



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis.**

Evaluación del efecto de la administración terapéutica de péptido inmunomodulador, compuesto químico y biológico, en la recuperación motora y expresión de genes en ratas con lesión traumática de la médula espinal.

Que presenta la pasante: **Karla Dennys Cruz Barrera**
Con número de cuenta: **312101707** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de agosto de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez	
VOCAL	M.V.Z. Raúl García Tinajero	
SECRETARIO	Dra. Lucia Angélica García Camacho	
1er. SUPLENTE	M.D. Olivia Adams Vázquez	
2do. SUPLENTE	Dra. Marcela Autran Martínez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

Unidad de Investigación Médica en Inmunología
UMAE, Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund”
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



Dictamen de Aprobado

Comité Local de Investigación en Salud 3603.
HOSPITAL DE PEDIATRIA, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

Registro COFEPRIS 17 CI 09 015 042

Registro CONBIOÉTICA CONBIOETICA 09 CEI 032 2017121

FECHA Martes, 02 de julio de 2019

Dr. Raúl Silva García

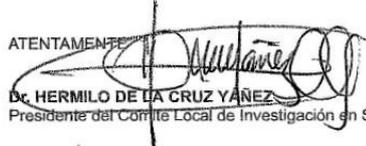
PRESENTE

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título **Administración terapéutica del Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos y N-tert-butil-alfa-fenil-nitrona en ratas con lesión traumática de la médula espinal** que sometió a consideración para evaluación de este Comité, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **APROBADO**:

Número de Registro Institucional
R-2019-3603-058

De acuerdo a la normativa vigente, deberá presentar en junio de cada año un Informe de seguimiento técnico acerca del desarrollo del protocolo a su cargo. Este dictamen tiene vigencia de un año, por lo que en caso de ser necesario, requerirá solicitar la reaprobación del Comité de Ética en Investigación, al término de la vigencia del mismo.

ATENTAMENTE


Dr. HERMILO DE LA CRUZ YÁÑEZ
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 3603

Imprimir

IMSS
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por la formación. A su personal docente, administrativo y alumnos por el apoyo en las diversas etapas.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social y la Unidad de Investigación Médica en Inmunología (UIMI) del Hospital de Pediatría del CMN SXXI por el apoyo y facilidades brindadas durante mi estancia.

Al Dr. Jorge Lara de la Universidad Autónoma de Nuevo León que colaboró para poder llevar a cabo esta investigación proporcionándonos membrana amniótica, parte fundamental y central del trabajo.

Al Bioterio del CMN SXXI y a su personal por facilitar uso de animales e instalaciones para parte de este proyecto.

A mi tutor Dr. Raúl Silva por su orientación, confianza y motivación.



A mi familia

Gracias a mis padres que estuvieron a mi lado en cada paso para lograr el sueño de mi infancia, por todas las tazas de café en las noches de desvelo, por permitirme llenar su casa de posit'os, llegar con overoles sucios después de práctica, y aceptar a mi proyecto de farmacología como un integrante más de la familia, por todo su amor y comprensión.

A mis hermanas Diana y Carina que siempre han sido un pilar fundamental, mi inspiración y más grande ejemplo a seguir, gracias por escuchar cada que me pongo en modo serio a explicarles algún tema, aunque no lo pidan, por todo su amor y apoyo.

A Edgar por recorrer este trayecto conmigo, por la dicha de crecer, aprender y madurar juntos, por creer en mí, por toda su paciencia y amor.

Gracias a toda la unidad de investigación, al Dr. Raúl Silva por permitirme ser parte del equipo por todo su apoyo y dedicación a la ciencia, a Jonathan y Lili que fueron mis mentores, por la paciencia en lo que fue mi iniciación en el mundo de la investigación, Alberto por compartirme su conocimiento quirúrgico y clínico, por introducirme y abrirme las puertas a la neurología, a Esaú y David por estar siempre dispuestos a apoyarme.

A mi alma mater por ser mi segundo hogar, brindarme las herramientas y poner en mi camino innumerables profesores que dejaron en mí más que solo conocimiento; por permitirme coincidir con personas que acompañaron mi desarrollo académico y personal. Anita y Aly por su sincera amistad y por qué pasito a pasito de codón hemos llegado más lejos de lo que pensábamos mientras escuchábamos esta frase, a las “niñas” Caro, Adri y Gaby por hacer más ameno el camino. A todas las personas que tuve la fortuna de conocer y compartir con las que siempre estaré agradecida por su apoyo y amistad.

RESUMEN

La lesión de médula espinal (LME) es un problema presente en la clínica veterinaria y se caracteriza por tener muchos padecimientos y/o agentes causales. Sin embargo, los protocolos de atención y tratamientos son escasos y poco definidos. Dentro de las terapéuticas establecidas se encuentran en su mayoría dirigidas a las afecciones iniciales post lesión, por esta razón es importante entender a la LME como un proceso que se divide en dos fases, primaria y secundaria, esta se caracteriza por un proceso inflamatorio particular, donde diversos componentes celulares, estructurales y bioquímicos propios de la médula espinal aportan un impacto variable a considerar. Los tratamientos utilizados en la línea de investigación del laboratorio han mostrado ofrecer una recuperación motora significativa cuando se utiliza la mezcla de los tratamientos, actuando sobre diversos blancos entre ellos la lipoperoxidación y la expresión de moléculas pro y antiinflamatorias a nivel de mRNA en una etapa aguda.

En el presente estudio se evaluaron los efectos de los tratamientos sobre la recuperación motora y expresión de genes relacionados con neuro modelación y formación de cicatriz glial, relacionado con el uso de membrana amniótica como trama celular. Para lo cual se formaron nueve grupos, con seis individuos cada uno a los cuales se les realizó laminectomía y/o hemisección, posteriormente se administró el tratamiento (dependiendo el grupo) utilizando para esto un compuesto químico y biológico (CQB)*, péptido inmunomodulador (PI), y membrana amniótica (MA); una vez por semana y durante ocho semanas se determinó la recuperación motriz mediante la escala de “BBB” posterior a ello se obtuvo muestra de médula espinal (0.5cm rostral 0.5caudal al sitio de lesión para proceder a realizar la determinación génica mediante RT-PCR.

La evaluación motora llevada a cabo mediante la escala de recuperación motriz “BBB” arrojó que el grupo MA+ CQB y el grupo PI+CQB presentaron mejor recuperación con respecto al grupo control a las 8 semanas. Por otro lado, en la expresión génica el grupo PI+CQB se consideró que tuvo los mejores resultados en cuanto a expresión de genes relacionados con la respuesta de neuro modelación y formación de cicatriz glial más regulada. Sin embargo, algunas expresiones, se cree pueden estar influenciada por el tiempo de evolución/ muestreo.

En conclusión, aunque se debe comprobar la transducción proteica mediante diversas técnicas, así como el uso de MA de manera periférica a la lesión para observar su comportamiento, la combinación de tratamientos resulta benéfica en proceso de recuperación crónica y modulación de expresión génica.

***En proceso de patente**

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	14
2. MARCO TEÓRICO	17
2.1 SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	17
2.1.1 <i>Encéfalo</i>	20
2.1.2 <i>Médula Espinal</i>	23
2.2 LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL EN MEDICINA VETERINARIA	26
2.2.1 <i>Signos clínicos asociados a lesión de médula espinal</i>	27
2.3 MECANISMOS DE LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL	28
2.3.1 <i>Mecanismos de lesión medular primaria</i>	28
2.3.2 <i>Mecanismos de la lesión medular secundaria</i>	29
2.4 MECANISMOS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y LIBERACIÓN DE RADICALES LIBRES POST TRAUMA RAQUIMEDULAR	36
2.4.1 <i>Principales especies reactivas de Oxígeno</i>	37
2.5 LIPOPEROXIDACIÓN	40
2.6 PROTEÍNAS COMO DIANA DE OXIDACIÓN	44
2.7 TRATAMIENTOS	45
2.8 INMUNOTERAPIA	49
2.9 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LME	50
2.9.1 <i>Proteína ácida fibroglial (GFAP)</i>	50
2.9.2 <i>Proteína asociada de crecimiento 43 (GAP-43)</i>	51
2.9.3 <i>Neurotrofina 3 (NT-3)</i>	54
2.9.4 <i>Molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (Iba-1)</i>	54
2.9.5 <i>Vimentina (VIM)</i>	55
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	57
4. JUSTIFICACIÓN	58
5. HIPÓTESIS	58
6. OBJETIVOS	59
6.1 GENERAL	59
6.2 PARTICULARES	59
7. METODOLOGÍA	59
7.1 POBLACIÓN Y GRUPOS	59
7.2 TAMAÑO DE LA MUESTRA	59
7.3 TIPO DE ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL.	60
7.4 PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS	60
a) <i>Péptido inmunomodulador</i>	60
b) <i>Compuesto químico y biológico</i>	61
c) <i>Membrana amniótica</i>	61
7.5 TÉCNICAS Y PROCESOS DE EVALUACIÓN	61
a) <i>Lesión de médula espinal.</i>	61
b) <i>Evaluación clínica. Prueba de habilidad locomotora a campo abierto Basso, Beattie and Bresnahan (BBB).</i>	62
c) <i>Diseño de iniciadores.</i>	63
d) <i>Determinación de expresión génica por PCR Tiempo Real.</i>	63
e) <i>PCR tiempo real.</i>	64
f) <i>Método estadístico</i>	65
8. RESULTADOS	66

8.1 DISEÑO DE INICIADORES PARA ANÁLISIS DE EXPRESIÓN	66
8.2 DETERMINACIÓN DE INTEGRIDAD DE RNA	67
8.3 EVALUACIÓN DE MOTILIDAD ESCALA “BBB”	68
8.4 EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA	72
9. DISCUSIÓN	78
10. CONCLUSIONES	85
11. PERSPECTIVAS	85
12. REFERENCIAS	86
13. ANEXOS	91
<i>I. Articulaciones analizadas durante la evaluación motora a campo abierto.</i>	<i>91</i>
<i>II. Escala de calificación locomotora propuesta por Basso, Beattie y Bresnahan (48).</i>	<i>92</i>

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Cambios tisulares posterior a lesión en médula espinal.....	15
Figura 2. Morfología de motoneurona.....	18
Figura 3. Anatomía regional del encéfalo	20
Figura 4. Organización longitudinal del SNC.	23
Figura 5. Conformación anatómo fisiológica de la médula espinal.	24
Figura 6. Conformación de la médula espinal.	25
Figura 7. Segmentos de la ME	26
Figura 8. Mecanismos de lesión secundaria.	30
Figura 9. Curso temporal de la LME.....	34
Figura 10. Expresión de niveles de mRNA.	36
Figura 11. Lipoperoxidación no enzimática de PUFAS.....	43
Figura 13. Determinación, en gel de agarosa al 1.8%, de la integridad de RNA.....	67

Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno.....	38
Tabla 2. Genes y respuestas asociadas a LME	50
Tabla 3. Descripción gráfica de los grupos de estudio.	60
Tabla 4. Identificación de secuencia de genes en NCBI y generación de iniciadores	66
Gráfica 1. Evaluación motora a campo abierto	68
Gráfica 2. Promedio de la evaluación motora a campo abierto.....	69
Gráfica 3. Promedio de la evaluación motora a campo abierto a las ocho semanas	71
Gráfica 4. Expresión relativa del gen GFAP en muestras de ME	73
Gráfica 5. Expresión relativa del gen GAP-43 en muestras de ME	74
Gráfica 6. Expresión relativa del gen NT-3 en muestras de ME.....	75
Gráfica 7. Expresión relativa del gen Iba-1 en muestras de ME.	76
Gráfica 8. Expresión relativa del gen VIM en muestras de ME.....	77

ABREVIATURAS

- BBB Prueba de habilidad locomotora a campo abierto Basso, Beattie y Bresnahan
- BH-E Barrera Hemato-Encefálica
- BH-M Barrera Hemato-Medular
- CG Cicatriz glial
- FCE Embolia fibrocartilaginosa
- GAP-43 Proteína asociada de crecimiento 43
- GFAP Proteína ácida fibrogial
- i. p Intra peritoneal
- Iba-1 Molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1
- IL Interleucina
- LME Lesión de médula espinal
- LP Lipoperoxidación
- MA Membrana amniótica
- ME Médula Espinal
- NMI Neuronas motoras inferiores
- NMS Neuronas motoras
- NT-3 Neurotrofina 3
- ON Óxido Nítrico
- PBS Buffer fosfato salino
- PUFAS Ácidos grasos poliinsaturados
- RL Radicales libres

- RNS Especies reactivas de nitrógeno
- ROS Especies reactivas de oxígeno
- SNC Sistema nervioso central
- SNP Sistema nervioso periférico
- SOD Superóxido dismutasa
- TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa
- VIM Vimentina

1. INTRODUCCIÓN

La lesión de médula espinal (LME) es un problema presente en medicina veterinaria y puede conducir a déficits neurológicos permanentes y graves que afectan la motricidad, sensibilidad sensorial y función autonómica. Las causas más comunes de LME en perros son hernias de disco intervertebral, embolia fibrocartilaginosa (FCE) y traumas (1).

La LME es considerada un proceso complejo que engloba afecciones primarias y secundarias durante su desarrollo, a grandes rasgos, consiste en dos fases, la primaria comprende el trauma mecánico inicial por la transmisión de la energía al cordón espinal, deformidad secundaria y compresión persistente debida al mismo (2) (Figura 1). En general, se produce disrupción axonal, vascular y de membranas celulares, desencadenando muerte celular y cambios vasculares progresivos que inician la lesión medular secundaria, en la cual, la disfunción vascular, edema e isquemia, producen una serie de procesos como la liberación de radicales libres (RL) tales como las especies reactivas del nitrógeno [RNS por sus siglas en inglés (Reactive Nitrogen Species)] y oxígeno [ROS por sus siglas en inglés (reactive oxygen species)], alteraciones hidroelectrolíticas con excitotoxicidad y la apoptosis celular tardía, que resultan en un periodo sostenido de destrucción tisular (3).

Aunado a las especies reactivas, algunas sustancias importantes, implicadas en el daño secundario que tienen un efecto vasoactivo o permeabilizante celular que determina un proceso neurodegenerativo crónico con disturbios en la organización de las fibras como la formación de una cicatriz glial (CG) (4,5). Adicional a esto, cabe mencionar que el mecanismo de protección antioxidante en el sistema nervioso central (SNC) es inferior al de otros tipos celulares y que las células neuronales no son replicativas, una vez dañadas pueden permanecer disfuncionales o ser comprometidas hacia la apoptosis (5). Así, la LME provoca la activación del sistema inmune, por lo que durante las primeras horas o días después de la lesión medular se genera una reacción celular mediada por macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y astro glía reactiva generando un proceso inflamatorio y autorreactivo exacerbado que provoca un daño importante al tejido neural (6), donde, si su modulación no es efectiva o no se realiza, originan un efecto de daño generando inflamación descontrolada produciendo un proceso destructivo,

necrosis, formación de CG y la muerte neuronal pero que cuando se modula es esencial para la plasticidad y reparación neural (7,8,9).

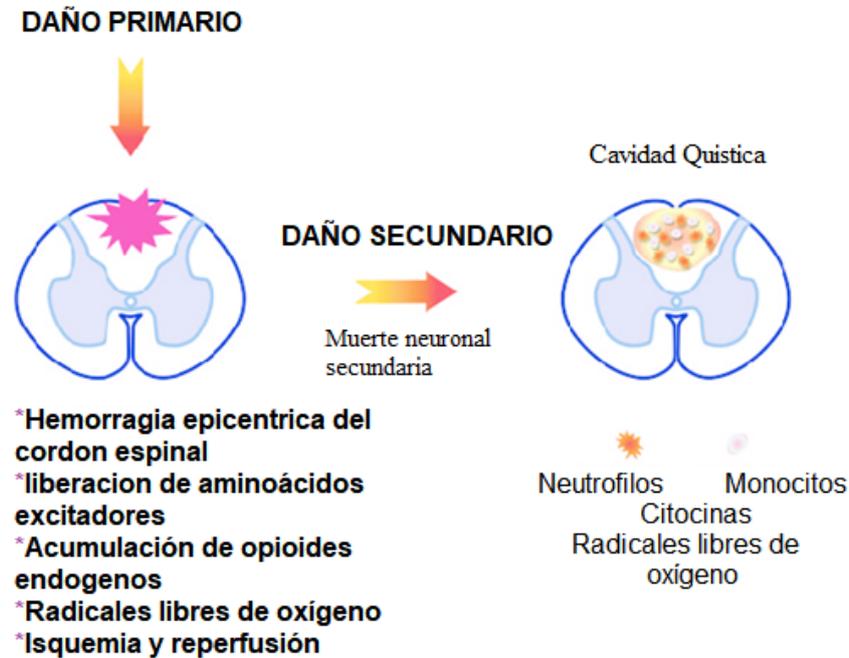


Figura 1. Cambios tisulares posterior a lesión en médula espinal en su fase primaria y secundaria, en las cuales se observan los principales procesos fisiológicos que se desencadenan, así como células, citocinas y radicales libres que se liberan durante la fase secundaria. Imagen modificada de Chacón y Nieto Sampedro, 2005 (8).

Se ha determinado que varios genes y sus productos de expresión se encuentran relacionados con regeneración axonal, entre estos, la proteína asociada a crecimiento 43 [GAP-43 por sus siglas en Ingles (Growth Associated Protein 43)] ha sido detectada en diferentes tipos de lesiones del SNC, su expresión aumenta notablemente durante el proceso de recuperación (9). La neurotopina 3 (NT-3) también se ha estudiado ampliamente en LME ya que se considera la expresión de NT-3 involucrada en la formación y el crecimiento ectópico de los axones sensoriales ascendentes (10).

La molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1 [Iba-1 por sus siglas en Ingles (Ionized calcium binding adapter molecule 1)] se activa rápidamente en respuesta al daño del SNC, dependiendo de la naturaleza del estímulo, la microglía puede tomar

varios estados de activación, que corresponden a la morfología de la microglía alterada, expresión génica y función (11). Por otra parte, la proteína glial ácida fibrilar [GFAP por sus siglas en Inglés (Glial fibrillary acidic protein)] también es considerado un marcador específico de enfermedades del SNC, y procesos neuronales nocivos que comprometen la integridad de la barrera hematoencefálica (BH-E) (12). Se han mostrado ser una serie de biomarcadores potencialmente útiles para predecir resultados clínicos en el trauma del SNC.

También han sido desarrollados métodos físicos para la recuperación de tejidos de distinta gama, como es el caso de la membrana amniótica (MA). La propia membrana y las células madre aisladas de ella han mostrado potencial para aplicaciones en el campo de la medicina regenerativa, debido a sus propiedades bacteriostáticas y antiangiogénicas. Se ha demostrado que la MA reduce el dolor, regula el proceso inflamatorio y mejora la cicatrización y epitelización de heridas; también exhibe baja o nula inmunogenicidad y actúa como una barrera física en el caso de una herida expuesta (13).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Sistema Nervioso Central

El SNC está formado por el cerebro y la médula espinal (ME) y se encuentra rodeado por una serie de huesos. El cerebro está cubierto por el cráneo y la ME por las vértebras cervicales, torácicas, lumbares y sacras, además de ligamentos. El sistema nervioso periférico (SNP) está formado por nervios espinales y craneales que transmiten las señales eléctricas, denominadas potenciales de acción, desde o hacia el SNC. Estos nervios son haces de axones del SNP. Los axones que transmiten los potenciales de acción hacia el SNC se denominan aferentes, y los que transmiten las señales desde el SNC se denominan eferentes (14).

Las células que conforman al SNC y se encargan de su mantenimiento abarcan neurogliales y la neurona.

- **Neurona:** Unidad celular funcional del SNC, se encarga de la recepción y transmisión de impulsos nerviosos; la estructura de la neurona abarca: axón, cuerpo celular o soma, dendritas y terminación sináptica (Figura 2) (15). Dependiendo la función que desempeñen se dividen en sensoriales y motoras (NMS), son las encargadas de la ejecución de los movimientos voluntarios y se dividen en dos grupos según su localización (16).
 - 1) Superiores: El soma de estas neuronas se encuentra en la corteza o tallo cerebral y sus axones forman a los tractos descendentes, cuyas terminaciones interactúan directa o indirectamente (a través de interneuronas) con las NMS espinales. Estos tractos descendentes conforman al sistema piramidal (tracto corticoespinal) y extrapiramidal (17).
 - 2) Inferiores: Estas neuronas de naturaleza glutamatérgica se localizan en el asta ventral de la ME y sus axones se proyectan hasta inervar directamente al músculo esquelético (16).

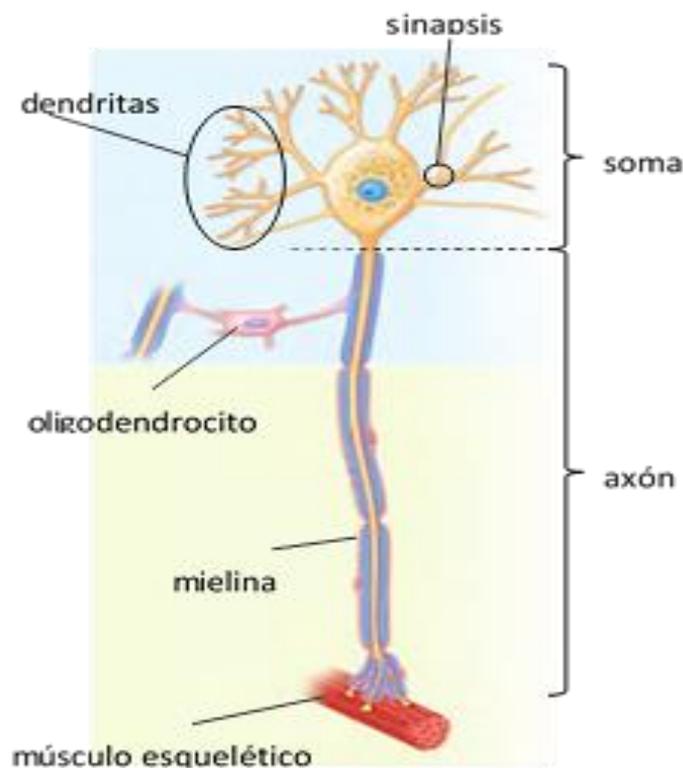


Figura 2. Morfología de motoneurona, el soma, las dendritas y axón proximal forman parte del SNC y en el SNP forma parte de los nervios periféricos. Las vainas de mielina son producidas por los oligodendrocitos en el SNC y por las células de Schwann en el SNP, Modificado de Ross y Pawlina, 2018 (16).

El otro tipo celular del sistema nervioso son las células gliales, que tienen un papel importante en la producción de las vainas mielínicas de los axones y en la modulación del crecimiento de neuronas en formación o dañadas, en la amortiguación de las concentraciones de potasio y neurotransmisores, en la formación de contactos entre las neuronas (sinapsis), y también participan en determinadas respuestas inmunitarias del sistema nervioso. Estas células no producen potenciales de acción, aunque cada vez parece más evidente que pueden detectar indirectamente la actividad eléctrica de las neuronas y utilizar esta información para modular la eficacia de la comunicación neuronal. Sin embargo, no todas las acciones de las células de la glía son beneficiosas para el sistema nervioso, puesto que a ellas se atribuyen ciertas respuestas neuroinflamatorias características de algunas enfermedades neurodegenerativas y la aparición de algunos trastornos de dolor crónico (14).

Existen cuatro tipos de neuroglia central:

◆ **Astroцитos:** morfológicamente heterogéneos que proveen soporte metabólico y físico para las neuronas. Se han identificado dos tipos:

1. **Protoplásmicos:** Son prevalentes en la llamada materia gris, dichos astroцитos tienen numerosas prolongaciones citoplasmáticas.
2. **Fibrosos:** Son comunes en la materia blanca. Estos astroцитos tienen menos prolongaciones que los protoplásmicos y son relativamente rectos

En ambos casos, contienen racimos prominentes de filamentos intermedios compuestos de GFAP, los cuales son numerosos en los astroцитos fibrosos. Así mismo se ha descrito que ayudan al mantenimiento de las uniones estrechas de los capilares que forman BH-E en su segmento medular, así como la confinación de neurotransmisores a terminaciones sinápticas y la remoción del exceso de estos por pinocitosis. En situaciones que el SNC considere patológicas adquieren un fenotipo que les da la capacidad de eliminar sustancias dañinas y encapsularlas a través de sus prolongaciones; sin embargo, se ha demostrado que provoca la formación de tejido de cicatrización que interfiere con la restauración de este, conocido como CG (18).

La formación de CG en respuesta a las lesiones del SNC, podría dificultar la neurorregeneración. Además, los astroцитos facilitan el reclutamiento de células inmunes en el SNC al liberar citocinas quimio atrayentes y activar las células T, lo que representa importantes moduladores inmunitarios en el SNC (19).

Publicaciones recientes describen la polarización de astroцитos reactivos en función de su perfil de expresión génica en fenotipos benéficos y perjudiciales. Los astroцитos activados por estímulos inflamatorios exhibieron un patrón de expresión génica que indica propiedades neurotóxicas (astroцитos A1), mientras que la isquemia induce astroцитos con funciones neuroprotectoras (astroцитos A2) (19).

◆ **Oligodendrocitos:** Células pequeñas que son activas en la formación y mantenimiento de mielina en el SNC, usualmente se encuentran alineados en filas entre los axones. Cada oligodendrocito forma un segmento internodal de mielina, este múltiple proceso ocurre cuando un solo oligodendrocito puede mielinizar uno o varios axones cercanos al mismo; cada proceso del

oligodendrocito se enrolla alrededor del axón, hasta que la vaina de mielina se encuentra completamente formada (18).

- ◆ **Microglía:** Definida propiamente como macrófagos residentes del SNC. Normalmente forman el 5% de las células gliales en el SNC, pueden proliferar y volverse fagocíticamente activas posteriores a una lesión o infección. Son originadas a partir de células progenitoras granulocíticas/monocíticas, las células precursoras de la microglía entran al SNC a partir del sistema vascular (18).
- ◆ **Ependimocitos:** Células que delimitan los ventrículos del cerebro y el canal central de la ME por donde circula el líquido cefalorraquídeo. Junto con los ventrículos del cerebro, esta red ependimaria es modificada constantemente para producir el fluido cerebroespinal para el transporte y secreción de materiales derivados de vesículas capilares adyacentes. Las células ependimarias modificadas y capilares asociados son llamados plexos coroideos (16).

2.1.1 Encéfalo

El encéfalo está constituido por el cerebro, tronco encefálico y cerebelo. El tronco encefálico se subdivide, de rostral a caudal, en diencefalo (tálamo e hipotálamo), cerebro medio, protuberancia y bulbo raquídeo (o medula oblongada) (Figura 3) (20).

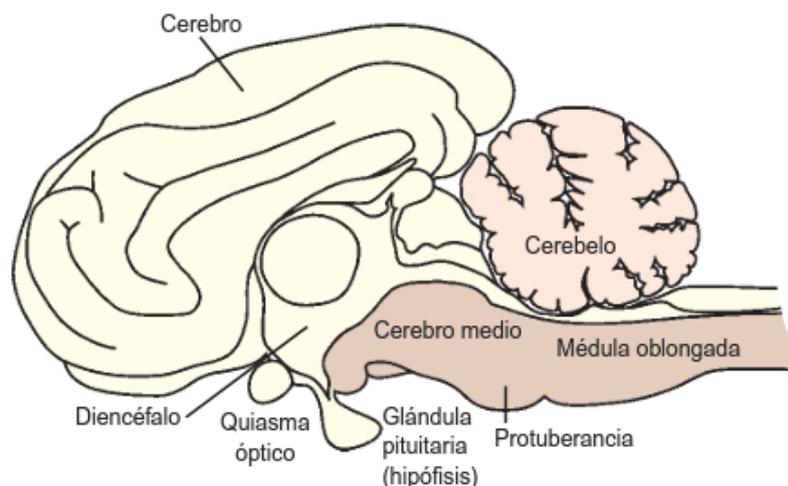


Figura 3. Anatomía regional del encéfalo; Tomada de Nelson R, 2013 (20).

El bulbo raquídeo se localiza rostralmente a la ME y se parece mucho a ella (figura 4.), también recibe información de los receptores sensitivos externos e internos del organismo y envía órdenes motoras a los músculos esqueléticos y lisos a través de los nervios craneales. En la cabeza y en la región del cuello se localizan grandes poblaciones de estos receptores y músculos. Los cuerpos celulares de las neuronas del bulbo que reciben entradas sensitivas de los nervios craneales o envían respuestas motoras se agrupan en agregados denominados núcleos nerviosos craneales sensitivos y motores, respectivamente. Los núcleos nerviosos craneales del bulbo raquídeo desempeñan un papel fundamental para las funciones vitales de los sistemas respiratorio y cardiovascular y para distintos aspectos relacionados con la alimentación (p. ej., gusto, movimiento de la lengua, deglución, digestión) y la vocalización (14).

La protuberancia se localiza rostralmente al bulbo raquídeo y contiene los cuerpos celulares de un gran número de neuronas en una cadena de dos neuronas que transmite información desde la corteza cerebral hasta el cerebelo (14).

El cerebelo no es una parte del tronco del encéfalo, pero suele describirse junto con la protuberancia porque tienen un origen embrionario similar. El cerebelo es importante para el movimiento coordinado, preciso y fino, y para el aprendizaje motor. Los núcleos nerviosos craneales de la protuberancia desempeñan funciones importantes recibiendo la información sensitiva sobre el tacto facial y realizando el control motor de la masticación (14).

El mesencéfalo, o cerebro medio, discurre rostralmente a la protuberancia y contiene los colículos superiores e inferiores, que son importantes para el procesamiento y la transmisión de la información visual y auditiva que se integra en otros niveles del cerebro. El mesencéfalo también contiene núcleos de los nervios craneales que controlan directamente los movimientos oculares y que provocan la constricción de las pupilas. Algunas regiones del cerebro medio coordinan especialmente los movimientos reflejos de los ojos. Cada región del tronco del encéfalo contiene fascículos axonales que conducen los potenciales de acción hacia o desde el prosencéfalo, así como fascículos que conducen los potenciales de acción hacia y desde la ME. Todas las regiones del tronco del encéfalo contienen una parte de la formación reticular, un complejo en forma de red constituido por un complejo en forma de red integrado

por numerosas agrupaciones de cuerpos celulares (núcleos) y por proyecciones axonales escasamente organizadas, que se localiza cerca de la línea media y que desempeña importantes funciones para la regulación de la consciencia y el despertar, la percepción del dolor y los reflejos espinales, así como para el movimiento (14).

En el diencefalo se encuentran el tálamo y el hipotálamo (Figura 4), que son estructuras grandes formadas por varios subnúcleos. El tálamo es una estación repetidora y un modulador de la información que llega a la corteza cerebral procedente de los sistemas sensitivos y de otras regiones del cerebro. El hipotálamo regula el sistema nervioso autónomo, controla la secreción hormonal de la hipófisis y desempeña una función principal para los aspectos fisiológicos y conductuales de la homeostasis (p. ej., mantenimiento de la temperatura, presión arterial y la alimentación)(14).

El telencefalo que normalmente se conoce como hemisferios cerebrales, está formado por la corteza cerebral y un pequeño número de estructuras subcorticales destacadas, como los ganglios basales y el hipocampo. La corteza cerebral interviene en las formas más complejas de la integración y percepción sensoriales consciente. También formula y ejecuta secuencias del movimiento voluntario. Los ganglios basales son una colección de núcleos que modulan las funciones motoras de la corteza cerebral, y el hipocampo desempeña una función importante para la memoria y el aprendizaje espacial (14).

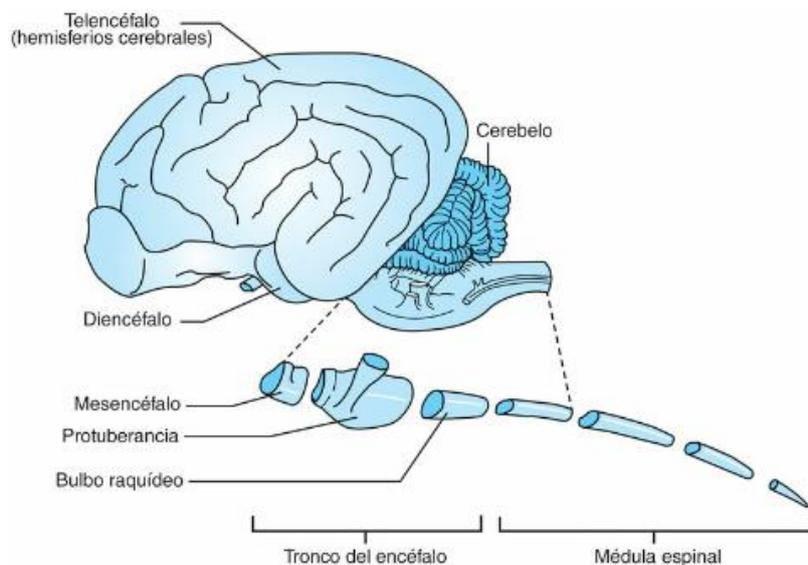


Figura 4. Organización longitudinal del SNC. El SNC puede dividirse en seis regiones principales: la médula espinal, el bulbo raquídeo, la protuberancia, el mesencéfalo, el diencéfalo y el telencéfalo (hemisferios cerebrales) Tomado de Klein B, 2020 (14).

2.1.2 Médula Espinal

La ME forma parte del SNC y comienza en el orificio occipital del cráneo, continúa en el bulbo raquídeo del encéfalo y termina en la región sacra (18). La ME es la región más caudal del SNC. Los axones de las raíces dorsales sensitivas conducen los potenciales de acción generados por la estimulación de los receptores sensoriales de la piel, músculos, tendones, articulaciones y los órganos viscerales a la ME (Figura 5). La ME contiene los cuerpos celulares y las dendritas de las neuronas motoras cuyos axones salen a través de las raíces ventrales para llegar al músculo esquelético o alcanzar el músculo liso (Figura 5). También se encuentran en ella los fascículos axonales que transportan la información sensitiva al cerebro y las órdenes motoras desde el cerebro hasta las neuronas motoras; de manera aislada puede controlar los reflejos simples, como los reflejos de estiramiento muscular y la retirada de las extremidades cuando actúa un estímulo doloroso (20).

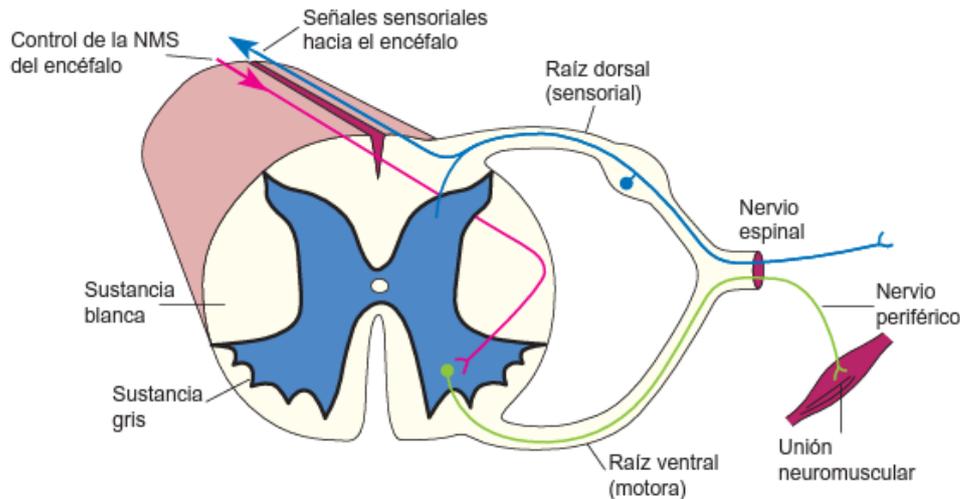


Figura 5. Conformación anatómo fisiológica de la médula espinal, ilustración de impulsos nerviosos y señales sensitivas; Tomada de Nelson R, 2013 (20).

La ME está compuesta por un cuerpo central en forma de mariposa de sustancia gris, rodeado de sustancia blanca. La sustancia gris de la ME contiene los cuerpos celulares de las interneuronas y de las neuronas motoras inferiores (NMI). La sustancia blanca está compuesta por fibras nerviosas organizadas en columnas de tractos ascendentes y descendentes. Estos largos tractos transmiten la información sensorial ascendente (propiocepción, tacto, temperatura, presión y dolor) y señales motoras descendentes entre los centros superiores del cerebro y las neuronas de la ME.

La ME puede dividirse funcionalmente en segmentos a partir de los cuales se originan un par de nervios espinales (izquierdo y derecho), que, a su vez, presentan una raíz o ganglio dorsal (sensitiva) y una ventral (motora) (Figura 6). Los cuerpos celulares de las NMI que inervan el miembro torácico se encuentran en la parte ventral de la sustancia gris de una porción engrosada de la ME, que se denomina intumescencia cervical (segmentos C6-T2), mientras que las NMI que inervan a las extremidades posteriores se originan en la llamada intumescencia lumbar (segmentos L4-S3) (20).

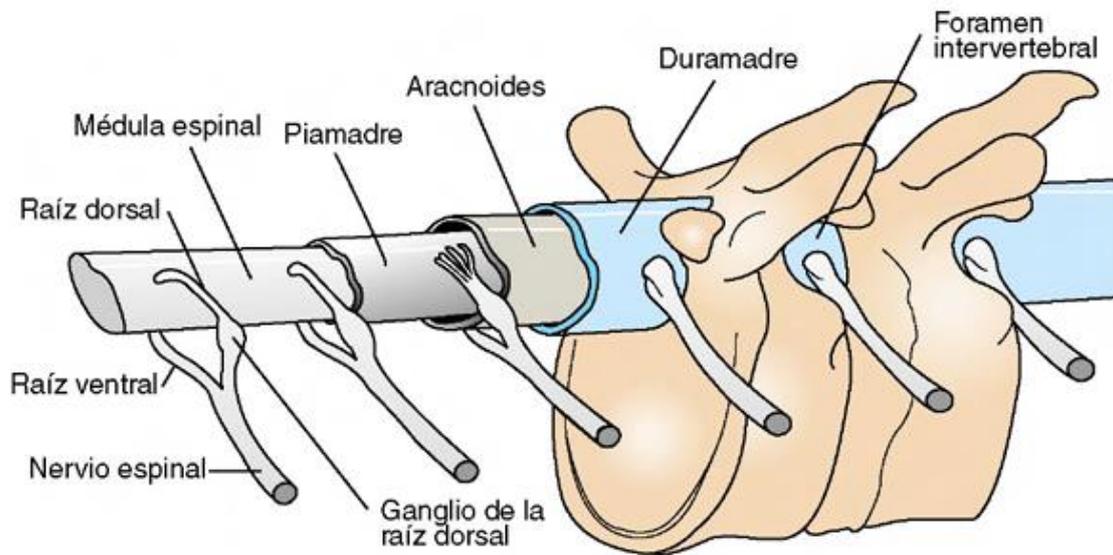


Figura 6. Conformación de la médula espinal. La ME y las tres membranas meníngeas en el interior del canal vertebral. Los potenciales de acción generados sobre los aferentes sensoriales penetran en la ME por medio de los axones de las raíces dorsales. Los generados en eferentes motoras salen de la ME por los axones de las raíces ventrales; Tomada de Klein B., 2020 (14).

Esto permite que se localice el punto de las lesiones de la ME en una de las cuatro regiones anatómicas funcionales: segmentos espinales C1-C5, C6-T2, T3-L3 o L4-S3 (Figura 7). Debido a que los tractos nerviosos ascendentes y descendientes de las extremidades posteriores se encuentran periféricamente en la médula, es frecuente que perros y gatos con lesiones compresivas de la médula cervical (C1-C5) presenten déficits de NMS más pronunciados en las extremidades posteriores que en las anteriores. Además, las lesiones que afectan únicamente al centro medular (síndrome medular central) en las regiones cervical craneal (C1-C5) o cervical caudal (C6-T2) suelen producir deficiencias profundas de NMS (C1-C5) o de NMI (C6-T2) en las extremidades anteriores, con déficits mínimos de NMS en las extremidades posteriores (20).

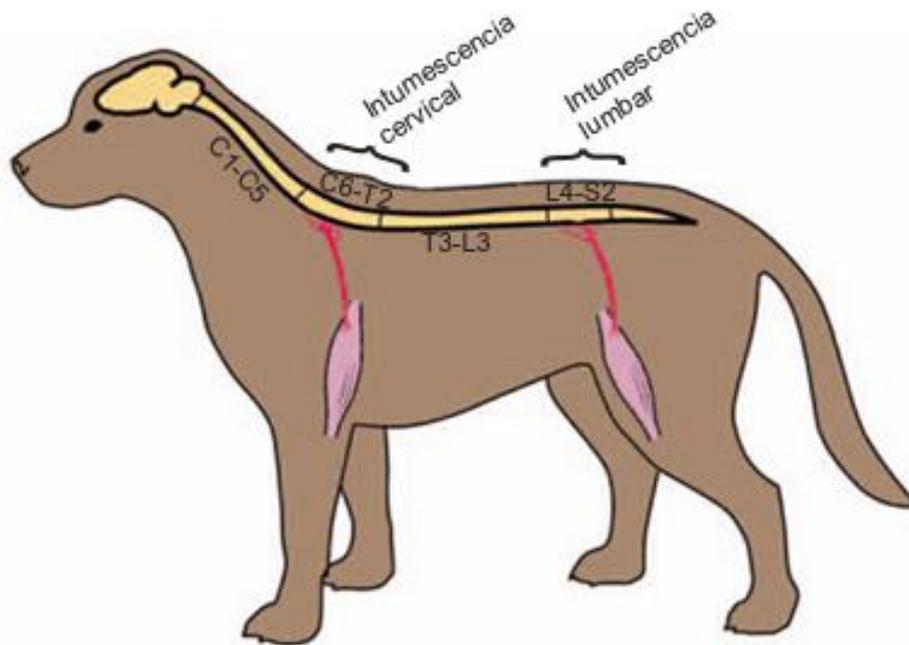


Figura 7. Segmentos de la ME en las intumescencias cervical (C6-T2) y lumbar (L4-S2 dan lugar a los nervios periféricos importantes de las extremidades; Tomada de Nelson R, 2013 (20).

2.2 Lesión de médula espinal en medicina veterinaria

Las LME agudas son un problema en medicina y veterinaria que pueden conducir a déficits neurológicos graves y permanentes que afectan la motricidad, sensibilidad sensorial, y función autonómica. Las causas más comunes de LME aguda en perros son hernias agudas de disco intervertebral, FCE y trauma. En el caso de los felinos padecen enfermedades similares, pero a diferentes frecuencias, siendo el trauma más común que las hernias de disco intervertebral y los eventos tromboembólicos suelen ser más comunes que la FCE (1). En muchos casos las LME pueden provocar daños completos o incompletos y comprometer las funciones principales de la ME. A diferencia de lo que ocurre en medicina humana, donde a menudo se toman medidas heroicas para controlar las LME, un gran porcentaje de los animales heridos son sacrificados, ya que las opciones médicas y quirúrgicas que están disponibles actualmente para tratar la LME son muy costosas y a menudo culminan en un mal resultado (21).

Se desconoce la incidencia exacta de LME traumática en perros y gatos. Sin embargo, se ha estimado que hasta el 2% de todos los casos ingresados en un hospital veterinario están afectados por LME resultante de la enfermedad del disco intervertebral. Para los perros sin padecimientos relacionados con disco intervertebral, el 60% de las LME se

deben a accidentes automovilísticos. Se estima que, en perros involucrados en accidentes automovilísticos, el 5% de los animales tendrán LME. Otras causas importantes de LME en perros son la isquemia resultante de la FCE y la espondilo mielopatía cervical (22).

En un estudio retrospectivo de gatos con enfermedad de la médula espinal, el 7% tenía LME por lesión de la columna vertebral, 4% de enfermedad del disco intervertebral, 2% de una lesión penetrante, el 7% tenía LME resultante de isquemia o infarto, y el resto no fue definido (22).

Es necesario comprender la fisiopatología de la lesión aguda de la ME para decidir las opciones terapéuticas que están actualmente en uso y aquellas que están siendo investigadas (21).

2.2.1 Signos clínicos asociados a lesión de médula espinal

La lesión física de la médula espinal da como resultado la interrupción mecánica y la degeneración de los axones ascendentes y descendentes. En consecuencia, las conexiones entre las neuronas y sus objetivos dentro del SNC se interrumpen y se producen diversas anomalías neurológicas, como lo son paresia y parálisis, los signos clínicos asociados con traumatismos de la columna vertebral son agudos, y generalmente de carácter no progresivo, los animales suelen presentar dolor (20,22).

Los componentes de la NMS incluyen los cuerpos de las células nerviosas en la corteza cerebral, los núcleos basales y el tronco del encéfalo, junto con los tractos motores del tronco del encéfalo y de la sustancia blanca de la ME, los cuales transmiten información desde los centros superiores del cerebro a la NMI. Estas vías cruzan la línea media en la parte rostral del tronco del encéfalo, por lo que las lesiones en el cerebro anterior dan lugar a deficiencias en las extremidades contralaterales a ausencia de la sensación de dolor profundo (20)

Los signos clínicos van a depender de la localización y gravedad de la lesión, y con frecuencia incluyen dolor local o generalizado, paresia, parálisis y, en ocasiones, incapacidad para orinar. Las lesiones de la médula espinal entre T3 y L3 causan paresia de NMS y ataxia de las extremidades posteriores, sin que se afecten las extremidades anteriores. La exploración de las extremidades posteriores revela una marcha

incoordinada de mayor amplitud, pérdida de la propiocepción consciente, retraso de las reacciones posturales, aumento del tono muscular extensor y reflejos normales o aumentados. A medida que empeoran las lesiones compresivas de la médula espinal en estos segmentos, se puede prever el agravamiento de los déficits neurológicos. En el caso de lesiones focales graves en esta región, puede producirse la pérdida del reflejo cutáneo del tronco caudal a la localización de la lesión (20).

Por lo general, los signos neurológicos que se observan en perros y gatos con enfermedad discal son bilaterales y simétricos. Los animales afectados suelen mostrar dolor a la palpación del raquis, justo encima del disco afectado, debido a la irritación de las meninges y raíces nerviosas en esa localización (20).

Después de una LME, varios factores endógenos deben contribuir a esta capacidad de re-expresión de la locomoción, por lo cual es importante conocer los mecanismos de lesión así como, los cambios en los circuitos espinales y los neurotransmisores involucrados (23).

2.3 Mecanismos de lesión de médula espinal

Los mecanismos de LME se dividen en mecanismo de lesión primaria y secundaria descritos a continuación.

2.3.1 Mecanismos de lesión medular primaria

La ME se puede contusionar o seccionar (24). El mecanismo más común es el tipo compresivo-contusivo, en el cual, el desplazamiento de los elementos de la columna vertebral, fragmentos óseos, discos y ligamentos, actúan mecánicamente sobre el cordón medular generando lesiones que frecuentemente se sostienen a través del tiempo. Otros mecanismos descritos son: cizallamiento, laceración, estiramiento agudo y aceleración-desaceleración súbita. Estos mecanismos físicos en ocasiones producen un corte transversal completo de la médula con pérdida de la continuidad anatómica del cordón espinal (3). El resultado es la disrupción física de las estructuras vasculares que causan hemorragias y como consecuencia isquemia, daño neural y glial generalizado (1).

2.3.2 Mecanismos de la lesión medular secundaria

La lesión secundaria es de suma importancia y es responsable de la expansión de la lesión primaria. El término se sigue utilizando en este campo y se refiere a una serie de fenómenos celulares, moleculares y bioquímicos que siguen autodestruyendo el tejido de la médula espinal e impiden la recuperación neurológica tras la lesión medular (25).

La lesión secundaria resulta de alteraciones en las concentraciones iónicas locales; pérdida de la regulación de la presión sanguínea local y sistémica (según el nivel de la lesión), reducción del flujo sanguíneo de la ME, ruptura de la BH-E, producción de RL, desequilibrio de metaloproteinasas activadas y liberación de neurotransmisores citotóxicos (Figura 8) (22).

Los mecanismos implicados en la lesión secundaria incluyen procesos bioquímicos degenerativos que exacerbaban el daño, como la pérdida de la integridad de la barrera Hemato-Medular (BH-M), isquemia / reperfusión, hipoxia, pérdida de homeostasis iónica, sobrecarga de calcio (Ca^{2+}), excitotoxicidad glutamatérgica, invasión de células inmunes, inflamación, liberación de citocinas, producción de RL, lipoperoxidación (LP) y producción excesiva de óxido nítrico (ON). También se ha demostrado que estos mecanismos están relacionados de una manera que se agrava cuando aumentan los niveles de estrés oxidativo, LP y que atenúa sus efectos cuando el tratamiento antioxidante se administra inmediatamente después de la LME (3).

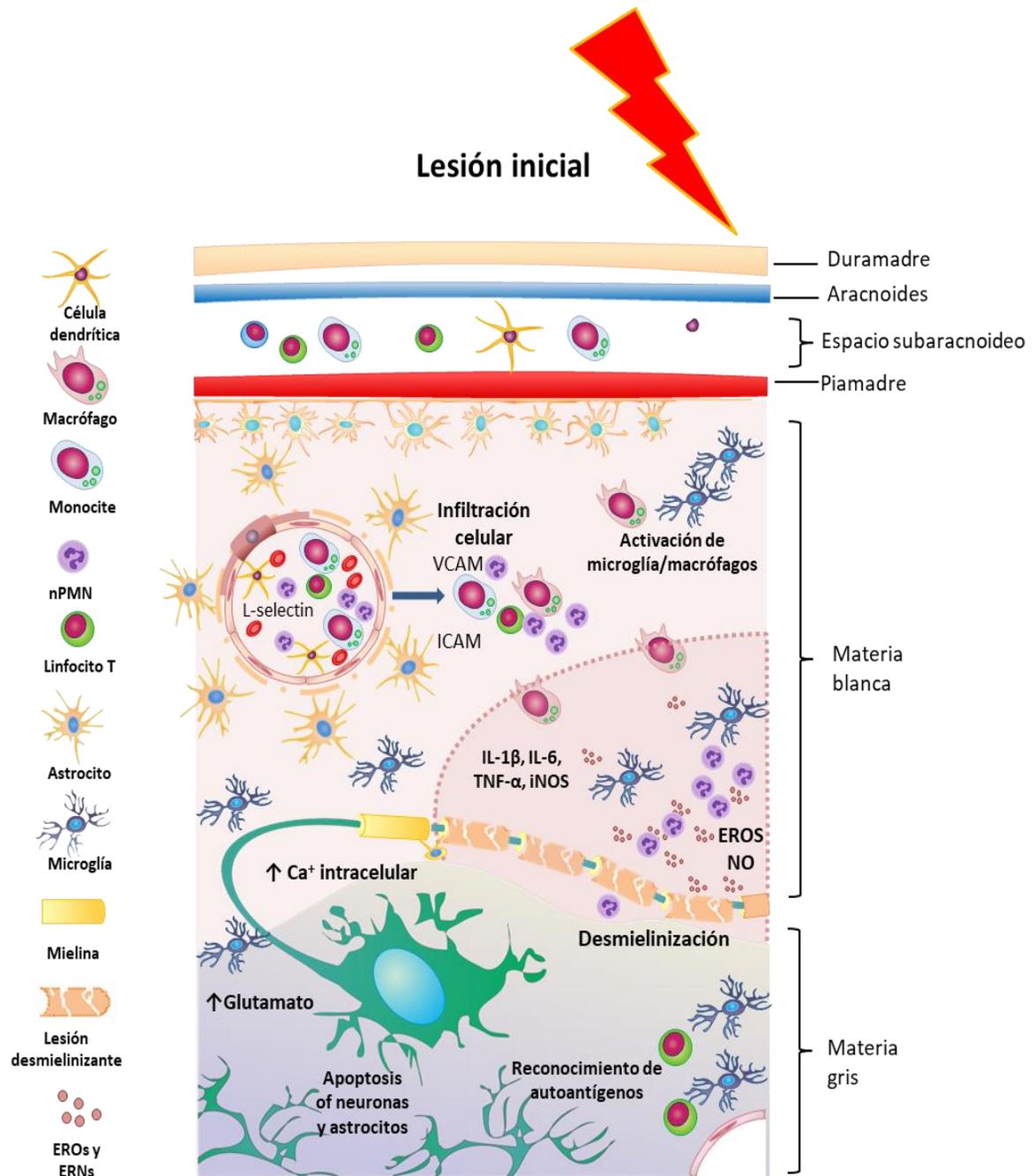


Figura 8. Mecanismos de lesión secundaria. Se ejemplifican algunos de los mecanismos más importantes para la fase aguda de la lesión secundaria, incluyendo excitotoxicidad por glutamato, alteración de balance iónico con aumento de Ca²⁺ intracelular, liberación de citocinas proinflamatorias, infiltración celular y producción de Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que causan el estrés oxidativo y lipoperoxidación. Tomado de Vilchis J, 2019 (26).

Los mecanismos se han subdividido en varias fases, de acuerdo con la cascada de eventos que se desencadenan en cada una de ellas:

a) Fase Inmediata (0 - 2 hrs.)

Se inicia en el momento del trauma. El primer cambio detectable es la inflamación generalizada del cordón espinal frecuentemente acompañada de hemorragia de la sustancia gris central en cuyas células se presenta necrosis debida a la disrupción mecánica de los vasos y/o a la isquemia resultante de esta disrupción. La disrupción microvascular induce hemorragia en la sustancia blanca circundante que puede empeorar el compromiso local y extenderlo a segmentos adyacentes proximal y distalmente (3).

b) Fase Aguda (2 - 48 hrs.)

Es el periodo en el que la lesión secundaria se vuelve dominante. Se considera que durante esta fase existen diversas alteraciones que forman una cascada de lesión medular secundaria entre las cuales se observa.

- Alteración de la regulación iónica y excito-toxicidad

La pérdida de la homeostasis iónica es una característica fundamental de la muerte celular por apoptosis y necrosis; específicamente la alteración de la concentración que inicia una serie de procesos nocivos como la activación de calpaínas, disfunción mitocondrial y producción de RL. La excitotoxicidad es el resultado de la activación excesiva de los receptores de glutamato porque su concentración se eleva súbitamente al liberarse en la lisis celular. Esto genera una falla del mecanismo de transporte intra y extracelular dependiente de energía, lo que perpetúa la alteración en la concentración iónica tisular (3).

- Mecanismo del estrés oxidativo y generación de radicales libres

Altas concentraciones de RL activan la peroxidación de ácidos grasos lo que produce lesión de las membranas celulares que implica muerte celular asociada a disfunción de los organelos y contribuye a la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} (3).

- Permeabilidad de la Barrera Hemato-Medular

La BH-M es un filtro altamente selectivo que limita el transporte de compuestos desde y hacia el parénquima del SNC. Después de la LME se produce un marcado incremento en la permeabilidad de la BH-M debido al efecto endotelial del incremento local de mediadores inflamatorios (3).

- Mediadores inflamatorios y respuesta inmune celular

El proceso inflamatorio que sobreviene a la LME es altamente complejo y compromete numerosas poblaciones celulares que incluyen astrocitos, microglía, linfocitos T, neutrófilos y monocitos. De manera adicional, una multitud de mediadores intracelulares, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferones e interleucinas (IL), también juegan un papel importante (3).

La infiltración celular proviene de nichos adyacentes y circulación periférica a través de capilares sanguíneos de parénquima y meninges. Además, se sabe que, durante la inflamación, las células dendríticas y partículas solubles drenan a través de vasos linfáticos presentes en meninges (27).

El reclutamiento de células inmunes en la ME sucede de manera secuencial, y se sincroniza por la expresión de diversas moléculas de adhesión endotelial como ICAM-1 y P-selectina, quimiocinas y citocinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , que incrementan su expresión dentro de las primeras 24 hrs. post lesión, con un segundo pico de TNF- α a los 7 días comprometiendo la permeabilidad de la BH-M. Inicialmente se da el arribo de neutrófilos, con un máximo a las 24 hrs. post lesión, y cumplen funciones de fagocitosis junto con liberación de proteasas, elastasa, mieloperoxidasa, metaloproteinasas y ROS. Posteriormente se presenta el máximo arribo de monocitos/macrófagos circulantes, a los 7 días post lesión, con mayor capacidad fagocítica y síntesis de citocinas pro-innflamatorias como TNF- α , IL-1 β y ON que a su vez activan la óxido nítrico sintasa inducible [iNOS por sus siglas en inglés (inducible nitric oxide synthase)], prostaglandinas y leucotrienos. Finalmente, los linfocitos, que infiltran en menor proporción con picos en la fase aguda entre 7-14 días, cumplen diversas funciones además de secretar citocinas en el sitio de lesión (Figura 9) (26).

Macrófagos y microglía se polarizan por señales en el microambiente hacia dos perfiles de activación: el perfil clásico M1 proinflamatorio (con marcadores como CD11b, iNOS) y el perfil alternativo M2 antiinflamatorio (con marcadores como Arginasa-1, CD206, CD163) que mantiene la homeostasis en la ME. IFN- γ , la activación de TLR-4 y otras citocinas producidas por linfocitos Th1, de respuestas contra patógenos intracelulares, inducen la polarización de macrófagos y microglía al perfil M1 para producir citocinas proinflamatorias (iNOS, IFN- γ , TNF- α , CCL5, IL-23, IL-12, IL-6 e IL-1 β), mientras este perfil se inhibe por citocinas Th2 (IL-13 e IL-4) induce la polarización hacia el perfil M2 productoras de citocinas antiinflamatorias (IL-10, TGF- β y IL-4). Ambas respuestas M1 y M2 se dan de manera coordinada en la fase aguda de la LME, con variación en su intensidad según la severidad del daño y edad del individuo, iniciando por una prevalencia de perfil proinflamatorio M1 y una etapa posterior regenerativa antiinflamatoria M2 (27).

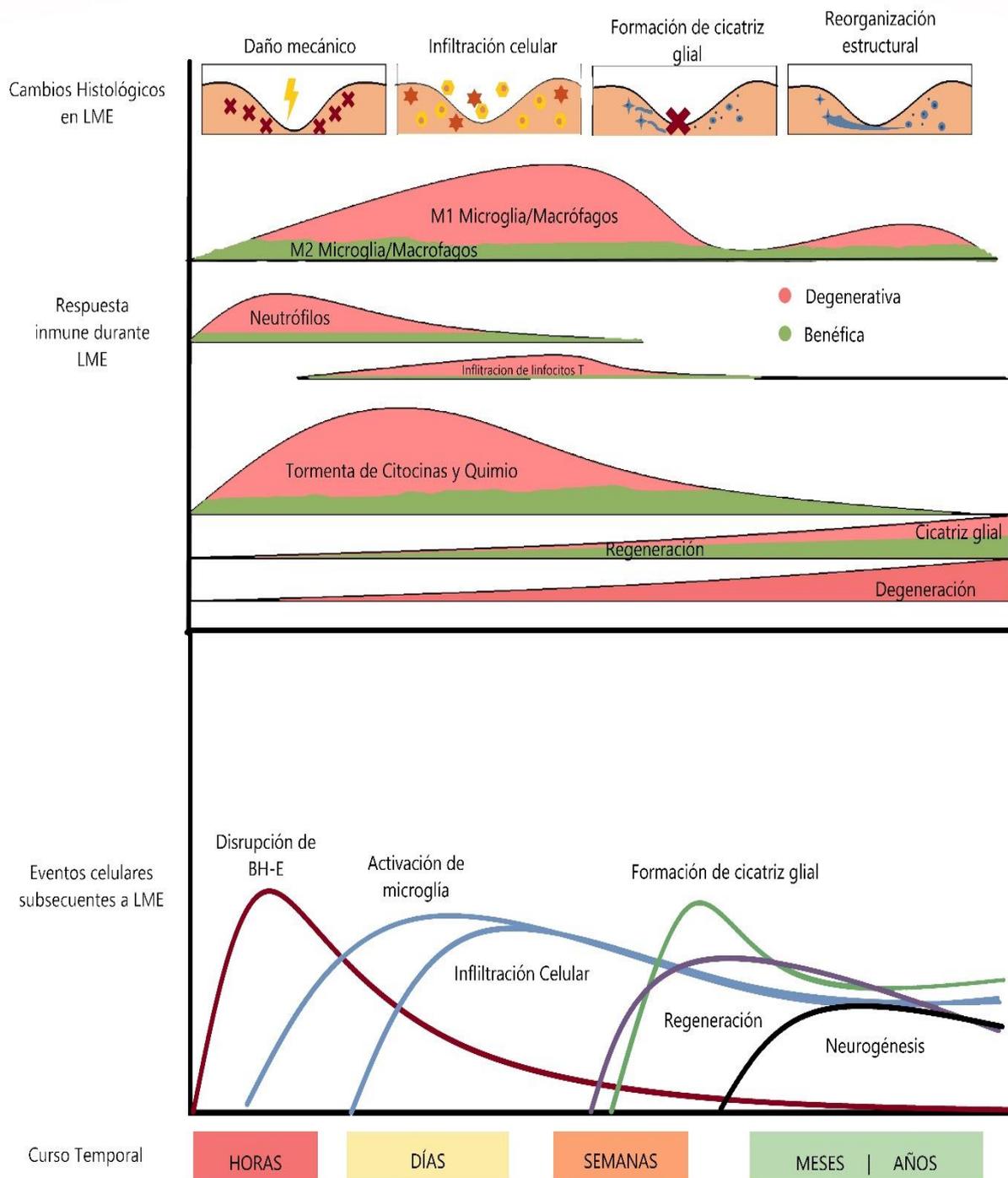


Figura 9. Curso temporal de la LME y respuesta inmune innata y adaptativa. Dentro de las primeras horas se compromete a integridad de la BH-M, lo que conduce a la infiltración celular. También se da una activación temprana de la microglía por el microambiente de citocinas, lo que lleva al desarrollo de respuesta inflamatoria, predominando el perfil proinflamatorio M1. En una etapa más tardía, se presenta la formación de una CG y una respuesta inmune adaptativa. Adaptado de Vilchis, 2019 (27).

La participación celular en la remodelación del tejido, así como en la formación de CG posterior a la LME se divide en fases según su tiempo de presentación y activación cronológica, como se muestra a continuación.

1. Fase Subaguda (2 días a 2 semanas)

En este periodo la respuesta fagocitaria es máxima buscando la remoción del tejido dañado del área de lesión y promoción del crecimiento axonal. También inicia una respuesta astrocitaria tardía en la cual, existe una hipertrofia e hiperplasia de la población de astrocitos localizados en la periferia de la lesión, formando un entrelazado proteico que va a configurar la CG. Esta cicatriz representa una barrera tanto física como química para la regeneración axonal. Sin embargo, la reacción astrocitaria tardía promueve también el restablecimiento de la homeostasis iónica y la reparación de la BH-M (3).

2. Fase Intermedia (2 semanas a 6 meses)

Se caracteriza por la continua maduración de la CG y el crecimiento axonal regenerativo, aunque estos intentos en lesiones severas son insuficientes para conseguir una recuperación funcional significativa (3).

c) Fase Crónica (6 meses en adelante)

En esta se lleva a cabo la maduración y estabilización de la lesión. Continúa la formación de la CG y se instaura la degeneración Walleriana de los axones severamente lesionados (proceso que puede tardar años o no llegar a ocurrir). Se considera que, a los 2 años de la LME, la lesión está completamente madura (3).

Dentro de las respuestas celulares, es importante resaltar el papel que las citocinas ejercen sobre estas. La similitud en la producción de citocinas por parte de los astrocitos activados y la microglía/macrófagos activados, dificulta definir de manera precisa el impacto de cada estirpe celular sobre los mecanismos de lesión secundaria de la LTME que afectan la supervivencia neuronal y reparación. Entre las citocinas más importantes involucradas en los procesos inflamatorios se encuentran la IL-1 β , TNF- α , la familia de IL-6 e IL-10 (Figura 10), se ha demostrado *in vitro* que la presencia de esta última

citocina potencia con IL-4 la polarización a M2, mientras que la presencia junto con TNF- α favorecerá M1 (27).

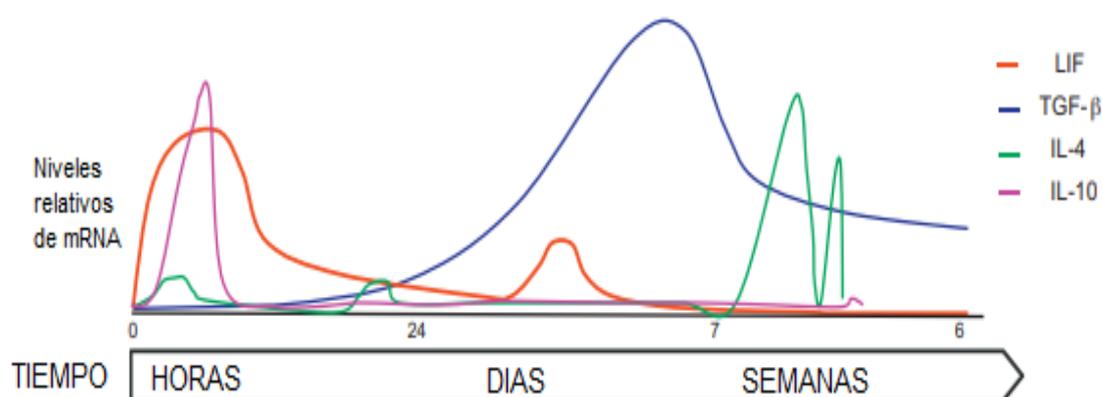


Figura 10. Expresión de niveles de mRNA de algunas de las citocinas implicadas en la resolución de la LME. Adaptado de Vidal P, 2013 (28).

2.4 Mecanismos de estrés oxidativo y liberación de radicales libres post trauma raquimedular

El estrés oxidativo podría definirse como una alteración del equilibrio pro-antioxidante, por la presencia de niveles elevados de ROS y RNS que superan los mecanismos de defensa antioxidantes endógenos y se asocian con daño a una amplia gama de compuestos celulares, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, que contribuye a la fisiopatología de la LME (26).

La producción de radicales a partir de la LP de la membrana celular en las lesiones del SNC provoca deterioro enzimático dependiente de fosfolípidos, alteraciones en los gradientes iónicos e incluso lisis de las membranas. Además, juegan un papel importante en la hipoperfusión post-traumática que presenta una reducción del flujo sanguíneo de la ME conduciendo la aparición de edema y respuesta inflamatoria (2).

Los ROS incluyen: radicales (moléculas inestables con un solo electrón desapareado), como superóxido (O_2^{\cdot}), radicales hidroxilos (HO^{\cdot}) y peroxilo (ROO^{\cdot}) y no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (26).

Entre estas ROS es importante conocer las principales características que definen el nivel de daño celular posterior al trauma en SNC.

2.4.1 Principales especies reactivas de Oxígeno

Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Es el radical más abundante y común a nivel celular. Se forma principalmente en la cadena de transporte de electrones y fagocitosis, para ser usado en la actividad bactericida (29).

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). No es un radical libre, pero es una forma reactiva de gran importancia, ya que posee la capacidad de generar el radical hidroxilo cuando se encuentra en presencia de metales como el hierro. Esta ROS, es formada principalmente en la matriz mitocondrial, al realizar la reducción parcial de oxígeno o dismutación del radical superóxido por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Aunque también se genera en otros organelos celulares como el retículo endoplásmico, peroxisomas y citosol (26).

Radical Hidroxilo (OH^{\cdot}). Posee una alta reactividad, esto es inversamente proporcional a su vida media, lo que indica que tiene una vida media bastante corta, debido a que reacciona de manera rápida e inespecífica con los blancos celulares más cercanos (DNA, proteínas, lípidos y carbohidratos). Tiene una capacidad superior a las demás ROS de causar daño a nivel celular, debido a que las células no cuentan con un sistema enzimático antioxidante contra este radical (29).

Singulete de Oxígeno (1O_2). La especie reactiva singulete de oxígeno es producida en diferentes procesos, como; la fagocitosis, inducción luminosa, reacciones catalizadas por peroxidasas, entre otras. Es capaz de modificar diferentes biomoléculas como el DNA y causar daños en las proteínas a través de la oxidación de ciertos grupos esenciales de aminoácidos (aa) entre los cuales se encuentran; triptófano (Trp), metionina (Met), histidina (His) y cisteína (Cys). De igual forma, inicia la LP generando radicales como el alcoxilo (RO^{\cdot}) y peroxilo (ROO^{\cdot}). Posee una vida media corta de aproximadamente 0.5 microsegundos. Se caracteriza por que en su estado molecular no tiene restricción en la transferencia de electrones, por tal motivo es altamente reactivo (29).

En los primeros minutos y horas posteriores a la lesión, diferentes fuentes de $O_2^{\cdot-}$, cascada de ácido araquidónico, fuga mitocondrial y sistemas enzimáticos (nicotina-amida-adenina dinucleótido fosfatooxidasa (NADPH), mieloperoxidasas, ciclooxigenasa (COX) y xantina oxidasa, presentes en la microglía activada y en células infiltrantes (macrófagos y neutrófilos), actúan aportando $O_2^{\cdot-}$ derivado de la reducción de moléculas de oxígeno con un solo electrón (e^-) durante el estrés oxidativo, aunque el $O_2^{\cdot-}$ en sí mismo es reactivo, su reactividad oxidativa directa hacia sustratos biológicos en ambientes acuosos es relativamente débil, pero se distingue como un agente oxidante y nucleófilo activo que puede reaccionar con donantes de hidrógeno (p. Ej., Ascorbato y tocoferol), (Tabla 1) mediante la canalización en la cual se ve involucrada la SOD se produce moléculas de H_2O_2 las cuales puede reaccionar con cationes de metales de transición para formar especies oxidantes, principalmente en presencia de iones hierro férrico (Fe^{3+}) y cobre (Cu^{2+}) (26).

Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno

Especies reactivas del oxígeno (ROS)			
Radicales			
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Alcoxilo	RO^{\cdot}
Hidroxilo	$^{\cdot}OH$	Peroxilo	ROO^{\cdot}
No radicales			
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Ozono	O_3
Singulete de Oxígeno	1O_2	Peróxido orgánico	$ROOH$
Ácido hipocloroso	$HOCl$	Ácido hipobromoso	$HOBr$
Especies reactivas del nitrógeno (RNS)			
Radicales			
Óxido nítrico	ON^{\cdot}	Dióxido de nitrógeno	NO_2^{\cdot}
No radicales			
Peroxinitrito	$ONOO^-$	Catión nitrosilo	NO^+
Trióxido de dinitrógeno	N_2O_3	Anión nitroxilo	NO^-
Tetraóxido de dinitrógeno	N_2O_4	Ácido peroxinitroso	$ONOOH$
Ácido nitroso	HNO_2	Peroxinitritosalquílicos	$ROONO$

El SNC es rico en Fe^{3+} , contenido en transferrina en plasma y ferritina intracelular. Este hierro puede ser liberado de sus transportadores a valores de pH 6 o menos, como el que se alcanza en la hipoxia y acumulación de ácido láctico y convertirse en catalítico; una segunda fuente de hierro proviene de la hemoglobina liberada después de una hemorragia inducida mecánicamente. El O_2 actúa donando un electrón al Fe^{3+} , y el hierro ferroso (Fe^{2+}) cataliza la conversión de H_2O_2 en HO^\bullet y HO^\bullet . Por lo tanto, O_2 y H_2O_2 reaccionan en presencia de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ y promover la formación de HO^\bullet y HO^\bullet (26).

Por otro lado, el O_2 puede interactuar con ON, un radical hidrofóbico y levemente reactivo generado enzimáticamente a partir de L-arginina por isoformas de óxido nítrico sintasa (NOS) (22). La familia está integrada por varios miembros: ON neuronal, ON endotelial y la iNOS, todas ellas se localizan en el citosol. La forma ON endotelial es la fuente primordial de ON en las células endoteliales vasculares (30).

En contraste a estas tres enzimas, la ON mitocondrial es una isoforma localizada en la mitocondria. Su localización en dicha organela asegura la formación de ONOO^- , a partir de la presencia de ON y de O_2 a nivel mitocondrial. Esta enzima puede producir superóxido cuando se desacopla y este RL a su vez se combina con ON (30), dando lugar a uno de los RNS más importantes, peroxinitrito ONOO^- , potente oxidante y nitrante *in vivo*, ya sea para reacciones de oxidación directa, en las que reacciona con dianas de bajo peso molecular, proteínas (con tioles y centros metálicos), y dióxido de carbono, o por radicales derivados de escisión hemolítica, secundarios a la reacción con dióxido de carbono o protonación, incluidos en RNS. En condiciones biológicas, ONOO^- existe en equilibrio con su forma ácida, el ácido peroxinitroso (ONOOH), que decae rápidamente por hemólisis y dan lugar al radical dióxido de nitrógeno altamente reactivo (ON_2^\bullet) y HO^\bullet favorecido por el bajo pH en SNC. Entre las diferentes reacciones directas de ONOO^- , una de las más relevantes es con monóxido de carbono (CO), del sistema tampón de bicarbonato, para formar nitrosoperoxocarbonato (ONOOCO_2), por escisión agentes oxidantes fuertes, tales como dióxido de nitrógeno (ON_2^\bullet) y radicales carbonatos (CO_3^\bullet) (26).

2.5 Lipoperoxidación

Después del aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, la disfunción mitocondrial, la degradación de ácido araquidónico y la activación de iNOS, se produce la formación de ROS y RNS causando la LP, daño de proteínas y ácidos nucleicos, induciendo alteraciones en el citoesqueleto y organelos que llevan a la lisis (2).

La LP se define como una degradación oxidativa y descomposición de lípidos de manera descontrolada por vía no enzimática y ocurre cuando las ROS reaccionan con ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS), lo que lleva a la modificación de sus propiedades fisicoquímicas, alterando la integridad de la membrana celular. Los PUFAS son ácidos grasos de cadena larga con dos o más dobles enlaces en configuración *cis*, cada uno separado por un puente de metileno ($-\text{CH}_2-$) en su cadena principal de carbono. Los lípidos por su conformación química son la clase de biomoléculas más susceptible a sufrir oxidación (26).

La vía enzimática produce lípidos, mediadores como prostanoïdes, leucotrienos, lipoxinas, resolvinas y maresinas por la acción de COX o lipoxigenasas (LOX), entre otros, que provocan desregulación del flujo sanguíneo, daño de la BH-M, respuesta inflamatoria y muerte celular programada (26).

El SNC es particularmente vulnerable al LP por varios factores: tiene una alta actividad metabólica oxidativa, contenido de PUFAS y cationes de metales de transición.

Los ácidos grasos están altamente concentrados dentro de la mielina de los astrocitos en el SNC, son más susceptibles a la peroxidación, lo cual podría ser un factor determinante en la desmielinización. Además, los oligodendrocitos poseen bajos niveles de enzimas antioxidantes, tienen un alto contenido de hierro y una relación alta de lípido y proteína en la mielina, representando un blanco preferencial de las ROS (31,32).

Por el contrario, tiene bajas defensas antioxidantes y replicación neuroglial. La LP es un proceso en cadena que involucra la participación de ROS, RNS, PUFAS y sistemas oxidativos, entre otros, donde se ha propuesto una intervención terapéutica con moléculas que pueden tanto prevenir la formación de RL como evitar que las ya formadas reaccionen con biomoléculas (26).

Debido a que el pico de producción de ROS ocurre dentro de las primeras 24 hrs. después de la lesión, o durante la isquemia-reperusión, los fármacos que pueden usarse para esta "primera producción de RL" están limitados por su tiempo de intervención. Sin embargo, las fases en las que se desarrolla la LP pueden persistir mientras existan sustratos oxidables, por lo que conocer las reacciones involucradas permite diseñar estrategias y fármacos con mayor ventana terapéutica (26).

Los RL se pueden formar a partir de diversos mecanismos, siendo la adición de un electrón a una molécula estable el más común (29).

La peroxidación no enzimática de PUFAS es la vía principal del estrés oxidativo; HO• participa como uno de los inicios del LP por su solubilidad y la falta de un sistema enzimático para eliminarlo. Este y otros radicales eliminan un radical H• dentro del lípido (LH), que proporciona un radical lipídico (L•). La estabilización por resonancia de L• produce un dieno conjugado que reacciona con O₂ para formar un radical lípido peroxilo (LOO•) y genera un hidropéroxido lipídico (LOOH) cuando retira hidrógeno de un PUFA adyacente, produciendo un segundo L•. Los LOOH se consideran el producto inicial de LP, pero estos compuestos son inestables y pueden descomponerse con la participación de Fe³⁺ o Fe²⁺ nuevamente en LOO• o LO• también puede iniciar reacciones en cadena, como las reacciones LOO• descritas anteriormente. Por lo tanto, un HO• puede generar un alto número de LOOH a través de una serie de reacciones en cadena. Finalmente, la terminación de las reacciones en cadena ocurre por la estabilización de los radicales que reaccionan entre sí, formando un nuevo enlace y eliminando el radical, o donando electrones (generalmente H•) a los radicales por compuestos, sin convertirse en radicales. En el caso de los LOOH previstos en las reacciones LP anteriores, estos sufren una fragmentación en la que los PUFAS oxidados dan lugar a productos secundarios de cadena corta, como los hidroxialquenes (aldehídos neurotóxicos) relativamente estables como el malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), 4-hidroxi-2-hexenal (HHE) y 2-pro-penal (acroleína). En general, el LOOH puede reaccionar de diferentes maneras que conducen a una ruptura del enlace C-C y la formación de hidroxialquenos por medio de diferentes mecanismos (Figura 11) (26).

Mientras que la LP compromete la integridad de la membrana celular, los productos secundarios altamente reactivos pueden unirse covalentemente a proteínas y ADN, comprometiendo su estructura y función. Se ha demostrado que la HNE puede desempeñar un papel importante como molécula de señalización, mejorando la capacidad antioxidante celular y la respuesta adaptativa a bajas concentraciones; puede promover el daño de las proteínas y del ADN en los organelos, lo que lleva a la inducción de autofagia, senescencia o detención del ciclo celular; y finalmente puede inducir la muerte celular programada por apoptosis o necrosis a un nivel alto o muy alto (26).

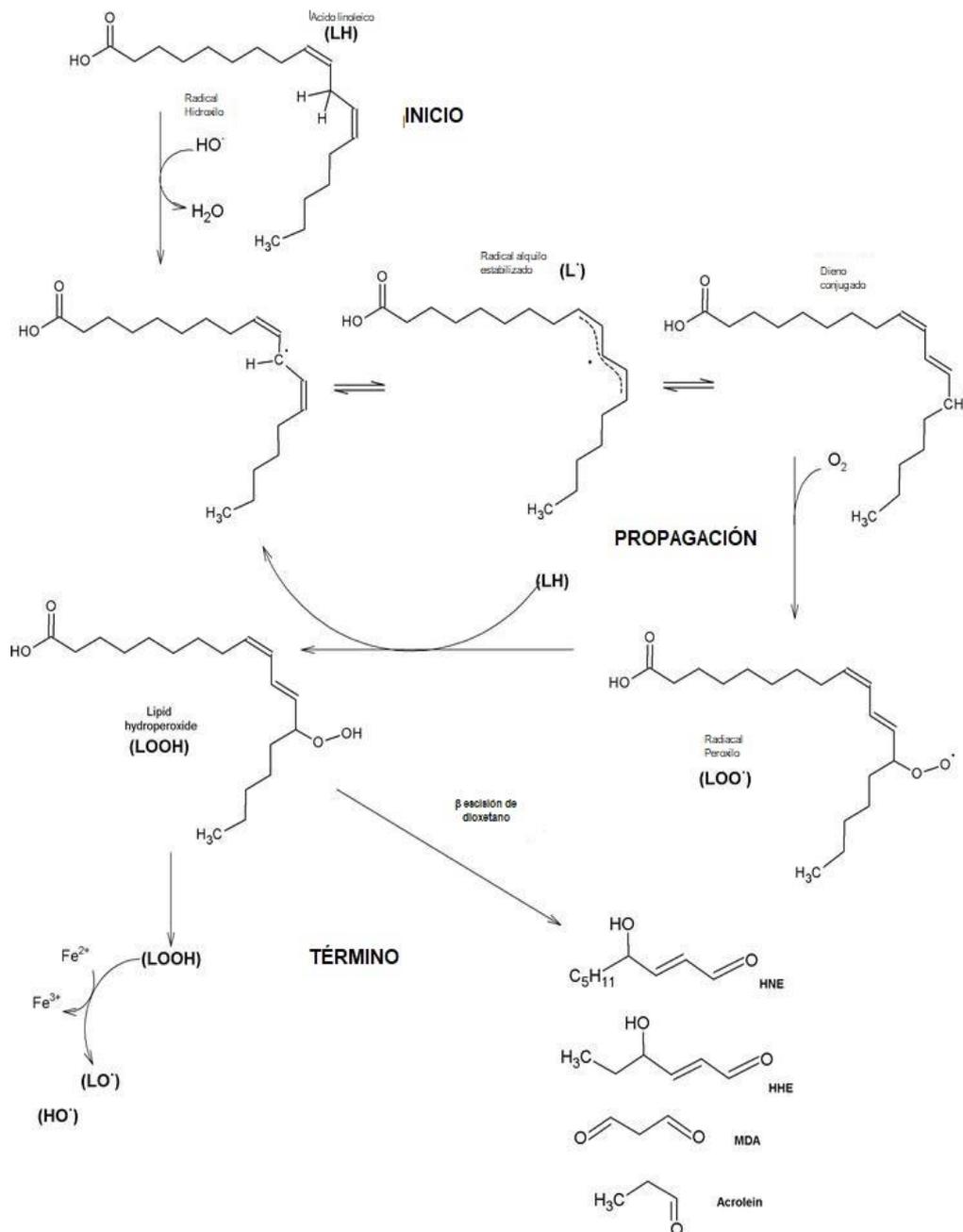


Figura 11. Lipoperoxidación no enzimática de PUFAS. Los tres pasos de la peroxidación lipídica no enzimática de PUFAS. En la etapa de iniciación, se elimina un átomo de hidrógeno en una posición bis alílica usando un radical o un metal activo redox para generar un radical alquilo estabilizado por resonancia. El radical se isomeriza para formar el dieno conjugado más estable, antes de reaccionar con el oxígeno molecular. En la etapa de propagación, los radicales pueden reaccionar con nuevos sustratos, formando hidropéroxidos lipídicos (LOOH), que pueden reaccionar con el hierro creando nuevos radicales. Este paso se repite hasta el paso de terminación, donde los radicales son "apagados" por antioxidantes o reaccionan con otro radical. La descomposición de LOOH genera especies como MDA, HNE, etc. LH, lípido; L $^\bullet$, radical alquilo / lípido; LOO $^\bullet$, radicalperoxilo; LOOH, hidropéroxido de lípidos; LO $^\bullet$, radical lípido alcoxilo; HNE: 4-hidroxi-2-nonenal; MDA: malondialdehído; HHE: 4-hidroxi-2-hexenal. Modificado de: Vilchis, y cols. 2019 (26).

2.6 Proteínas como diana de oxidación

La oxidación de proteínas para ROS puede conducir a la hidroxilación de grupos aromáticos y cadenas laterales de aa alifáticos, nitración de residuos de aa aromáticos, nitrosilación reversible de grupos sulfhidrilo, sulfoxidación de residuos de Met, conversión de algunos residuos aa en derivados carbonilo, escisión de la cadena polipeptídica y formación de agregados proteicos reticulados (26).

Además, los grupos funcionales de proteínas pueden reaccionar con productos de LP y derivados de carbohidratos (glicación / glicoxidación) para producir derivados inactivos, donde la oxidación irreversible de proteínas se describe mediante cuatro vías: ruptura de enlaces peptídicos, carbonilación, formación de enlaces proteína-proteína y nitración (26).

Uno de los procesos de oxidación irreversibles más importantes es la carbonilación de proteínas. Implica la oxidación de la proteína anterior y derivados de aa con grupo carbonilo (C=O), "reaccionando preferentemente sobre Trp, Thr, Cys, Met, y residuos de His, reacciones de cetonas y aldehídos sobre Cys, Lys, His y por glicación / glicoxidación de grupos amino de Lys, etc. La modificación de la estructura de la proteína después de la oxidación también puede dar lugar a derivados reticulados intra o inter proteicos por varios mecanismos diferentes. Los productos finales de LP, como HNE y MDA, pueden causar proteínas reticuladas, como reacciones de ambos grupos aldehído (26).

A partir de todas estas modificaciones se pueden identificar diversas moléculas tanto en líquido cefalorraquídeo como en sangre, tanto en humanos como en animales, y se han propuesto como biomarcadores para diagnosticar la gravedad de la LME. Algunos de esos biomarcadores derivados de proteínas, neurofilamento, GFAP, tau, enolasa específica de neuronas y proteína B de unión al calcio S100 (S100p), que forman parte de los componentes de neuronas, oligodendrocitos y astrocitos reactivos (26).

2.7 Tratamientos

Tomando en cuenta las fases del desarrollo en cuanto LME, la intervención terapéutica temprana ha demostrado mejorar las posibilidades de recuperación, según lo observado en diversos ensayos clínicos en los que se utilizó como tratamiento succinato sódico de metilprednisolona, eficaz solo cuando se administró en las primeras 8hrs. después de la lesión.

La investigación de nuevos agentes farmacológicos para el tratamiento de la LME se centra en los procesos de lesión secundaria, siendo las terapias antioxidantes las más importantes. Los principales objetivos de las terapias farmacológicas para las LME se pueden clasificar en neuroprotección y neuro regeneración. Las terapias antioxidantes están catalogadas dentro de la primera (26).

A continuación, y de manera resumida, se presentan algunos de los agentes que se encuentran en fase experimental y otros (cuando se mencionan), en ensayos clínicos, bien porque su eficacia ha sido demostrada en modelos animales o por su uso ya probados o aprobado en otras patologías.

Melatonina: La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es un compuesto pleiotrópico que actúa principalmente en la regulación de los ritmos circadianos y el sueño. Cuando reacciona con ROS, se convierte en 3-hidroximelatonina cíclica. Estimula la expresión y actividad de SOD, glutatión peroxidasas, catalasa y glutatión reductasas e inhibe o disminuye la expresión de ON pro-oxidativos, diferentes vías de señalización, factores de transcripción y citocinas proinflamatorias (26).

Minociclina: El clorhidrato de minociclina es un antibiótico de tetraciclina semisintético disponible con potentes actividades antiinflamatorias (regulación de las vías de la fosfolipasa A 2 y MAPK / PIK3) y neuroprotectoras (protección contra la inflamación inducida por glutamato); también inhibe las metaloproteinasas de la matriz y el influjo de Ca^{2+} mitocondrial. La minociclina tiene propiedades antioxidantes y antiapoptóticas, probablemente actuando en dosis elevadas como eliminador directo de radicales, como la vitamina E, debido a su estructura de anillo fenólico (26).

Estrógeno: El tratamiento con hormonas esteroides gonadales (estradiol, testosterona, estrógeno) ha resultado en una recuperación motora con una reducción del volumen de

la lesión en modelos animales. A través de sus receptores (ER α y ER β), el estrógeno ejerce una neuroprotección a concentraciones fisiológicas y una mejor neuroprotección como antioxidante a altas concentraciones. El estrógeno modula la expresión génica; promueve la angiogénesis; inhibe la inflamación, impidiendo que la microglía libere moléculas inflamatorias como TNF- α , ROS, prostaglandina (E2), etc. Regula la expresión de enzimas antioxidantes; e induce la producción de glutatión reducido (GSH) mitocondrial (26).

Ácidos grasos omega-3: Los ácidos grasos omega-3: ácido α -linolénico, ácido eicosapentaenoico (con cinco enlaces insaturados) y ácido docosahexaenoico (DHA, con seis enlaces insaturados) forman parte de los triacilglicérols que se consumen en la dieta. El DHA es un componente estructural principal del cerebro humano, la corteza cerebral y la retina. La falta de DHA puede afectar la fluidez y la integridad de la membrana en los sinaptosomas; además, afecta la arquitectura de proteínas que actúan como receptores y canales (26).

Antioxidantes endógenos (vitaminas C, D, E y ubiquinol): Se han estudiado varias moléculas que ya actúan como antioxidantes endógenos como candidatas para su aplicación en terapias antioxidantes para la LME (26).

La vitamina C, o ácido ascórbico, es una pequeña molécula soluble en agua que tiene un doble enlace y participa en varios procesos metabólicos como agente reductor.

La vitamina D (1,25-dihidroxitamina D3, VDH, forma activa) es una molécula con esqueleto de colesterol y actúa de manera similar a las hormonas y esteroides en varios sistemas. Su receptor está ampliamente distribuido en el SNC y aparentemente actúa sobre los mismos objetivos que la progesterona a través de vías similares. Su uso en modelos de daño del SNC *in vivo* e *in vitro* ha mostrado resultados prometedores en varios aspectos. La prolongación o exacerbación de la inflamación también da lugar a un mayor daño por estrés oxidativo; por tanto, el efecto de VDH *in vivo* sobre la inhibición de iNOS y aumento de IL-4 y TGF- β *in vitro* modulando la producción de moléculas implicadas en estrés oxidativo, daño neurotóxico y crecimiento axonal.

Los tocoferoles son un grupo de cuatro compuestos fenólicos liposolubles denominados α , β , γ y δ , que se encuentran en los aceites vegetales, siendo alfa (α -T, considerada la

vitamina E clásica) la que tiene mayor proporción en sangre y tejidos. Todos los tocoferoles son fuertes antioxidantes que rompen cadenas al eliminar eficazmente ROS y RNS. α -T reduce significativamente la actividad de iNOS y COX-2; Además, se ha evaluado el efecto de extractos o derivados sintéticos, disminuyendo la muerte celular por excitotoxicidad y estrés oxidativo en astrocitos, acelerando la remielinización de lesiones focales desmielinizadas químicamente inducidas. El ubiquinol (forma reducida) o coenzima Q10 se encuentra entre los antioxidantes que disminuyen su concentración después de la LME. Es un cofactor liposoluble presente en la membrana mitocondrial interna que actúa como antioxidante en la cadena respiratoria. Previamente, se ha demostrado el efecto sobre el daño por isquemia-reperfusión en el SNC, previniendo la LP y reduciendo el tamaño de las lesiones (26).

Factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM): Mediante el uso del FILM en diversos estudios *in vitro* se observó que retarda la migración de monocitos humanos sin afectar la locomoción de otras estirpes celulares (neutrófilos, polimorfonucleares o eosinófilos), evita la producción de ROS y la síntesis inducida de ON (27).

Estudios *in vivo* han demostrado la capacidad que tiene el FILM para retardar el arribo de monocitos en ventana de Rebeck en humanos e inhibir la hipersensibilidad cutánea al dinitroclorobenceno en cobayos (33).

Así mismo se ha demostrado que el FILM disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12 e IFN- γ , favoreciendo la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β , modulando la respuesta inflamatoria (33). Se ha descrito que tiene efecto sobre la expresión de genes que participan en la migración, proliferación, síntesis/degradación de la matriz extracelular, vasculogénesis, angiogénesis y guiado axonal (34).

Mediante diversos estudios se ha evaluado el papel del FILM en el control y modulación de LP en etapas agudas de LME observando en estos, concentraciones disminuidas de marcadores específicos de oxidación lipídica como los son HNE y MDA (27). Estudios de análisis de microarreglos, PCR tiempo real, citometría de flujo, y determinación de proteínas por el método inmuno-enzimático ELISA en las líneas celulares U-937 (pre monocítica) y MRC-5 (fibroblastos) activadas con PMA, mostraron que el FILM inhibe la producción de interleucinas y quimiocinas

pro-inflamatorias y favorece la producción de citocinas anti-inflamatorias, con lo cual promueve el balance homeostático crítico para la modulación de la respuesta inflamatoria se sugiere que bastan tres dosis de FILM para tener una respuesta neuroprotectora en la LTME, proponiendo este protocolo para estudios posteriores (35).

Nitrona: Las nitronas fueron originalmente desarrolladas como una herramienta para estudiar los radicales libres en química y posteriormente en procesos oxidativos biológicos, usadas como interceptores de orbita (spin-trapping) que reaccionan con RL de oxígeno como O_2^- y $-OH$ para producir especies menos reactivas (27).

Membrana Amniótica:

Las células epiteliales y mesenquimales aisladas de MA poseen características de células madre, pluripotenciales que tienen la capacidad de diferenciación hacia líneas de las diferentes capas germinales y propiedades inmuno moduladoras (36). Células de la MA comenzaron a utilizarse en ensayos preclínicos en modelos animales de diversas enfermedades con resultados prometedores. No obstante, al igual que lo observado con células mesenquimales de otras fuentes, la mayor parte de las veces, el efecto benéfico no podía atribuirse a la plasticidad celular, porque el número de células que se injerta es escaso. Diferentes observaciones experimentales sugieren que las células madre derivadas de la MA actúan benéficamente por sus efectos inmunomoduladores e inmunorreguladores. Los mecanismos implicados se han investigado extensamente en ensayos *in vitro* y en modelos animales de enfermedades inflamatorias (37).

Marino y cols, (13) mencionan que, en ensayos clínicos, la MA completa ha sido evaluada para el tratamiento en cartílagos articulares, defectos de tendones y regeneración en nervios periféricos, por su actividad neurogénica. Este último estudio se llevó a cabo por Mligiliche y cols. (38) con el cual se concluyó que la lámina de matriz extracelular del amnios humano es un material de conducción eficaz para la regeneración de nervios periféricos. La tasa de aparición de axones mielinizados de menos de 4 micras de diámetro fue significativamente mayor en el grupo donde se utilizaron los tubos de matriz de amnios, la reinervación del músculo gastrocnemio se demostró electrofisiológicamente 9 meses después de la implantación.

Cuando la MA se utiliza como injerto, rellena un defecto tisular reemplazando la matriz estromal ausente y proporcionando una membrana basal para que la epitelización se

produzca sobre ella. La placa basal de la MA facilita la migración de células epiteliales, refuerza adhesiones de células basales, promueve la diferenciación epitelial y previenen la apoptosis. La presencia de diferentes formas de láminas características de la placa basal es la que le permite la rápida adhesión y proliferación celular sobre ella (33).

2.8 Inmunoterapia

El uso de anticuerpos en el tratamiento de la LME es diverso y está dirigido a las funciones de las células inmunes involucradas en la inflamación y el proceso patológico. La invasión inicial de leucocitos depende de la interacción del grupo de diferenciación de la integrina CD11d / CD18 [CD por sus siglas en Ingles (clusters of differentiation)] con la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1). Otra integrina importante es el dímero $\alpha 4\beta 1$ también conocido como antígeno muy tardío 4 (VLA-4), y los tratamientos con anticuerpos monoclonales anti- $\alpha 4\beta 1$ bloqueantes o el bloqueador de molécula pequeña BIO5192 mostraron una menor afluencia de neutrófilos / macrófagos, reducción de la actividad oxidante (COX-2, ON o iNOS, MDA), preservaron la materia blanca y gris, mejoraron las diferentes evaluaciones motoras y disminuyeron la alodinia mecánica después de la LME, en comparación con los controles (26).

El componente de tipo enzimático se considera como la primera línea de defensa primaria, y se encarga de evitar el acúmulo de ROS como; el anión superóxido y peróxido de hidrógeno, catalizando la transferencia de electrones de un sustrato hacia los radicales (29).

Recientemente se demostró en modelos de ratas con hemisección medular en T13 que el trasplante de células aisladas del epitelio amniótico dentro de la ME realizado a los 14 días de la sección medular suprime la alodinia mecánica y reduce la expresión de las proteínas F4/80 (marcador de microglía) en el sitio del daño, y en el segmento espinal L4-5, ubicado por debajo del daño. Además, inhibe significativamente el incremento de la fosforilación del receptor NMDA (indicador de dolor neuropático crónico en las ratas con sección medular) en los segmentos L4-5, lo que sugiere que las células aisladas del epitelio amniótico producen un efecto antinociceptivo en el estímulo mecánico en animales neuropáticos. Además, al reducir la expresión de la microglía se produce

menos liberación de citocinas proinflamatorias y, subsecuentemente, menos dolor crónico (37).

2.9 Biomarcadores relacionados con LME

Existen una serie de genes de proteínas, citocinas, interleucinas y compuestos biológicos ampliamente estudiados auxiliares a la determinación de procesos proinflamatorios, antiinflamatorios, neurogénicos, degenerativos en el SNC particularmente en ME, algunos de ellos se encuentran agrupados en la tabla 2, que se consideran como estándares de evaluación en la LME (27).

Algunos de ellos han sido seleccionados y descritos a continuación para su evaluación el presente trabajo.

Tabla 2. Genes y respuestas asociadas a LME

Respuesta	Genes
Proinflamatoria	IL-6, IL-12, COX-2, IFN γ , TNF α , CXCR1, IL-1 β
Antiinflamatoria	IL-10, IL-4, TGF- β 3
Lipoperoxidación	SOD-1, SOD-2, iNOS, MPO
Neuro modelación	GAP 43, BASP1, BDNF, NT3
Formación de Cicatriz glial	GFAP, VIM, IBA 1
Constitutivos	HPRT, β -actina

2.9.1 Proteína ácida fibroglial (GFAP)

La GFAP es una proteína derivada de las células gliales, que forman parte del filamento intermedio del citoesqueleto de los astrocitos, donde es la proteína más abundante y que normalmente se encuentra elevada en los astrocitos reactivos durante la plasticidad, la neurodegeneración y después de una lesión, donde se asocia con la formación de CG (12,39).

Después de una activación severa, los astrocitos secretan diversas sustancias neurotóxicas y expresan un nivel elevado de GFAP, que se considera una proteína marcadora de astrogliosis. GFAP aumenta en la periferia de la lesión isquémica después

de agresiones neurodegenerativas (40). Los astrocitos aumentan la expresión de filamentos intermedios, GFAP, nestina y vimentina (VIM), y se hipertrofian. Los astrocitos reactivos proliferan y se movilizan hacia el sitio de la lesión y forman una estructura en forma de malla de procesos filamentosos entremezclados alrededor del epicentro de la lesión. Se ha demostrado que la CG astrocítica sirve como una barrera protectora que evita la propagación de las células inmunitarias infiltradas en los segmentos adyacentes. La atenuación de la reactividad de astrocitos y la formación de cicatrices mediante el bloqueo de la activación de STAT3 da como resultado peores resultados en la LME. La astrogliosis reactiva también es esencial para la reconstrucción de la BH-E, y el bloqueo de este proceso conduce a una infiltración de leucocitos exacerbada, muerte celular, daño de la mielina y reducción de la recuperación funcional (25).

Es considerado un marcador específico de enfermedades del SNC, y también está relacionado con varios procesos neuronales nocivos que comprometen la integridad de la BH-E, y ha mostrado ser un biomarcador potencialmente útil para predecir resultados clínicos en el tracto cerebro espinal. Su nivel normal en suero es <0.03 ng/ml, por lo que cualquier elevación de este indicará disrupción de la BH-M (12).

Las concentraciones serológicas y en Líquido cefalorraquídeo (LCR) de GFAP se correlacionan positivamente con la gravedad de la lesión en pacientes con LME traumática dentro de las 36 hrs. iniciales. En general, la expresión de GFAP en LCR y suero ha demostrado ser dependiente de la gravedad y podría servir como biomarcador para la detección de lesión/ regeneración en individuos con LME aguda (39).

Por lo tanto, la manipulación de la CG se ha perseguido como una estrategia de tratamiento prometedora para la LME (25). De acuerdo con lo mencionado se tiene conocimiento del uso de esta proteína para la determinación del grado de lesión/recuperación en individuos sometidos a LME completa.

2.9.2 Proteína asociada de crecimiento 43 (GAP-43)

Dentro de las neuronas, la GAP-43 y su homóloga proteína 1 soluble en ácido cerebral (BASP-1) se enriquecen en terminales de axón, donde regulan el citoesqueleto de actina. Modulando la dinámica de la actina, GAP-43 y BASP1 logran sus funciones fisiológicas en el neurodesarrollo, la función sináptica y la regeneración nerviosa (41).

En la edad adulta la expresión de GAP-43 es relativamente baja, con la excepción de neuronas localizadas en regiones con plasticidad continua y remodelación sináptica. Después de una ruptura estructural del sistema nervioso adulto, un aumento de GAP-43 fue observado en neuronas, cono de crecimiento y algunas células gliales (42).

Mediante el estudio realizado por Bhattacharyya (43), se encontró que GAP-43 se localiza en el citoplasma de las neuronas y se observó un aumento en la expresión del marcador regenerativo GAP-43 y el número de neuronas supervivientes tanto rostral como caudal al sitio de la lesión. Este biomarcador se expresa en gran medida durante los períodos de crecimiento activo del axón y sinaptogénesis. Su participación fundamental en el neurodesarrollo ha sido demostrada por estudios de eliminación genética (41).

Durante la lesión neural y mediante diversos estímulos las neuronas y la glía comienzan con la liberación de citocinas y factores neurotróficos, que pueden activar proteínas asociadas al crecimiento como GAP-43 y BASP1 para promover la neuro protección y la regeneración. Tras la lesión, la fuga de células dañadas o moribundas conduce a un exceso de glutamato en el espacio extracelular, al mismo tiempo la privación de oxígeno-glucosa estimula a los astrocitos, microglía y neuronas para que secreten IL-6, IL-10, las cuales activan las vías JAK / STAT3 y PI3K / Akt, regula al alza GAP-43 y BASP1 y promueve el crecimiento de neuritas *in vitro* y la sinaptogénesis *in vivo* (Figura 12) (41).

La fosforilación de ambas proteínas son dependientes del Ca^{2+} de tal manera durante el desarrollo y funcionamiento con niveles basales de Ca^{2+} la producción de estas se mantiene baja. Durante la LP se lleva a cabo aumentos considerables de Ca^{2+} , por lo cual se ha considerado que el aumento de estas proteínas está relacionado con este desbalance (41).

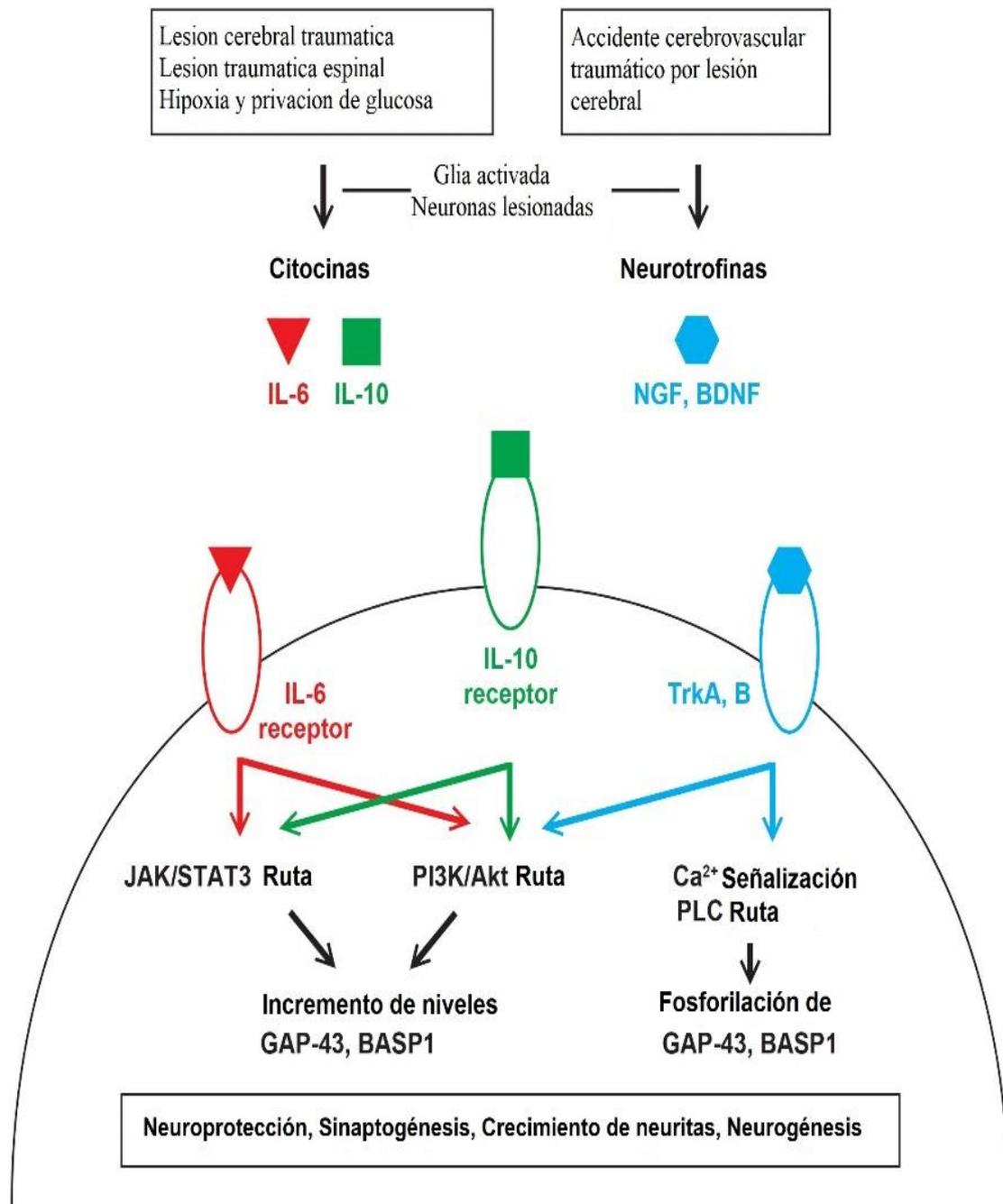


Figura 12. Vías de señalización inducidas por lesiones que regulan GAP-42 y BASP1. Modificado de: Chung y cols.2020 (41).

2.9.3 Neurotrofina 3 (NT-3)

La neurotrofina 3 (NT-3) pertenece a la familia de cuatro proteínas neurotróficas relacionadas estructuralmente, entre las cuales se encuentran el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofinas 3, 4 y 5, y el factor de crecimiento nervioso (NGF). Todas las proteínas tienen funciones importantes en el desarrollo del SNC y periférico, supervivencia celular, diferenciación y crecimiento a lo largo de la vida (10).

Las neurotrofinas actúan sobre dos tipos de receptores, los denominados receptores de alta afinidad de tirosina cinasa (TrkA, TrkB y TrkC) y su receptor de baja afinidad (p75). Actualmente se conocen las vías metabólicas activadas por interacción de las neurotrofinas con sus receptores Trk. Tras interactuar las neurotrofinas con sus receptores de alta afinidad Trk, se da pie a la señalización iniciada por las GTP asas Ras y Rap1, que activan a la familia de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), involucradas en la supervivencia y diferenciación neuronales (38).

La microglia tiene un rol activo en la neurogénesis: elimina células progenitoras neuronales apoptóticas que no se han incorporado en los circuitos neuronales, dirige la migración y la diferenciación de las mismas y libera factores neurotróficos (NGF, NT-3 y -4, BDNF)(45). La NT-3 es el tercer factor neurotrófico, se ha demostrado que apoya la supervivencia y diferenciación de neuronas existentes, estimula el crecimiento, diferenciación y sinapsis de nuevas neuronas mediante la activación de moléculas por la interacción de las L neurotrofinas con su receptor de alta afinidad como lo es la proteína fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3-K), la cual es capaz de fosforilar a la proteína cinasa B (PKB) o (Akt), esta señalización está relacionada con la inactivación de proteínas apoptóticas. Por último, la activación del receptor de baja afinidad para las neurotrofinas p75 es regulada principalmente por péptidos precursores, y su principal blanco es una vía apoptótica (44,46).

2.9.4 Molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (Iba-1)

Se sabe que los iones de calcio son uno de los mediadores de señales más importantes en todas las células, incluido el SNC, en el cual los iones de calcio ejercen su señalización a través de la asociación con varios enlaces de calcio. La Molécula

adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (Iba-1) se demostró por primera vez en la microglía y se sabe que tiene la actividad de agrupación de actina y participa en la fagocitosis y la ondulación de la membrana en la microglía activada. Se ha informado que es una molécula clave en la fagocitosis, y que está involucrada en las vías de señalización del calcio y una pequeña GTPasa (47,48).

Iba-1 actúa cooperativamente con la proteína G reactiva, molécula clave en la activación de la microglía, cuyo rol es dirigir la reorganización del citoesqueleto de actina. Esta remodelación es importante para los eventos celulares desencadenados luego de la activación, entre los cuales se encuentran la proliferación, migración, fagocitosis y producción de agentes bioactivos (42).

2.9.5 Vimentina (VIM)

La VIM es una proteína de filamento intermedio de tipo III, ampliamente distribuida y conservada en todas las especies. Desempeña gran variedad de funciones celulares y tisulares. Se ha identificado que proporcionar la flexibilidad mecánica necesaria para la contracción, migración y proliferación célula (49).

VIM, como una de las proteínas de filamento intermedio de mamíferos más ampliamente expresada, se expresa generalmente en astrocitos reactivos y se informó en células mesénquimas, condrocitos y células endoteliales, particularmente en fibroblasto y células diferenciadoras (50).

En las células, VIM construye una red extensa y activamente dinámica de filamentos que atraviesa el citoplasma, sufre alteraciones de forma y localización constantes, relativamente rápidas en respuesta a modificaciones postraduccionales y al estrés bioquímico y/o mecánico, considerado en el proceso biológico esencial para desarrollo embrionario, formación de cicatriz y formación de metástasis de cáncer, caracterizadas por la inducción de la motilidad celular, cambios en la expresión génica y aumento de la supervivencia (49).

Es bien sabido que los astrocitos hipertróficos pueden sobre expresar GFAP y VIM para inhibir la regeneración axonal. Por tanto, existe una estrecha relación entre GFAP y VIM en los astrocitos reactivos. Los estudios han demostrado que el papel de VIM implica la adhesión celular, migración, supervivencia y la transducción de señalización. Entre estos elementos, la gliosis reactiva caracterizada por hipertrofia de procesos de

astrocitos que cargan varios filamentos intermedios, incluidos nestina, VIM y GFAP, se conocía como el principal obstáculo para la regeneración nerviosa.

En el estudio realizado por Qian Jiang, 2017 (50), quien concluyó que de manera conjunta la VIM puede ejercer su función de inhibir la regeneración durante un tiempo prolongado después de la lesión. Por lo tanto, debería ser útil una eliminación de VIM con un tiempo prolongado en la médula espinal, para inhibir la formación de cicatrices y luego permitir la regeneración nerviosa.

3.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La incidencia de LME en medicina veterinaria aun no es posible conocerla por la falta de registros estadístico de los casos. La LME ocasiona trastornos anatómicos y fisiológicos con graves secuelas sobre la función neural desarrollados en dos fases, durante la primera el daño neuronal es inmediato por el impacto y la necrosis isquémica y la segunda se caracteriza por la aparición de alteraciones bioquímicas que causan el daño de la lesión secundaria.

Estos estadios activan al sistema inmune, generando una reacción celular, lo que provoca un proceso inflamatorio y daño importante al tejido neural con una respuesta inflamatoria no modulada e intensa que contribuye a la degeneración del tejido y generación de CG poco controlada que se relaciona con la falta de interacción neural de las células presentes anterior y posterior al sitio de lesión. Las estrategias terapéuticas convencionales para este tipo de lesión no son satisfactorias, ya que tienen resultados muy limitados, a pesar de las mejoras en cuidados quirúrgicos y de rehabilitación.

Las terapias propuestas en los últimos años comienzan a enfocarse a la modulación de procesos de lesión secundaria, mediante la administración de productos que tienen como objetivo regular el proceso inflamatorio y controlar la agregación celular para evitar la remodelación tisular desmedida y con esto la formación de CG que impida la reconexión neural de las células en neoformación.

4. JUSTIFICACIÓN

Mediante estudios previos en modelos murinos, se ha logrado determinar que la acción del péptido inmunomodulador (PI) en combinación con otros agente inmunomoduladores favorece la recuperación motriz posterior a LME, así como la regulación del estrés oxidativo y el cambio en la expresión de genes involucrados en la inflamación comparado con grupos de combinación binaria y controles.

Tomando en cuenta que se ha demostrado neuroprotección con el uso de estos péptidos de manera individual, favorecen la resistencia del tejido a la toxicidad y reducen la degeneración secundaria de neuronas, en el presente trabajo se propone la aplicación del PI y/o de un compuesto químico y biológico* (CQB) aplicado sobre la membrana amniótica (MA), tanto de manera individual como mediante su combinación, para favorecer la recuperación motriz y modular la expresión de genes relacionados con la neoformación y remodelación tisular.

5. HIPÓTESIS

La combinación terapéutica del péptido inmunomodulador, el compuesto químico conjunto con la membrana amniótica, modulará la expresión de los genes estudiados y favorecerá la recuperación motriz.

***En proceso de patente**

6. OBJETIVOS

6.1 General

Evaluar el efecto de la administración terapéutica de péptido inmunomodulador, compuesto químico y biológico, en la recuperación motora y expresión de genes en ratas con lesión traumática de la médula espinal.

6.2 Particulares

Comparar y evaluar en los diferentes grupos de animales sometidos a una LTME tratados post-lesión con la combinación de péptidos inmunomoduladores y MA mediante la determinación de:

1. Recuperación motora.
2. Expresión de genes de perfiles pro sinápticos en médula espinal
3. Expresión de genes de perfiles regenerativos en médula espinal

7. METODOLOGÍA

7.1 Población y grupos

Se utilizaron ratas cepa Sprague Dawley, hembras de 12 a 15 semanas de edad, con un peso de 200-250g.

7.2 Tamaño de la muestra

Nueve grupos de seis ratas cada uno, más 20% de reposición por muerte en el proceso experimental. Total: 65 ratas. Los grupos generados son los enlistados en la tabla 3 que muestra a cada grupo en las filas de la izquierda y los procedimientos en las columnas, el punto representa el procedimiento aplicado a cada grupo. La primera aplicación de cada tratamiento se efectuó sobre el sitio de lesión expuesto al momento posterior a la hemisección, las aplicaciones subsecuentes (de haberlas) se efectuaron por vía intraperitoneal (i. p) (ver administración de tratamiento). Péptido inmunomodulador (PI); compuesto químico y biológico (CQB)*; Membrana amniótica (MA). El grupo Sham se refiere al grupo control quirúrgico (Laminectomía sin lesión ni tratamiento), mientras que el grupo control se refiere al grupo con laminectomía, con LME y tratado con PBS.

Tabla 3. Descripción gráfica de los grupos de estudio.

	GRUPO	Laminectomía	Hemisección	Tratamiento
1	Sham	•	-	-
2	Control	•	•	Administración de PBS
3	MA	•	•	MA
4	PI	•	•	Administración de PI
5	PI + CQB	•	•	Administración de PI y CQB
6	MA + PI	•	•	Administración de PI y MA
7	MA+ CQB	•	•	Administración de MA y CQB
8	MA+ PI +CQB	•	•	Administración de PI , CQB Y MA
9	CQB	•	•	Administración del CQB

7.3 Tipo de estudio y diseño experimental.

Estudio de causa-efecto, diseño experimental puro con animales de laboratorio.

Realizado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología UMAE, Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund” Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Los animales de experimentación fueron donados y mantenidos en condiciones adecuadas durante el proceso experimental en el Bioterio del CMN-SXXI del IMSS.

7.4 Preparación y administración de los tratamientos

a) Péptido inmunomodulador

Sintetizado en American Peptide Company Co., Sunnyvale, CA, USA. Se disolvió a una concentración de 20mg/ml de PBS. Las soluciones de trabajo se probaron que están libres de endotoxina usando el ensayo Limulus (Amoebocyte Lysate Endosafe KTA Charles River Endosafe INC, Charleston, SC, USA) y se almacenó a -20°C hasta su uso. Dosis en cada aplicación: 0.87mg/kg de peso.

b) Compuesto químico y biológico

Sintetizado en Sigma-Aldrich, Inc. USA. Se disolvió a una concentración 9mg/ml en PBS y se almacenó a -20°C hasta su uso. Dosis en cada aplicación: 0.5mg/kg de peso.

c) Membrana amniótica

Se utilizó aloinjerto membrana amniótica (MAFIX; Apolo Medical Services, S.A de C.V, México) previamente liofilizada procesada en láminas de 5 x 5mm. En los grupos a los cuales se les administra MA, esta fue impregnada con los tratamientos correspondientes y fue colocada en la zona interna de la hemisección.

Administración del tratamiento: Inmediatamente y posterior a la LME se preparó la combinación de tratamientos, se homogenizó y se colocaron entre el sitio de la hemisección de la médula espinal. Suturamos el área quirúrgica y posteriormente, de acuerdo con el grupo, se administró i.p la misma dosis de PI por 3 días (1 dosis c/24hrs) y dos dosis de QCB (una cada 15 días). Se realizaron los cuidados postoperatorios.

7.5 Técnicas y procesos de evaluación

a) Lesión de médula espinal.

Para realizar la hemilaminectomía, se aplicó un protocolo anestésico basado en Ketamina 50 mg/ kg y Xilacina 10 mg/kg mediante una inyección intramuscular, se rasuró ampliamente el área dorsal. Se colocó en decúbito esternal, y realizamos una correcta higienización de la piel, cumpliendo con protocolos quirúrgicos adecuados.

Posteriormente se incidió la piel sobre la línea de procesos espinosos, aproximadamente de 2 cm craneal y caudal a la determinación externa del sitio de abordaje ubicada en la vértebra torácica No. 9, visualizando la fascia muscular, a continuación, se incidió esta lateralmente a los procesos espinosos sin comprometer el músculo, una vez visualizadas las inserciones musculares son cortadas lo más cercano al proceso espinoso. Posteriormente se reflejó la musculatura hacia lateral, permitiendo visualizar los procesos articulares, donde se incidieron las inserciones musculares lo más cercano a la cápsula articular.

Una vez despejados los procesos articulares, se confirmó la ubicación exacta del espacio vertebral a abordar.

Para esto, primero se eliminó el proceso articular con una gubia Rongeur y posteriormente se desgastó el arco vertebral con ayuda de unos alicates quirúrgicos, se introdujo cuidadosamente en el espacio intervertebral para cortar la cortical interna hacia craneal y caudal para ingresar al canal vertebral.

La hemisección se realizó mediante un corte lateralizado, para lo cual se incidieron las meninges para poder exponer la ME y realizar la hemisección con la ayuda de micro tijeras, se verifica que el corte estuviera correctamente ubicado y que no queden fibras nerviosas sin cortar, el corte se comprobó con un gancho especial para ME (Spinal Cord Hook, Fine Science Tools, Foster City CA, USA).

Posteriormente se procedió a suturar la fascia muscular con sutura absorbible de ácido poliglicólico #4-0, y patrón continuo, anclándose a la fascia para evitar espacios muertos y posteriormente la piel con sutura no absorbible de Nylon #4-0, pudiendo utilizar un patrón simple discontinuo.

Por último, se realizaron los cuidados postquirúrgicos, procurando la hidratación de los individuos, y observando su correcta recuperación.

b) Evaluación clínica. Prueba de habilidad locomotora a campo abierto Basso, Beattie and Bresnahan (BBB).

Después de la lesión y el tratamiento respectivo la evaluación se realizó cada 7 días por un periodo de 8 semanas, usando la prueba de habilidad locomotora a campo abierto “BBB” con escala de 0 a 21, en donde la recuperación, p. ej. se califica como 0 (parálisis completa) a 21 (movilidad completa) (ver Anexo 1). Se colocó a las ratas de manera individual por un periodo de 4 min en un campo abierto de 1.5 x 1.5 mts. y se calificó la capacidad de recuperación de movimiento de la cadera, rodilla y tobillo por observadores calificados a doble ciego (51). Se reportó gráficamente la recuperación de la función locomotora en puntaje de 0-21 de acuerdo con la escala de “BBB” vs tiempo de observación.

c) Diseño de iniciadores.

Se seleccionaron cinco genes expresados diferencialmente, relacionados con la plasticidad, la neurodegeneración, formación de CG y un gen constitutivo, para validar su cambio de expresión mediante PCR tiempo real, teniendo en cuenta su diferencia en la expresión dependiendo del tratamiento administrado.

Para el análisis de expresión de los genes: GFAP, GAP 43, NT3, Iba-1, VIM y β -Actina (gen constitutivo), se diseñaron secuencias de iniciadores a partir de la secuencia del cDNA reportados en el Genebank [NCBI (National Center for Biothechnology Information; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)]. El diseño de los iniciadores para qPCR se realizó mediante los programas libre OligoPerfect (ThermoFisher Scientific) y software Oligo Primer Analysis SoftwareV4.0 (Molecular Biology Insights), los iniciadores obtenidos fueron validados en el Primer-BLAST del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Los criterios del diseño fueron tamaño de 20-21 nucleótidos, temperatura de alineación (Tm) de 60 a 61°C, con un equilibrio de bases AT y GC, con secuencias que no fueron complementarias entre sí y que no forman estructuras secundarias (Tabla 4. ver sección de resultados). El amplicón fue de un fragmento de 80-250 pb.

d) Determinación de expresión génica por PCR Tiempo Real.

Posterior al tiempo de observación de la determinación de recuperación motora, de las seis ratas de cada grupo, se obtuvo RNA total (RNAt) a partir de 1 cm (0.5 cm rostral, 0.5 cm caudal del sitio de lesión) de tejido medular (obtenido por laminectomía) en 1.0 ml de Trizol (Invitrogen, life Technologies). En breve; el tejido se homogenizó por 10s [PRO-200, Bio-Gen Series (Pro Scientific Inc., USA)], se agregó 220 μ l de cloroformo (Sigma-Aldrich, Inc. USA), homogenizó y centrifugó a 10000rpm/15min/4°C, se obtuvo el sobrenadante, y se agregó 500 μ l de isopropanol (Sigma-Aldrich, Inc. USA), y mantuvo a -20°C/60min, se centrifugó a 10000 rpm/15min/4°C, se eliminó el isopropanol y se adicionó 1 ml de etanol al 80% frío, se centrifugó a 6000rpm/5min/4°C, eliminó el alcohol y calentó 3min/45°C y posteriormente a TA/10min, se adicionó 50 μ l de agua inyectable a 45°C, y homogeneizó. Finalmente, se

determinó la concentración y pureza a 260/280 nm en un espectrofotómetro [Epoch2® (BioTek Instruments, Inc., USA)] y la integridad en un gel de agarosa al 1.8%.

Una vez obtenido el RNAt se procedió a sintetizar cDNA por medio del protocolo [FastGene, Scriptase II (NIPPON genetics., EU)]. Se realizó una mezcla A, a partir de 2 µg de RNAt se mezclaron con 1 µl de FastGene, Scriptase II oligo dT (NIPPON genetics., EU), se agregó 2 µl de FastGene, Scriptase II dNTP (NIPPON genetics., EU), se adiciono agua destilada estéril para obtener un volumen final de 12,5 µl.

Se realizó una mezcla B, adicionando 4 µl de 5x FastGene, Scriptase II buffer (NIPPON genetics., EU), 2 µl 0.1 M FastGene, Scriptase II DTT (NIPPON genetics., EU) y 0.5 µl FastGene, Scriptase II inhibidor RNasa (NIPPON genetics., EU).

Se calentó la mezcla A, a 65°C durante 5 min. y enfrió rápidamente a 4°C, se agregó la mezcla B, se incubaron a 42°C durante 2 min. y enfrió a 4°C, se adicionó 1 µl de FastGene Scriptase II enzima (NIPPON genetics., EU), y se incubo a 42°C durante 50 min. para la desactivación completa de la enzima se incubó a 70°C durante 15 min.

e) PCR tiempo real.

La expresión basada en la cuantificación relativa de los genes se realizó por duplicado en un volumen de 10 µl. Se mezclaron 2.5 µl del cDNA, 0.5 µl de cada iniciador (10 pMol), 2 µl de la mezcla de reacción [Light Cyler Fast Start (ROCHE, Life Science, DEU)] y 4.5 µl de agua. El protocolo consta 1 ciclo de Pre-incubación 10min/95°C, y 40 ciclos de amplificación que consta de: desnaturalización 10s/95°C, alineación 10s/60°C y amplificación 7s/72°C; posterior a los 40 ciclos se realizó un ciclo de curva de fusión 10s/95°C con una rampa de 4.4°C/s para llegar a 60s/65°C y 1s/97°C, y un ciclo de enfriamiento 30s/37°C. Las curvas de amplificación se analizaron con el software de Light Cyler 96 (ROCHE, Life Science, DEU). La identificación de los productos de PCR se confirmó por el análisis de las curvas de disociación, se usó un control negativo sin templado de cDNA. Las concentraciones relativas se calcularon por el método Ct (número de ciclos en el que se inicia la amplificación exponencial del templado), verificando que cada duplicado tenga la misma curva de fusión que garantiza la especificidad de amplificación del producto.

Los resultados de Ct obtenidos se normalizaron mediante doble delta y se estandarizaron mediante la comparación con el grupo Sham, según lo reportado por Rao

et. al, 2013 (52) para posteriormente comparar los grupos con tratamiento *vs* grupo control.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{una muestra objetivo}) - \Delta CT (\text{una muestra de referencia})$$

f) Método estadístico

Análisis descriptivo de los grupos para verificar la distribución de los datos.

Los datos de las determinaciones de la escala “BBB” fueron analizados utilizando una prueba de ANOVA de dos vías para datos repetidos (53) y un test de comparación múltiple Tukey con un valor crítico de $p=0.05$ para considerar estadísticamente significativo.

El análisis estadístico para RT-PCR se realizó mediante Kruskal-Wallis, con una prueba post-hoc de comparación múltiple de Dunnett, determinando una $p<0.05$ para el límite de significancia, especificando en cada resultado. Se eligió el software GraphPad Prism para realizar el análisis de los datos

8. RESULTADOS

8.1 Diseño de iniciadores para análisis de expresión

La secuencia de cada gen fue obtenida del GenBank de la base de datos de NCBI. Mediante los parámetros mencionados en la metodología, se obtuvieron las secuencias de los iniciadores (Tabla 4), que fueron probados con tejido control y estandarizados mediante gradientes de temperatura.

Tabla 4. Identificación de secuencia de genes en NCBI y generación de iniciadores

GEN	GEN BANK ID	Secuencia de primer derecho	Secuencia de primer izquierdo
GFAP	NM_017009.2	AGA AAA CCG CAT CAC CAT TC	TCC TTA ATG ACC TCG CCA TC
GAP-43	NM_017195.3	CTA AGG AAA GTG CCC GAC AG	GCA GGA GAG ACA GGG TTC AG
NT-3	NM_031073.3	GGG GGA TTG ATG ACA AAC AC	ACA AGG CAC ACA CAC AGG AA
IBA-1	D82069.1	GCTCCTCCAAGACCCAAACTAA	AGG AAG TGC TTG TTG ATC CCA T
VIM	NM_031140.1	AAT GCT TCT CTG GCA CGT CT	GCT CCT GGA TCT CTT CAT CG
B-actina	NM_031144.3	AAGCCAACCGTGAAAAG	GTGGTACGA CCAGAGGCATAC

8.2 Determinación de integridad de RNA

La integridad de RNA se analizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.8% colocando un agente intercalante como marcador de fluorescencia y muestras de interés, pudiendo observar la fracción 28 S y 18 S del RNA ribosomal. La primera línea de la figura 13 representa el corrimiento del marcador de peso molecular (MPM), las otras líneas de corrimiento electroforético son ejemplo de la extracción del RNA de algunas de las muestras de médula espinal.

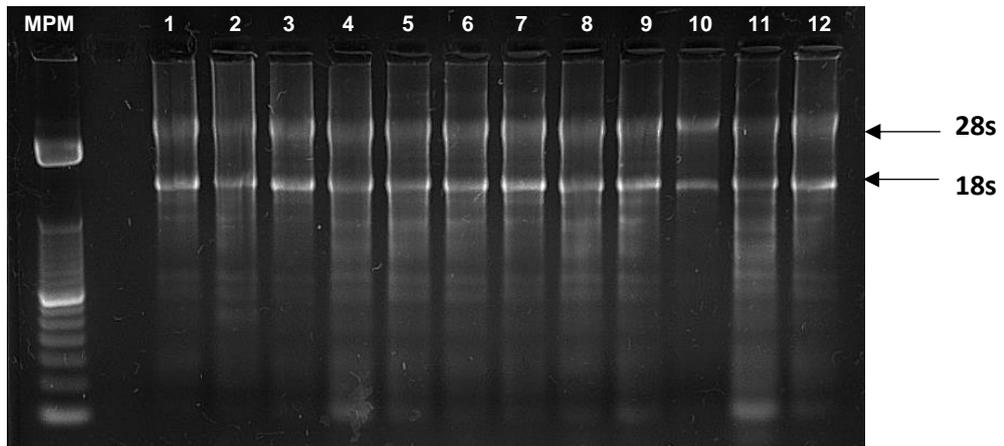


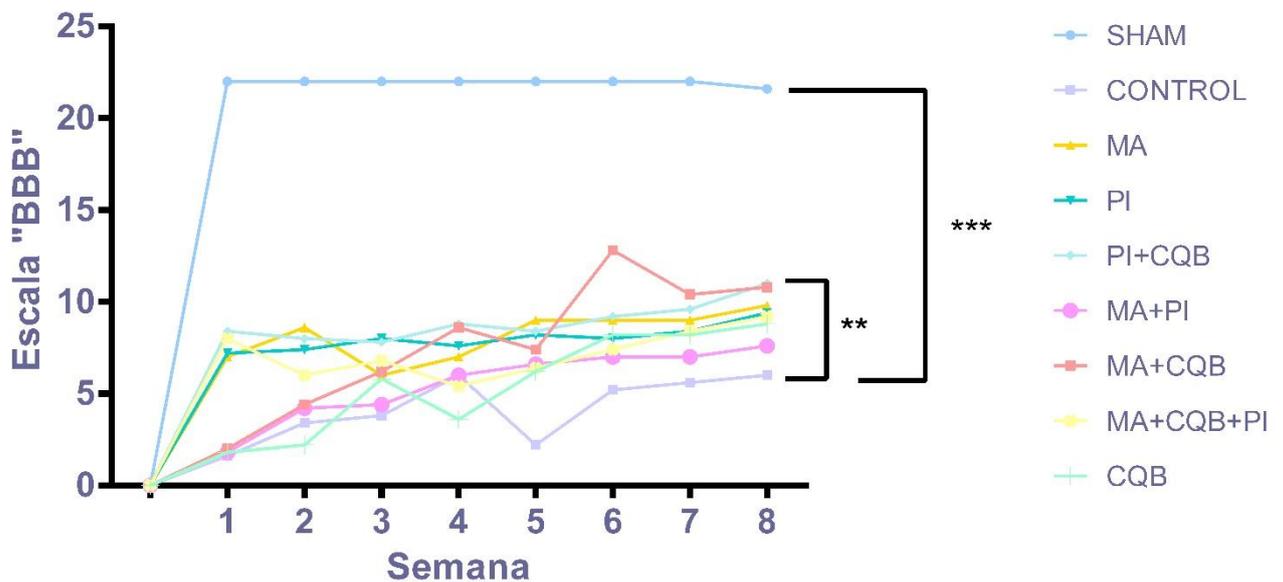
Figura 13. Determinación, en gel de agarosa al 1.8%, de la integridad de RNA obtenido de ME.

8.3 Evaluación de motilidad escala “BBB”

Uno de los objetivos a los que está encaminada la terapia para LME es la recuperación motora, mostrando una mejora en cuanto a la capacidad física de apoyo y tiempo de sustentación en el plano en los miembros pélvicos, así como la capacidad de involucrar movimientos articulares finos (Anexo I).

Durante el estudio, los animales de los 9 grupos fueron evaluados una vez por semana durante 8 semanas tomando en cuenta los criterios descritos en el Anexo II.

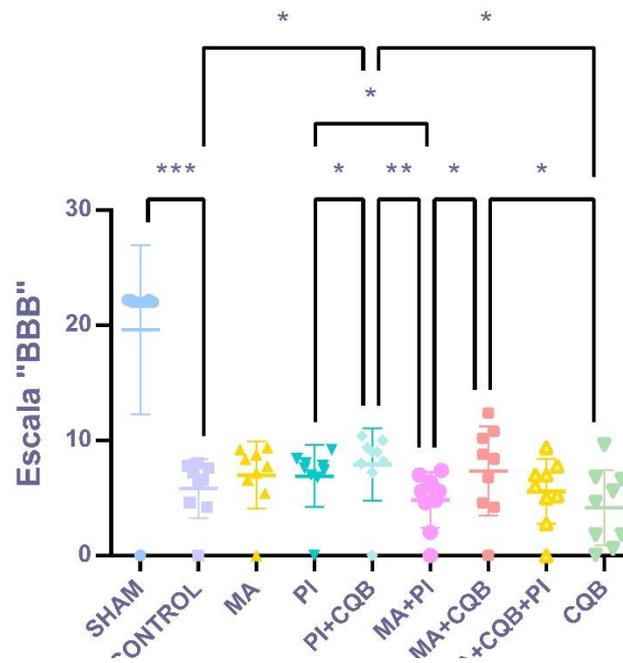
El análisis de la recuperación motriz se realizó mediante su observación durante un periodo promedio de 4 min. colocando a los animales en campo abierto y realizando estímulos auditivos y sensoriales para favorecer la locomoción, la evaluación se realizó por duplicado a doble ciego, el promedio obteniendo de los resultados por semana se encuentran representados en la Gráfica 1, donde se observa la distribución temporal de la evaluación motriz de acuerdo con la escala “BBB”



Gráfica 1. Evaluación motora a campo abierto.

Análisis semanal promedio de la recuperación motriz de los grupos tratados y no tratados con las combinaciones correspondientes. El grupo Sham presenta una diferencia significativa vs el grupo control. Los datos muestran medias \pm SEM con una $n=6$ en todos los grupos (ANOVA de dos vías con prueba post-hoc de Dunnett).

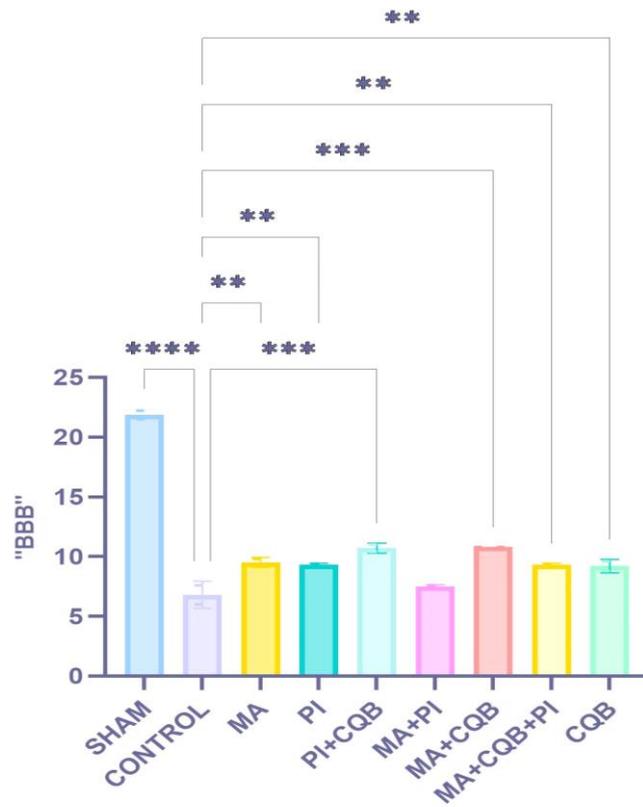
Los valores obtenidos de la evaluación motriz se analizaron mediante ANOVA de dos vías y una comparación múltiple de Dunnett mostrando una diferencia significativa entre el grupo Sham (solo laminectomía) y el grupo control (laminectomía +PBS) ($p < 0.0001$) (Gráfica 2). Posteriormente se comparó el grupo control vs cada grupo con tratamiento, en donde se encontró que los grupos PI, PI+CQB, MA+PI+ CQB, MA+CQB presentaban una $p = < 0.0001 - 0.0463$ vs grupo control corroborando con esto una diferencia significativa en estos grupos con tratamiento.



Gráfica 2. Promedio de la evaluación motora a campo abierto.

Diferencias significativas entre los grupos con diversos tratamientos

La evaluación “BBB” se llevó a término a la octava semana, obteniendo así los valores representados en la gráfica 3, en la cual se observan los grupos analizados. En cuanto a los niveles de significancia entre el grupo Sham y control mostraron una diferencia significativa con una ****p= <0.0001, los grupos en los cuales se observó mayor recuperación motriz con respecto al grupo control fueron aquellos donde se utilizó el tratamiento de combinación de CQB con PI y/o MA en los cuales se observó una ***p=0.0004 y ***p=0.0005 respectivamente. De similar forma mostrando diferencia significativa, pero con una dispersión menor encontramos a los grupos MA, PI, MA+CQB+PI, CQB mostrando una **p= 0.0078 **p=0.0128 **p=0.0128 y **p= 0.0166 respectivamente, con respecto al grupo control. El grupo MA+ PI no mostro diferencias significativas con respecto al grupo control. En cuanto a los valores asignados en la “BBB” se observó una mayor puntuación basada en esta escala con respecto al grupo control. Entre MA+CBQ vs PI+CBQ, se observó una diferencia en cuanto a la tendencia de recuperación (escala “BBB”) mayor en el grupo MA+CQB, siendo los promedios por grupo a las ocho semanas; SHAM=21 CONTROL=6.82, MA=9.5, PI=9.3, PI+CQB= 10.7, MA+PI=7.5, MA+CQB=10.8, MA+CQB+PI=9.3 y CQB=9.2.

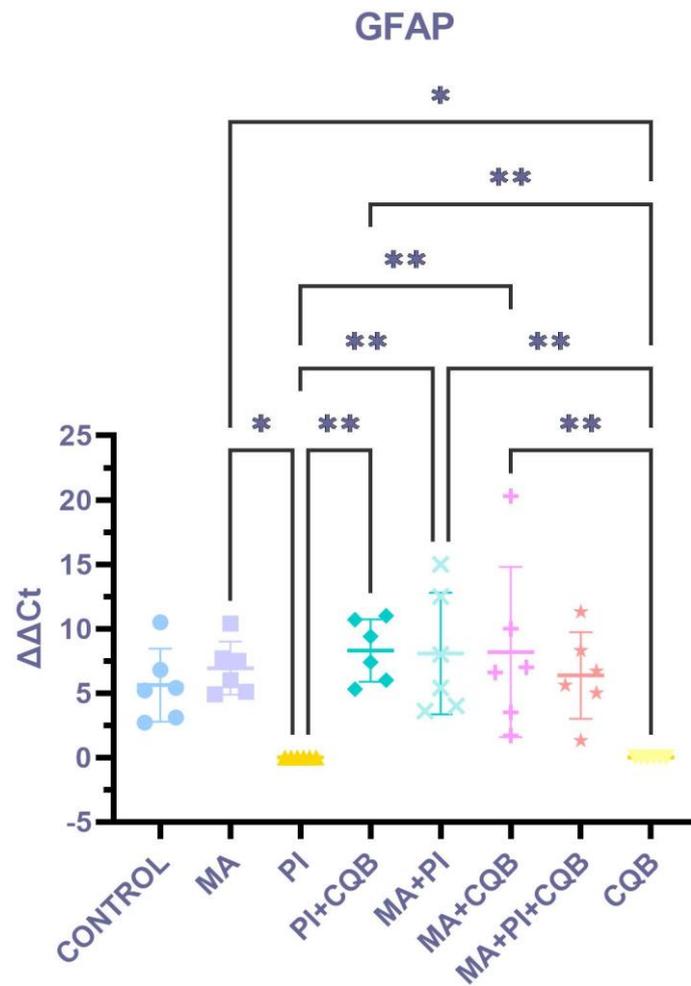


Gráfica 3. Promedio de la evaluación motora a campo abierto a las ocho semanas. Al finalizar la totalidad del tiempo de determinación de recuperación motriz mediante la escala de “BBB” a las ocho semanas, se observa que la terapia de combinación de MA+CQB y PI +CQB favorece la recuperación motriz, $**p=0.0005$ y $** p=0.0004$ comparados con el grupo control. Los datos muestran medias \pm SEM con una $n=6$ en todos los grupos (prueba post-hoc de Dunnett).

8.4 Evaluación de expresión génica

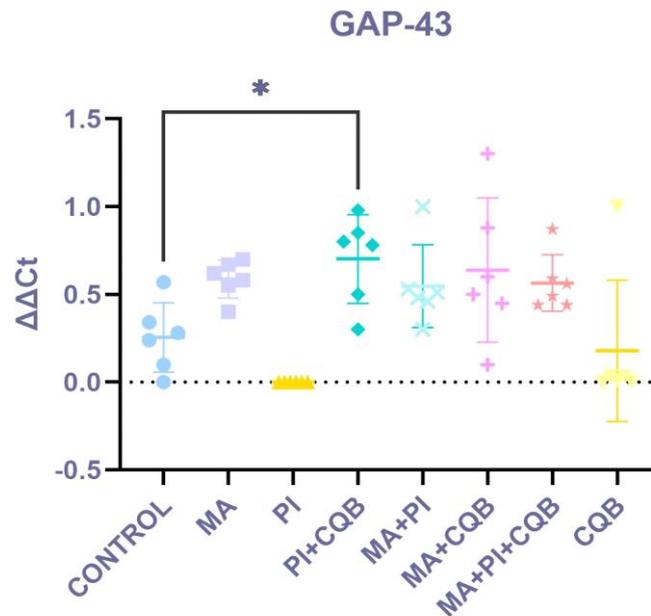
Excluyendo al gen constitutivo, usado para la normalización de la expresión, se reportan los resultados de expresión relativa de 5 genes a las 8 semanas post lesión de cada uno de los grupos. Los resultados de Ct obtenidos se normalizaron mediante doble delta y se estandarizaron mediante la comparación con el grupo Sham, El análisis estadístico se realizó mediante Kruskal-Wallis, con una prueba post-hoc de comparación múltiple de Dunnett. Así, se reportan los grupos con diferencia significativa entre los tratamientos respecto al grupo control a menos que se mencione otro grupo.

La gráfica 4 muestra la expresión génica de GFAP, mediante el análisis de $\Delta\Delta Ct$ en el cual se puede observar la disminución de la expresión del gen GFAP en los grupos PI y CQB con respecto a sus homólogos combinados con MA mostrando entre estos una $**p=0.0091$ y $**p=0.0080$ respectivamente.



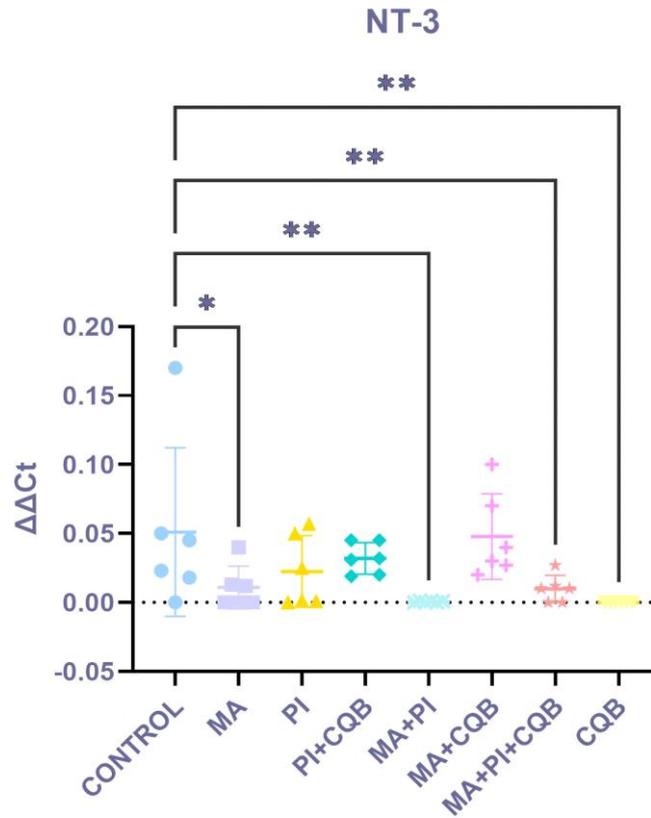
Gráfica 4. Expresión relativa del gen GFAP en muestras de ME de ratas con LME a las 8 semanas. Prueba estadística Kruskal-Wallis y comparación múltiple entre grupos. $*p<0.05$. Se muestra promedio +/- desviación estándar en cada grupo de estudio, $n=6$.

En la gráfica 5 se expresan los valores de $\Delta\Delta Ct$ obtenidos mediante la cuantificación de qPCR del gen GAP-43, mediante la cual se pudo determinar que la expresión génica se mantiene en valores similares, no obstante, en el grupo PI+CQB se presenta una diferencia significativa ($p=0.0226$), mostrando que la combinación de tratamientos favorece la expresión génica de GAP-43.



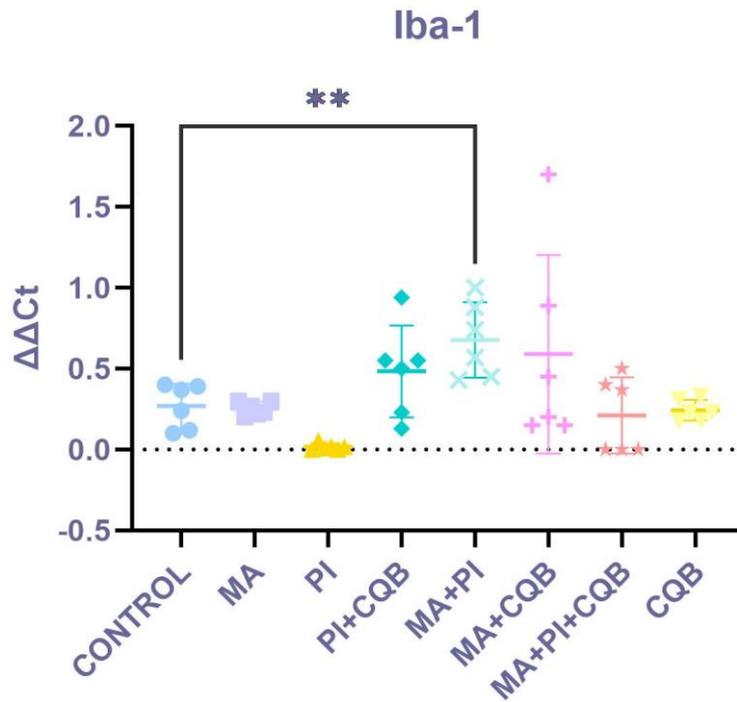
Gráfica 5. Expresión relativa del gen GAP-43 en muestras de ME de ratas con LME a las 8 semanas. Prueba estadística Kruskal-Wallis y comparación múltiple de con el grupo control. * $p<0.05$. Se muestra promedio \pm desviación estándar en cada grupo de estudio, $n=6$.

En la gráfica 6 observamos la evaluación $\Delta\Delta Ct$ del gen NT-3 mediante la cual se pudo determinar que en los grupos MA, MA+PI, MA+PI+CQB, CQB, la expresión se ve disminuida en comparación con el grupo control, considerando los grupos PI+CQB y MA+CQB los grupos con expresión relativa dentro de los rangos del grupo control



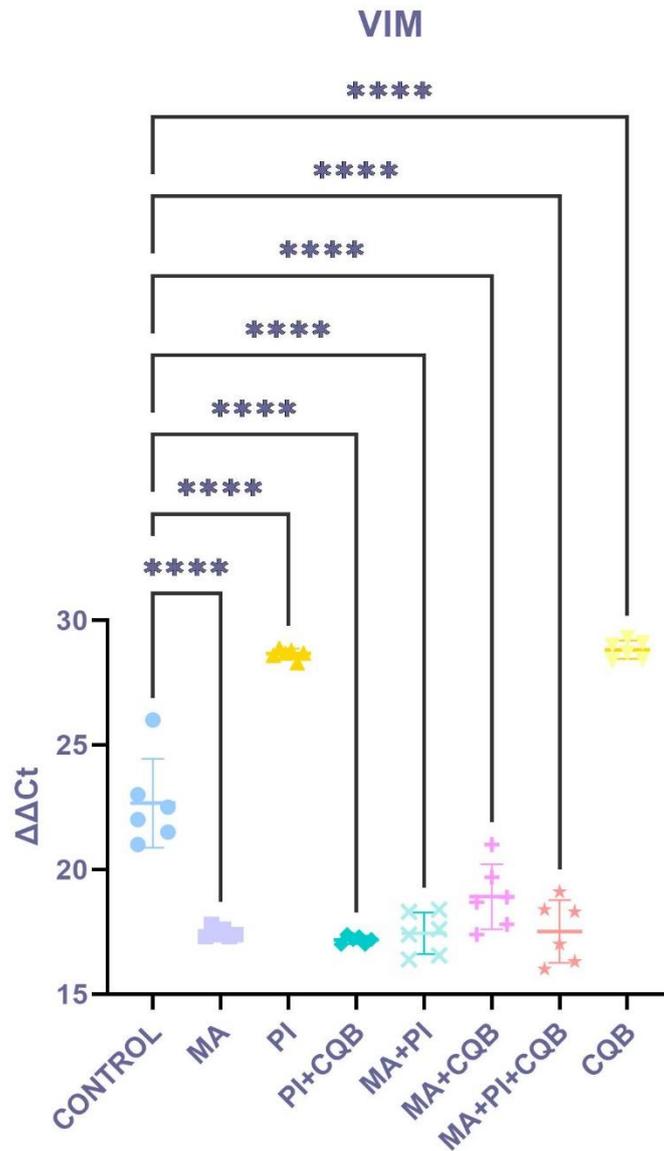
Gráfica 6. Expresión relativa del gen NT-3 en muestras de ME de ratas con LME a las 8 semanas. Prueba estadística Kruskal-Wallis y comparación múltiple de con el grupo control. * $p < 0.05$. Se muestra promedio \pm desviación estándar en cada grupo de estudio, $n = 6$.

Observando la gráfica 7 representa la evaluación de la expresión génica de Iba-1 mediante la determinación de $\Delta\Delta Ct$, se pudo observar una diferencia significativa en el grupo MA+PI con una $**p=0.093$ mostrando con esto una expresión aumentada del gen Iba-1.



Gráfica 7. Expresión relativa del gen Iba-1 en muestras de ME de ratas con LME a las 8 semanas. Prueba estadística Kruskal-Wallis y comparación múltiple de con el grupo control. $*p<0.05$. Se muestra promedio \pm desviación estándar en cada grupo de estudio, $n=6$.

En la determinación de expresión génica de VIM representada en la gráfica 8, se observó diferencia significativa en todos los grupos con respecto al grupo control siendo $p < 0.0001$. Los grupos tratados individualmente (PI y CQB) mostrando una sobreexpresión de dicho gen y grupos mixtos y MA una expresión disminuida del mismo.



Gráfica 8. Expresión relativa del gen VIM en muestras de ME de ratas con LME a las 8 semanas. Prueba estadística Kruskal-Wallis y comparación múltiple de con el grupo control. * $p < 0.05$. Se muestra promedio \pm desviación estándar en cada grupo de estudio, $n = 6$.

9. DISCUSIÓN

La LME se considera un problema frecuente en medicina humana y recientemente tomado en cuenta en la medicina veterinaria; debido a que las causas de lesión son múltiples y complejas, los tratamientos actualmente utilizados implican terapias invasivas de pronóstico no siempre favorable.

La documentación de este tipo de padecimientos es poco frecuente, sin embargo, en los últimos años se ha buscado tener un control más puntual en cuanto a la casuística. Lo cual facilita y brinda información importante para prever y anticipar los procesos que se enfrentan.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la administración terapéutica de péptido inmunomodulador y/o compuesto químico y biológico, en la recuperación motora, mediante la escala “BBB” desarrollada por Basso y cols, 1995 con el propósito de establecer una escala de calificación locomotora eficiente, ampliada e inequívoca para estandarizar las medidas de resultado locomotor posterior a LME. Dicha escala sigue estando vigente actualmente, no obstante, sigue siendo una escala de recuperación cualitativa y subjetiva.

Algunos modelos de evaluación de recuperación locomotora han reportado el uso de la escala en conjunto con electromiografía y/o evaluación de presión de superficie podal tanto en modelos murinos y especies mayores principalmente gatos (23,54,55). En los últimos años la evaluación mediante los sistemas de análisis de movimiento cinemático tridimensional, están en constante uso ya que brindan una evaluación automatizada, cuantitativa y más precisa del movimiento del miembro en cuestión. No obstante, su uso no ha abarcado un amplio campo debido a sus limitaciones con respecto a la capacitación técnica y necesidad de equipos de imagen sofisticados (56).

Tomando en cuenta lo anterior y considerando las actualizaciones en cuestión de la evaluación de recuperación locomotora, se considera importante implementar métodos cuantitativos para futuras investigaciones, sin embargo, la determinación de la recuperación motora, mediante la escala de “BBB”, ha sido implementada de manera exitosa y aplicada por varios grupos de manera eficaz.

Durante la evaluación de la recuperación locomotora de los grupos establecidos, se demostró una recuperación gradual de todos los grupos respecto al grupo control, mediante el análisis estadístico se pudo observar que el grupo MA+CQB (***) $p=0.0005$

destaco en cuanto a la recuperación seguido del grupo PI +CQB (**p=0.0004) (aunque sin diferencia significativa entre ellos) ambos grupos son de interés para la continuidad de su uso no solo en LME sino en otros modelos con patologías neurodegenerativas.

El uso de MA ha reportado anteriormente principalmente en el área de oftalmología, dermatología y procesos de osteoartritis (15,32). Sin embargo a su uso en neurología ha sido escasamente reportado y estudiado, ya que los únicos usos en esta área están relacionados con nervios periféricos, con un éxito limitado y atribuible a los biopolímeros tubulares utilizados en conjunto colocando la MA periféricamente a los nervios posterior a su anastomosis (54). En comparación, durante el presente estudio, el uso de la MA se realizó colocando directamente en la incisión de la ME con lo cual se esperaba formara una trama de red celular para favorecer la reconexión axonal. No obstante, en algunos grupos se estima pudo actuar como barrera física inicial e impedir la reconexión axonal sin necesariamente implicar formación de CG, por lo que se ha planteado utilizar la MA de manera superficial en la lesión para evitar el posible efecto de “barrera” ocasionada por la misma.

Otro de los objetivos fue analizar la expresión de genes con los diferentes tratamientos propuestos, con los genes seleccionados se buscó identificar factores de neuro modulación y formación de CG en modelos crónicos de recuperación de LME. La expresión de la mayoría de estos genes se ve afectada en la fase crónica y es modulada por los efectos inmunológicos de la fase de la lesión aguda.

El primer gen evaluado fue GFAP relacionado con la astrogliosis reactiva tras la LME, los astrocitos aumentan la expresión de filamentos intermedios, GFAP, nestina y VIM. Los astrocitos reactivos proliferan, se hipertrofian, y se movilizan hacia el lugar de la lesión, forman una estructura en forma de malla de procesos filamentosos entremezclados alrededor del epicentro de la lesión. Se ha demostrado que la CG astrocítica sirve de barrera protectora que impide la propagación de las células inmunitarias infiltradas en los segmentos adyacentes. La astrogliosis reactiva también es esencial para la reconstrucción, sin embargo, la CG se ha reportado relación con el bloqueo de la astrogliosis reactiva, proceso que conduce a una infiltración de leucocitos exacerbada, muerte celular, daño de la mielina y reducción de la recuperación funcional. A pesar del papel protector de la CG formada por GFAP en la LME aguda, su evolución y persistencia en las fases subaguda y crónica de la lesión se ha considerado un potente

inhibidor de la reparación y regeneración de la médula espinal (25). De manera simultánea en los grupos tratados con PI que es un pentapéptido que inhibe la migración de monocitos sin afectar la locomoción de otros tipos celulares como neutrófilos polimorfonucleares o eosinófilos se establece una regulación de locomoción de ciertas estripes celulares que regulan el proceso inflamatorio (26,27,34,35)

Los resultados observados en la expresión génica sugieren que la presencia de MA en los tratamientos propuestos aumenta la expresión de GFAP, aunque la sobre expresión génica de GFAP en grupos con MA no comprueba la transducción proteica, se puede suponer que histológicamente se observará formación de CG en los grupos mencionados; de manera contrastada se observa que los tratamientos individualmente disminuyen la expresión del gen GFAP en comparación con el grupo control.

Contrastando estos resultados con otros análisis de expresión génica y concentraciones séricas, es importante destacar que los enfoques estándares de las terapias en modelos de LME están dirigidos a los procesos descritos en las fases agudas (24, 48 y 72 hrs.) donde se estima que los valores antes mencionados regresan a una concentración basal 72 horas posterior a la LME.

En diversos estudios reportados por Leinster y cols, (39) se sugiere la medición de concentraciones serológicas y en LCR de GFAP como predictores de la severidad de LME, en etapas tardías de lesión aguda; por lo cual podría ser utilizado en futuras investigaciones como predictor de severidad y herramienta de pronosis, así como evaluar las concentraciones séricas de GFAP en modelos de LME crónicos.

A pesar de la perspectiva histórica de que la CG es una barrera mecánica para la regeneración, las moléculas inhibitoras en la cicatriz en formación y los métodos para superarlas han sugerido estrategias de modificación molecular para permitir el crecimiento neuronal y la regeneración funcional (55). Para lo cual es necesario implementar métodos de observación directa de la formación de CG, métodos comúnmente utilizados es la inmunohistoquímica (IHC) utilizando anticuerpo anti GFAP para determinar la presencia de esta proteína en los astrocitos de la zona de lesión permitiendo observar formación de cicatriz glial. Existen métodos novedosos utilizados recientemente para la evaluación tisular que no implican la sección del tejido y favorece la observación tridimensional del tejido, la técnica lleva el nombre de Clarity

es una técnica de obtención de imágenes de tejidos que utiliza tejidos embebidos en hidrogeles para eliminar los lípidos manteniendo intactas las proteínas y la estructura fina del tejido (57). Clarity se ha utilizado ampliamente en el campo de la reconstrucción tridimensional de tejidos intactos y el análisis de información biomolecular, lo que mejora la capacidad para obtener información biológica estructural y molecular de sistemas intactos (57). La técnica de inmunotinción por Clarity esta propuesta para la siguiente parte del proyecto, con lo cual se pretende tener imágenes de utilidad para complementar el presente estudio.

De manera conjunta la proteína VIM tiene la capacidad de formar una red de filamentos, que contribuye a la formación de la CG, otras de las funciones descritas son la regulación de la adhesión, migración y traducción de señales, así mismo se asocia con la lipoperoxidación (49). Tomando esto en cuenta y según lo reportado, se prevé encontrar que la VIM ubicada en los astrocitos aumenta significativamente en los tejidos cicatriciales después de la LME incluidos nestina, VIM y GFAP, se conocen como el principal obstáculo para la regeneración nerviosa (50).

En el estudio realizado por Pekny M. y cols. 2007 (58), se menciona la VIM como regulador de la neuro plasticidad, usando ratones deficientes en GFAP y VIM. Se demostró que los astrocitos reactivos en una etapa temprana después neurotrauma tienen un efecto neuroprotector, mientras que, en una etapa posterior, parece promover la formación de cicatrices, de modo de impedir la neurogénesis y la regeneración axonal. Evaluando los resultados obtenidos se puede observar el aumento de la expresión de gen VIM en los tratamientos individuales, por el contrario, los tratamientos en conjunto y con MA se expresaron a la baja lo cual podría favorecer la posible interconexión.

Lo observado en los resultados obtenidos del presente análisis con respecto a VIM discrepa del estudio realizado en el 2014 por Qian B. y cols. (50), en el cual se observó que la eliminación de la VIM en los tejidos de la cicatriz mostraba una mejora significativa de la función locomotora en los miembros posteriores, mientras que la sobreexpresión de la VIM mostró un efecto opuesto. De manera similar en estudios previos realizados por Parra y cols, (18), se determinó la cantidad de colágeno en el sitio de lesión como resultado de un proceso ocurrido durante un estadio crónico es la sustitución del tejido funcional por la CG delimitada por astrocitos protoplásmicos y proteínas de matriz extracelular (colágeno principalmente), se observó que en los tratamientos donde se aplicó el PI existe una menor área de colágena en los tejidos, así

mismo demostraron que el PI en conjunto con CQB modulan la expresión de genes pro/anti apoptóticos, “suponiendo” con esto una posible disminución en la expresión de VIM.

Dentro de los genes de interés involucrados en la formación de CG se encuentra Iba-1 actúa cooperativamente con la pequeña proteína G Reactiva, molécula clave en la activación de la microglia, cuyo rol es dirigir la reorganización del citoesqueleto de actina. Esta remodelación es importante para los eventos celulares desencadenados luego de la activación, entre los cuales se encuentran la proliferación, migración, fagocitosis y producción de agentes bioactivos (45), sin embargo, pocos estudios han evaluado su expresión génica ya que se encuentra más relacionado con su uso en IHC. En el presente estudio se pudo observar una expresión aumentada del gen Iba-1 en el grupo MA+PI. En uno de los estudios donde se evaluó la expresión génica de Iba-1 realizado por Sandhir R y cols, (59) muestran una expresión elevada de los marcadores de activación microglial, CD11b e Iba-1, en el hipocampo a nivel transcripcional e Iba-1 a nivel traduccional después de LME por contusión. La activación máxima se observó después de 3 días de lesión tanto en ratones adultos como envejecidos. Lo cual también tiene que ser considerado en los modelos de LME crónica, cuya determinación de expresión en otro modelo fue a los dos meses post lesión/tratamiento. Anteriormente fue reportado que Iba-1 coopera con la L-fimbrina en la modulación de la reorganización de la actina para facilitar la migración celular y la fagocitosis por parte de la microglía (47), sin embargo también se sabe que además de proporcionar apoyo trófico y metabólico a las neuronas dañadas, desactivando especies tóxicas y eliminando restos celulares, existe una creciente evidencia de que la respuesta también puede ser perjudicial para las neuronas, ya que la microglía y los astrocitos activados pueden producir una variedad de moléculas potencialmente neurotóxicas que están implicadas en la neurodegeneración (59), por lo cual se considera un factor importante la regulación de los procesos relacionados con la astrogliosis como lo menciona en su estudio Parra y cols, (18) tanto los grupos tratados con CQB y PI regulan positivamente los procesos de regeneración favoreciendo la recuperación motriz, en modelos crónicos.

La evaluación de dos genes que codifican la expresión de proteínas relacionadas con la neuro modulación han sido ampliamente reportados, el primero de ellos es GAP-43 el cual ha sido detectado en diferentes tipos de lesiones de nervios periféricos y SNC,

donde su expresión aumenta notablemente durante el proceso de recuperación (11,43,44,60) debido a que regula la dinámica de la actina y el ciclo de vesículas presinápticas en las terminales de los axones, lo que facilita el crecimiento, la regeneración y la plasticidad de los axones (41) los grupos evaluados durante el estudio mostraron una expresión mayor al grupo control cuando se utilizó el tratamiento PI+CQB lo cual podría estar relacionado estrechamente con los estímulos constantes y formación crónica de CG, lo cual provoca que las neuronas y la glía comienzan con la liberación de citocinas y factores neurotróficos, que pueden activar proteínas asociadas al crecimiento como GAP-43 y BASP1 (gen y proteína que también es de interés estudiar a futuro) para promover la neuroprotección y la regeneración de manera crónica. Por otro lado, observaciones experimentales sugieren que las células madre derivadas de la MA actúan benéficamente por sus efectos inmunomoduladores e inmunorreguladores (37), sin embargo, los resultados de expresión génica no arrojaron información respecto al aumento de expresión en los grupos tratados con MA

Los resultados de la expresión génica NT-3 muestran que los grupos MA, MA+PI, MA+PI+CQB, CQB se ven desfavorecidos, de manera contrastada los grupos PI, PI+CQB, MA+CQB se mantiene similares con respecto al grupo control. Otros estudios han demostrado que el BDNF, NT-3 y NT-4/5 pueden proteger de la muerte neuronal inducida por estrés oxidativo. Sin embargo un estudio de células madre hematopoyéticas realizado por Xiong L y cols, (61) en modelos crónicos de LME en el cual veinticuatro semanas después de LME, la determinación de expresión por qRT-PCR mostró que la expresión de ARNm de NT-3 y MEK-1 disminuyó significativamente, por tal motivo se plantea que el decremento de los niveles de NT-3 está relacionado con la temporalidad ya que después de 72 hrs se observó su expresión niveles basales. Para lo cual en los modelos evaluados después de 8 semanas podía no estar presente y sería interesante verificar la expresión de NT-3 y otros genes y proteínas neuro protectoras a diferentes tiempos, cuya expresión, sin duda, estaría aumentada en algún momento crítico de la lesión, considero de importancia llevar a cabo la medición de expresión tanto génica como traducción proteica de NT-4 y 5 para conocer la participación de ellos en este modelo; así como realizar la medición en modelos agudos de LME.

Según los resultados observados y según las perspectivas futuras acerca del estudio del uso de estas terapias considero necesario explorar más sobre la diferenciación de

activación de astrocitos reactivos y el efecto que tienen los tratamientos sobre sus diferenciación astrocítica, así mismo implementar mediciones séricas de los factores de expresión de las proteínas evaluadas, para obtener datos del comportamiento y niveles de expresión durante las ocho semanas de evaluación, de manera complementaria se sugiere la evaluación de otros genes involucrados tanto en el proceso pro inflamatorios, regeneración axonal y formación de CG (IL-6, IL-12, COX-2, IFN- γ , TNF- α , CXCR1, IL-1 β , IL-10, IL-4, TGF- β 3, SOD-1, SOD-2, iNOS, MPO, BASP1, BDNF)

El uso de técnicas histológicas como lo es Clarity junto con la inmuno tinción de las proteínas de interés permite confirmar la transducción proteica, así como la conformación de la CG (en caso de encontrarse) supone una correlación directa con los resultados presentados actualmente. Se sugiere el uso de MA colocado de manera superficial en la lesión.

Dentro de los tratamientos propuestos en el presente estudios y relacionando los resultados obtenidos en observaciones pasadas (18,27,34,35) planteo como una buena opción terapéutica el uso de PI +CQB en procesos transquirúrgicos, descompresivos o reconstructivos, considerar su uso en terapias mínimamente invasivas y, estudiar la vía de administración i.v o i.p únicamente para los procesos que no requieran intervención quirúrgica.

10. CONCLUSIONES

La combinación terapéutica del PI+CQB modula la expresión de los genes involucrados en la neuro modelación y formación de CG y favorece la recuperación motriz.

La expresión génica puede estar influenciada por la temporalidad del modelo crónico.

La MA puede actuar como barrera física para la reconexión axonal, y regular la expresión génica.

11. PERSPECTIVAS

- La segunda fase del presente estudio consta de evaluar histológicamente la transducción de las proteínas mediante la técnica Clarity (57).
- En la misma línea de investigación se busca establecer un protocolo para el uso de MA de manera superficial en la zona seccionada.
- Relacionar el efecto de los tratamientos con respecto a la diferenciación astrocítica.
- Evaluar la administración del tratamiento únicamente por vía i.v o i.p.
- Determinar la expresión de los genes analizados a diferentes tiempos durante la fase aguda-crónica.

12. REFERENCIAS

1. Olby N. The Pathogenesis and Treatment of Acute Spinal Cord Injuries in Dogs. *Vet Clin N Am - Small Anim Pract* [Internet]. 2010;40(5):791–807. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195561610000653>
2. Padilla ZH, Ramos VY, Raphael AMH, Joaquin AF, Moscote SL, Moscote L. Fisiopatología del trauma raquimedular. *Rev Mex Neuroci* . 2017;18(5):46–53.
3. Ballesteros P, Pacheco B, Martínez A, Flederman V, Zamorano P. Lesión de la médula espinal. Actualización bibliográfica: Fisiopatología y tratamiento inicial. *Coluna*. 2012;11(1):73–6.
4. Fitch MT, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol* [Internet]. 2008;209(2):294–301. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488607002130>
5. Karri J, Li S, Chen YT, Stampas A, Li S. Observations of Autonomic Variability Following Central Neuromodulation for Chronic Neuropathic Pain in Spinal Cord Injury. *Neuromodulation* [Internet]. 2021;24(3):427–33. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1094715921000362>
6. Beck KD, Nguyen HX, Galvan MD, Salazar DL, Woodruff TM, Anderson AJ. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: Evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain*. 2010;133(2):433–47.
7. Lanzillotta A, Porrini V, Bellucci A, Benarese M, Branca C, Parrella E, et al. NF- κ B in innate neuroprotection and age-related neurodegenerative diseases. *Front Neurol*. 2015;6(98):1–8.
8. Chacón SC, Nieto SM. Fisiopatología de la lesión medular. Revisión de literatura Pathophysiology of spinal cord injury. *Vet Méx*. 2005;36(1):75–86.
9. Matamala F, Paredes M, Cornejo R. Efecto del Láser de Baja Energía sobre la Expresión de GAP-43 (Growth Associated Protein 43) en Nervio Isquiático Lesionado de Rata. *Int J Morphol*. 2010;28(3):815–21.
10. Hodgetts S, Harvey A. Neurotrophic Factors Used to Treat Spinal Cord Injury. In: Litwack G, editor. *Vitamins and Hormones* [Internet]. Academic Press; 2017. p. 405–57. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S008367291630067X>
11. Hanlon LA, Raghupathi R, Huh JW. Depletion of microglia immediately following traumatic brain injury in the pediatric rat: Implications for cellular and behavioral pathology. *Exp Neurol* [Internet]. 2019;316:39–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488619300652>
12. Rodríguez SA, Cervera E, Valencia VG, Villalba AP. Revisión de tema: Biomarcadores neuronales y gliales como estrategia de clasificación cuantitativa de la severidad del trauma craneoencefálico. *Salud Uninorte*. 2016;36(2):302–18.

13. Marino MI, Martínez CAG, Peña MVM, Acosta OCA, Vílchez CF, Guzmán LA, et al. Human amniotic membrane intra-articular injection prevents cartilage damage in an osteoarthritis model. *Exp Ther Med* [Internet]. 2018/11/02. 2019;17(1):11–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30651759>
14. Klein BG. Neurofisiología. In: *Cunningham Fisiología Veterinaria* [Internet]. 6a ed. 2020. p. 215–315. Available from: <http://ebooks.elsevier.com>
15. Coward LA. *Towards a theoretical neuroscience: From cell chemistry to cognition*. 1st ed. Vol. 8, *Towards a Theoretical Neuroscience: From Cell Chemistry to Cognition*. Boston: Springer Netherlands; 2013. 1–443 p.
16. Ross M, Pawlina W. *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular*. 8th ed. Panamericana; 2018. 352–363 p.
17. Netzahualcoyotzi C. *Estrategias de neuroprotección para el proceso degenerativo de las motoneuronas espinales inducido por excitotoxicidad in vivo* [Tesis doctoral]. [México]: Universidad nacional autónoma de México ; 2016.
18. Parra VDM. *Estrategia neuroprotectora de péptidos inmunomoduladores en animales con lesión traumática de médula espinal* [Tesis de maestría]. [México]: Instituto Politécnico Nacional; 2017.
19. Klemens J, Ciurkiewicz M, Chludzinski E, Iseringhausen M, Klotz D, Pfankuche VM, et al. Neurotoxic potential of reactive astrocytes in canine distemper demyelinating leukoencephalitis. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):11689. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48146-9>
20. Nelson R, Couto G. Transtornos neuromusculares. In: *Medicina Interna de Pequeños Animales*. 6th ed. Barcelona: Elsevier Sic; 2013. p. 983–1026.
21. Park E, White G, Tiebier L. Mechanisms of injury and emergency care of acute spinal cord injury in dogs and cats. *J Vet Emerg Crit Care*. 2012;22(2):78–160.
22. Webb AA, Ngan S, Fowler JD. Spinal cord injury I: A synopsis of the basic science. *Can Vet J* [Internet]. 2010;51(5):485–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20676289>
23. Martinez M, Delivet-Mongrain H, Leblond H, Rossignol S. Recovery of hindlimb locomotion after incomplete spinal cord injury in the cat involves spontaneous compensatory changes within the spinal locomotor circuitry. *J Neurophysiol* [Internet]. 2011;106:1969–84. Available from: www.jn.org
24. Quadri SA, Farooqui M, Ikram A, Zafar A, Khan MA, Suriya SS, et al. Recent update on basic mechanisms of spinal cord injury. *Neurosurg Rev* [Internet]. 2020;43(2):425–41. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10143-018-1008-3>
25. Alizadeh A, Dyck SM, Karimi AS. Traumatic spinal cord injury: An overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms. *Front Neurol*. 2019;10(282):1–25.
26. Vilchis J, Villamar D, Toscano ZJ, Espinoza L, Garcia J, Garcia R. *Current Developments in Antioxidant Therapies for Spinal Cord Injury*. In: Ibarra A, Guizar S, Garcia R, editors. *spinal Cord Injury Therapy*. 1st ed. Ciudad de México; 2019. p. 161–254.

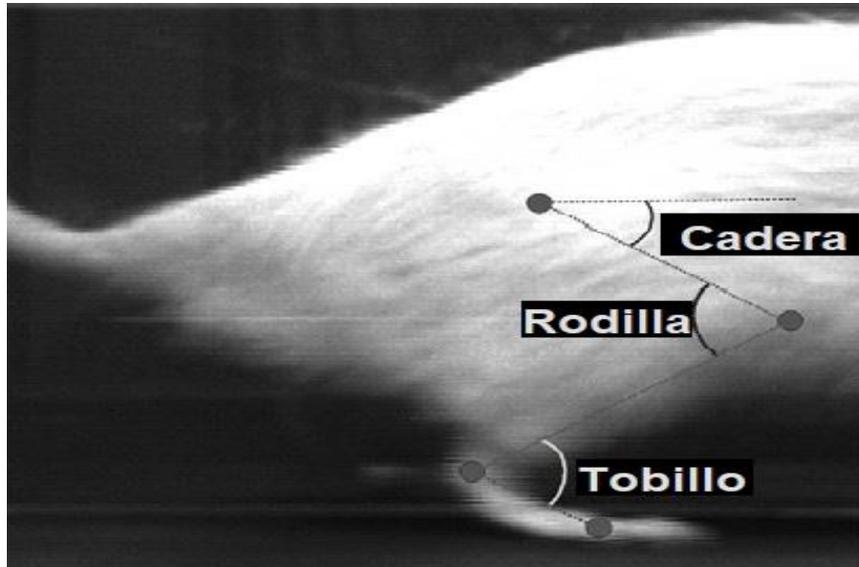
27. Vilchis J. Evaluación del efecto inmunomodulador de péptidos en el estrés oxidativo y respuesta inflamatoria en animales con lesión traumática de médula espinal [Tesis de maestría]. [México]: Universidad Nacional Autónoma De México; 2019.
28. Vidal PM, Lemmens E, Dooley D, Hendrix S. The role of “anti-inflammatory” cytokines in axon regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013;24(1):1–12.
29. Constanza L, María M, Ariza M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova.* 2012;10(18):135–250.
30. Carvajal CC. Especies reactivas del oxígeno: Formación, función y estrés oxidativo. *Med leg Costa Rica.* 2019;36(1):91–100.
31. Moreno C J. Determinación del deterioro cognitivo y su relación con los niveles séricos de vitamina B12 y folatos en pacientes con esclerosis múltiple [Tesis de maestría]. [México]: Universidad Autónoma de Querétaro; 2018.
32. Flores A L, Gabriel O G, Pacheco M FP, Bitzer Q OK, Ortiz G. Mecanismos patogénicos en el desarrollo de la esclerosis múltiple: ambiente, genes, sistema inmune y estrés oxidativo. *Invest Clin.* 2015;56(1):201–14.
33. Kretschmer RR, Rico G, Giménez JA. A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 2001;112(2):201–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685100003674>
34. Bermeo G, Ibarra A, García E, Flores RA, Rico RG, Marroquín R, et al. Monocyte Locomotion Inhibitory Factor Produced by *E. histolytica* Improves Motor Recovery and Develops Neuroprotection after Traumatic Injury to the Spinal Cord. Jaeschke H, editor. *Biomed Res Int* [Internet]. 2013;2013:340727. Available from: <https://doi.org/10.1155/2013/340727>
35. Herrera GJ. Evaluación del efecto del FILM en la recuperación motora y expresión de genes de fase aguda en ratas con lesión traumática de la médula espinal. Universidad Nacional Autónoma de México ; 2017.
36. Farhadhosseinabadi B, Farahani M, Tayebi T, Jafari A, Biniazan F, Modaresifar K, et al. Amniotic membrane and its epithelial and mesenchymal stem cells as an appropriate source for skin tissue engineering and regenerative medicine. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46:431–40.
37. Insausti CL, Rodríguez M, Castellanos G, Moraleta JM. Propiedades inmunomoduladoras de las células madre de la membrana amniótica. *Nuevas perspectivas. Rev Hematol Mex.* 2014;15:11–20.
38. Mligiliche N, Endo K, Okamoto K, Fujimoto E, Ide C. Extracellular matrix of human amnion manufactured into tubes as conduits for peripheral nerve regeneration. *J Biomed Mater Res.* 2012;63(5):591–600.
39. Leister I, Haider T, Mattiassich G, Kramer JLK, Linde LD, Pajalic A, et al. Biomarkers in Traumatic Spinal Cord Injury Technical and Clinical Considerations: A Systematic Review. Vol. 34, *Neurorehabil. Neural Repair.* SAGE Publications Inc.; 2020. p. 95–110.

40. Brahmachari S, Fung YK, Pahan K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci* [Internet]. 2006;26(18):4930–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16672668>
41. Chung D, Shum A, Caraveo G. GAP-43 and BASP1 in Axon Regeneration: Implications for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020;8:537–67. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.567537>
42. Carriel V, Garzón I, Campos A, Cornelissen M, Alaminos M. Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014;11(1):553–63.
43. Bhattacharyya S, Dinda A, Vishnubhatla S, Anwar MF, Jain S. A combinatorial approach to modulate microenvironment toward regeneration and repair after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett* [Internet]. 2021;741:135–500. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394020307709>
44. Castillo PD, Rivas AS. Interacción entre factores neurotróficos y especies reactivas de oxígeno en los mecanismos de muerte y proliferación celular. *Arch Neurocienc*. 2011;16(1):26–32.
45. Porte AS. Microglia en la neurotoxicidad inducida por manganeso: vías de muerte celular y respuesta neuronal [Tesis doctoral]. [Buenos Aires]: Universidad De Buenos Aires; 2018.
46. Rangasamy SB, Soderstrom K, Bakay RAE, Kordower JH. Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease. In: Björklund A, Cenci MA, editors. *Prog Brain Res* [Internet]. Elsevier; 2010. p. 237–64. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612310840130>
47. Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem*. 2004;88(4):844–56.
48. Mikkelsen HB, Huizinga JD, Larsen JO, Kirkeby S. Ionized calcium-binding adaptor molecule 1 positive macrophages and HO-1 up-regulation in intestinal muscularis resident macrophages. *Anat Rec* [Internet]. 2017/02/12. 2017;300(6):1114–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27860408>
49. de Oliveira AM. Lipoxidación de vimentina y su interacción con zinc [Tesis Doctoral]. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; 2019.
50. Qian BJ, You L, Shang FF, Liu J, Dai P, Lin N, et al. Vimentin Regulates Neuroplasticity in Transected Spinal Cord Rats Associated with miRNA138. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2015;51(2):437–47. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8745-2>
51. Basso M, Beattie M, Bresnahan J. A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats. *J Neurotrauma*. 1995;12(1):1–21.
52. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat bioinforma*

- biomath [Internet]. 2013;3(3):71–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25558171>
53. Scheff stephen, Saucier D, Cain M. A Statistical Method for Analyzing Rating Scale Data: The BBB Locomotor Score. *J Neurotrauma*. 2002;19(10):60–1251.
 54. Hariri R, Kaplunovsky A, Murphy P. Biotejido de colágeno y métodos de preparación y uso del mismo. 2014. p. 1–25.
 55. Fitch M, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol* [Internet]. 2008;2(209):294–301. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488607002130>
 56. Wong J, Shah PK. 3D kinematic gait analysis for preclinical studies in rodents. *J Vis Exp*. 2019 Aug 1;2019(150):1–17.
 57. Guo Z, Zheng Y, Zhang Y. CLARITY techniques based tissue clearing: types and differences. *Folia Morphol*. 2021;1–12.
 58. Pekny M, Wilhelmsson U, Bogestål YR, Pekna M. The Role of Astrocytes and Complement System in Neural Plasticity. In: *Int Rev Neurobiol* [Internet]. Academic Press; 2007. p. 95–111. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074774207820058>
 59. Sandhir R, Onyszchuk G, Berman N. Exacerbated glial response in the aged mouse hippocampus following controlled cortical impact injury. *Exp Neurol* [Internet]. 2008/07/02. 2008;213(2):372–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18692046>
 60. Rodríguez BR. Evaluación de ratas con lesión crónica de la médula espinal tratadas con una estrategia de combinación para mejorar el efecto restaurador de la inmunización con el péptido A91. [México]: Universidad Autónoma Metropolitana ; 2017.
 61. Xiong LL, Liu F, Deng SK, Liu J, Dan QQ, Zhang P, et al. Transplantation of Hematopoietic Stem Cells Promotes Functional Improvement Associated with NT-3-MEK-1 Activation in Spinal Cord-Transected Rats. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2017;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2017.00213>

13. ANEXOS

I. Articulaciones analizadas durante la evaluación motora a campo abierto.



Movimientos evaluados:

1. Apoyo plantar
2. Coordinación
3. Flexión
4. Extensión

II. Escala de calificación locomotora propuesta por Basso, Beattie y Bresnahan (48).

Puntuación	Atributos
0	No hay movimiento observable de las extremidades posteriores.
1	Ligero movimiento de una o dos articulaciones, generalmente de cadera y/o rodilla.
2	Movimiento extensivo de una articulación o movimiento extensivo de una articulación y ligero movimiento de la otra.
3	Extenso movimiento de dos articulaciones.
4	Ligero movimiento de las tres articulaciones de las extremidades posteriores.
5	Ligero movimiento de dos articulaciones y amplio movimiento de la tercera articulación.
6	Extenso movimiento de dos articulaciones y ligero movimiento de la tercera articulación.
7	Extenso movimiento de las tres articulaciones en las extremidades posteriores.
8	Barrido sin soporte de peso o soporte plantar de la pata sin soporte de peso.
9	Soporte plantar de la pata con soporte de peso solo en la etapa de apoyo (es decir, cuando está estático) u ocasional, frecuente o inconsistente paso dorsal con soporte de peso y sin paso plantar.
10	Paso plantar con carga de peso ocasional y sin coordinación entre las extremidades anteriores y posteriores.
11	Paso plantar con carga de peso frecuente a constante y coordinación ocasional de las extremidades anteriores y posteriores.
12	Paso plantar con carga de peso frecuente a constante y coordinación ocasional de las extremidades anteriores y posteriores.
13	Paso plantar con carga de peso frecuente a constante y coordinación frecuente de las extremidades anteriores y posteriores.
14	Paso plantar con soporte de peso consistente, coordinación consistente de la extremidad delantera y posición predominantemente rotada de la pata (interna o externamente) durante la locomoción tanto en el instante de contacto inicial con la superficie como antes de mover los dedos de los pies al final de la etapa de soporte o paso plantar frecuente, coordinación constante de la extremidad delantera y paso dorsal ocasional.

Continuación de Anexo II. Escala de calificación locomotora propuesta por Basso, Beattie y Bresnahan.

15	Paso plantar consistente, coordinación constante de la extremidad delantera y sin movimiento de los dedos de las patas o movimiento ocasional durante el movimiento hacia adelante de la extremidad; posición predominante de la pata es paralela al cuerpo en el momento del contacto inicial.
16	El paso plantar consistente y la coordinación de la extremidad trasera durante la marcha y el movimiento de los dedos de las patas ocurre con frecuencia durante el movimiento hacia adelante de la extremidad; la posición predominante de la pata es paralela al cuerpo en el momento del contacto inicial y curvada en el instante del movimiento.
17	El paso plantar consistente y la coordinación de la extremidad trasera durante la marcha y el movimiento de los dedos de las patas ocurre con frecuencia durante el movimiento hacia adelante de la extremidad; la posición predominante de la pata es paralela al cuerpo en el momento del contacto inicial y en el instante de movimiento de los dedos.
18	El paso plantar consistente y la coordinación de la extremidad trasera durante la marcha y el movimiento de los dedos de las patas se produce constantemente durante el movimiento hacia adelante de la extremidad; la posición predominante de la pata es paralela al cuerpo en el momento del contacto inicial y curvada durante el movimiento de los dedos.
19	El paso plantar consistente y la coordinación de la extremidad trasera durante la marcha y el movimiento de los dedos de las patas se produce constantemente durante el movimiento hacia adelante de la extremidad; la posición predominante de la pata es paralela al cuerpo en el instante de contacto y en el momento del movimiento de los dedos de las patas, y el animal presenta una cola hacia abajo parte o todo el tiempo.
20	El paso plantar consistente y la coordinación de la extremidad trasera durante la marcha y el movimiento de los dedos de las patas se produce constantemente durante el movimiento hacia adelante de la extremidad; la posición predominante de la pata es paralela al cuerpo en el instante de contacto y en el momento del movimiento de los dedos de las patas, y el animal presenta una elevación constante de la cola y la inestabilidad del tronco.
21	Paso plantar consistente y marcha coordinada, movimiento consistente de los dedos de las patas; la posición de la pata es predominantemente paralela al cuerpo durante toda la etapa de soporte; estabilidad constante del tronco; elevación constante de la cola

Notas.

Ligero: Movimiento parcial de la articulación, por debajo de la mitad del rango de movimiento de la articulación.

Extensa: Movimiento parcial de la articulación por encima de la mitad del rango de movimiento de la articulación.

Movimiento de pedaleo: Movimiento rítmico de la extremidad posterior en la que se extienden sus tres articulaciones, luego completamente flexionadas y una vez más extendidas. El animal generalmente se inclina hacia los lados, la superficie plantar de la pata puede o no tocar el suelo, ningún soporte de peso corporal es evidente sobre toda la superficie de la pata trasera.

Sin soporte de peso: Contracción de los músculos extensores de la extremidad posterior durante el paso plantar de la pata o sin elevación del muslo.

Con soporte de peso: Contracción de los músculos extensores de la extremidad posterior durante el paso plantar de la pata o la elevación del muslo.

Paso plantar: La pata está en contacto plantar con el soporte de peso, seguido por el movimiento hacia adelante de la extremidad hasta que se restablezca el contacto plantar con el soporte de peso.

Paso dorsal: El peso es soportado por la superficie dorsal de la pata en un punto del ciclo de paso.

Coordinación de las extremidades delanteras y posteriores: Por cada paso de la extremidad delantera se da un paso con la extremidad posterior y las extremidades posteriores alterna.

Ocasional: Menos o igual de la mitad de las veces, < 50%. Frecuente: Más de la mitad, pero no siempre, 51- 94%.

Consistente: Casi siempre o siempre, 95 – 100%.

Inestabilidad del tronco: Lateralización del peso que causa oscilación de un lado a otro o colapso parcial del tronco.