra en el interior formando una "H" y la parte externa está conformada por materia blanca (10). La materia gris se divide en cuatro segmentos; el primero de ellos son las astas dorsales, el segundo segmento es el intermedio, el tercero las astas ventrales y una región central rodeando el canal central (10). Se habla de que las principales funciones de la médula espinal son el control motor, la percepción de sensación y un mecanismo autónomo (10), aunque estas funciones siempre estarán mediadas por una red de neuronas, como los ganglios supraespinosos, interneuronas, entre otras células que les permitirán a estas funciones llevar un control de las señales aferentes y eferentes (10).

En cuanto a la irrigación, la médula espinal está irrigada por unas arterias segmentarias provenientes de la aorta descendente, la porción del tórax por arterias intercostales y en menor cantidad arteria subcostal, y la porción lumbar por las arterias segmentarias que vienen directamente de la aorta descendente (11). Este suministro de arterias no solo será para la médula espinal, sino que abarca la columna vertebral, músculos adyacentes y raíces nerviosas (11).

En el caso de la médula espinal vamos a encontrar dos sistemas arteriales que estarán en su superficie. El primero de estos dos sistemas está conformado por una arteria espinal dorsal (AED) que corre a lo largo de la médula y dos arterias espinales ventrales o ventrolaterales (AEV); en el segundo sistema arterial vamos a encontrar una red llamada plexo pial, que está cubriendo la periferia de la médula espinal (11).

Estos dos sistemas podríamos considerarlos como extrínsecos, ya que la médula espinal tiene un sistema arterial intrínseco dividido en dos partes. El primer sistema es por medio de una vía central o centrífuga que está formado por la arteria central también llamada arteria sulcal o sulcos comisurales, que se originan a partir de la AED que viaja a través de la fisura mediana anterior (11). El segundo sistema es por medio de una vía periférica centrípeta, también llamada vasocorona, que esta tiene su origen en el plexo pial, estas proyecciones serán como perforadores que estarán ingresando a la materia blanca centrípetamente (11), de tal forma que el sistema central estaría irrigando la materia gris y el sistema periférico la sustancia blanca.

El flujo de sangre venosa es en parte similar al arterial, también consiste en un sistema intrínseco y extrínseco (periferia). En el sistema intrínseco tenemos a las venas centrales o sulcales que recolectan la sangre de ambas mitades de la parte medial de los cuernos anteriores, la comisura gris anterior y la sustancia blanca del funículo anterior. Las venas radiales o periféricas son los otros vasos sanguíneos que forman parte de la vía intrínseca teniendo su origen en los pequeños capilares que surgen en la periferia de la materia gris de los cuernos lateral y del núcleo dorsal de Clark o de la sustancia blanca (11). Estas venas periféricas van hacia la periferia de la médula formando un anillo venoso que eventualmente va a desembocar en el sistema venoso superficial, que consiste en venas longitudinales que a su vez formarán una red por las mismas anastomosis que se generan (11). La sangre es drenada por medio de las venas espinales dorsales que recibe la sangre de las venas sulcales y de las venas de la fisura ventral; en el caso de las venas posteriores estas pueden ser hasta tres venas espinales ventrales siendo la mediana la que tiene el mayor calibre, mientras que las otras venas se ubican postero lateralmente a las AEV's y son llamadas venas pinales posterolaterales (11).

### 3. Lesión medular aguda

A lo largo de estos años se ha visto el daño no solamente de salud sino en el aspecto socioeconómico de sufrir una lesión medular, tanto en la medicina humana como en la medicina veterinaria. Hasta la fecha se han probado diferentes métodos, sobre todo químicos, para reducir el daño generado durante la lesión medular. Los modelos animales para experimentación son una fuente útil de

información para comprender y desarrollar mejores tratamientos para este problema. En 1973 se crea la “American Spinal Injury Association” lo que permitiría el libre intercambio de información, investigación con el fin de mejorar los tratamientos que se aplicarían a los pacientes que sufren de este problema (12). Fue hasta 1982 cuando se implementa una escala de clasificación en las lesiones espinales que evolucionaría a la actual “American Spinal Injury Association Impairment Scale” (AIS) con el fin de tener una mayor precisión de cuál pudiera ser el origen de la lesión espinal; en medicina veterinaria se mencionan el uso de la escala de Frankel modificada, 14-point pelvic limb neurologic score y “Texas Spinal Cord Injury Score” (TSCIS) (13), pero realmente no está descrita una escala que sea universal como en la medicina humana.

Durante la lesión medular se presentarán dos tipos de lesiones, una primaria y otra secundaria. La lesión primaria será provocada por el traumatismo inicial, mientras que la lesión secundaria será provocada por los cambios fisiológicos que sufrirán las células por el traumatismo inicial como, por ejemplo, lesiones vasculares, daño por excitotoxicidad, desbalance iónico, inflamación, estrés oxidativo y muerte celular (1).

### 3.1 Lesión medular primaria

Está originada por el traumatismo que daña el parénquima de la médula espinal ya sea por compresión por el hueso o del disco intervertebral, fractura de hueso o por un objeto externo (1). Existe una incidencia de las causas por las que se origina una lesión medular:

- 1) Compresión de la médula espinal por un traumatismo.
- 2) Traumatismo que va a generar una compresión momentánea.
- 3) Distracción o separación de dos vértebras adyacentes.
- 4) Laceración o bien transección (1).

Dentro de las causas previamente mencionadas tenemos que la compresión a la médula espinal es la más común dentro de las lesiones medulares, pero se debe mencionar que la compresión momentánea es muy poco frecuente (1).

### 3.2 Lesión medular secundaria

Una vez generada la lesión primaria se va generando la segunda fase de daño, repercutiendo en la sobrevida del tejido medular. Hablamos de que la médula espinal tendrá daño por la destrucción celular ocasionada por la isquemia-reperusión, el daño que sufre el endotelio o por la poca vascularización después de haberse producido el trauma, la presencia de edema en el órgano, la destrucción axonal, los daños que se van a ir presentando en la membrana celular, la acumulación de calcio ( $Ca^{++}$ ) dentro de la células, los procesos inflamatorios mediados por células, citocinas, quimiocinas y la biosíntesis de las especies reactivas a oxígeno (ROS), darán paso a que las células y al órgano en cuestión sufran muerte celular, retardando una supuesta recuperación, sumado a los eventos que se pueden ir presentando cuando la lesión pase a un estadio crónico (1).

### 3.3 Lesión vascular

Durante la lesión medular aguda, la médula estará expuesta a una serie de cambios fisiológicos. La ruptura de los vasos sanguíneos dentro de la médula espinal, provocando un retraso en el aporte sanguíneo al órgano por consiguiente se generará un periodo de isquemia, al haber un traumatismo en la médula espinal producirán hemorragias (14). Durante la isquemia, la falta de aporte sanguíneo y por lo tanto la falta de oxígeno va estimular la sobreexpresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) provocando un aumento de la permeabilidad vascular; la ruptura de la barrera hematoencefálica estará causando que el líquido de la matriz extracelular penetre al tejido, provocando un desbalance iónico y formación de edema en el área de lesión, así como el aumento de líquido en el interior de las células (15). La materia gris y la materia blanca tienen un aporte sanguíneo diferente, la materia blanca tiene una red de capilares y neuronas con una demanda metabólica mayor, lo que le permite soportar estos periodos de isquemia, incluso se menciona que a los 15 minutos post-traumatismo el nivel sanguíneo regresa a su estado basal (1). La materia gris no cuenta con esta red de capilares lo que le estaría permitiendo que el retorno sanguíneo regrese a un estado basal. Al recuperarse el aporte sanguíneo después del periodo de isquemia que se produjo por la compresión medular, se generará un segundo fenómeno, la reperfusión, ocasionando que el oxígeno que entra al área de lesión actúe provocando un aumento en la formación de radicales libres por vía enzimática aunado a la formación de radicales libres que se generaron por la vía no enzimática en el momento del traumatismo (16).

### 3.4 Daño por excitotoxicidad, desbalance iónico y estrés oxidativo

Una vez que se ha generado la compresión medular, hay ruptura de los capilares dentro de la médula espinal provocando hemorragia, como la generación de radicales libres y un desbalance iónico. Durante la lesión medular aguda el calcio intracelular aumenta por el desbalance iónico y la presencia de radicales libres provocando una mayor liberación del glutamato, aumentando los primeros 15 a 30 minutos posteriores a la lesión y regresará a niveles basales a la hora post traumatismo (17,21). El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC que se ha estudiado en la lesión medular, sus receptores se dividen en dos tipos: por canales catiónicos llamados ionotrópicos, y receptores asociados a proteína G llamados metabotrópicos (18). Los receptores catiónicos están clasificados en tres distintos tipos: N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) y receptores de kionato (19). Tanto en el humano como en la rata existe una clasificación para los transportadores de glutamato que tienen como función regular las concentraciones de glutamato en la hendidura sináptica, ya que las células nerviosas como astrocitos, neuronas, glia pueden liberar glutamato cuando las concentraciones de  $Ca^{++}$  intracelulares aumentan (20). Mientras la cantidad de glutamato va aumentando en la matriz extracelular, las células empiezan a tener cambios en su interior, presentando un desbalance iónico (20).

Durante la compresión medular, el órgano va a sufrir un periodo de isquemia produciendo que los niveles de oxígeno bajen y la producción de adenosín trifosfato (ATP) se vea disminuida durante el periodo de isquemia. Cuando la

célula no puede producir ATP, pasa a un metabolismo anaeróbico ocasionando que la misma célula produzca menos sustancias antioxidantes, las bombas como la de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  se verán afectadas al igual la bomba de  $\text{Ca}^{++}$  (22). Las bombas como la de  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  se verá afectada por la acumulación de  $\text{Na}^+$  que se encuentra en el interior de la célula, las bombas de  $\text{Ca}^{++}$  del retículo endoplasmático dejarán de funcionar provocando que no pueda recapturar el  $\text{Ca}^{++}$  (23). La disminución del pH y la acidosis metabólica que se va a ir produciendo afectará la actividad enzimática, los ribosomas se verán deteriorados inactivando así la síntesis de proteínas, la acumulación de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$  provocará una hiperosmolaridad haciendo que el líquido en la matriz extracelular entre a la célula haciendo que esta se hinche (24).

La célula empieza a tener un desbalance iónico, la mitocondria empieza a pasar a un estado de alteración impidiendo que sus funciones normales se puedan realizar, las células empiezan a morir y sus canales iónicos fallan por la presencia de ERO, estas empiezan a aumentar a partir de que se origina el traumatismo en la médula espinal y elevando sus niveles pudiendo llegar a niveles muy altos a la hora de la lesión (25). Existen diferentes rutas por la cual se va a generar estrés oxidativo, entre las principales tenemos el sistema de oxidasa xantina, sistema oxidasa de NADPH, la cadena transporte de electrones mitocondriales y el óxido nítrico sintetasa desacoplado, esto en rutas enzimáticas; mientras que en las no enzimáticas esta incluidas la hemoglobina y la mioglobina cuando se genera un daño muy severo (26).

### 3.5 Respuesta inmunológica

Al efectuarse sobre la médula espinal el primer daño, en este caso la compresión medular, se va a producir la destrucción de los vasos sanguíneos dentro de la médula espinal, así como los vasos que la rodean y la ruptura de la barrera hematoencefálica. Estas dos alteraciones van a producir que las células del sistema inmune puedan infiltrarse con mayor facilidad a la médula espinal. Los niveles de citocinas proinflamatorias aumentan a nivel local y sistémico, esta concentración puede ser medida en el líquido cefalorraquídeo a minutos o incluso horas después de la lesión (27). Al generarse el primer daño en la médula espinal los niveles de neutrófilos aumentarán a partir de las 12 horas post lesión medular, teniendo un nivel máximo en las primeras 24 horas (28). Después de este periodo, los niveles de neutrófilos irán disminuyendo paulatinamente. Otra molécula inflamatoria que va a intervenir durante el proceso de la inflamación es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que tendrá un aumento a partir de las 3 horas desde que se generó la lesión hasta un periodo de 24 horas (29). La interleucina 6 (IL-6) tendrá presencia a partir de los 15 minutos posterior a la lesión (29); estas dos moléculas tendrán una gran presencia en el área donde se llevó a cabo el daño en la médula espinal. Se han reportado que tanto TNF- $\alpha$  como IL-1 $\beta$  llegan a ocasionar muerte de oligodendrocitos, inhibiendo transportadores de glutamato en los astrocitos, esta acumulación de glutamato es lo que va a producir la muerte de los oligodendrocitos por exotoxicidad (30). Este ciclo en el cual el TNF- $\alpha$  es liberado provoca un aumento de glutamato, hay un incremento en el radio excitador/inhibidor aumentando los niveles de Ca<sup>++</sup> provocando que haya muerte

neuronal por apoptosis (25). La respuesta de citocinas proinflamatorias parece estar regulada por el factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) este mismo factor que va a codificar para las diferentes citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 entre otras, va a estar regulado por el factor inducido por hipoxia 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) (24).

### 3.6 Muerte celular por apoptosis y necrosis

Durante el impacto que sufre la médula espinal habrá células del sistema nervioso que van a morir por necrosis, un proceso no fisiológico. La apoptosis será un proceso de muerte celular que estará mediada por diferentes moléculas. Estos dos procesos de muerte celular son los más estudiados dentro de la lesión medular aguda (31).

Como se había mencionado antes la apoptosis es un proceso que estará regulado para que la célula programe su ciclo de vida. Su proceso estará dividido en dos diferentes estadios, un proceso extrínseco y un proceso intrínseco, ambos activados para inducir la muerte de la célula (31).

Intrínseca: la fase intrínseca de la apoptosis está determinada por las mitocondrias que responden a los estímulos que se presentan en el interior de las células. Podemos hablar de dos tipos de factores que se encontrara una célula para que inicie la apoptosis, los factores o señales negativos serán cuando no haya presencia de citoquinas, hormonas o factores de crecimiento en el microambiente de la célula promoviendo moléculas de la apoptosis como son puma, noxa y bax que normalmente se encuentran inactivadas dentro de la célula (31). Mientras que los factores que se encuentran en la naturaleza son llamados como factores o

señales positivas, como son, virus, toxinas, radiación, radicales libres, hipoxia, entre otros (32).

Los cambios que se generan por los estímulos positivos y negativos causan que la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) se altere, esta acción dará paso a que sean liberadas al citosol proteínas pro-apoptóticas iniciando la vía intrínseca (32). Una vez abiertos los poros mitocondriales habrá dos grupos de moléculas que serán liberadas, el primero liderado por el citocromo *c*, Smac/DIABLO y la proteasa serina HtrA2/Omi (31). De este grupo, es de gran importancia el citocromo *c* ya que desencadena la vía intrínseca, se habla también que la caspasa-9 es el elemento que origina esta vía sin embargo ambas moléculas son esenciales para que se lleve a cabo la vía intrínseca. El citocromo *c* se une a la proteína apoptótica proteasa factor de activación 1 (APAF-1) y a la procaspasa-9, formando un apoptosoma que activa a la caspasa-9; mientras Smac/Diablo y HtrA2/Omi tiene la función de inhibir a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) (32). La caspasa-9 junto con la caspasa-3 iniciarán la cascada de las caspasas para que se lleve a cabo la apoptosis (33).

El segundo grupo que es liberado de la mitocondria es: endonucleasa G, factor inductor de apoptosis (AIF) y DNasa activada por caspasa (CAD) cuyas funciones se realizarán después de que hayan translocado al núcleo, AIF tendrá la función de fragmentar al DNA y la condensación de la cromatina nuclear periférica, la endonucleasa G se va unir a la cromatina nuclear produciendo fragmentos de ADN oligonucleosómico, CAD tras unirse con la caspasa-3 y translocado al núcleo, formarán fragmentos de ADN oligonucleosómico como otros procesos más

avanzados de la condensación de la cromatina (33). Cabe mencionar que las funciones AIF y la endonucleasa G son independientes a las caspasas (33).

Extrínseca: la fase extrínseca de la apoptosis se podrá observar dos elementos; el primero pertenece a los ligandos de la muerte y el segundo a los receptores de la muerte. Los ligandos que son liberados por células NK y macrófagos tienen participación en la vía extrínseca de la apoptosis son TNF, Fas ligando (Fas-L) y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL). Estos se unen a sus respectivos receptores TNF, se acoplan con el receptor 1 de TNF (TNFR1), Fas-L con Fas, que también se les conoce como CD95/Apo-1 y el receptor TRAIL (33). Después de la interacción del ligando con su receptor empieza la vía extrínseca con la activación de procaspasa-8 a caspasa-8, esta activación va a producir el complejo de señal inductor de muerte (DISC, por sus siglas en inglés), esta señal va a ocasionar que se recluten más procaspasas-8 activará dos vías nuevas, una llamada tipo 1 y otro tipo 2 (31). El tipo 1 está directamente relacionada con la caspasa-8 que al iniciar su activación dará lugar a la apoptosis; mientras que en el tipo 2, las IAPs van a inhibir a la caspasa-8 aunque estas pueden ser inhibidas por las mismas proteínas que serán liberadas de la mitocondria durante la vía intrínseca de la apoptosis (31).

Necrosis: En contraparte con la apoptosis, la necrosis es un proceso independiente que no requiere el estímulo como de un ligando; es un proceso que no tiene control y es generado por el daño tan severo hacia la célula causado por un shock repentino como puede ser daño por radiación, calor, químico, hipoxia, entre otro (31). En este proceso participan proteínas pro-inflamatorias como el

factor nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ). La célula se hincha por su incapacidad de mantener la homeostasis, posteriormente hay ruptura de la membrana celular, derramando todo su contenido al intersticio tisular produciendo inflamación y daño al tejido (33).

#### 4. Factor inductor de hipoxia-1 (HIF-1)

El factor inductor de hipoxia será clave para esta investigación, ya que como lo dice su nombre los niveles de HIF-1 aumentan cuando un tejido entra en un periodo de hipoxia. En el caso de la lesión medular en el modelo animal la médula espinal presenta un periodo de hipoxia provocando que el factor HIF-1 aumente y pueda transcribir diferentes factores. El factor HIF-1 es un heterodímero compuesto de dos moléculas, una HIF-1 $\alpha$  y otra porción que en todo momento se está expresando HIF-1 $\beta$  o también llamado hidrocarburo de aril (34, 35). Mientras HIF-1 $\beta$  se expresa de manera continua en el núcleo de la célula, HIF-1 $\alpha$  es expresada al interior de la célula, sin embargo, sus niveles serán muy bajos ya que es una molécula muy sensible al oxígeno y se degradará rápidamente, se estima que su tiempo de vida en una célula en estado de normoxia es de alrededor de 5 minutos (34, 35). Entonces, HIF-1 $\alpha$  va a sufrir una degradación mientras exista oxígeno en el interior de la célula. Durante el proceso de eliminación en un periodo de normoxia HIF-1 $\alpha$  será hidroxilado en prolina 402 y 564 por medio de reacciones dependientes de oxígeno, en seguida será acoplado a un complejo de ubiquitinación por parte de Von Hippel-Lindau que finalmente se degradará en por medio de un sistema de proteasoma (34, 35).

En un cuadro de daño medular por compresión, las cantidades de oxígeno se verán reducidas por lo que la eliminación de HIF-1 $\alpha$  no se realizará por la sensibilidad de este proceso hacia el oxígeno. La acumulación de HIF-1 $\alpha$  en la célula dará paso a formar heterodímeros con HIF-1 $\beta$  provocando el reclutamiento de p300 y proteínas de unión CREB (CBP) que son coactivadores de transcripción que con la unión de los elementos de respuesta-hipoxia resultará en la transactivación de alrededor de 100 genes (34, 35).

## Tratamientos

### 4. Dimetil sulfóxido (DMSO)

Dimetil sulfóxido conocido comúnmente como DMSO fue descubierto por los alemanes en el siglo XIX con la intención de crear papel de la pulpa de madera con costos más bajos, al producirse diferentes compuestos se llegó al descubrimiento del DMSO (36). Una sustancia para la que poco a poco fueron encontrando diferentes usos entre ellos tenemos la gran capacidad de transportar moléculas a través de las barreras. DMSO tiene diferentes funciones, aunque destaca la función de transportar las moléculas a través de las barreras tisulares, incluso se habla que tiene una gran facilidad de penetrar a través de la piel; otra función que suele tener es la de preservación de los tejidos, se ha mencionado en algunos artículos el uso de DMSO como crioprotector la función que más conocemos dentro del campo de la veterinaria como un antiinflamatorio (36). Son tres las funciones principales del DMSO, aunque la última ya no se aplica tanto a la medicina humana sino a la medicina veterinaria, se utiliza mucho sobre todo en clínica como agente antiinflamatorio. Debemos aclarar que estas no son las únicas

funciones que se le han encontrado al DMSO, se puede incluir la fosforilación oxidativa en la mitocondria, que tiene una mejora, una propiedad para degradar radicales libres, aumento en la diuresis, neuroprotector cuando se presentan isquemia en el cerebro, entre otras (37).

## 6. Metilprednisolona

La administración de succinato de metilprednisolona ha sido por varios años el principal fármaco que se administra en una lesión medular, sin embargo, su uso en la clínica ha sido cuestionado, sobre todo en medicina humana. Los beneficios que tiene el succinato de metilprednisolona en el tejido no son muchos, incluso se recomienda que su administración no sea mayor a las 8 horas post traumatismo. En diferentes estudios se habla de una controversia con su uso por lo mismo de que sus beneficios son pocos y los problemas secundarios llegan a estar presentes en algunos pacientes. La práctica de administrar este fármaco en una lesión medular se debe más a que actualmente no hay un tratamiento específico contra la lesión medular y la única medida es optar por un fármaco que no ayuda del todo y con el riesgo de generar daños secundarios (5).

Uno de los principales problemas o riesgos que se tiene al administrar succinato de metilprednisolona es que produce un aumento en las infecciones en heridas y hemorragias gastrointestinales, aunque estos problemas son manejables (38). El problema en México es que su administración sobrepasa el límite de 8 horas cuando en los estudios que se realizan con una administración no mayor a 8 horas se observan una diferencia estadística significativa que hay una mejora motora en un lapso de 6 meses, pero como lo mencione en México llegan casos donde

pasan días, semanas, meses o incluso años de no recibir tratamientos lo que complica que los pacientes puedan tener una recuperación motora y sensitiva.

Por ser un corticosteroide sintético con efectos como antiinflamatorio e inmunosupresor, se utiliza tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. Es un fármaco que logra atravesar la membrana celular uniéndose a receptores intracelulares de glucocorticoides, este complejo va a translocar hacia el núcleo uniéndose a secuencias específicas en el DNA y provocando la supresión o el bloqueo de ciertos genes (38). Esta unión promueve la expresión de genes con propiedades antiinflamatorias y el bloqueo de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B (38). A su vez tiene el efecto de suprimir la síntesis de la ciclooxigenasa (COX)-2 que al haber un daño en un tejido es responsable de la producción de prostaglandinas dando origen a la cascada de la inflamación (38).

Al administrarse por vía intravenosa le da un periodo de acción de una hora, con una vida media de 0.25 horas y tiene su metabolismo en el hígado con excreción urinaria (33).

## 7. Justificación

La lesión medular aguda es un serio problema para la medicina humana y veterinaria, causando una discapacidad permanente y mortalidad, siendo más vulnerables los jóvenes. En cuanto a medicina veterinaria existe un gran número de animales que no son tratados por los elevados costos de los tratamientos farmacológicos y quirúrgicos, prefiriendo en algunos casos la eutanasia como una medida de solución. Hoy en día no se tiene un fármaco que sea el ideal para el

tratamiento de la lesión medular aguda ya que los medicamentos actuales no son específicos para tratar este problema y presentan efectos secundarios no deseados.

Chetomin (Dithiodiketopiperacina): obtenido del hongo *Chaetomium spp.* la dithiodiketopiperacina es un metabolito (Enzo Biochem, Inc. New York) que tiene propiedades antimicrobianas con la capacidad de bloquear la interacción que tiene HIF-1 $\alpha$  con p300 (39, 40). El Chetomin actúa en la estructura terciaria del dominio CH1 del coactivador p300 de esta forma va a bloquear su interacción con HIF-1 $\alpha$  impidiendo que se lleve a cabo la transcripción inducida por hipoxia (39, 40). Se menciona que el Chetomin tiene una vida media de 4 horas (39, 40). El uso de Chetomin para bloquear la interacción entre p300 y HIF-1 $\alpha$  es en modelos tumorales donde se ha observado que el fármaco si llega a bloquear esa interacción incluso se ha observado en trabajos de este tipo una disminución del crecimiento tumoral (39, 40).

Actualmente no se conocen estudios con base en el Chetomin en lesión medular aguda, sin embargo, la investigación con moléculas en la inhibición o modulando HIF-1 $\alpha$  puede ayudar en la disminución del daño medular (39, 40).

## 8. Objetivo

Evaluar el efecto de la sustancia activa del Chetomin a un nivel histológico para conocer los efectos sobre el daño medular agudo.

## 9. Objetivos específicos

- 1.- Diseñar un modelo de daño medular agudo en ratas wistar
- 2.- Administrar metilprednisolona, chetomin y el vehículo a diferentes tiempos del daño medular.
- 3.- Evaluar por medio de histopatología los efectos de cada uno de los fármacos que fueron administrados a distintos tiempos.

## 10. Hipótesis

Hipótesis nula: la administración del fármaco Chetomin una hora y ocho horas después de la lesión medular aguda no provocará una disminución del daño celular por la administración.

Hipótesis alternativa: la administración del fármaco Chetomin una hora y ocho horas después de la lesión medular aguda provocará una disminución del daño celular por la administración.

## 11. Modelo de experimentación

Se utilizaron 42 ratas wistar de 250-300 gr, de entre 6 a 8 semanas de edad, clínicamente sanas provenientes del departamento de investigación experimental y bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), con clave de aprobación del protocolo CEX-1914-18-18-1 y fueron alojadas en el departamento de cirugía experimental. Fueron colocadas en cajas de policarbonato (21 cm de altura x 40 cm base mayor x 34 cm base menor x 51 cm largo), pellets *ad libitum* (LabDiet 5001 Rodent Diet, Brentwood, USA),

agua (500 ml) *ad libitum*, cama de viruta (Hygienic Bedding Premium Scientific Bedding, Rosenberg, Alemania), condiciones ambientales y ciclos luz de 12 horas, así como el manejo del modelo animal que se utilizó fueron de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999.

## 12. Tamaño de la muestra

Se emplearon 7 animales por grupo de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$X=N/ (A/100)$$

Dónde:

X= Número total de animales

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

A= Mortalidad esperada en el procedimiento (10%)

Incidencia A= 100%-10%= 90%

De acuerdo el estudio y utilizando esta fórmula tenemos:

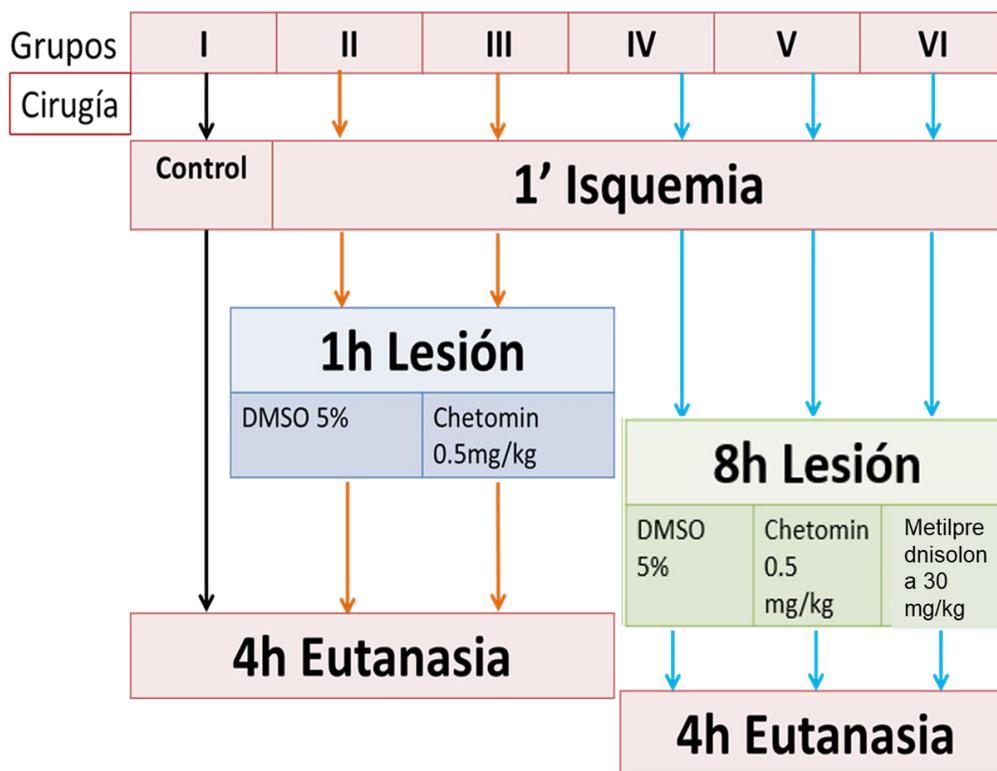
$$X= 6/ (90/100) = 6.66$$

Se obtuvo un valor de X= 6.66 pero al necesitar un número absoluto los números fueron redondeados al número superior dando como resultado X=7. Lo que quiere decir que en cada grupo de estudio se utilizaron 7 sujetos experimentales (41).

### 13. Descripción de grupos experimentales

Se utilizaron 6 grupos experimentales durante el estudio, figura 1. Se administró el vehículo dimetil sulfoxido (DMSO, Zoetis, México) a una concentración de 5% ya que es un químico que facilita la penetración de sustancias a través de la membrana plasmática y es un excelente solvente para muchos químicos (42,43). Se planteó utilizar dos grupos de DMSO con la finalidad de conocer la interacción que tendría el vehículo con el tejido medular a la hora y a las ocho horas después de la lesión. El fármaco Chetomin (Enzo Biochem, Inc. New York) se administró junto con el DMSO por vía intravenosa en la vena lateral caudal de la rata con una jeringa 31G a un grupo de una hora y a otro grupo de ocho horas posterior a la lesión medular. El succinato de metilprednisolona se administró vía intravenosa en la vena lateral caudal de la rata con una jeringa 31G a un grupo a las ocho horas posterior a la lesión medular.

Los tiempos de la administración de los fármacos fueron establecidos porque en un accidente donde se generaría un traumatismo medular se tiene contemplado que, en teoría transcurriría una hora para el tratamiento farmacológico. Las ocho horas fueron establecidas porque se menciona que las primeras 8 horas posterior a la lesión medular aguda son críticas, dejando un margen de hasta las 24 horas (44).



**Figura 1.-** Esquema que muestra la distribución de los grupos experimentales

Grupo 1 Control (n=7): Extracción de la médula espinal después de haber realizado la laminectomía sin ocasionar daño medular.

Grupo 2 DMSO 1 h (n=7): Tratamiento con el vehículo (DMSO 0.5 mg/Kg a una concentración de 5%; IV) una hora posterior a la lesión medular aguda y la extracción del tejido medular lesionado a las 4 horas después de su tratamiento.

Grupo 3 Chetomin 1 h (n=7): Tratamiento con Chetomin (0.5 mg/Kg; IV, DMSO 5%) una hora posterior a la lesión medular aguda y la extracción del tejido medular lesionado a las 4 horas después de su tratamiento.

Grupo 4 DMSO 8 h: Tratamiento con el vehículo (DMSO 0.5 mg/Kg a una concentración de 5%; IV) ocho horas posteriores a la lesión medular aguda y la extracción del tejido medular lesionado a las 4 horas después de su tratamiento.

Grupo 5 Chetomin 8 h: Tratamiento con Chetomin (0.5 mg/Kg; IV, DMSO 5%) ocho horas posteriores a la lesión medular aguda y la extracción del tejido medular lesionado a las 4 horas después de su tratamiento.

Grupo 6 Succinato de metilprednisolona 8 h: Tratamiento con succinato de metilprednisolona (30mg/Kg; IV) ocho horas posteriores a la lesión medular aguda y la extracción del tejido medular lesionado a las 4 horas después de su tratamiento.

#### 14. Técnica quirúrgica

Los animales fueron anestesiados con Acepromacina-Ketamina (2.5, 50 mg/Kg) por vía intramuscular con una jeringa de calibre 27G, como analgésico se administró Meloxicam por vía subcutánea con una jeringa de 27G en el pliegue dorsal a una dosis de 2 mg/Kg, como profiláctico se administró Enrofloxacin (10 mg/Kg). 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 frecuencia respiratoria de 60 ventilaciones por minuto y se conectó a una máquina de anestesia para roedores (Kent Scientific Somno Suite) y se mantuvo la anestesia con Isoflurano al 2-2.5 % de CAM (concentración alveolar mínima) (45).

Se colocó en decúbito ventral fijando sus extremidades con cintas micropore, se realizó una tricotomía de la región vertebral toracolumbar (T5-L2) y se embrocó la región con clorhexidina. Acto seguido se incidió longitudinalmente en el dorso de la rata por planos hasta llegar a fascia toracolumbar, se disecó el espacio paravertebral de manera subperióstica hasta llegar a espacio espinolaminar y posteriormente hasta la apófisis transversa ipsilateral y en todo momento se realizó hemostasia. Con apoyo de microscopio quirúrgico (Carl Zeiss, OPMI-1,) utilizando el objetivo 19x se realizó laminectomía a nivel de T9. Se realizó un clipaje medular extradural mediante clip vascular con presión a 30 gramos y se retiró al minuto de compresión (46). Se realizó hemostasia. Se suturó la fascia toracolumbar con sutura absorbible multifilamento 2-0 y piel con surgete continuo con sutura no absorbible monofilamento 3-0.

Al finalizar el procedimiento quirúrgico cada animal se colocó en una caja de policarbonato limpia, con cama de viruta limpia, agua y comida *ad libitum*, con una fuente de calor externa, los parámetros como la temperatura y humedad se manejaron de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999.

## 15. Administración de fármacos

A los grupos que se les administró DMSO como vehículo, se utilizó una concentración del 5% ya que se menciona que concentraciones por debajo del 10% no son tóxicas (47). Se administró a una hora y a ocho horas posteriores a las lesiones medulares. Se embrocó con alcohol en la región donde está localizada la vena lateral caudal de la rata, se cargó una jeringa con un calibre de aguja de 31G, se puncionó la vena de la rata y al final se realizó una ligera presión

con una torunda de algodón para ejercer hemostasia en el área de la punción. La dosis del Chetomin fue en relación con estudios previos donde se utilizó a una dosis de 0.5 mg/Kg, de igual manera se administró en la vena lateral caudal de la rata del mismo procedimiento que con el vehículo DMSO (48, 49), con una jeringa de 31G, se embroco con alcohol el área donde se puncionó, se ejerció presión al final con una torunda de algodón sobre la herida. En cuanto al succinato de metilprednisolona se utilizó a una macrodosis de 30 mg/Kg porque es la dosis empleada en los humanos como en los animales domésticos cuando sufren de lesiones medulares y en estudios previos está establecida esta dosis en ratas para estos tipos de estudios (49, 51). Se administró en la vena lateral caudal de la rata al igual que el vehículo DMSO y el fármaco Chetomin.

## 16. Toma de muestra

Para la obtención del tejido medular lesionado cada animal fue anestesiado con pentobarbital sódico a una dosis de eutanasia (120 mg/Kg) por vía intraperitoneal en el lado derecho del vientre del roedor. Se realizó una tricotomía en la región del esternón, se embroco con clorhexidina, se incidió por línea media en el esternón, se localizó el proceso xifoides y con una tijera de mayo se cortó longitudinalmente sobre la línea media del esternón para exponer el bloque cardiopulmonar. Se ubicó el ventrículo izquierdo y con la tijera de mayo se incidió el ventrículo izquierdo para poder introducir una cánula que llegó directamente a la aorta. Se perfunde con 100 ml formaldehído al 5% durante 2-3 minutos. Después de este proceso se colocó decúbito ventral abordando la médula espinal por donde se había hecho la primera incisión, se recolectó el bloque medular y se almacenó en

frascos de vidrio de 10 cc de capacidad en proporciones de 4:1 de formaldehído al 10%.

## 17. Evaluación histopatológica

Se realizaron cortes transversales de las médulas espinales obtenidas de los modelos experimentales. Se tiñeron con hematoxilina-eosina y fueron evaluados por el servicio de patología del Hospital Central Sur de Alta Especialidad PEMEX. Se evaluaron los siguientes parámetros con ayuda de un microscopio óptico de 10x y 40x para valorar las lesiones que se originaron.

**Edema:** Se evaluó el líquido en el parénquima medular observado en cortes histológicos con una distribución focal o difusa y haciendo una evaluación de acuerdo con la presencia de edema: ausente, leve, moderado y severo.

**Hemorragia:** Se evaluó la extravasación de eritrocitos al parénquima medular en los cortes histológicos evaluando su distribución focal o difusa: ausente, leve, moderado y severo.

**Picnosis:** Se evaluó la contracción del núcleo en las neuronas y la condensación de la cromatina evaluando su distribución focal o difusa: ausente, leve, moderado y severo.

**Infarto:** Se evaluó la extensión del área de necrosis con una distribución focal o difusa: ausente, leve moderado y severo.

Infiltración de polimorfonucleares: Se evaluó la presencia de neutrófilos por su distribución focal o difusa en el parénquima medular: ausente, leve, moderado y severo.

La escala de medición fue la siguiente:

| Calificación | Grado de lesión |
|--------------|-----------------|
| 1            | Ausente         |
| 2            | Leve            |
| 3            | Moderado        |
| 4            | Severo          |

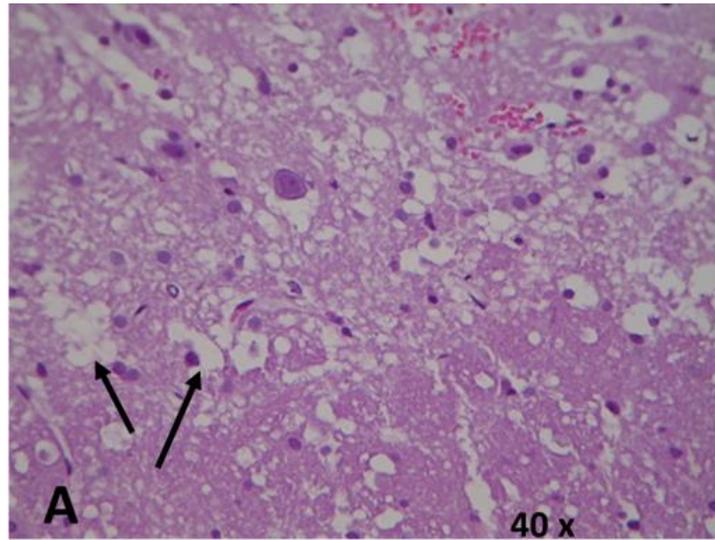
## 18. Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva expresada en media  $\pm$  error estándar (EE). Se empleó el análisis de Kruskal-Wallis y la prueba de varianza (ANOVA) post hoc de Tukey para comparar los resultados obtenidos en los diferentes grupos de estudio. Se tomó como estadísticamente significativo un valor menor o igual de  $p \leq 0.05$ . Se utilizó el programa estadístico SPSS v20.0 (IBM™ statistics).

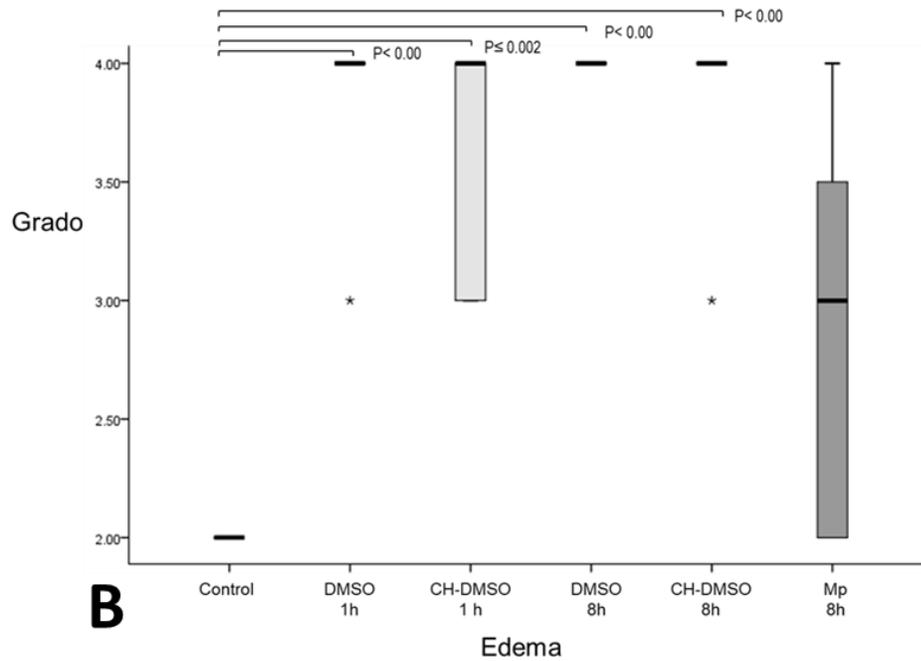
## 19. Resultados

Posterior al trauma medular agudo se evaluó la formación de edema y se observó que a las de 8 horas de la lesión el grupo tratado con el vehículo; DMSO 8 h tuvo mayor desarrollo de edema ( $p < 0.00$ ), figura 2A; seguido del grupo CH-DMSO 8 h ( $p < 0.00$ ), grupo DMSO 1 h, posteriormente el grupo CH-DMSO 1 h, figura 2B; todos ellos con una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo

control. Finalmente, el grupo tratado con MP presentó un nivel de edema más bajo, pero sin ninguna diferencia significativa.

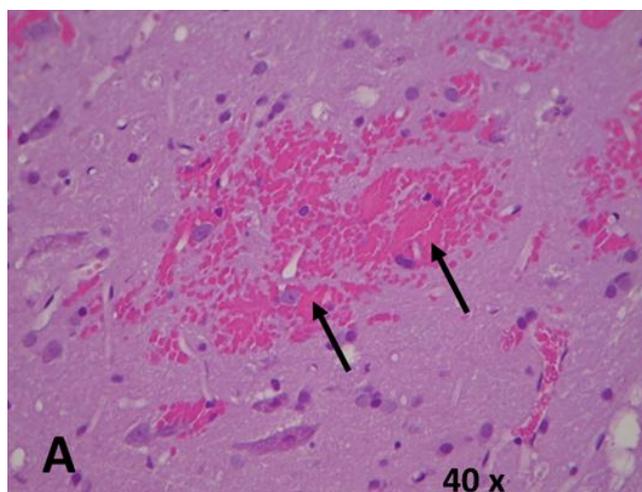


DMSO 8 h

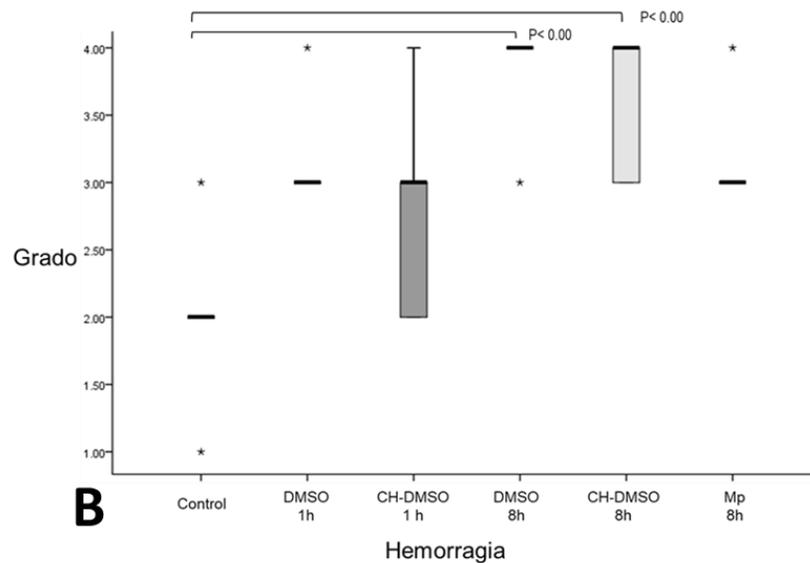


**Figura 2: A)** El corte histológico de la médula espinal ubicado en su porción de la sustancia gris perteneciente al grupo DMSO 8 h muestra formación de edema utilizando la tinción de hematoxilina-eosina. **B)** A pesar de que no se mostró una diferencia estadísticamente significativa, el grupo de metilprednisolona mostro un nivel más bajo de edema con respecto a los grupos con tratamiento.

En la observación histopatológica del trauma medular se realizó la evaluación de hemorragia donde el grupo tratado con el vehículo DMSO 8 h tuvo mayor presencia de hemorragia ( $p < 0.00$ ), figura 3A; seguido del grupo CH-DMSO 8 h ( $p < 0.00$ ), sin embargo, no se presentó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con tratamiento, figura 3B. La menor presencia de hemorragia se observó en el grupo CH-DMSO 1h sin ninguna diferencia estadísticamente significativa, figura 3B.

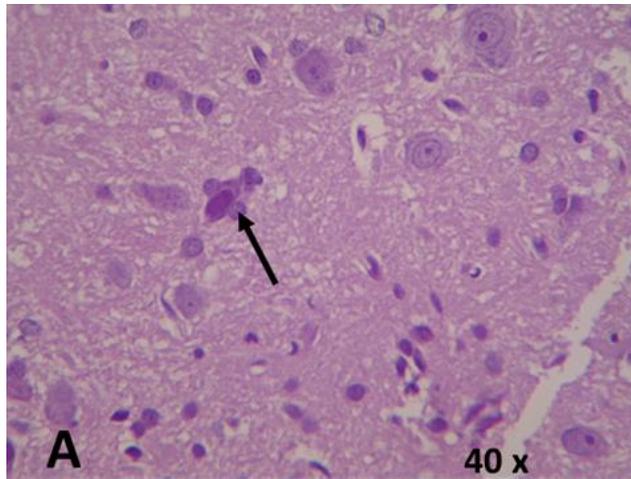


DMSO 8 h

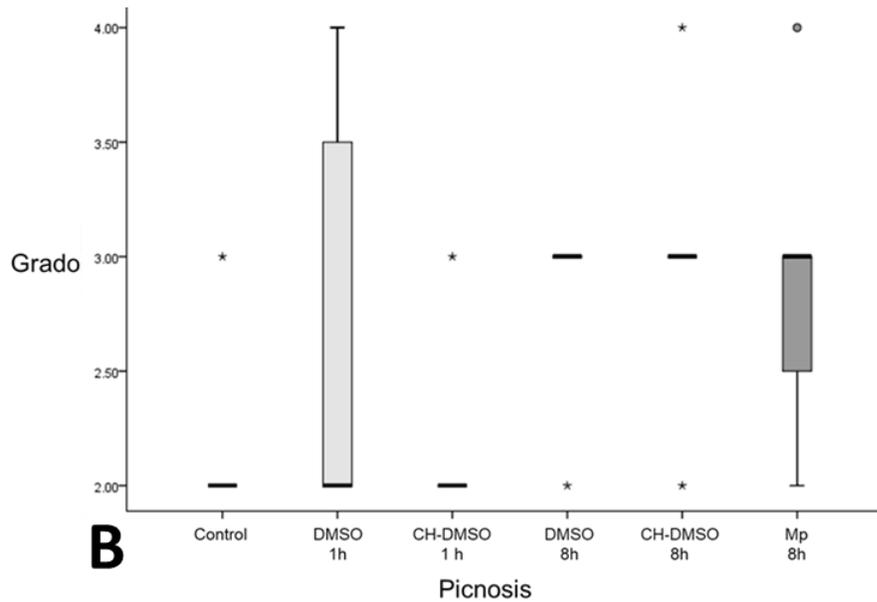


**Figura 3: A)** En el corte histológico de la médula espinal ubicado en su porción de la sustancia gris perteneciente al grupo 4 DMSO 8 h se observa hemorragia en la médula espinal utilizando la tinción de hematoxilina-eosina. **B)** Se observó que el grupo de DMSO 8h hubo mayor formación de hemorragia con respecto a los grupos con tratamiento.

Se evaluó por histopatología la picnosis de las neuronas donde no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa, figura 4B. En el corte histológico nos muestra al grupo CH-DMSO 8 h que presentó un ligero aumento, figura 4A.

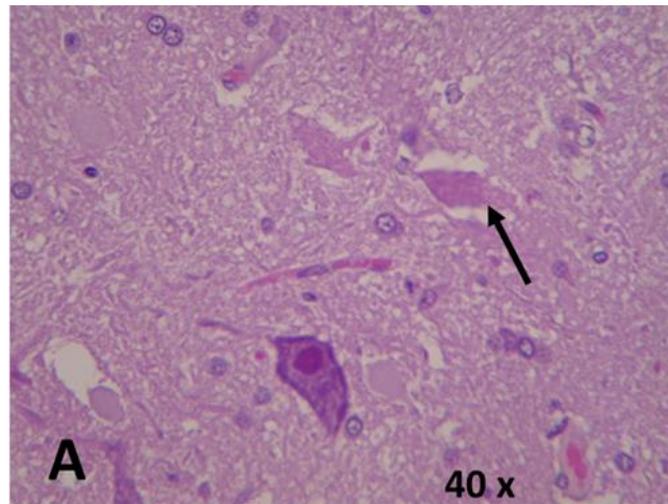


CH-DMSO 8 h

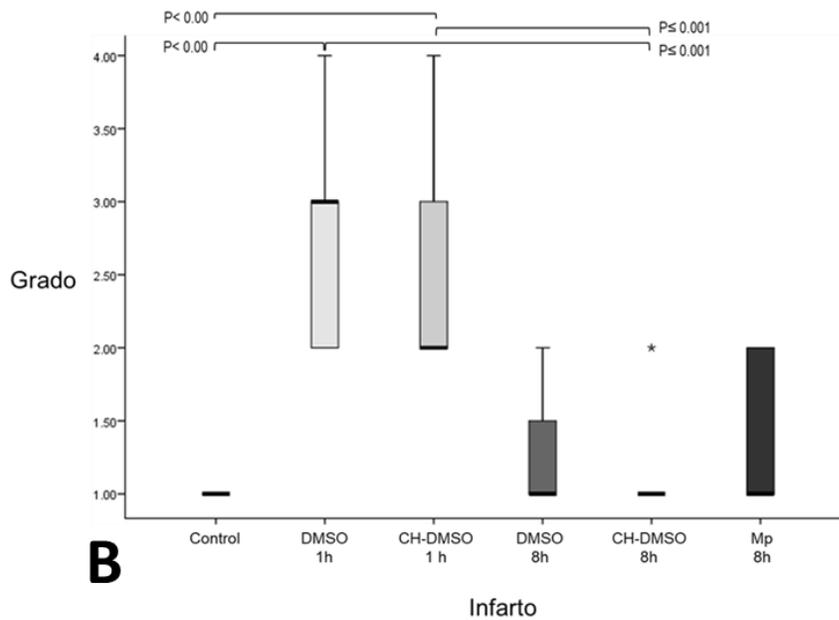


**Figura 4: A)** Se observa el corte histológico de médula espinal ubicado en su porción de la sustancia gris perteneciente al grupo 5 CH-DMSO 8 h donde se observa la lesión de picnosis en las neuronas utilizando la tinción hematoxilina-eosina. **B)** Sin haber una diferencia estadísticamente significativa, los grupos DMSO 1h y CH-DMSO 1h tuvieron un menor nivel de picnosis con respecto a los otros grupos con tratamiento.

Posterior se realizó la histopatología del cambio isquémico, se observó que el grupo de DMSO 1h ( $p < 0.00$ ) tuvo un mayor desarrollo de cambios isquémicos seguido por el grupo CH-DMSO 8 h ( $p < 0.00$ ) al grupo CH-DMSO 8 h ( $p \leq 0.001$ ) teniendo una diferencia estadísticamente significativa, figura 5B. El grupo que presentó un menor daño generado por cambio isquémico fue el CH-DMSO 8 h, pero sin ninguna diferencia estadísticamente significativa, figura 5A.



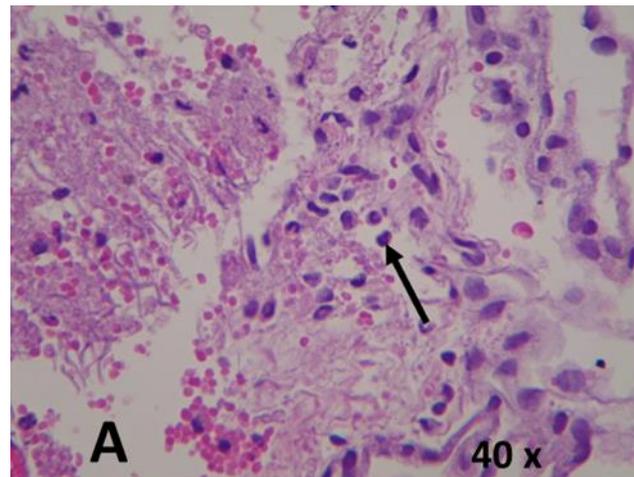
CH-DMSO 8 h



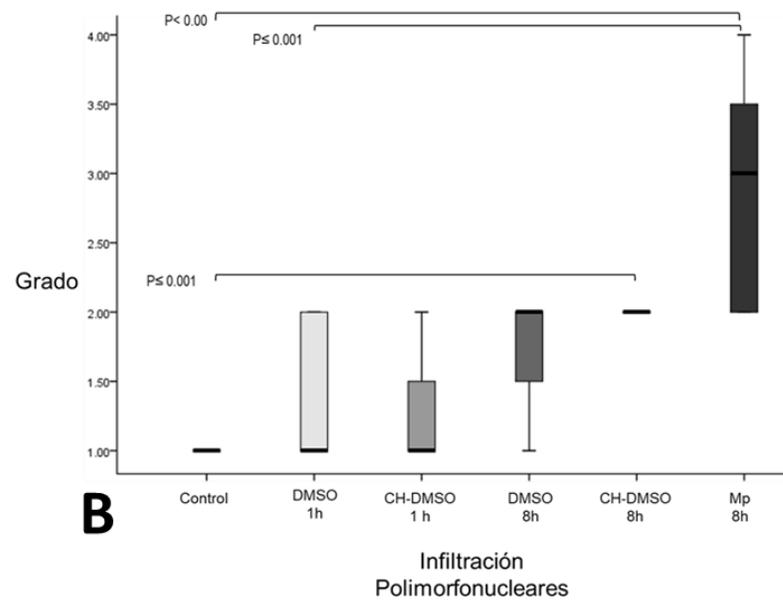
**Figura 5: A)** En el corte histológico de la médula espinal ubicado en su porción de la sustancia gris perteneciente al grupo 5 CH-DMSO 8 h utilizando la tinción de hematoxilina-eosina se observa una neurona sana y una neurona que sufre de cambios isquémicos, nótese el cambio de pigmentación del citoplasma. **B)** A pesar de que no hubo una diferencia estadísticamente significativa el grupo de CH-DMSO 8h presentó un menor grado de infarto con respecto a los grupos con tratamiento.

Finalmente, se evaluó por histopatología la infiltración de polimorfonucleares, hubo un mayor desarrollo por infiltración de polimorfonucleares en el grupo de succinato de metilprednisolona 8 h ( $p < 0.00$ ) con una diferencia estadísticamente significativa del grupo DMSO 1 h ( $p \leq 0.001$ ), figura 6B. Mientras que el grupo con menor presencia de células inflamatorias fue CH-DMSO 1 h, pero sin ninguna diferencia estadísticamente significativa. En el corte histológico del grupo de succinato de

metilprednisolona 8 h se observó que tuvo mayor índice de infiltración de polimorfonucleares, figura 6A.



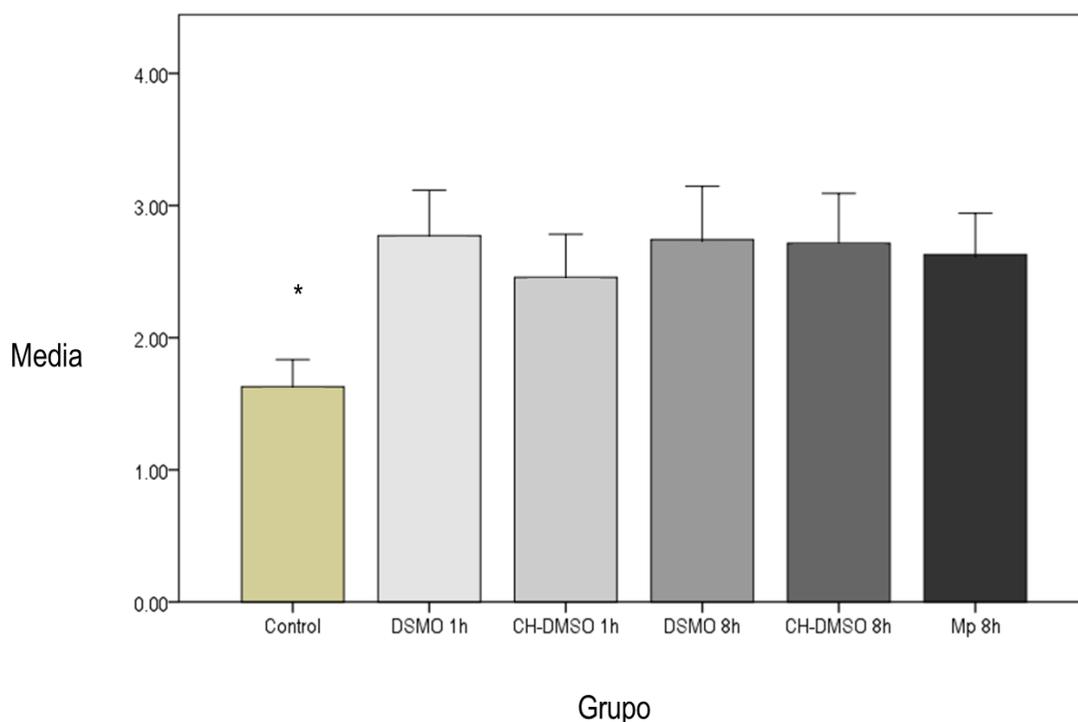
Metilprednisolona 8 h



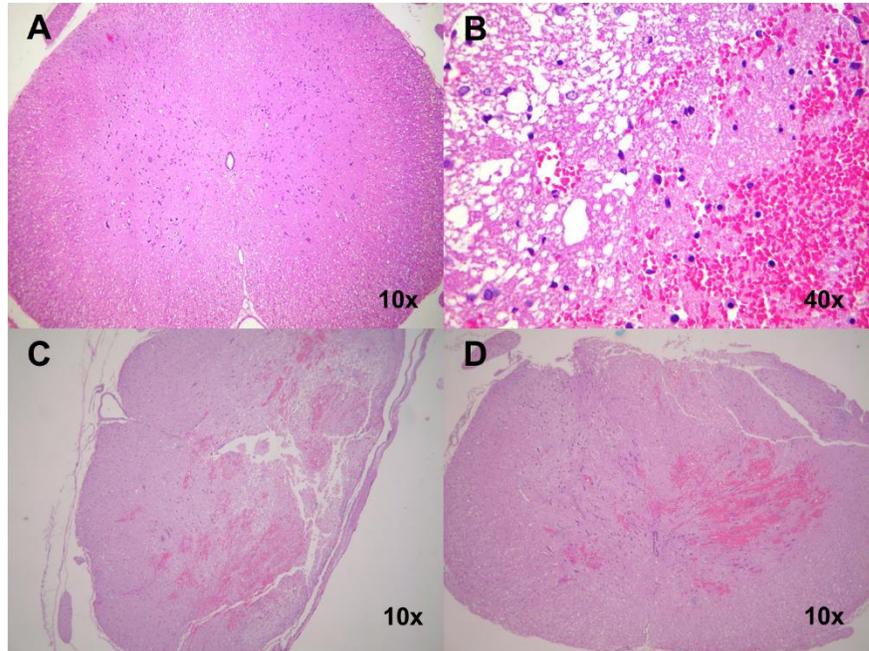
**Figura 6: A)** En el corte histológico de la médula espinal ubicada en su porción de sustancia blanca perteneciente al grupo succinato de metilprednisolona 8 h se observa la infiltración de polimorfonucleares que se encuentran en el tejido de médula espinal utilizando la tinción de hematoxilina-eosina. **B)** El grupo de

metilprednisolona 8 horas mostró niveles más elevados de infiltración por polimorfonucleares con respecto a los grupos con tratamiento.

Finalmente, se realizó un promedio general del grado de lesión de todas las variables de estudio y se compararon todos los grupos de estudio. Se observó que el grupo DMSO 1 h presentó un ligero aumento en el grado de lesión y el grupo de CH-DMSO 1 h presentó menor daño, aunque en ninguno de los dos casos se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ), figura 7.



**Figura 7:** Se representan las medias y sus errores estándar por cada grupo del estudio.



**Figura 8:** Se observan cortes histológicos de la médula espinal utilizando la tinción de hematoxilina-eosina correspondientes al grupo control (A), grupo 3 (B), grupo 5 (C) y al grupo 6 (D).

En la imagen, figura 8, se observa una comparación de los grupos tratados con Chetomin y Succinato de metilprednisolona con el grupo control. En estas imágenes se puede observar que lo más característico de los grupos con tratamiento con respecto al grupo control es la presencia de hemorragia, infiltración de polimorfonucleares y la presencia de edema. Sin embargo los grupos con tratamiento no presentaron entre ellos una diferencia estadísticamente significativa.

## 20. Discusión

La lesión medular aguda es una causa importante de discapacidad permanente y de mortalidad ya sea en pacientes adultos jóvenes y en las pequeñas especies.

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 (38). La lesión medular primaria es producto mecánico del traumatismo sobre el tejido medular. Las medidas de seguridad que se han implementado en los autos como las bolsas de aire o el cinturón de seguridad, así como en centros de trabajo; donde, los trabajadores están expuestos a sufrir caídas o de alguna manera presentar traumatismo espinal, han contribuido a la disminución de esta entidad, aunque en las pequeñas especies controlar estas medidas es complicado, están siempre expuestos accidentes o a traumatismos generados entre los animales o provocados por los humanos (2). Cuando exista una progresión a lesión medular secundaria aún no existen tratamientos eficaces, aunque de manera relativa se ha demostrado que el uso de succinato de metilprednisolona a dosis altas en las primeras horas del trauma puede disminuir las secuelas a largo plazo; sin embargo, su uso es controversial ya que no hay una diferencia significativa a nivel histológico en la médula espinal (50) y por los efectos adversos como hemorragias gastrointestinales, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario, infecciones por heridas, sepsis y tromboembolismo pulmonar que se pudieran presentar (51).

En este estudio la evidencia histopatológica se pudo observar que durante la administración del vehículo DMSO no tuvo ninguna interacción positiva al tejido nervioso y no se exacerbó la lesión medular, consideramos que su aplicación como vehículo debe ser estudiada en diferentes concentraciones menores de 5% para confirmar que no se presentan interacciones negativas en el tejido nervioso

(52). Los grupos con Chetomin se mostraron con un menor grado de lesión en los parámetros evaluados con respecto a los grupos que solamente fueron tratados con el vehículo DMSO. Estos resultados muestran un escenario que da un indicio de una ligera atenuación del daño medular ocasionado por la isquemia-reperusión. El uso del succinato de metilprednisolona a las 8 horas post-lesión no presentó ninguna diferencia estadísticamente significativa lo que nos indicaría que su uso no garantiza una mejora en el tejido nervioso. El tiempo de lesión que transcurre después del trauma pudiera ser amplio lo que generaría una respuesta celular y al inhibir o bloquear la transcripción del factor HIF puede llegar hacer tarde para observar cambios histológicos. El grupo con menor daño fue el CH-DMSO 1 h obteniendo mejores resultados que el grupo con succinato de metilprednisolona.

## 21. Conclusión

Ya que el fármaco Chetomin no presenta ningún antecedente en el empleo en lesiones medulares en una fase aguda, se requeriría seguir investigando su accionar en el tejido nervioso lesionado, con la intención de recabar mayor información sobre su empleo en dichas lesiones. La posibilidad de utilizar dosis continuas en periodos de tiempo más prolongados con el fin de observar el impacto que tiene el Chetomin sobre el tejido nervioso lesionado. Existe la posibilidad del uso de concentraciones más bajas de DMSO o utilizando otro vehículo para comparar los posibles efectos secundarios que puedan presentarse en el tejido nervioso. Ya que es un fármaco sin ningún antecedente en este tipo de

lesiones se podrían abarcar más pruebas a nivel molecular para conocer la utilidad que este fármaco está teniendo sobre el tejido nervioso dañado.

## 22. Referencias

1. Arsalan Alizadeh, Scott Matthew Dyck and Soheila Karimi-Abdolrezaee. Traumatic spinal cord injury: An overview of pathophysiology, models and acute injury mechanism. *Frontiers in Neurology*. Marzo 2019, Volumen 10, Artículos 282.
2. Aubrey A. Webb, Sybil Ngan, J. David Fowler. Spinal cord injury I: A synopsis of the basis science. *Canadian Veterinary Journal*. Mayo 2010; 51: 485-492.
3. Nicolas Granger, DVM, PhD, MRCVS, Darren Carwardine, BVSc. Acute spinal cord injury. Tetraplegia and paraplegia in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2014; 44: 1131-1156.
4. Matthew Piazza, MD, James Schuster, MD, PhD. Timing of Surgery After Spinal Cord Injury. *Neurosurgery Clinics of North America*. 2017; 28: 31-39.
5. Zhongyu Liu, MD, Yang Yang, MD, Lei He, MD, Mao Pang, MD, Chunxiao Luo, MD, Bin Liu, MD, PhD, and Limin Rong, MD, PhD. High-dose methylprednisolone for acute traumatic spinal Cord injury. A meta-analysis. *American Academic of Neurology*. 2019; 93 (9).
6. Carolina Rouanet, Danyelle Reges, Eva Rocha, Vivian Gagliardi, Gisele Sampaio Silva. Traumatic spinal cord injury: current concepts and treatment update. *Arq Neuropsiquiatr*; 2017; 75(6): 387-393.

7. Hayta, Emrullah, Elden, Hasan, Acute spinal cord injury: a review of pathophysiology and potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs for pharmacological intervention. *Journal of Chemical Neuroanatomy* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ichemneu.2017.08.001>
8. Yao Li<sup>1</sup>, Wen Han, Yanqing Wu, Kailiang Zhou, Zhilong Zheng, Haoli Wang, Ling Xie, Rui Li, Ke Xu, Yanlong Liu, Xiangyang Wang, Jian Xiao. Stabilization of HIF-1 $\alpha$  by DMOG promotes recovery from acute spinal cord injury by inhibiting neural apoptosis and enhancing axon regeneration. *Journal of Neurotrauma*. 2019; 36 (24): 3394-3409.
9. Vertebras: Clasificacion, funcion y morfología. Elsevier Connect. 25 05 2020. <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/anatomia-vertebras-clasificacion-funcion-y-morfologia>
10. Antal Nógrádi and Gerta Vrbová. Anatomy and physiology of the spinal cord. Madame Curie Bioscience Database [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6229/>
11. Alejandro Santillan, Veronica Nacarino, Edward Greenberg, Howard A Riina y Pierre Gobin, Athos Patsalides. Vascular anatomy of the spinal cord. *NeuroIntervent Surg*. 2011
12. Timothy T. Roberts MD, Garret R. Leonard MD, Daniel J. Cepela MD. Classifications in Brief American Spinal Injury Association (ASIA) Impairment Scale. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2017. 475: 1499-1504.
13. Gwendolyn J. Levine, Jonathan M. Levine, Christine M. Budke, Sharon C Kerwin, Jennifer Au, Arathi Vinayak, Bianca F. Hettlich, Margaret R. Slater.

- Description and repeatability of a newly developed spinal cord injury scale for dogs. Preventive Veterinary Medicine. Volumen 89. 2009. 121-127.
14. Patrick Losey, Daniel C. Anthony. Impact of vasculature damage on the outcome of spinal cord injury: a novel collagenase-induced model may give new insights into the mechanisms involved. Neural Regeneration Research. 2014; 9 (20): 1783-1786.
  15. Yong Cao, Tianding Wu, Zhou yuan, Dongzhe Li, Shuangfei Ni, Jianzhong Hu, Hongbin Lu. Three dimensional imaging of microvasculature in the rat spinal cord following injury. Scientific Reports. 2015.
  16. Sandino Estrada-Mondaca, D en C, Alfonso Carreón-Rodríguez, M en C, María del Carmen Parra-Cid, M en C, Clemente Ibarra-Ponce de Leon, MD, MC, Cristina Velasquillo-Martínez, M en C, Charles A. Vacanti, MD, Jaime Belkind-Gerson. Lesión de médula espinal y medicina regenerativa. Salud pública de México. Volumen 49, no. 6, 2007.
  17. Arsalan Alizadeh, Scott Matthew Dyck and Soheila Karimi-Abdolrezaee. Traumatic spinal cord injury: an overview pathophysiology, models and acute injury mechanisms. Frontiers in Neurology. Marzo 2019. Volumen 10. Artículo 282.
  18. Kwame M. Brown, Jean R. Wrathall, Robert P. Yasuda, Barry B. Wolfe. Glutamate receptor subunit expression after spinal cord injury in young rats. Developmental Brain Research. 2004, 152, 61-68.
  19. Joana Goncalves-Ribeiro, Carolina Campos Pina, Ana Maria Sebastiao y Sandra Henriques Vaz. Glutamate transporters in hippocampal LTD-LTP

- not just prevention of excitotoxicity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Agosto 2019. Volumen 13. Artículo 357.
20. Louis P. Vera-Portocarrero, Charles D. Mills, Zaiming Ye, Steven D. Fullwood, David J. McAdoo, Claire E. Hulsebosch, Karin N. Westlund. Rapid changes in expression of glutamate transporters after spinal cord injury. *Brain Research*. 2002. 104-110.
21. Meng-Yu Wu, Giou-Teng Yiang, Wan-Ting Liao, Andy Po-Yi Tsai, Yeung-Leung Cheng, Pei-Wen Cheng, Chia-Ying Li, Chia-Jung Li. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;46: 1650-1667.
22. Edward D. Hall. Antioxidant therapies for acute spinal cord injury. *The American Society for Experimental Neuro Therapeutics*. Abril 2011. Volumen 8. 152-167.
23. Ovidiu Horea Bedreag, Alexandru Florin Rogobete, Mirela Sarandan, Alina Cradigati, Marius Papurica, Oana Maria Rosu, Corina Maria Dumbuleu, Dorel Sandesc. Oxidative stress and antioxidant therapy in traumatic spinal cord injuries. *Romanian Journal of Anesthesia and Intensive Care*. 2014. Volumen 21, No. 2. 123-129.
24. Corrales Lucía Constanza y Muñoz Ariza Maira María. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova* [Online]. 2012, Volumen 10, No. 18, pp. 213-225. ISSN 1794-2470.
25. Olmos G, Llado J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm*. 2014; 2014: 861231.

26. 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.
27. Rodrigues LF, Moura-Neto V, TCLS ES. Biomarkers in Spinal Cord Injury: from Prognosis to Treatment. *Mol Neurobiol*. 2018.
28. Seiji Okada. The pathophysiological role of acute inflammation after spinal cord injury. *Inflammation and Regeneration*. 2016. 36: 20.
29. Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Wu YP, Chen WS. Inflammation and apoptosis in spinal cord injury. *Indian J Med Res*. 2012;135(3):287-296.
30. Bowes AL, Yip PK. Modulating inflammatory cell responses to spinal cord injury: all in good time. *J Neurotrauma*. 2014;31(21):1753-66.
31. Mark S D'Arcy. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International* ISSN 1065-6995.
32. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
33. Jan R, Chaudhry GE. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull*. 2019;9(2):205-218. doi:10.15171/apb.2019.024
34. A E Greijer, E van der Wall. The role of hypoxia inducible factor (HIF-1) in hypoxia. *J Clin Pathol*. 27 September 2004.

35. Burslem GM, Kyle HF, Nelson A, Edwards TA, Wilson AJ. Hypoxia inducible factor (HIF) as a model for studying inhibition of protein-protein. *Chem Sci*. 2017; 8 (6): 4188-4202. doi:10.1039/c7sc00388a
36. Capriotti K, Capriotti JA. Dimethyl sulfoxide: history, chemistry, and clinical utility in dermatology. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2012;5(9):24-26.
37. Mariantonella Colucci, Francesco Maione, Maria Carmela Bonito, Alessandro Piscopo, Amalia Di Giannuario, Stefano Pieretti. New insights of dimethyl sulfoxide effects (DMSO) on experimental in vivo models of nociception and inflammation. *Pharmacol Res* 2008 Jun;57(6):419-25. doi: 10.1016/j.phrs.2008.04.004. Epub 2008 Apr 24.
38. Christian A Bowers, Bornali Kundu, Gregory W J Hawryluk. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an increasingly philosophical debate. *Neural Regen Res* 2016 Jun;11(6):882-5. doi: 10.4103/1673-5374.184450.
39. Andrew L Kung, Sonya D Zabludoff, Dennis S France, Steven J Freedman, Elizabeth A Tanner, Annelisa Vieira, Susan Cornell-Kennon, Jennifer Lee, Beqing Wang, Jamin Wang, Klaus Memmert, Hans-Ulrich Naegeli, Frank Petersen, Michael J Eck, Kenneth W Bair, Alexander W Wood, David M Livingston. Small molecules blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. *Cancer Cell* 2004 Jul;6(1):33-43. doi: 10.1016/j.ccr.2004.06.009.
40. Yan Xia, Hyun-Kyung Choi, Kyeong Lee. Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-inhibitors. *Eur J Med Chem* 2012 Mar;49:24-40. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.01.033.

41. Alejandro Rojo Amigo. Cálculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animales. Valoración de las incidencias. *Animales de Laboratorio*. 2014; 62: 31-33.
42. Yang Xiang, Ming-ming Zhao, Sujiao Sun, Xiao-Long Guo, Qiquan Wang, Sheng-An Li, Wen-Hui Lee, Yun Zhang. A high concentration of DMSO activates caspase-1 by increasing the cell membrane permeability of potassium. *Cytotechnology*. 2018; 70: 313-320.
43. Kara Capriotti, MD, Joseph A. Capriotti, MD. Dimethyl Sulfoxide History, Chemistry, and Clinical Utility in Dermatology. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 2012; 9: 24-26.
44. J.T. Wilcox, K. Satkunendrarajah, Y. Nasirzadeh, A.M. Laliberte, A. Lip, D.W. Cadotte, W.D. Foltz, M.G. Fehlings. Generating level-dependent models of cervical and thoracic spinal cord injury: Exploring the interplay of neuroanatomy, physiology, and function, *Neurobiology of Disease* (2017).
45. S. Zhang, C. Duehrkop, JA. Plock and Rieben. Inhalation anesthesia of rats: influence of the fraction of inspired oxygen on limb ischemia/reperfusion injury. *Laboratory Animals* 2016, Vol. 50 (3) 185-197.
46. M Sharif-Alhoseini, M Khormali, M Rezaei, M Safdarian, A Hajighadery, MM Khalatbari, M Safdarian, S Meknatkhah, M Rezvan, M Chalangari, P Derakhshan and V Rahimi-Movaghar. Animal models of spinal cord injury: A systematic review. *International Spinal Cord Society*. 2017: 1-8.
47. Joana Galvao, Benjamin Davis, Mark Tilley, Eduardo Normando, Michael R. Duchon, and M. Francesca Cordeiro. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal*. 2014; 28.

48. 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.
49. A E Frampton, C A Eynon. High dose methylprednisolone in the immediate management of acute, blunt spinal cord injury what is the current practice in emergency departments, spinal units, and neurosurgical units in the UK. *Emergency Medicine Journal*. 2006; 23: 550-553.
50. José E Pereira, Luís M Costa, António M Cabrita, Pedro A Couto, Vítor M Filipe, Luís G Magalhães, Michele Fornaro, Federica Di Scipio, Stefano Geuna, Ana C Maurício, Artur S P Varejão. Methylprednisolone fails to improve functional and histological outcome following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*. 2009 nov;220(1):71-81.
51. Aubrey A. Webb, Sybil Ngan, David Fowler. Spinal cord injury II: Prognostic indicators, standards of care, and clinical trials. *Canadian Veterinary Journal*. 2010; 51: 598-604.
52. Francesco Tamagnini, Sarah Scullion, Jonathan T. Brown, Andrew D. Randall. Low Concentrations of the Solvent Dimethyl Sulphoxide Alter Intrinsic Excitability Properties of Cortical and Hippocampal Pyramidal Cells. *PLOS One*. March 2014, Volume 9, Issue 3.