



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA TIBOLONA EN LA INFLAMACIÓN Y LA RECUPERACIÓN MOTORA EN  
UN MODELO DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**B.Q.D. FREYERMUTH TRUJILLO XIMENA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANGÉLICA BERENICE COYOY SALGADO**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

**DRA. MARÍA DE LOS ANGELES ARACELI DÍAZ RUIZ**

DEPARTAMENTO DE NEUROQUÍMICA, INNN

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. SEPTIEMBRE, 2023.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA TIBOLONA EN LA INFLAMACIÓN Y LA RECUPERACIÓN MOTORA EN  
UN MODELO DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**B.Q.D. FREYERMUTH TRUJILLO XIMENA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANGÉLICA BERENICE COYOY SALGADO**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

**DRA. MARÍA DE LOS ANGELES ARACELI DÍAZ RUIZ**

DEPARTAMENTO DE NEUROQUÍMICA, INNN

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. SEPTIEMBRE, 2023.**

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA)  
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/0519/2023  
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **27 de marzo de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **FREYERMUTH TRUJILLO XIMENA** con número de cuenta **414019083** con la tesis titulada **“EFECTO DE LA TIBOLONA EN LA INFLAMACIÓN Y LA RECUPERACIÓN MOTORA EN UN MODELO DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ANGÉLICA BERENICE COYOY SALGADO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. ISABEL ARRIETA CRUZ  
Vocal: DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS  
Vocal: DRA. MARISOL OROZCO IBARRA  
Vocal: DR. JUAN CARLOS CORONA CASTILLO  
Secretario: DRA. MARÍA DE LOS ANGELES ARACELI DÍAZ RUIZ

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

**A T E N T A M E N T E**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 26 de junio de 2023

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/RCHT/EARR/rcht



# Agradecimientos Institucionales

- a) Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas**, Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**).
- b) El apoyo económico fue fundamental para realizar la investigación que se expone en esta tesis, por lo que agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**).
- c) Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto número 845110, **FORDECYT-PRONACES**.
- d) A mi tutora principal; **Dra. Angélica Berenice Coyoy Salgado**, le agradezco infinitamente todo el apoyo, la enseñanza y la paciencia que me mostró a lo largo del desarrollo de esta tesis.
- e) A los miembros del Comité: **Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade** y la **Dra. Ma. De los Ángeles Araceli Díaz Ruiz**, gracias por aportarme de su conocimiento y sus consejos.

# Agradecimientos a Título Personal

- a) Al **Dr. Christian Humberto Guerra Araiza**, la **Dra. Gabriela Morali de la Brena** y el **Dr. Carlos Orozco Barrios**, gracias por la ayuda, el apoyo y la confianza que tuvieron en mí.
  
- b) Gracias a **M.V. Julio García Hernández** y a todo el personal del **Bioterio del C.M.N. SXXI, IMSS**, por el apoyo, las risas y la motivación que siempre estuvieron dispuestos a aportar.
  
- c) Agradezco también al personal del **laboratorio de microscopía del C.M.N. SXXI, IMSS**.

# Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a:

A mi madre **Adriana Trujillo Solares** y a mi hermano **Adolfo Manuel Freyermuth Trujillo**, que me enseñaron que es posible seguir adelante cuando parece imposible.

A mis amigos, **Amy Papworth**, **Max Ortega**, **Mariana Lara**, **Alfredo Asali**, **Eugenio González**, **Rodrigo Ponciano**, **Andrea Guatemala**, **Yann Herrera** y a **Darío Betancourt**, cuyo apoyo y amor incondicional fue indispensable para lograr esta meta.

A **Link** y **Zelda**, mis lobos guardianes.

# Índice

Índice de Figuras

Índice de Tablas

Índice de Abreviatura

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
1.1 Sistema Nervioso	5
1.1.1. Anatomía de la Médula Espinal	7
1.2. Lesión Traumática de Médula Espinal	10
1.2.1. Epidemiología y Etiología	10
1.2.2. Fisiopatología	12
1.2.2.1. Lesión Primaria	13
1.2.2.2. Lesión Secundaria	14
1.2.2.2.1. Fase Inmediata	14
1.2.2.2.2. Fase Aguda	14
1.2.2.2.3. Fase Intermedia	15
1.2.2.2.4. Fase Crónica	15
1.3. Inflamación en la Lesión Traumática de Médula Espinal	16
1.3.1. Fase Inmediata	18
1.3.1.1. Disrupción de la Barrera Cerebroespinal	18
1.3.1.2. Células de la Microglía	18
1.3.1.3. Inflamasomas	21
1.3.1.4. Citocinas	22
1.3.1.4.1. Interleucina 1	22
1.3.1.4.2. Factor de Necrosis Tumoral Alfa	24
1.3.1.4.3. Interleucina 12	26
1.3.1.4.4. Interferón gamma	28
1.3.1.4.5. Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 Alfa	30
1.3.1.4.6. Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos	31
1.3.1.4.7. Interleucina 2	33
1.3.1.4.8. Interleucina 4	34
1.3.1.4.9. Interleucina 13	35
1.3.1.4.10. Interleucina 10	37
1.3.1.5. Neutrófilos	39
1.3.2. Fase Aguda	41

1.3.2.1. Macrófagos	41
1.3.2.2. Células Dendríticas	42
1.3.2.3. Linfocitos	42
1.3.3. Fases Intermedia y Crónica	43
1.4. Neuroprotección de Hormonas Sexuales	44
1.5. Tibolona	47
1.4.1. Tibolona como Agente Neuroprotector	51
<b>2. Justificación</b>	<b>53</b>
<b>3. Hipótesis</b>	<b>54</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>55</b>
<b>5. Metodología</b>	<b>56</b>
5.1. Animales	56
5.2. Lesión Traumática de Médula Espinal	57
5.3. Tratamientos	58
5.4. Cuantificación de Citocinas	62
5.5. Evaluación de Recuperación Funcional	67
5.6. Evaluación de Tejido Preservado	70
5.7. Análisis Estadístico	72
5.7.1. Estudio del Efecto de la Tibolona en la Expresión de Citocinas Pro y Anti-Inflamatorias en la Médula Espinal con Lesión Traumática	72
5.7.2. Estudio del Efecto de la Tibolona en la Recuperación Funcional Motora de la Médula Espinal con Lesión Traumática	72
5.7.3. Estudio del Efecto de la Tibolona en la Preservación del Tejido de la Médula Espinal con Lesión Traumática	75
<b>6. Resultados</b>	<b>76</b>
6.1. Efecto de la Tibolona en la Regulación de Citocinas Pro y Anti-Inflamatorias Después de una Lesión Traumática de Médula Espinal	76
6.1.1. Efecto de la Tibolona en la Regulación de Citocinas Pro-Inflamatorias	77
6.1.1.1. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Interleucina 1 Alfa	77
6.1.1.2. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Interleucina 1 Beta	79
6.1.1.3. Efecto de la Tibolona en la Regulación del Factor de Necrosis Tumoral Alfa	81
6.1.1.4. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Interleucina 12	83
6.1.1.5. Efecto de la Tibolona en la Regulación del Interferón Gamma	85
6.1.1.6. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 Alfa	87

6.1.1.7. Efecto de la Tibolona en la Regulación del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos	88
6.1.1.8. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Interleucina 2	89
6.1.2. Efecto de la Tibolona en la Regulación de Citocinas Anti-Inflamatorias	90
6.1.2.1. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Interleucina 4	90
6.1.2.2. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Interleucina 13	91
6.1.2.3. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Interleucina 10	92
6.2. Efecto de la Tibolona en la Recuperación Motora Después de una Lesión Traumática de Médula Espinal	94
6.3. Efecto de la Tibolona en el Tejido Preservado Después de una Lesión Traumática de Médula Espinal	99
<b>7. Discusión</b>	<b>101</b>
<b>8. Conclusión</b>	<b>111</b>
<b>9. Perspectivas</b>	<b>112</b>
<b>10. Referencias Bibliográficas</b>	<b>115</b>

# Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Neurona y células gliales en el sistema nervioso central	05
<b>Figura 2.</b> Anatomía macroscópica de la médula espinal	08
<b>Figura 3.</b> Sección transversal de la médula espinal torácica	09
<b>Figura 4.</b> Eventos inflamatorios principales en la lesión traumática de médula espinal	17
<b>Figura 5.</b> Metabolismo de la tibolona	50
<b>Figura 6.</b> Resumen de los esquemas de tratamientos para la evaluación del efecto de la tibolona en la Inflamación después de una lesión traumática de médula espinal	60
<b>Figura 7.</b> Resumen de los esquemas de tratamiento para la evaluación del efecto de la tibolona en la recuperación motriz y el tejido preservado después de una lesión traumática de médula espinal	61
<b>Figura 8.</b> Efecto de la tibolona en la regulación de la interleucina 1 alfa en la lesión traumática de médula espinal	78
<b>Figura 9.</b> Efecto de la tibolona en la regulación de la interleucina 1 beta en la lesión traumática de médula espinal	80
<b>Figura 10.</b> Efecto de la tibolona en la regulación del factor de necrosis tumoral alfa en la lesión traumática de médula espinal	82
<b>Figura 11.</b> Efecto de la tibolona en la regulación de la interleucina 12 en la lesión traumática de médula espinal	84
<b>Figura 12.</b> Efecto de la tibolona en la regulación del interferón gamma en la lesión traumática de médula espinal	86
<b>Figura 13.</b> Efecto de la tibolona en la regulación de la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa en la lesión traumática de médula espinal	87
<b>Figura 14.</b> Efecto de la tibolona en la regulación del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos en la lesión traumática de médula espinal	88
<b>Figura 15.</b> Efecto de la tibolona en la regulación de la interleucina 12 en la lesión traumática de médula espinal	89
<b>Figura 16.</b> Efecto de la tibolona en la regulación de la interleucina 4 en la lesión traumática de médula espinal	90

<b>Figura 17.</b> Efecto de la tibolona en la regulación de la interleucina 13 en la lesión traumática de médula espinal	91
<b>Figura 18.</b> Efecto de la tibolona en la regulación de la interleucina 10 en la lesión traumática de médula espinal	93
<b>Figura 19.</b> Efecto de la tibolona en la recuperación motora después de una lesión traumática de médula espinal	94
<b>Figura 20.</b> Área bajo la curva de los tres grupos de estudio mostrando el efecto de la tibolona en la recuperación motora después de la lesión traumática de médula espinal	98
<b>Figura 21.</b> Efecto de la tibolona en el tejido preservado después de una lesión traumática de médula espinal	100
<b>Figura 22.</b> Resultados y tendencias observadas del efecto de la tibolona en la lesión traumática de médula espinal en la regulación de citocinas pro y anti-inflamatorias, el tejido preservado y la recuperación funcional	103

# Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Fases de la lesión traumática de médula espinal y sus principales eventos patológicos	13
<b>Tabla 2.</b> Características generales y participación de la interleucina 1 en la lesión traumática de la médula espinal	24
<b>Tabla 3.</b> Características generales y participación del factor de necrosis tumoral alfa en la lesión traumática de la médula espinal	26
<b>Tabla 4.</b> Características generales y participación de la interleucina 12 en la lesión traumática de la médula espinal	27
<b>Tabla 5.</b> Características generales y participación del interferón gamma en la lesión traumática de la médula espinal	29
<b>Tabla 6.</b> Características generales y participación de la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa en la lesión traumática de la médula espinal	31
<b>Tabla 7.</b> Características generales y participación del factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos en la lesión traumática de la médula espinal	32
<b>Tabla 8.</b> Características generales y participación de la interleucina 2 en la lesión traumática de la médula espinal	33
<b>Tabla 9.</b> Características generales y participación de la interleucina 4 en la lesión traumática de la médula espinal	35
<b>Tabla 10.</b> Características generales y participación de la interleucina 13 en la lesión traumática de la médula espinal	36
<b>Tabla 11.</b> Características generales y participación de la interleucina 10 en la lesión traumática de la médula espinal	38
<b>Tabla 12.</b> Esquemas de tratamientos para la evaluación del efecto de la tibolona en la inflamación después de una lesión traumática de médula espinal	59
<b>Tabla 13.</b> Esquemas de tratamiento para la evaluación del efecto de la tibolona en la recuperación motriz y en el tejido preservado después de una lesión traumática de médula espinal	61
<b>Tabla 14.</b> Preparación de stocks para la curva patrón de albúmina de suero bovino	63
<b>Tabla 15.</b> Escala de 21 puntos para la evaluación locomotriz de Basso Beattie y Bresnahan	68

# Índice de Abreviatura

<b>AKR:</b> aldocetoreductasa	<b>IL-2R:</b> receptor a interleucina 2
<b>APC:</b> célula presentadora de antígeno	<b>IL-3:</b> interleucina 3
<b>AP-1:</b> proteína activadora 1	<b>IL-4:</b> Interleucina 4
<b>AR:</b> receptores a andrógenos	<b>IL-4R<math>\alpha</math>:</b> receptor de interleucina 4
<b>ASC:</b> proteína tipo punto asociada a apoptosis	<b>IL-6:</b> interleucina 6
<b>BBB:</b> Basso, Beattie y Bresnahan	<b>IL-10:</b> interleucina 10
<b>BCE:</b> barrera cerebrospinal	<b>IL-10R:</b> receptor a interleucina 10
<b>BDNF:</b> factor neurotrófico derivado de cerebro	<b>IL-12:</b> interleucina 12
<b>BSA:</b> albúmina de suero bovino	<b>IL-13:</b> Interleucina 13
<b>CARD:</b> dominio de reclutamiento y activación de caspasas	<b>IL-13R<math>\alpha</math>1:</b> receptor a interleucina 13
<b>CCL3:</b> ligando de quimiocina 3	<b>IL-17:</b> interleucina 17
<b>CD:</b> Grupo de diferenciación	<b>IL-18:</b> interleucina 18
<b>COX-2:</b> ciclooxigenasa-2	<b>IL-25:</b> interleucina 25
<b>CSPG:</b> proteoglicanos de condroitín sulfato	<b>iNOS:</b> óxido nítrico sintasa inducible
<b>DAMPs:</b> patrones moleculares asociados a daño	<b>IRAK:</b> proteincinasa activada por el receptor de interleucina 1
<b>DNA:</b> ácido desoxirribonucleico	<b>IRS:</b> sustrato de receptor a insulina
<b>E2:</b> estradiol	<b>JNK:</b> c-Jun N-terminal quinasa
<b>ER:</b> receptores a estrógenos	<b>LRR:</b> dominio de repetición rica en leucina
<b>Erk:</b> cinasas reguladas por señalización extracelular	<b>LT:</b> linfotoxina
<b>GDNF:</b> factor neurotrófico derivado de glía	<b>LTME:</b> lesión traumática en médula espinal
<b>GM-CSF:</b> factor estimulante de colonia de granulocitos-macrofagos	<b>MAPK:</b> proteína cinasa activada por mitógeno
<b>GM-CSFR:</b> receptor a GM-CSF	<b>MAPKKK:</b> proteín cinasa cinasa cinasa activadas por mitógenos
<b>HO-1:</b> hemo oxigenasa-1	<b>MCP-1:</b> proteína quimioatrayente de monocitos 1
<b>HOCl:</b> ácido hipocloroso	<b>MFI:</b> intensidad de fluorescencia media
<b>HO<sub>2</sub>:</b> hidroperóxidos	<b>MHC-II:</b> complejos de histocompatibilidad molecular 2
<b>H<sub>2</sub>O:</b> agua	<b>MIP-1<math>\alpha</math>:</b> proteína inflamatoria de macrófagos
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> peróxido de hidrógeno	<b>MMPs:</b> metaloproteinasas de la matriz
<b>ICAM-1:</b> molécula de adhesión intracelular 1	<b>MNP:</b> proteína nuclear MIP-1 $\alpha$
<b>IGF-1:</b> factor de crecimiento tipo insulina-1	<b>MPO:</b> mieloperoxidasa
<b>IFNGR:</b> receptor al Interferón gamma	<b>MYD88:</b> gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide ochentaiocho
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b> Interferón gamma	<b>NADPH:</b> oxidasa de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>IL-1:</b> Interleucina 1	<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b> factor nuclear- kappa beta
<b>IL-1RacP:</b> proteína accesoria del receptor a	
<b>IL-1:</b> interleucina 1	

**NGF:** factor de crecimiento nervioso  
**NK:** asesinas naturales  
**NKT:** célula T asesina natural  
**NLRs:** receptores tipo NOD  
**NLRP:** inflammasoma que contiene dominios NACHT, LRR y PYD  
**NO:** óxido nítrico  
**NOD:** dominio de oligomerización de nucleótido  
**NOS-2:** óxido nítrico sintasa-2  
**NOX2:** NADPH oxidasa 2  
**Nrf2:** factor nuclear eritroide tipo 2  
**N6-GAS:** elemento potenciador de respuesta a STAT6  
**O<sub>2</sub>:** superóxido  
**OH:** hidroxilo  
**O=N-O-O:** peroxinitrito  
**PAMPs:** patrones moleculares asociados a patógenos  
**PI3K:** fosfatidilinositol-3 cinasa  
**POMC:** pro-opiomelanocortina  
**PR:** receptores a progestágenos  
**PYD:** dominio de pirina  
**RNS:** especies reactivas de nitrógeno  
**ROS:** especies reactivas de oxígeno  
**SDF-1:** factor derivado de células estromales 1  
**SERM:** moduladores selectivos de los receptores estrogénicos  
**SNC:** sistema nervioso central  
**SNP:** sistema nervioso periférico  
**SOD:** superóxido dismutasa  
**STAT:** transductor de señales y activador de la transcripción

**STEAR:** regulador de actividad estrogénica de tejido selectivo  
**SUR1:** receptor 1 de sulfonilurea  
**TACE:** enzima convertidora de TNF  
**TAB:** proteína de unión a TAK  
**TAK1:** proteincinasa activada por TGF-β  
**TCR:** receptor de células T  
**TGF-β:** factor de crecimiento transformante beta  
**TIB:** tibolona  
**TIR:** dominios tipo Toll y tipo IL-1R  
**TLRs:** receptores tipo toll  
**TNF-α:** factor de necrosis tumoral alfa  
**TRAF:** factor asociado al factor de necrosis tumoral  
**TRPM4:** receptor potencial transitorio melastatin 4  
**UBC13:** enzima E2 N conjugadora de ubiquitina  
**UEV1A:** enzima E2 variante 1 conjugadora de ubiquitina  
**VCAM-1:** molécula de adhesión celular vascular 1  
**VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular  
**Vh:** vehículo  
**3α-OH-TIB:** 3 alfa-hidroxi tibolona  
**3β-OH-TIB:** 3 beta-hidroxi tibolona  
**3β-HSD-ISO:** 3 beta hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa  
**Δ4-TIB:** delta 4-tibolona

# Resumen

La lesión traumática de la médula espinal (LTME), es un problema de salud grave para el cual actualmente no se cuenta con un tratamiento seguro y eficaz. Cada año entre 250 000 y 500 000 personas sufren una LTME. Dependiendo de la severidad de la lesión los pacientes pueden perder la sensibilidad, el funcionamiento sexual, del intestino, de la vejiga y presentar disfunción autonómica y parálisis, e incluso provocar la muerte. La fisiopatología de la LTME se divide en lesión primaria y lesión secundaria. La lesión primaria consiste en el daño mecánico instantáneo que ocurre al momento de la lesión. La lesión secundaria está conformada por la fase inmediata, aguda, intermedia y crónica, en las que ocurren procesos fisiopatológicos consecuentes al trauma inicial. La inflamación incrementa el daño en la lesión secundaria y provoca cambios en el metabolismo celular y en la expresión génica que resultan en un periodo prolongado de destrucción tisular.

Debido a que hasta la fecha no se cuenta con un tratamiento que pueda revertir el daño generado por la LTME, es importante desarrollar alternativas terapéuticas para los pacientes con LTME. Se ha demostrado que los esteroides tienen efectos neuroprotectores por lo que es prometedor su uso para reducir la lesión secundaria de la LTME, sin embargo, debe tomarse en cuenta que los esteroides exógenos pueden producir efectos secundarios adversos, incluyendo cáncer, lo cual podría evitarse con el uso de esteroides sintéticos, como la tibolona (TIB), la cual ejerce los efectos neuroprotectores de las hormonas sexuales, sin promover dichos efectos. Tomando en cuenta que los efectos neuroprotectores de los esteroides pueden ocurrir mediante la regulación de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, en este trabajo se investigó el efecto de la TIB en la regulación de la neuroinflamación y su impacto en el tejido preservado, relacionando sus efectos con la recuperación de la función motora después de una LTME en un modelo biológico.

Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley, a las cuales se les realizó una laminectomía (Lam), seguida de una LTME moderada a la altura de la vértebra torácica 9 haciendo uso del estereotáxico *New York Impactor*, como modelo de LTME. Para

estudiar el efecto de la TIB sobre la neuroinflamación post-LTME, se usaron cuatro grupos de estudio: LTME, Lam y dos grupos con LTME a los cuales se les administró TIB oralmente a dosis de 1 y 2.5 mg/Kg a la media hora post-LTME y diario. Se cuantificó la concentración de citocinas pro y anti-inflamatorias en el sitio lesionado de la médula espinal con kits MILLIPLEX a las 3 horas, 3, 7 y 14 días post-LTME. Para estudiar el efecto de la TIB sobre el tejido preservado y la recuperación motora post-LTME, se usaron tres grupos de estudio: LTME, Lam y un grupo de LTME al cual se le administró TIB oralmente a dosis de 1 mg/Kg a la media hora post-LTME y diario durante 14 días, a los cuales se les determinó su recuperación motora haciendo uso de la escala Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) semanalmente y a las 8 semanas se midió el tejido preservado mediante tinciones con Luxol fast blue.

El tratamiento de TIB tuvo los siguientes efectos significativos: A las 3 horas post-LTME, la dosis de 1 mg/kg aumentó la concentración del TNF- $\alpha$  y disminuyó la del IFN- $\gamma$ . La dosis de 2.5 disminuyó al TNF- $\alpha$  y a ambas dosis se disminuyó el GM-CSF. A los 3 días post-LTME, las dosis de 1 mg/Kg y 2.5 mg/kg aumentaron la concentración de la IL-1 $\beta$ , la concentración del TNF- $\alpha$  también aumentó pero sólo a dosis de 1 mg/Kg. A los 7 días post-LTME, las dosis de 1 mg/Kg y 2.5/Kg disminuyeron la concentración de la IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y del TNF- $\alpha$ , y la dosis de 1 mg/Kg aumentó la de la IL-10. A los 14 días post-LTME, la dosis de 1 mg/Kg aumentó la concentración de la IL-1 $\alpha$  y a esta dosis y a 2.5 mg/Kg disminuyó la de la IL-12. Adicionalmente, la administración de TIB (1 mg/Kg) después de una LTME favoreció la preservación del tejido medular de forma significativa (Lam,  $172.4 \pm 9.202$ ; LTME,  $106.9 \pm 6.677$  y LTME+TIB (1 mg/Kg),  $135.2 \pm 5.54$ ), y una recuperación más rápida en la funcionalidad motora (Lam,  $20.708 \pm 0.510$ ; LTME,  $11.104 \pm 4.222$  y LTME+TIB (1 mg/Kg),  $13.615 \pm 4.282$ ), sin significancia.

**Conclusión:** La administración de TIB después de una LTME tiene un efecto en la concentración de las citocinas pro-inflamatorias; IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , GM-CSF, IL-2 y anti-inflamatorias; IL-10, en la médula espinal lesionada. Esta regulación de la neuroinflamación ejercida por la TIB favoreció el incremento del tejido preservado en la zona de la lesión y generó una tendencia a una recuperación de la función motora más rápida.

# Abstract

Traumatic spinal cord injury (TSCI) is a severe health problem without a current secure and effective treatment. Between 250 000 and 500 000 people suffer from a TSCI every year. Depending on the severity of the injury, patients can lose sensibility, sexual, intestine and bladder function and present autonomic dysfunction and paralysis, and can even cause death. The physiopathology of TSCI can be divided into primary and secondary injury. Primary injury consists in the instantaneous mechanical damage that occurs at the moment of injury. The secondary injury consists in the immediate, acute, intermediate and chronic phases, in which physiopathological processes that result from the initial trauma occur. Inflammation increases the damage in the secondary injury and causes cellular metabolism and gene expression changes, resulting in a prolonged period of tissue destruction.

Due to the fact that to date there is no treatment available that can reverse the damage caused by TSCI, it is important to develop therapeutic alternatives for patients with TSCI. It has been demonstrated that steroids have neuroprotective effects, making their use promising in reducing secondary injury from TSCI. However, it should be taken into account that exogenous steroids can produce adverse side effects, including cancer, which could be avoided with the use of synthetic steroids such as tibolone (TIB), that has the neuroprotective effects of sex hormones without promoting the development of said effects. Taking into consideration that the neuroprotective effects of steroids can occur through the regulation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, this study investigated the effect of TIB on the regulation of neuroinflammation and its impact on preserved tissue, correlating its effects with the recovery of motor function after TSCI in a biological model.

Male Sprague Dawley rats were used, on which a laminectomy (Lam) was performed, followed by moderate TSCI at the level of the 9th thoracic vertebra using the *New York Impactor* stereotaxic apparatus, as TSCI models. To study the effect of TIB on post-TSCI neuroinflammation, four study groups were used: LTME (spanish for TSCI), Lam, and two groups with TSCI to which TIB was orally administered at doses of 1 and 2.5 mg/kg, half an hour after the TSCI and daily. The concentration of pro- and

anti-inflammatory cytokines in the injured site of the spinal cord was quantified using MILLIPLEX kits at 3 hours, 3, 7, and 14 days post-TSCI. To study the effect of TIB on preserved tissue and motor recovery post-TSCI, three study groups were used: LTME, Lam, and a LTME group to which TIB was orally administered at a dose of 1 mg/kg, half an hour after the TSCI and daily for 14 days. Their motor recovery was determined using the Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) scale weekly and the preserved tissue was measured using Luxol fast blue staining at week 8 post-TSCI.

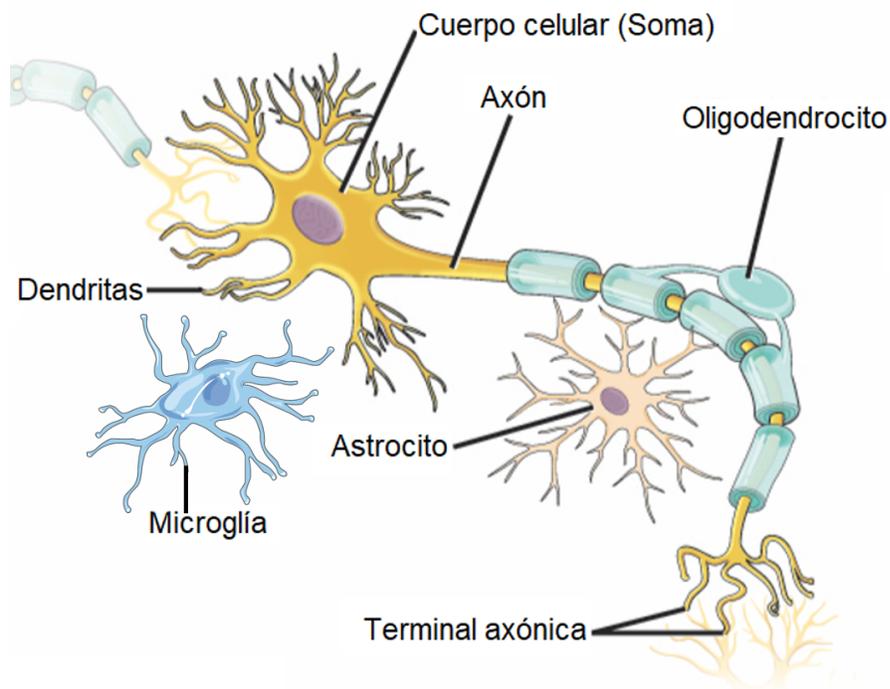
The TIB treatment had the following significant effects: At 3 hours post-TSCI, the dose of 1 mg/kg increased the concentration of TNF- $\alpha$  and decreased the concentration of IFN- $\gamma$ . The dose of 2.5 mg/kg decreased TNF- $\alpha$ , and both doses decreased the GM-CSF. At 3 days post-TSCI, the doses of 1 mg/kg and 2.5 mg/kg increased the concentration of IL-1 $\beta$ . The concentration of the TNF- $\alpha$  also increased but only at the dose of 1 mg/kg. At 7 days post-TSCI, the doses of 1 mg/kg and 2.5 mg/kg decreased the concentration of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ , and the dose of 1 mg/kg increased the concentration of IL-10. At 14 days post-TSCI, the dose of 1 mg/kg increased the concentration of IL-1 $\alpha$ , and at this dose and 2.5 mg/kg, the concentration of IL-12 decreased. Additionally, the administration of TIB (1 mg/kg) after TSCI significantly favored the preservation of spinal cord tissue (Lam, 172.4 $\pm$ 9.202; LTME, 106.9 $\pm$ 6.677; and LTME+TIB (1 mg/kg), 135.2 $\pm$ 5.54) and a faster recovery in motor functionality (Lam, 20.708 $\pm$ 0.510; LTME, 11.104 $\pm$ 4.222; and LTME+TIB (1 mg/kg), 13.615 $\pm$ 4.282), without significance.

**Conclusion:** The administration of TIB after TSCI has an effect on the concentration of pro-inflammatory cytokines; IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , GM-CSF, IL-2, and anti-inflammatory cytokine; IL-10, in the injured spinal cord. This regulation of the neuroinflammation exerted by the TIB favored the increase of preserved tissue in the injured site and generated a tendency to have a faster motor function recovery.

# 1. Introducción

## 1.1 Sistema Nervioso

El sistema nervioso se divide en sistema nervioso central (SNC), que consiste en el cerebro y la médula espinal, y en el sistema nervioso periférico (SNP), formado por los nervios craneales y espinales. El sistema nervioso está formado por neuronas y células gliales (Fig. 1). Las neuronas contienen un cuerpo celular, una extensión denominada axón, que manda los impulsos electroquímicos lejos del cuerpo celular y también contienen dendritas; prolongaciones citoplasmáticas que tienen la capacidad de generar y transmitir los impulsos hacia el cuerpo celular (Scanlon & Sanders, 2007).



**Figura 1.** *Neurona y células gliales en el sistema nervioso central.* La neurona tiene dendritas y axones. También se muestran tres tipos de células gliales: los astrocitos, que regulan el ambiente químico de la célula nerviosa; los oligodendrocitos que aíslan el axón para que el impulso nervioso eléctrico se transfiera con más eficacia, y la microglía, que constituye a los macrófagos del SNC. Modificada y traducida de Molnar & Gair (2013).

El espacio donde se comunican dos neuronas se llama sinapsis. El impulso eléctrico que avanza mediante la membrana celular de una neurona no puede cruzar la

sinapsis si no existen las condiciones adecuadas, ya que la continuación de la transmisión del impulso requiere que neurotransmisores presentes en vesículas salgan mediante exocitosis del botón sináptico en el extremo terminal del axón presináptico. Los neurotransmisores liberados en la sinapsis se unen a receptores específicos de la membrana celular postsináptica generando un nuevo impulso eléctrico que viajará por el axón de la siguiente neurona hasta llegar a su respectivo botón sináptico, permitiendo así la comunicación entre neuronas (Scanlon & Sanders, 2007).

La envoltura de mielina es una membrana plasmática modificada que envuelve al axón en forma de espiral. La mielina se origina y forma parte de las células de Schwann en el SNP y de los oligodendrocitos en el SNC. La mielina tiene interrupciones periódicas donde pequeñas porciones del axón quedan descubiertas formando los nodos de Ranvier, mientras que los segmentos mielinizados de los axones constituyen los internodos. La mielina es un aislante que mejora la conductividad eléctrica de los axones. La mielina *in situ* tiene un contenido de agua de aproximadamente 40%. La masa seca de la mielina se caracteriza por una elevada proporción de lípidos y una baja proporción de proteína (Quarles et al., 1999).

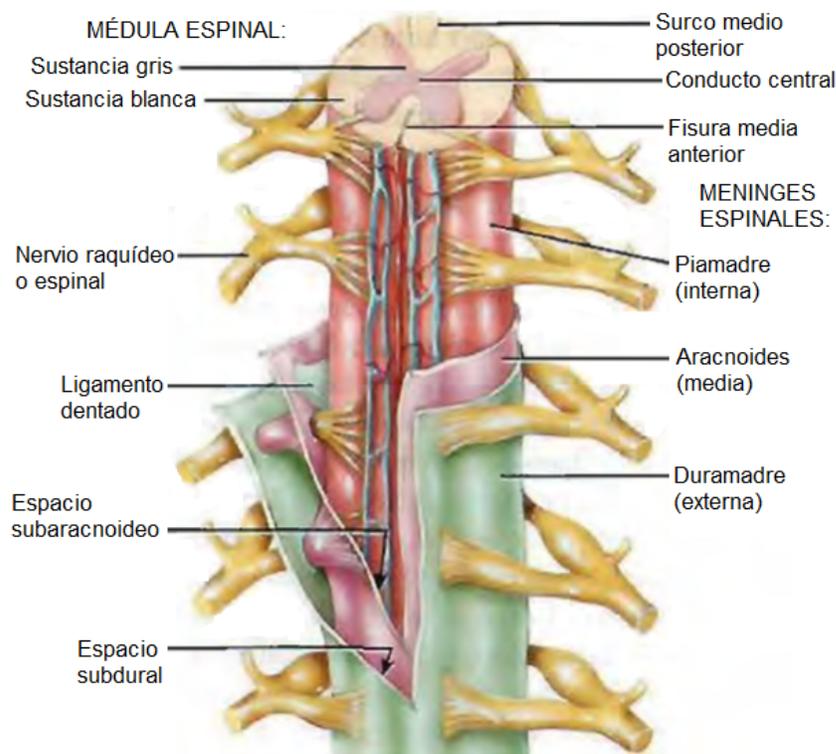
Si un nervio periférico es cortado y unido de manera precisa mediante microcirugía, los axones y dendritas pueden regenerarse mediante túneles formados por el neurilema, constituido por células de Schwann (Scanlon & Sanders, 2007). También, las células de Schwann producen factor de crecimiento de nervios (NGF), factor neurotrófico derivado de glía (GDNF) y factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factores de crecimiento que promueven el crecimiento axonal (Wei et al., 2019). Gracias a esto, los nervios pueden eventualmente reestablecer sus conexiones y el individuo puede recuperar sensación y movimiento en el miembro que fue cortado. El SNC carece de neurilema al estar sus vainas de mielina formadas por oligodendrocitos, una de las células gliales del SNC. La ausencia de células del neurilema, significa que no ocurre la regeneración de neuronas de tal manera que una lesión en médula espinal resulta en la pérdida permanente de la función (Scanlon & Sanders, 2007).

Otro tipo de célula glial son los astrocitos, estos se encargan de mantener la homeostasis reciclando neurotransmisores y aportando nutrientes a las neuronas (Pekny & Pekna, 2016). Además, tienen extensiones que rodean a los capilares cerebrales, contribuyendo a las funciones de la barrera hematoencefálica que previene que desechos potencialmente peligrosos en la sangre entren al tejido cerebral por difusión. El tercer tipo de célula glial es la microglía que tiene la importante función de fagocitar células dañadas y patógenos, por lo cual se encuentran en constante movimiento (Scanlon & Sanders, 2007). Los macrófagos son las células efectoras ante una respuesta inflamatoria en lesiones en el SNC y son derivados de la microglía o de monocitos hematógenos, estos son funcionalmente indistinguibles por su morfología y marcadores antigénicos. Debido a esto, en un contexto de lesión en el SNC, la microglía activada se refiere como macrófago/microglía (Louw et al., 2016). Otra célula importante son los pericitos, estas células contráctiles están presentes en intervalos a lo largo de las paredes capilares. En el SNC son importantes para la formación de vasos sanguíneos, el mantenimiento de la barrera cerebroespinal, la regulación de la entrada de células inmunes al SNC y el control de la circulación sanguínea (Attwell et al., 2016).

### 1.1.1. Anatomía de la Médula Espinal

La médula espinal está alojada en la columna vertebral, la cual sirve de protección. Los ligamentos vertebrales, las meninges y el líquido cefalorraquídeo constituyen una protección adicional. Las meninges son tres capas de tejido conectivo que revisten al SNC (Fig. 2). Las meninges espinales rodean a la médula y se continúan con las meninges craneales, las cuales envuelven al encéfalo. La más superficial de las tres meninges es la duramadre, compuesta por tejido conectivo denso irregular. La médula espinal también se encuentra protegida por un colchón de grasa y de tejido conectivo que se localiza en la cavidad epidural, comprendido entre la duramadre y la pared del conducto vertebral. La meninge media es una membrana avascular denominada aracnoides por la predisposición similar a la de una tela de

araña que presentan las fibras de colágeno y algunas fibras elásticas que la componen. Entre la duramadre y la aracnoides se halla el estrecho espacio subdural, que contiene líquido intersticial. La más interna de las meninges es la piamadre, una fina y transparente capa de tejido conectivo que se adhiere a la superficie de la médula y al encéfalo. Está compuesta por fibras colágenas y algunas fibras elásticas intercaladas. En la piamadre hay una gran cantidad de vasos sanguíneos que abastecen de oxígeno y nutrientes a la médula espinal. Entre la aracnoides y la piamadre se encuentra el espacio subaracnoideo que contiene líquido cefalorraquídeo (Tortora & Derrickson, 2011).

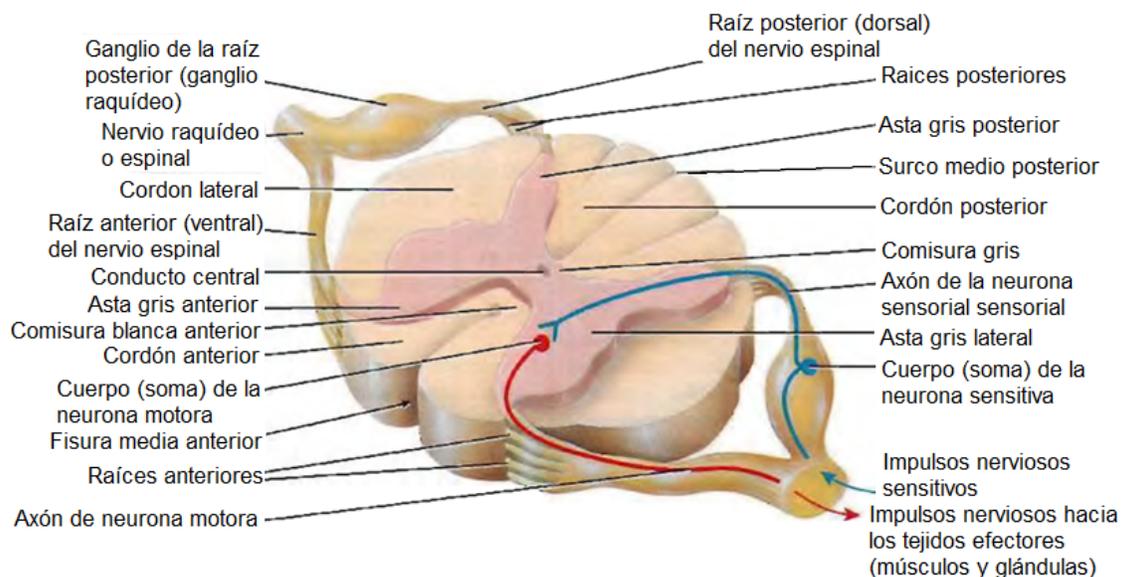


**Figura 2.** Anatomía macroscópica de la médula espinal. Vista anterior y sección transversal de la médula espinal. Tomada y traducida de Tortora & Derrickson (2011).

La médula espinal es casi cilíndrica, pero presenta un ligero aplanamiento antero-posterior. En los adultos se extiende a partir de la médula oblongata, hasta el borde superior de la segunda vértebra lumbar. En los humanos, durante la niñez temprana, la médula espinal y la columna vertebral crecen en longitud como parte del desarrollo de todo el cuerpo. El alargamiento de la médula espinal se detiene alrededor

del cuarto o quinto año de vida, pero la columna vertebral sigue creciendo, por lo que la médula espinal no ocupa toda la longitud de la columna vertebral en el adulto. La longitud de la médula espinal de un adulto es de unos 42 a 45 cm. Su diámetro se aproxima a los 2 cm en la región torácica media, es algo más ancha en la región cervical baja y la región lumbar media, y algo menos en su segmento inferior (Tortora & Derrickson, 2011).

La médula espinal está constituida por materia gris y materia blanca. Dos surcos se introducen en la sustancia blanca de la médula espinal y la dividen en dos sectores, uno derecho y otro izquierdo (Fig. 3). La sustancia gris de la médula espinal tiene forma de mariposa y se halla rodeada de sustancia blanca. La sustancia gris consiste en dendritas, cuerpos neuronales, axones amielínicos y células gliales. La sustancia blanca está constituida principalmente por haces de axones mielínicos. En el centro de la comisura gris se encuentra un pequeño espacio llamado conducto central que se extiende a lo largo de toda la médula y contiene líquido cefalorraquídeo (Tortora & Derrickson, 2011).



**Figura 3.** Sección transversal de la médula espinal torácica. Se muestra la anatomía interna de la médula espinal y la organización de la sustancia gris y de la sustancia blanca. Las flechas azules y rojas indican la dirección en la que se propagan los impulsos nerviosos. Tomada y traducida de Tortora & Derrickson (2011).

En la sustancia gris de la médula y del encéfalo, los agrupamientos de cuerpos neuronales forman grupos funcionales conocidos como núcleos. Los núcleos sensitivos reciben información de los receptores correspondientes por medio de las neuronas sensitivas, y los núcleos motores envían información a los tejidos efectores a través de las neuronas motoras. La sustancia gris a cada lado de la médula espinal se halla dividida en regiones llamadas astas. Las astas anteriores contienen los núcleos motores somáticos, que generan impulsos nerviosos para la contracción de los músculos esqueléticos. Las astas posteriores contienen los núcleos sensitivos somáticos y autonómicos. Entre las astas anteriores y posteriores se hallan las astas laterales en los segmentos torácicos bajo, lumbar y sacro de la médula espinal, las cuales contienen los núcleos motores autónomos que regulan la actividad del músculo liso, el músculo cardíaco y las glándulas (Tortora & Derrickson, 2011).

La sustancia blanca, al igual que la sustancia gris, está organizada en regiones. Las astas anteriores y posteriores dividen a la sustancia blanca de cada lado en tres áreas anchas denominadas cordones (anteriores, posteriores y laterales). Cada cordón, contiene fascículos de axones que tienen un origen o un destino en común y que lleva información similar. Pueden extenderse a distancia hacia arriba o hacia abajo en la médula espinal y se denominan tractos. Los tractos sensoriales (ascendentes), consisten en axones que envían impulsos nerviosos hacia el cerebro. Los tractos que envían impulsos nerviosos desde el cerebro se denominan tractos motores (descendentes). Los tractos motores y sensitivos de la médula espinal se continúan con los tractos motores y sensitivos del encéfalo (Tortora & Derrickson, 2011).

## 1.2. Lesión Traumática de Médula Espinal

### 1.2.1. Epidemiología y Etiología

La médula espinal es un órgano indispensable para que el cerebro pueda comunicarse con el resto del cuerpo y consecuentemente permite, entre varias otras cosas, el movimiento voluntario del músculo esquelético. Desafortunadamente la

médula espinal puede lesionarse comprometiendo sus diversas funciones. La lesión traumática de médula espinal (LTME) es uno de los problemas de salud más devastadores ya que puede provocar paraplejía o tetraplejía. Paraplejía se define como el deterioro de la función sensorial o motora en las extremidades inferiores y tetraplejía se define como la pérdida parcial o total de la función sensorial o motora en las cuatro extremidades (Alizadeh et al., 2019). De tal forma que la LTME impide a los individuos realizar sus actividades cotidianas, creando un impacto psicológico, social y económico elevado a corto y largo plazo en personas jóvenes de edad productiva (Rodríguez et al., 2016).

La incidencia de LTME a nivel mundial es de 40 a 80 nuevos casos por millón de población cada año, lo que significa que cada año entre 250 000 y 500 000 personas sufren una LTME. A nivel de país, la incidencia de LTME varía alrededor del mundo de 13 a 53 casos por millón de población (Bickenbach et al., 2013). La ocurrencia de este padecimiento tiene una distribución de edad bimodal, donde uno de los picos se encuentra entre los 15 y los 29 años de edad y el segundo pico se encuentra por arriba de los 65 años. La LTME ocurre más comúnmente en hombres y la mayoría de las lesiones se producen en la zona cervical (Ludwig et al., 2017). Los gastos médicos acumulados a lo largo de la vida de un paciente varían entre 500 000 a 2 millones de dólares (Kong & Gao, 2017).

Las causas principales de la LTME en orden de frecuencia son los accidentes en vehículos de motor (50 %), caídas y lesiones relacionadas con el trabajo (30 %), heridas de bala o por crimen violento (11 %) y accidentes por deportes (9 %) (Ludwig et al., 2017; Rowland et al., 2008). En Latinoamérica el 16.8 % de las lesiones traumáticas de médula espinal están asociadas a armas de fuego, en Brasil es el 42 %, para Turquía el 25 %, para Sudáfrica el 21 %, para Estados Unidos es el 11.7 %, para Europa occidental el 4 % y en Canadá sólo el 2 % está asociado a armas de fuego (Zárate et al., 2016). En Pakistán, la causa principal de LTME en niños ocurre por armas de fuego, en muchos casos la causa son explosiones de bombas, esto es rara vez reportado en otros países (Darain et al., 2018).

Desafortunadamente en México no hay información de las características epidemiológicas de pacientes con LTME, determinar estas características permitiría la identificación de grupos vulnerables y establecer iniciativas de medidas preventivas para reducir el número de casos nuevos (Pickett et al., 2006; Rodríguez et al., 2016). Un estudio clínico demográfico que se llevó a cabo en la Unidad de Medicina Física y Rehabilitación, un centro de rehabilitación del instituto Mexicano del Seguro Social durante el periodo de agosto 2006 a julio 2013 en México demostró que el promedio de edad de pacientes víctimas de una LTME es el  $37.9\% \pm 15.9$  años de edad, el 78.2% eran del sexo masculino, el nivel educativo predominante era básico (63.6%) y el 73.1 tenían empleo. La caída se mostró como el mecanismo de lesión predominante, representando al 41.6% de las lesiones, reemplazando a las lesiones por accidentes de motor. El promedio de edad de pacientes cuya LTME fue causada por caída fue de  $44 \pm 16$  años. Las lesiones sufridas por personas más jóvenes ( $28.4 \pm 10.1$  años) tienden a ser por violencia. La zona más afectada es el nivel torácico (en 56.7%) seguido del nivel cervical (13.4%) (Rodríguez et al., 2016).

### 1.2.2. Fisiopatología

Dependiendo de la severidad de la LTME, los pacientes pueden incurrir en déficits neurológicos que van desde alteraciones o pérdida de la sensibilidad, del funcionamiento del intestino, de la vejiga, del funcionamiento sexual, disfunción autonómica, hasta parálisis e incluso puede provocar la muerte. Además, la secuela de la discapacidad ocasiona complicaciones sistémicas que incluyen neumonía y dependencia de ventilador, entre otras (Ludwig, et al., 2017). La fisiopatología de la LTME se describe como bifásica; se divide en lesión primaria y lesión secundaria. Los mecanismos de la lesión secundaria pueden a su vez ser divididos en fase inmediata, aguda, intermedia y crónica (Rowland, et al., 2008). A pesar de que el daño iniciado por la lesión original es irreversible, la lesión secundaria es un proceso activo que ocurre a nivel molecular y celular y por lo tanto es reversible y modificable. Esto representa una oportunidad para aplicar un tratamiento medicinal, en el cual, una intervención pronta y

eficiente puede limitar el proceso patológico y mejorar la recuperación funcional (Zhang et al., 2013). Las fases de la LTME y sus eventos patológicos principales se resumen en la tabla 1.

**Tabla 1. Fases de la lesión traumática de médula espinal y sus principales eventos patológicos**

Tiempo transcurrido después de la LTME					
Inmediato	≤2 Horas	≤48 Horas	≤14 Días	≤6 Meses	>6 Meses
Mecanismos de la lesión primaria	Lesión Secundaria				
	Fase Inmediata	Fase Aguda Temprana	Fase Subaguda	Fase Intermedia	Fase crónica
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Compresión</li> <li>● Contusión</li> <li>● Laceración</li> <li>● Rotura</li> <li>● Estiramiento agudo</li> <li>● Aceleración/desaceleración</li> <li>● Desplazamiento de hueso o disco</li> <li>● Fractura-dislocación</li> <li>● Fractura por estallamiento<sup>1</sup></li> <li>● Ruptura traumática de axones<sup>2</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Hemorragia en la sustancia gris</li> <li>● Necrosis hemorrágica</li> <li>● Activación de microglía</li> <li>● Liberación de IL-1<math>\beta</math>, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>, entre otros<sup>2</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Edema vasogénico y citotóxico</li> <li>● Producción de ROS (lipoperoxidación)</li> <li>● Citotoxicidad mediada por glutamato</li> <li>● Hemorragia</li> <li>● Necrosis</li> <li>● Invasión de neutrófilos</li> <li>● Permeabilidad máxima de barrera hematoencefálica</li> <li>● Desmielinización temprana (muerte de oligodendrocitos)</li> <li>● Muerte neuronal</li> <li>● Hinchamiento axonal</li> <li>● Eventos sistémicos (Shock sistémico, Hipertensión, Hipoxia)<sup>2</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Infiltración de macrófagos<sup>1</sup></li> <li>● Inicia formación de cicatriz astrogial</li> <li>● Reparación de la barrera hematoencefálica</li> <li>● Resolución del edema<sup>2</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Continúa la formación de cicatriz glial</li> <li>● Formación de quistes</li> <li>● Estabilización de la lesión<sup>2</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Degeneración Walleriana prolongada<sup>2</sup></li> </ul>

Tomado, modificado y traducido de <sup>1</sup> Baptiste & Fehlings, 2006; <sup>2</sup> Rowland, et al., 2008. LTME: Lesión traumática de médula espinal; IL: Interleucina;  $\beta$ : beta; TNF: Factor de necrosis tumoral;  $\alpha$ : alfa; ROS: Especies reactivas de oxígeno.

### 1.2.2.1. Lesión Primaria

La lesión primaria se refiere al daño mecánico instantáneo que se genera a consecuencia de la lesión inicial. La fractura o dislocación de la columna vertebral imprime fuerza directamente en la médula espinal, afectando a los axones, vasos

sanguíneos y membranas celulares. Los mecanismos físicos que producen la lesión primaria incluyen ruptura, laceración, estiramiento agudo y lesiones por aceleración y desaceleración repentinas (Rowland, et al., 2008). El mecanismo de lesión primaria más común causante de parálisis ocurre por la compresión de la médula espinal debido al desplazamiento de hueso o discos en la columna vertebral durante la fractura-dislocación o fractura por estallamiento (Baptiste & Fehlings, 2006).

### 1.2.2.2. Lesión Secundaria

#### 1.2.2.2.1. Fase Inmediata

La fase inmediata comienza al momento de la lesión y dura aproximadamente 2 horas (Norenberg et al., 2004). Esta fase es el resultado inmediato del evento causante de la lesión, en la que se observa sección traumática de los axones, muerte inmediata de neuronas y células gliales, y el fenómeno de shock medular (Ditunno et al., 2004). El resultado es la pérdida de la función de manera instantánea. El primer cambio fisiopatológico detectable es el edema generalizado de la médula espinal, comúnmente acompañado de hemorragia en la sustancia gris de la región central, donde las células inmediatamente mueren vía necrosis causada por la disrupción mecánica directa de las membranas celulares o por la isquemia provocada por la disrupción vascular (Rowland, et al., 2008). En esta fase se inician diversos procesos fisiopatológicos incluyendo la activación de las células microgliales casi instantáneamente después de la LTME (Donnelly & Popovich, 2007), el incremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Pineau & Lacroix., 2007), y en la concentración de glutamato extracelular hasta alcanzar niveles citotóxicos (Wrathall et al., 1996).

#### 1.2.2.2.2. Fase Aguda

En esta fase ocurren por lo general las intervenciones neuroprotectoras al ser en esta cuando los pacientes generalmente llegan al hospital a buscar ayuda médica después de haber sufrido el accidente que provocó la LTME (Rowland, et al., 2008). La

fase aguda de la LTME se divide en la fase aguda temprana y la fase subaguda. La fase aguda temprana dura de 2 a 48 horas posteriores a la lesión y se caracteriza por la presencia de hemorragia continua, edema creciente e inflamación. Adicionalmente marca el inicio de la producción de radicales libres, desregulación iónica, excitotoxicidad mediada por glutamato y neurotoxicidad asociada al sistema inmune (Tator & Koyanagi, 1997). Por su parte, la fase subaguda comienza dos días después de la lesión y perdura hasta dos semanas. En esta fase la respuesta fagocítica se encuentra en su punto máximo, removiendo residuos celulares del área de lesión a fin de promover el crecimiento axonal mediante la remoción de residuos de mielina que se comportan como inhibidores de crecimiento (Rowland et al., 2008).

#### 1.2.2.2.3. Fase Intermedia

La fase intermedia corresponde al periodo comprendido entre las dos semanas y los seis meses posteriores a la LTME. Esta fase se caracteriza por la eliminación de restos necróticos, la resolución del edema, la maduración continua de la cicatriz astrogliar y el desarrollo de siringomielia post-traumático, una complicación de la LTME que consiste en el desarrollo de quistes, cavidades llenas de líquido dentro de la médula espinal. Algunos síntomas de siringomielia son la pérdida sensorial del tipo disociativo con dolor y pérdida de temperatura con la preservación del tacto fino y sensación vibracional. Eventualmente puede provocar deterioro de funciones motoras y desgaste de músculo adicional (Rowland et al., 2008; Scivoletto et al., 2020). Además, esta fase también se caracteriza por brotes de regeneración axonal (Rowland et al., 2008). Se ha demostrado que los axones del tracto corticoespinal rebrotan durante la tercera semana y los 3 meses después de la LTME en un modelo en rata, mientras que las fibras retículoespinales rebrotan de 3 a 8 meses después de la LTME (Hill et al., 2001).

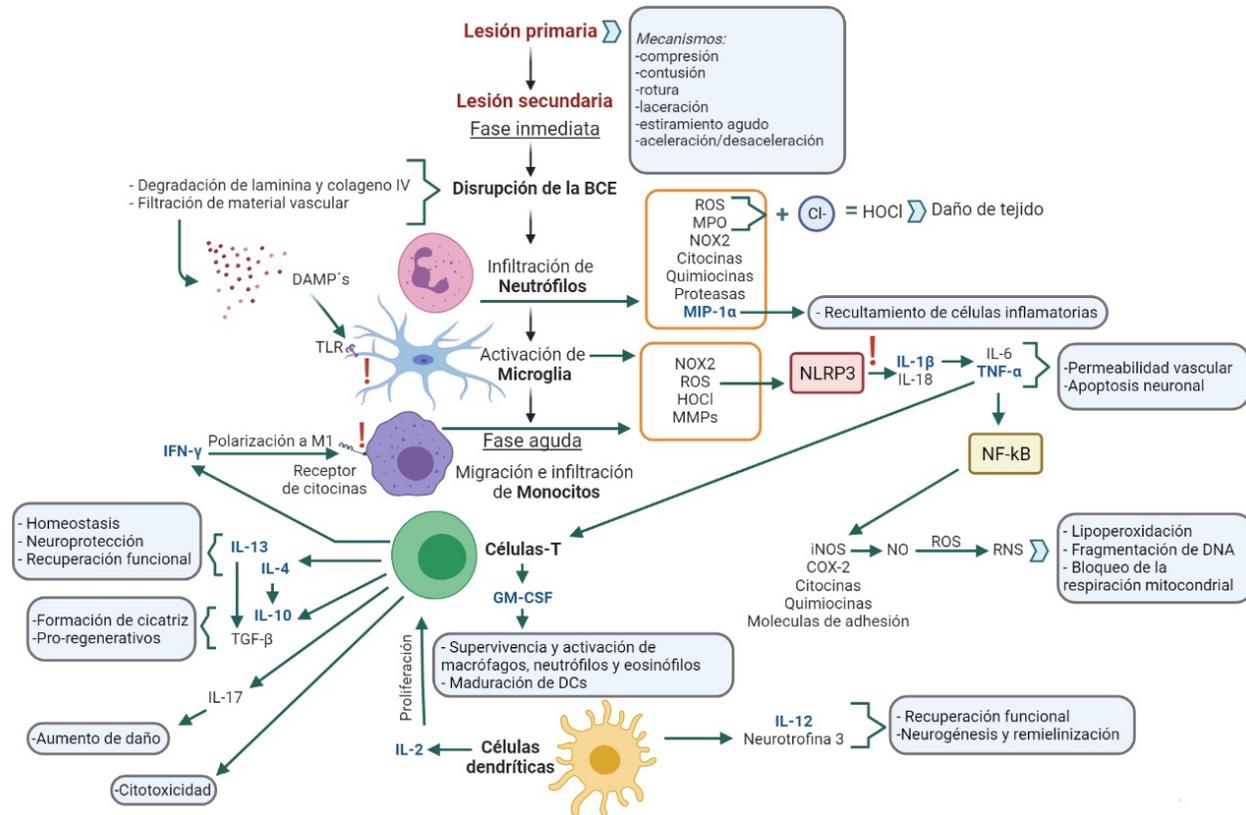
#### 1.2.2.2.4. Fase Crónica

La fase crónica inicia 6 meses después de la LTME y perdura a lo largo de toda la vida del paciente. Esta fase se caracteriza por la maduración y estabilización de la

lesión. Se forma una cicatriz continua y quistes. También se observa en esta fase el proceso de degeneración Walleriana que se caracteriza por rompimiento axonal y desmielinización, así como la remoción de residuos que ocurre distalmente a la lesión (Barton et al., 2017). Sin embargo, para que los axones lacerados y sus cuerpos celulares se renueven por completo, pueden pasar años (Rowland et al., 2008) o puede no ocurrir. Se considera que 1 a 2 años después de la LTME, ésta ha madurado por completo, aunque desafortunadamente, no se mantiene estática y la formación de un quiste puede causar disfunción neurológica retardada, como parálisis ascendente y dolor neuropático, hasta en el 30 % de los pacientes (Stoodley, 2000).

### 1.3. Inflamación en la Lesión Traumática de Médula Espinal

La respuesta inflamatoria en el SNC lesionado es muy complicada ya que presenta una naturaleza dual que puede ser benéfica o deletérea. Un ejemplo de esta dualidad se observa en el comportamiento del TNF- $\alpha$  después de una LTME. Esta citocina es clave en la inflamación y aumenta su producción posterior a la LTME en neuronas, glía y células endoteliales, por lo que su inhibición con anticuerpos neutralizantes ha demostrado mejorar la recuperación funcional neurológica (Bethea et al., 1999). Sin embargo, la señalización del mismo factor también ha demostrado tener un papel neuroprotector *in vitro* (Cheng et al., 1994) e *in vivo* (Kim et al., 2001). Los principales eventos inflamatorios que se llevan a cabo en las respectivas fases de la LTME, se resumen en la figura 4.



**Figura 4. Eventos inflamatorios principales en la lesión traumática de médula espinal.** La fisiopatología de la LTME consiste en una lesión primaria, el daño mecánico, y la lesión secundaria. En la fase inmediata de la lesión secundaria, la disrupción de la BCE causa la activación de la microglía. Los neutrófilos se infiltran y junto con la microglía, liberan factores pro-inflamatorios (incluyendo a la **IL-1β** la cual a su vez provoca el aumento del **TNF-α**) que causan mecanismos deletéreos y daño tisular adicional. Los neutrófilos liberan a la **MIP-1α** que recluta células inflamatorias. En la fase aguda los monocitos migran, se infiltran, maduran a macrófagos y se polarizan predominantemente al perfil M1 mediante una activación clásica por presencia de **IFN-γ** proveniente de células Th1. Los macrófagos M1 presentan un perfil de expresión pro-inflamatorio, similar al de la microglía. Las células T son estimuladas por el **TNF-α** para producir **GM-CSF** que promueve la supervivencia y maduración de células inflamatorias. Las células Th2 liberan **IL-13** e **IL-4**, las cuales provocan el aumento de **TGF-β** e **IL-10** respectivamente, promoviendo neuroprotección. El **TGF-β** y la **IL-10** favorecen la formación de cicatriz y son pro-regenerativos. Las células Th17 liberan **IL-17** que aumenta el daño y las células T CD8<sup>+</sup> son citotóxicas. Las células dendríticas favorecen la proliferación de células T al liberar **IL-2** y neurogénesis al liberar neurotrofina-3 e **IL-12**. BCE: barrera cerebroespinal. ROS: especies reactivas de oxígeno; MPO: mieloperoxidasa; NOX2: NADPH oxidasa 2; Cl<sup>-</sup>: cloro; HOCl: ácido hipocloroso; DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño; TLRs: Receptores tipo toll; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; MMPs: metaloproteinasas de la matriz; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa; NLRP3: inflammasoma que contiene dominios NACHT, LRR y PYD; IL-1β: Interleucina-1 beta; IL-18: Interleucina-18; IL-6: Interleucina-6; NF-κB: factor nuclear- kappa beta; COX-2: ciclooxigenasa-2; NO: óxido nítrico; RNS: especies reactivas de nitrógeno; DNA: ácido desoxirribonucleico; IL-12: Interleucina-12; IL-10: Interleucina-10; IL-4: Interleucina-4; IL-13: Interleucina-13; IFN-γ: interferón gamma; TGF-β: factor de crecimiento transformante beta; CD: grupo de diferenciación. (Biorender)

### 1.3.1. Fase Inmediata

#### 1.3.1.1. Disrupción de la Barrera Cerebroespinal

Inicialmente la LTME causa directamente necrosis y apoptosis de células endoteliales vasculares, ruptura de componentes de la membrana basal y daño estructural de la pared microvascular. Esto contribuye a la disrupción de la barrera cerebroespinal (BCE) que protege la médula espinal (Xun et al., 2017) y está constituida por uniones estrechas y células endoteliales de capilares sin fenestraciones intracelulares (Ren et al., 2018). Esta disrupción conlleva a una fuga del contenido vascular y a la acumulación de varias citocinas inflamatorias, lo que agrava aún más la reacción inflamatoria, así como el edema y otros mecanismos de daño secundario (Xun et al., 2017; Ren et al., 2018). Además, los componentes de la membrana basal, colágeno IV y laminina, comienzan a degradarse posterior a una LTME. La secreción de colágeno IV y laminina aumenta como parte de un mecanismo que busca la regeneración vascular y se activa rápidamente por requerimientos fisiopatológicos. Más aún, resultados previos han mostrado que la formación temprana de colágeno IV y laminina después de la LTME contribuye a la restricción de la reacción inflamatoria y promueve la neovascularización (Xun et al., 2017).

#### 1.3.1.2. Células de la Microglía

La microglía consiste en células extremadamente sensibles y son las primeras en responder a un daño en el SNC (Liberto et al., 2004). La activación de las células de la microglía, así como la invasión de neutrófilos ocurre prácticamente de inmediato después de una LTME y se mantienen por aproximadamente dos días (Donnelly & Popovich, 2008; Faden et al., 2016). La microglía es relevante en un contexto de LTME ya que lleva a cabo una activación profunda en respuesta a una lesión y constituye una fuente prominente de mediadores inflamatorios (Qu et al., 2012). Esto causa su activación y, subsecuentemente sufre cambios hipertróficos morfológicos y funcionales (Anwar et al., 2016), incluyendo una transformación a un modo migratorio, retracción de procesos, alargamiento del soma, incremento en la regulación de antígenos de

superficie y producción de quimiocinas y citocinas innatas incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-1, interleucina 3 (IL-3), interleucina 6 (IL-6), interleucina 12 (IL-12), interleucina 18 (IL-18), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), linfotóxina (LT), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ), metaloproteinasas de la matriz (MMPs), óxido nítrico (NO) y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) (Stoll et al., 2002; Trivedi et al., 2006; Anwar et al., 2016). Cabe destacar que la LT, el TNF- $\alpha$ , el NO y las ROS, pueden dañar a las células directamente (Liberto et al., 2004).

Generalmente, las células de la microglía existen en dos estados polarizados básicos los cuales son dependientes de señales externas; el fenotipo pro-inflamatorio M1 (clásicamente activadas) y el fenotipo anti-inflamatorio M2 (activado de forma alternativa), que produce citocinas anti-inflamatorias como la interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10), interleucina 13 (IL-13) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), para ayudar a mantener la homeostasis (Anwar et al., 2016; Trivedi et al., 2006). La microglía activada M1 está caracterizada por sus marcadores de superficie celular CD (grupo de diferenciación) 45, integrina  $\alpha_M\beta_2$ , receptor de complemento 3, CD11b) e intracelulares (óxido nítrico sintasa-2 o NOS-2). En contraste, el fenotipo anti-inflamatorio M2 se reconoce por su capacidad de liberar las citocinas anti-inflamatorias mencionadas y por sus marcadores extrínsecos (receptor de manosa CD206-receptor atrapador) e intrínsecos (arginasa) (Anwar et al., 2016).

En la primera semana después de la LTME, las poblaciones de macrófagos M1 y M2 están presentes en la zona de la lesión con una distribución relativamente similar pero conforme avanza el tiempo los macrófagos eventualmente se polarizan a M1. Esta polarización a M1 se ha observado en diversas especies y tipos de lesión de médula espinal, siendo una característica común de esta lesión (Zhang et al., 2013). Adicionalmente, la microglía al ser fagocitos, funciona como células presentadoras de antígeno (Trivedi et al., 2006) y los macrófagos/microglía estimulados, juegan un papel importante en la remoción del tejido dañado o deteriorado eliminando posibles inhibidores de crecimiento, siendo así una ventaja en cuanto a la recuperación funcional y la regeneración neuronal (Kong & Gao, 2017).

En la generación de la lesión secundaria después de una LTME, la microglía M1 activada inicia una cascada de respuestas neurotóxicas que contribuye a la muerte por apoptosis y necrosis de células endoteliales, neuronas, axones y oligodendrocitos (Anwar et al., 2016). Los macrófagos/microglia activada son una fuente crónica de muchas sustancias citotóxicas, así como citocinas pro-inflamatorias, el TNF- $\alpha$ , óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), ácido hipocloroso (HOCl) y ROS (Gilgun et al., 2001). Los ROS son producidos en el curso natural del metabolismo de oxígeno en la cadena respiratoria mitocondrial (Gilgun et al., 2001), especialmente bajo la influencia de ciertos químicos ambientales y la luz solar (Urushitani et al., 2000). A pesar de ser productos normales del metabolismo celular, así como mensajeros de señalización importantes, una cantidad excesiva de ROS es citotóxica (Gilgun et al., 2001).

El término ROS incluye radicales superóxido ( $O_2^-$ ), radicales hidroxilo ( $OH^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) e hidroperóxidos ( $HO_2$ ), además de otros como las especies reactivas de sulfuro, especies reactivas de nitrógeno (RNS), NO y peroxinitrito ( $O=N-O-O-$ ) (Elufioye et al., 2017). Uno de los factores inflamatorios principales es la producción exagerada de ROS en el sitio del trauma, estos consumen a los antioxidantes endógenos resultando en la disrupción del balance redox, lo que provoca un daño severo del ácido desoxiribonucleico (DNA), proteínas y lípidos (lipoperoxidación). Además de contribuir a una peroxidación incontrolada, el equilibrio perturbado también contribuye a la inflamación y edema concomitante (Nukolova et al., 2018). Los macrófagos/microglía activados secretan cantidades enormes de MMPs, las cuales contribuyen a la degradación de la membrana basal vascular, provocando un aumento en la permeabilidad para la infiltración de células inflamatorias. La microgliosis reactiva después de la LTME participa en el ciclo autopropagante de daño neuronal inicial, la microglía activada por restos de mielina, que a su vez aumenta la regulación a la alta de citocinas pro-inflamatorias y moléculas neurotóxicas que causan más daño tisular y continúa el ciclo de activación/destrucción (Louw et al., 2016).

### 1.3.1.3. Inflamasomas

La familia de los receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótido (NOD), o NLRs, contienen un dominio de repetición rica en leucina (LRR), un dominio central NACHT y un dominio variable amino terminal que en el caso de la subfamilia NLRP, es un dominio de pirina (PYD) N-terminal. Los inflamasomas son proteínas que contienen dominios NACHT, LRR y PYD (NLRP). Los NLRP1 y NLRP3 están constituidos por un dominio NLRP, una caspasa-1 y un adaptador llamado proteína tipo punto asociada a apoptosis (ASC) (Zendedel et al., 2015). Los ROS activan los inflamasomas NLRP3 (Luo et al., 2014). La activación de los NLRP provoca el reclutamiento de ASC, el cual contiene un dominio de reclutamiento y activación de caspasas (CARD). El ASC puede entonces interactuar con el dominio CARD de la pro caspasa-1, esto conlleva a que se convierta en su forma activa, caspasa-1, la cual a su vez convierte pro formas de IL-1 $\beta$  e IL-18 a sus respectivas formas activas, con lo que inicia una respuesta inflamatoria (Zendedel et al., 2015).

En la microglía se han caracterizado tres tipos de inflamasomas, NLRP3, NLRC4 y Aim2 (Lin et al., 2017). La vía de NLRP3 es responsable de inducir respuestas de neuroinflamación y muerte celular (Jiang et al., 2016). Regular al inflamasoma NLRP3 ha mostrado ejercer neuroprotección en un modelo de LTME por contusión en rata (Zendedel et al., 2015). Es importante considerar al factor nuclear eritroide tipo 2 (Nrf2), un regulador maestro del estrés oxidante (Shang et al., 2017) que regula la transcripción de varios genes antioxidantes bajo condiciones de estrés oxidante e inflamación (Liu et al., 2008). En la LTME, la activación de la vía de señalamiento de Nrf2 conlleva a la detoxificación y a la expresión de genes de defensa antioxidantes (Wang et al., 2012). La Hemo Oxigenasa-1 (HO-1), un blanco de Nrf2, es una enzima anti-inflamatoria y de detoxificación de fase II (Lee et al., 2015A), que contribuye a la inhibición del inflamasoma NLRP3 (Luo et al., 2014).

#### 1.3.1.4. Citocinas

En la fase inmediata después de la LTME aumenta la producción de citocinas pro-inflamatorias (Ludwig et al., 2017; Pineau & Lacroix, 2007) y, a pesar de que aún no se conoce el mecanismo exacto, es generalmente aceptado que las citocinas inflamatorias juegan un papel pivote en desatar una cascada de eventos que conlleva a la apoptosis celular (Ning et al., 2012). Las citocinas inflamatorias comprenden una amplia categoría de proteínas pequeñas y solubles que median y modulan el complejo comportamiento funcional del sistema inmune (Ren et al., 2018). La acumulación temprana de citocinas inflamatorias en y alrededor de los microvasos en la zona isquémica, ha sido ampliamente reportado, lo que puede ser la causa del edema en la médula espinal y de la muerte por apoptosis de las neuronas (Ning et al., 2012).

El aumento de citocinas que generalmente acompaña a la LTME, a su vez, causa el incremento en la regulación de agentes inflamatorios y apoptóticos que incluyen al factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B), a la cinasa c-Jun N-terminal y a la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) P38 (Ludwig et al., 2017). Se ha reportado que los tres miembros principales de la familia de MAPK, cinasas reguladas por señalización extracelular (Erk), c-Jun N-terminal cinasa (JNK) y p38, son responsables de la producción de citocinas. La activación de MAPK es esencial para la producción de varias citocinas inflamatorias, incluyendo a la IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Qu et al., 2012). Es importante mencionar que las familias MAPK, responden al estímulo del estrés y están involucradas en la producción de ROS (Emre et al., 2007).

##### 1.3.1.4.1. Interleucina 1

La función principal de las citocinas de tipo interleucina 1 (IL-1) es regular las reacciones pro-inflamatorias en respuesta al daño en tejido mediante la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) o la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Esto las convierte en mediadores importantes en las respuestas inmunes innatas (Weber et al., 2010). La interleucina 1

(IL-1) tiene dos isoformas; la interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) y la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), las cuales tienen un 26% de homología y ejercen acciones biológicas similares (Ren et al., 2018). La IL-1 $\alpha$  se encuentra principalmente anclada a la membrana y señala a través de mecanismos autocrinos o yuxtácrinos, mientras que la IL-1 $\beta$  es secretada y actúa de forma paracrina o sistémica (Weber et al., 2010).

La IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  se unen al receptor a la IL-1 tipo I (IL-1R1) el cual se expresa de forma ubicua. Esta unión ligando-receptor provoca un cambio conformacional en el IL-1R1, facilitando el reclutamiento de la proteína accesoria del receptor a la IL-1 (IL-1RacP), mediante regiones llamadas dominios tipo Toll/IL-1R (TIR), el complejo trimétrico se ensambla rápidamente a dos proteínas de señalización intracelular, el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MYD88) y la proteína cinasa activada por el receptor de IL-1 (IRAK) 4. La IL-1, el IL-1R1, la IL-RAcP, el MYD88 y la IRAK4 forman un módulo de señalización estable inducido por la IL-1. La IRAK4 se autofosforila y a su vez fosforila a la IRAK 1 y la IRAK 2. A esto le sigue el reclutamiento y oligomerización del factor asociado al factor de necrosis tumoral (TRAF) 6 (Weber et al., 2010).

TRAF6 sirve como una ubiquitina E3 ligasa que, junto con el complejo de ubiquitina E2 ligasa compuesto por la enzima E2 N conjugadora de ubiquitina (UBC13) y la enzima E2 variante 1 conjugadora de ubiquitina (UEV1A), une cadenas de poliubiquitina unidas a K63 a varios intermediarios de señalización de la IL-1, incluyendo IRAK1, la proteína cinasa activada por TGF- $\beta$  (TAK1), un miembro de la familia de proteína cinasa cinasa cinasa activadas por mitógenos (MAPKKK), y la proteína de unión a TAK 1 (TAB) 2 y TAB3. La ubiquitinación de TAK1 promueve la asociación con TRAF6 y con MEKK3, otra proteína de la familia MAPKKK (Weber et al., 2010). La oligomerización de TRAF6 y subsecuente formación de al menos dos complejos de señalización TAK 1 y MEKK3, activan las vías de NF- $\kappa$ B, JNK y p38 MAPK (Weber et al., 2010). Las características generales y la participación de la IL-1 en la LTME se resumen en la tabla 2.

**Tabla 2. Características generales y participación de la interleucina 1 en la lesión traumática de la médula espinal**

IL-1			
Células productoras principales	Células blanco	Características Generales	Participación en la LTME
Monocitos Macrófagos <sup>1</sup> Células endoteliales Fibroblastos <sup>8</sup>	Monocitos/Macrófagos <sup>9</sup> Microglía Neuronas <sup>2</sup> Células epiteliales Condrocitos Fibroblastos <sup>8</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● La maduración de la IL-1<math>\beta</math> depende de la activación del inflammasoma                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Induce el aumento otras citocinas pro-inflamatorias (TNF-<math>\alpha</math> y la IL-6)</li> </ul> </li> <li>● Activa la inmunidad innata induciendo la expresión de citocinas y quimiocinas inflamatorias<sup>3</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ provoca infiltración de leucocitos polimorfonucleares a zona inflamada<sup>3,4</sup></li> </ul> </li> <li>● Estimula monocitos/macrófagos</li> <li>● Amplifica inflamación<sup>2</sup></li> <li>● Regulador maestro de las reacciones inflamatorias del sistema inmune<sup>3</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Activa células T<sup>1</sup></li> </ul> </li> <li>● Incrementa fagocitosis y actividad bactericida</li> <li>● Potencia actividad del sistema del complemento                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Facilita la activación de la respuesta inmune adaptativa<sup>3</sup></li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Se expresa como consecuencia de la activación microglial                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Neuroinflamación</li> </ul> </li> <li>● Activación de la microglía</li> <li>● Muerte neuronal directa</li> <li>● Estrés oxidante y producción de neurotoxinas                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Muerte neuronal indirecta</li> </ul> </li> <li>● Efecto anti-neurogénico<sup>2</sup></li> <li>● Incrementa producción de COX-2<sup>4</sup></li> <li>● Promueve la activación de p38 MAPK y de la caspasa 3<sup>1</sup></li> <li>● La maduración de la IL-1<math>\beta</math> depende de la activación del inflammasoma<sup>5</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Incrementa expresión del TNF-<math>\alpha</math><sup>1,6</sup> y la IL-6<sup>6</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Incrementa permeabilidad vascular<sup>7</sup></li> <li>■ Aumenta migración de:                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>● Neutrófilos</li> <li>● Microglía/macrófagos M1 activados<sup>1</sup></li> </ul> </li> <li>■ Apoptosis<sup>9</sup></li> </ul> </li> </ul> </li> <li>● Disminuye la plasticidad axonal<sup>10</sup></li> <li>● Disminuye recuperación funcional<sup>12</sup></li> <li>● Promueve la expresión del NGF (efecto neural no inmunológico mediado por IL-1)<sup>11</sup></li> <li>● Estimula producción de neurotrofina-3 y del BDNF                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Aumenta crecimiento de neuritas</li> <li>○ Neuroprotección<sup>2</sup></li> </ul> </li> </ul>

IL: interleucina; LTME: lesión traumática de la médula espinal; COX-2: Ciclooxigenasa-2; MAPK: proteína cinasa activada por mitógeno; TNF: factor de necrosis tumoral; NGF: factor de crecimiento nervioso; BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro. (<sup>1</sup> Ren et al., 2018; <sup>2</sup> Liu & Quan, 2018; <sup>3</sup> Morrison & Filosa, 2013; <sup>4</sup> Tonai et al., 1999; <sup>5</sup> Lin et al., 2017; <sup>6</sup> Burke et al., 2014; <sup>7</sup> Sheikpranbabu et al., 2009; <sup>8</sup> Weber et al., 2010; <sup>9</sup> Wang et al., 2005; <sup>10</sup> Boato et al., 2013; <sup>11</sup> De Kosky et al., 1996; <sup>12</sup> Akuzawa et al., 2008)

#### 1.3.1.4.2. Factor de Necrosis Tumoral Alfa

El aumento rápido en la expresión de TNF- $\alpha$  es característico en la zona de la LTME (Yune et al., 2003). Esta citocina es una proteína de 17 KDa que consiste en 157 aminoácidos, es un homotrímero en solución y su bioactividad se regula principalmente por receptores a TNF- $\alpha$  solubles. En humanos, el gen está mapeado en el cromosoma

6. El TNF es producido principalmente por macrófagos, linfocitos T y células asesinas naturales (NK), pero también es producido en menor medida por otras células incluyendo fibroblastos, células de músculo liso y células tumorales. Esta citocina es sintetizada como pro-TNF, el cual se une a la membrana y se libera cuando se corta de su pro-dominio por acción de la enzima convertidora de TNF (TACE). El TNF- $\alpha$  actúa a través de dos receptores distintos, el receptor al TNF (TNFR) 1 y TNFR2, pero a pesar de que la afinidad por TNFR2 es 5 veces más alta que con el TNFR1, este último inicia la mayor de las actividades biológicas. El TNFR1 es expresado por todos los tipos celulares mientras que el TNFR2 es expresado principalmente por células inmunes. La principal diferencia entre estos receptores es que el TNFR2 no tiene un dominio de muerte como el que posee el TNFR1, el cual no solo participa en la inducción de la apoptosis, sino también en la transducción de señales de supervivencia (Atzeni et al., 2013).

El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción importante para la inducción de moléculas relacionadas con la inflamación, que se encuentra corriente abajo en la señalización de TNF- $\alpha$  (Bao et al., 2016). El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción sensible a redox, que activa cascadas de señalización inducidas por el estrés oxidante y juega un papel importante en convertir el estrés oxidante en señales inflamatorias (Zhang et al., 2015). Dentro del núcleo, NF- $\kappa$ B induce la expresión de genes inflamatorios como ciclooxigenasa 2 (COX-2), iNOS y citocinas inflamatorias (Lee et al., 2004). El NO producido por iNOS es un radical libre de elevada reactividad que está implicado en la lesión neuronal y en enfermedades neurodegenerativas (Yune et al., 2003;). La vía de NF- $\kappa$ B también aumenta la regulación de la expresión de otras proteínas inflamatorias como quimiocinas y moléculas de adhesión (Lawrence, 2009). Las características generales y la participación del TNF- $\alpha$  en la LTME se resumen en la tabla 3.

**Tabla 3. Características generales y participación del factor de necrosis tumoral alfa en la lesión traumática de la médula espinal**

TNF- $\alpha$			
Células productoras principales	Células blanco	Características Generales	Participación en la LTME
Monocitos Macrófagos/ microglía Queratinocitos Mastocitos Células T activadas Células B activadas <sup>12</sup>	Macrófagos/ microglía <sup>3,12</sup> Neutrófilos <sup>12</sup> Astrocitos <sup>3</sup> Neuronas <sup>3</sup> Células endoteliales <sup>12</sup> Queratinocitos <sup>12</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Efecto trófico o tóxico, el cual es dependiente del tipo de célula y de los receptores que estén activando<sup>9</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Participa en la inducción de la apoptosis<sup>6</sup></li> <li>○ Participa en la transducción de señales de supervivencia<sup>6</sup></li> </ul> </li> <li>● Tiene al NF-kB corriente abajo<sup>4</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Aumenta expresión de:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>■ COX-2</li> <li>■ iNOS</li> <li>■ Citocinas inflamatorias<sup>5</sup></li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Induce muerte por apoptosis de neuronas, glía y oligodendrocitos<sup>1</sup></li> <li>● Aumenta edema y permeabilidad microvascular</li> <li>● Aumenta extensión de la herida<sup>11</sup></li> <li>● Induce expresión de moléculas de adhesión                     <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Recluta linfocitos y macrófagos al sitio de la lesión<sup>2</sup></li> </ul> </li> <li>● Induce iNOS en astrocitos, microglia, macrófagos y neuronas<sup>3</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Produce cantidades excesivas de moléculas NO<sup>3</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Vasodilatación</li> <li>■ Neurotransmisión<sup>1</sup></li> <li>■ Desmielinización dependiente de microglía</li> <li>■ Degeneración de las células del parénquima<sup>3</sup></li> <li>■ NO reacciona con O<sub>2</sub><sup>-</sup> generando peroxinitritos                             <ul style="list-style-type: none"> <li>● Neurotoxicidad mediada por glutamato<sup>8</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Lipoperoxidación</li> <li>○ Fragmentación de DNA</li> <li>○ Bloqueo de respiración mitocondrial                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Exacerba apoptosis en neuronas<sup>1,3,10</sup></li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li></ul>

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa; LTME: lesión traumática de la médula espinal; NF-kB: factor nuclear kappa B; COX-2: ciclooxigenasa-2; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; NO: óxido nítrico; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anión superóxido; DNA: ácido desoxiribonucleico. (<sup>1</sup>Yune et al., 2003; <sup>2</sup>Liberto et al., 2004; <sup>3</sup>Anwar et al., 2016; <sup>4</sup>Bao et al., 2016; <sup>5</sup>Lee et al., 2004; <sup>6</sup>Atzeni et al., 2013; <sup>8</sup>Urushitani et al., 2000; <sup>9</sup>Yune et al., 2004; <sup>10</sup>Ferguson et al., 2008; <sup>11</sup>Sharma et al., 2003; <sup>12</sup>Malerich & Elston, 2003)

#### 1.3.1.4.3. Interleucina 12

La IL-12 es una citocina importante en la regulación de la respuesta celular inmune, especialmente la respuesta inmune Th1. Es producida en respuesta a patógenos mediante los receptores tipo toll (TLRs) y otros receptores, a señales solubles y unidas a la membrana de células T activadas y de células NK, así como a componentes de la matriz extracelular, mediante CD44 y TLRs (Trinchieri, 2003). En el

SNC, la microglía expresa IL-12 y su receptor, por lo tanto, la microglía puede activarse con IL-12 secretada por sí misma (Yaguchi et al., 2008).

La transducción de señales mediante IL-12R, induce la fosforilación de tirosina, principalmente de las familias-Janus de cinasas JAK2 y TYK2, que a su vez, fosforilan y activan al transductor de señales y activador de la transcripción (STAT) 1, STAT3, STAT4 y STAT5. Los efectos celulares específicos de la IL-12 se deben principalmente a su habilidad para inducir la activación de STAT4. En células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, se requiere STAT4 para la inducción de la producción del interferón gamma (IFN-γ) por efecto de la IL-12, mientras que las células T CD4<sup>+</sup>, pero no las CD8<sup>+</sup>, requieren de STAT4 para la producción de IFN-γ en respuesta a la activación del receptor de células T (TCR). El IFN-γ inducido por IL-12 media muchas de las actividades pro inflamatorias de la IL-12 (Trinchieri, 2003). Las características generales y la participación de la IL-12 en la LTME se resumen en la tabla 4.

**Tabla 4. Características generales y participación de la interleucina 12 en la lesión traumática de la médula espinal**

IL-12			
Células productoras principales	Células blanco	Características Generales	Participación en la LTME
<ul style="list-style-type: none"> <li>Monocitos/macrófagos<sup>1</sup></li> <li>Microglía<sup>2</sup></li> <li>Neutrófilos<sup>1</sup></li> <li>DCs<sup>1</sup></li> <li>Células Th1<sup>1</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Macrófagos/microglía<sup>2</sup></li> <li>DCs<sup>2</sup></li> <li>Neuronas<sup>2</sup></li> <li>Astrocitos<sup>2</sup></li> <li>Células T<sup>1</sup></li> <li>Progenitores hematopoyéticos<sup>1</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Activa a STAT4               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Induce producción de IFN-γ<sup>1</sup></li> </ul> </li> <li>● Induce proliferación y formación de colonias de:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Células NK</li> <li>○ Células NKT</li> <li>○ Células T<sup>1</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Aumenta expresión de mediadores citotóxicos                   <ul style="list-style-type: none"> <li>● Potenciamiento de citotoxicidad<sup>1</sup></li> </ul> </li> <li>■ Aumenta expresión de citocinas<sup>1</sup></li> </ul> </li> </ul> </li> <li>● Favorece diferenciación a:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Células Th1</li> <li>○ Células T citotóxicas 1</li> <li>○ NK1<sup>1</sup></li> <li>○ Células B                   <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Potencia activación y producción de inmunoglobulinas asociadas a Th1<sup>1</sup></li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Aumenta número de macrófagos/microglía y DCs activadas<sup>2,3</sup></li> <li>● Aumenta expresión de BDNF               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Neurogénesis</li> <li>○ Remielinización<sup>3</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Promueve recuperación funcional<sup>2</sup></li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>

IL: interleucina; LTME: lesión traumática de la médula espinal; DCs: células dendríticas; Th: T cooperadoras; STAT: transductor de señales y activador de la transcripción; IFN: interferón-γ gamma; NK: asesinas naturales; NKT: célula T asesina natural; BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro. (<sup>1</sup> Trinchieri., 2003; <sup>2</sup> Yaguchi et al., 2008; <sup>3</sup> Ren et al., 2018)

#### 1.3.1.4.4. Interferón gamma

El IFN- $\gamma$ , originalmente llamado factor activador de macrófagos, es el único IFN tipo II (Schroder et al., 2004) y tiene una participación importante en la inmunorregulación (Ren et al., 2018). La producción de IFN- $\gamma$  es controlada por citocinas secretadas por células presentadoras de antígeno (APCs), siendo las más notorias la IL-12 y la IL-18. Estas citocinas funcionan como un puente que une la infección con la producción de IFN- $\gamma$  en la respuesta inmune innata. El reconocimiento de muchos patógenos por parte de los macrófagos induce la secreción de IL-12 y de quimiocinas como la MIP-1 $\alpha$ . Estas quimiocinas atraen a células NK al sitio de inflamación y la IL-12 promueve la síntesis de IFN- $\gamma$  en estas células. En macrófagos, células NK y T, la estimulación combinada de IL-12 e IL-18 incrementa todavía más la producción de IFN- $\gamma$ , mientras que los reguladores negativos de la producción de IFN- $\gamma$  incluyen a la IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  y los glucocorticoides (Schroder et al., 2004). El IFN- $\gamma$  aumenta su regulación en el tejido dañado después de una LTME con una ventana de tiempo que va de 2 a 12 horas después del trauma (Roselli et al., 2018).

El receptor al receptor al IFN- $\gamma$  (IFNGR) está formado por dos cadenas IFNGR1 que se unen al ligando asociadas a dos cadenas transductoras de señales IFNGR2 asociadas a una maquinaria de señalización. Las cadenas IFNGR1 e IFNGR2 pertenecen a la familia de receptores de citocinas clase II. La principal vía de señalización del IFN- $\gamma$  para influenciar la regulación de genes es la JAK-STAT, la cual involucra el reclutamiento secuencial de receptores y la activación de miembros de la familia de cinasas Janus (JAKs: JAK 1-3 y Tyk2) y de los STATs (STAT 1-6, incluyendo a STAT5a y STAT5b) para controlar la transcripción de genes blanco vía elementos de respuesta específicos (Schroder et al., 2004). Las características generales y la participación del IFN- $\gamma$  en la LTME se resumen en la tabla 5.

**Tabla 5. Características generales y participación del interferón gamma en la lesión traumática de la médula espinal**

IFN- $\gamma$			
Células productoras principales	Células blanco	Características Generales	Participación en la LTME
<p>Células Th1</p> <p>Células T CD8<sup>+</sup></p> <p>Células NK</p> <p>Células B,</p> <p>Células NKT</p> <p>Monocitos/ macrófagos</p> <p>DCs<sup>1</sup></p>	<p>Macrófagos/ microglía<sup>1</sup></p> <p>DCs<sup>1</sup></p> <p>Células NK<sup>1</sup></p> <p>Células T<sup>4</sup></p> <p>Células B<sup>1</sup></p> <p>Células endoteliales<sup>1</sup></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Involucrado en actividad antiviral<sup>6</sup></li> <li>● Dirige el crecimiento, la maduración y la diferenciación de muchos tipos de células<sup>1</sup></li> <li>● Su secreción por NKs y APCs es importante en la defensa contra infecciones<sup>1</sup></li> <li>● Aumenta la actividad de células NK<sup>1</sup></li> <li>● Su producción por APCs locales es importante para la auto-activación y en la activación de células cercanas<sup>1</sup></li> <li>● La estimulación de macrófagos por el IFN-<math>\gamma</math> induce: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Mecanismos antimicrobianos</li> <li>○ Mecanismos antitumorales</li> <li>○ Aumenta la regulación de vías de procesamiento y presentación de antígenos<sup>1</sup></li> </ul> </li> <li>● Coordina interacción linfocito-endotelio<sup>4</sup></li> <li>● Organiza la atracción de leucocitos<sup>1</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Es crucial para la plasticidad inmunológica del epitelio del plexo coroideo, permitiendo la entrada regulada de células T <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Promueve reparación<sup>4</sup></li> </ul> </li> </ul> </li> <li>● Regula funciones de las células B: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Producción de inmunoglobulinas</li> <li>○ Cambio de clase<sup>1</sup></li> </ul> </li> <li>● Regula el balance Th1 y Th2<sup>4</sup></li> <li>● Polarización de macrófagos al fenotipo M1<sup>6</sup></li> <li>● Participa en la apoptosis<sup>4</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Induce una mayor acumulación de macrófagos/microglía en la médula espinal<sup>2</sup></li> <li>● En modelos de LTME en ratones TCR<math>\delta^{-/-}</math> hay un grado mayor de recuperación funcional<sup>5</sup></li> <li>● Quimeras sin expresión de IFN-<math>\gamma</math>R en macrófagos mostraron: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Recuperación motora mejorada</li> <li>○ Niveles reducidos de citocinas inflamatorias<sup>6</sup></li> </ul> </li> </ul> <p><i>Observaciones contrastantes:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Aumenta niveles de mRNA de GDNF y del IGF-1</li> <li>● Promueve una recuperación más rápida en el rendimiento motor después de la lesión</li> <li>● Disminuye acumulación de CSPG, inhibidores del crecimiento axonal producidos por los astrocitos</li> <li>● Inhibe excrecencia de axones críticos producidos por astrocitos reactivos</li> <li>● Aumenta número de fibras nerviosas positivas a serotonina y de fibras nerviosas mielinizadas alrededor del epicentro de la lesión<sup>2</sup></li> <li>● Facilita la secreción de IL-10 por parte de las células Th1 y de macrófagos/microglía<sup>3</sup></li> </ul>

IFN- $\gamma$ : interferón gamma; LTME: lesión traumática de la médula espinal; Th: T cooperadoras; CD: grupo de diferenciación; NK: asesinas naturales; NKT; célula T asesina natural, DCs: células dendríticas; APCs; células presentadoras de antígeno; CSPG: proteoglicanos de condroitín sulfato; GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía; IGF-1: factor de crecimiento tipo insulina 1; IFN- $\gamma$ R; receptor al IFN-gamma; TCR $\delta^{-/-}$ : modelo de ratones deficientes en células T gamma delta, fuentes importantes de IFN- $\gamma$ ). (<sup>1</sup> Schroder et al., 2004; <sup>2</sup> Fujiyoshi et al., 2010; <sup>3</sup> Ishii et al., 2013; <sup>4</sup> Ren et al., 2006; <sup>4</sup> Tau & Rothman, 1999; <sup>5</sup> Sun et al., 2018; <sup>6</sup> Roselli et al., 2018)

#### 1.3.1.4.5. Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 Alfa

La MIP-1 $\alpha$ , también conocida como ligando de quimiocina 3 (CCL3), es una citocina involucrada en el reclutamiento de células inflamatorias, lo que juega un papel importante en las condiciones inflamatorias del SNC y del SNP (Pelish et al., 2020). La MIP-1 $\alpha$  pertenece a la familia de citocinas CC con propiedades quimiotácticas potentes, cuya función biológica es generar una respuesta inflamatoria caracterizada por la infiltración de neutrófilos. La función biológica de las quimiocinas ocurre después de la activación de receptores acoplados a proteínas G que están en la superficie de una variedad de células. Después de la activación, las quimiocinas inducen la migración y acumulación de células inflamatorias hacia la fuente de la producción de quimiocinas. Debido a que la MIP-1 $\alpha$  es una citocinas quimioatrayente asociada con el reclutamiento de leucocitos en respuesta a tejido lesionado o inflamación, puede unirse a los receptores de quimiocinas CCR1 y CCR5, por lo que esta proteína puede reclutar múltiples células. La MIP-1 $\alpha$  juega un papel determinante en la respuesta de los linfocitos. Por ejemplo, la MIP-1 $\alpha$  atrae preferencialmente a células T CD8<sup>+</sup> activadas, mientras que la MIP-1 $\beta$ , que comparte 56.7% de homología en su secuencia con la MIP-1 $\alpha$ , atrae selectivamente a células CD4<sup>+</sup> activadas (Bhavsar et al., 2015).

Bajo condiciones normales, la síntesis de la MIP-1 $\alpha$  ocurre en niveles muy bajos, sin embargo, una vez que ocurre la estimulación de células receptoras con endotoxinas, proteínas virales o citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 $\beta$ , se activan vías de señalización celular que inducen la producción de la MIP-1 $\alpha$  cuyos niveles son regulados por diferentes factores de transcripción. Uno de estos factores es la proteína nuclear MIP-1 $\alpha$  (MNP) que induce la transcripción del gen de la MIP-1 $\alpha$ . Después de una LTME, las células endoteliales vasculares se activan. La interacción entre estas y los leucocitos que están migrando del sistema circulatorio al sitio de inflamación depende de la producción de citocinas y de moléculas de adhesión endotelial, las cuales, en su estado activado, ayudan a retener leucocitos y trans-migrarlos al tejido inflamado de la lesión. La molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) juega un papel importante en la interacción entre monocitos y células endoteliales para producir a la

MIP-1 $\alpha$  (Bhavsar et al., 2015). Las características generales y la participación de la MIP-1 $\alpha$  en la LTME se resumen en la tabla 6.

**Tabla 6.** Características generales y participación de la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa en la lesión traumática de la médula espinal

MIP-1 $\alpha$			
Células productoras principales	Células blanco	Características Generales	Participación en la LTME
Monocitos/ macrófagos	Monocitos/ macrófagos	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Inhibición de células madre</li> <li>● Mantenimiento de la respuesta inmune efectiva</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● MIP-1<math>\alpha</math> y sus receptores aumentan posterior a una LTME<sup>2</sup></li> <li>● Recluta macrófagos a la zona de lesión                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Secretan factores de crecimiento                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Promueven proliferación de fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos.</li> <li>■ Producen proteínas que promueven el remodelamiento de la matriz extracelular</li> <li>■ Fagocitosis</li> <li>■ Promueven la curación de heridas</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>● Atrae células T CD8<sup>+</sup> activadas con preferencia<sup>1</sup></li> <li>● En la zona de lesión aumenta:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Neutrófilos</li> <li>○ Citocinas</li> <li>○ Quimiocinas pro-inflamatorias</li> </ul> </li> <li>● Disminuye recuperación locomotora</li> <li>● Aumenta tamaño de la lesión</li> <li>● Aumenta daño neuronal<sup>2</sup></li> </ul>
Células T	Neutrófilos	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Aumenta en sitios de:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Inflamación</li> <li>○ Resorción de hueso</li> </ul> </li> </ul>	
Células B	Basófilos	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Participa en el remodelamiento del tejido óseo                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Activa osteoclastos                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Induce directamente la destrucción del hueso</li> </ul> </li> <li>○ Induce osteoclastogénesis</li> </ul> </li> </ul>	
Neutrófilos	Eosinófilos	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Es una citocina quimiotáctica</li> </ul>	
DCs	DCs	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Recluta células inflamatorias:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Linfocitos</li> <li>○ Neutrófilos</li> <li>○ Eosinófilos</li> <li>○ Macrófagos                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Participa en curación de heridas</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	
Células NK	Linfocitos	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Inhibe proliferación de células hematopoyéticas<sup>1</sup></li> </ul>	
Osteoblastos	Plaquetas <sup>1</sup>		
Células epiteliales <sup>1</sup>			

MIP-1 $\alpha$ : proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa; LTME: lesión traumática de la médula espinal; DCs: células dendríticas; NK: asesinas naturales; CD: grupo de diferenciación. (<sup>1</sup> Bhavsar et al., 2015; <sup>2</sup> Pelish et al., 2020)

#### 1.3.1.4.6. Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos

El factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) es un factor de crecimiento pequeño glicoproteico producido por una gran variedad de tipos de células (Griffin et al., 1990) que actúa como factor hematopoyético de 14.2 kDa (Ren et al., 2018). El GM-CSF induce el crecimiento de varios linajes celulares hematopoyéticos y puede funcionar como factor neurotrófico e inducir la proliferación de células progenitoras neurales *in vitro* (Chung et al., 2014). Puede promover la

supervivencia y activación de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos y la maduración de DCs (Egea et al., 2010). Sus efectos biológicos son mediados a través de la unión a receptores de superficie celular, los cuales son expresados en células hematopoyéticas y algunas no-hematopoyéticas, como las células endoteliales (Griffin et al., 1990).

El receptor a GM-CSF (GM-CSFR) es un heterodímero que consiste de una subunidad- $\alpha$  específica para la unión de GM-CSF, y una subunidad- $\beta\gamma$  de señalamiento que comparte con los receptores a IL-3 e IL-5 en humanos. Usando cristalografía de rayos-X se determinó que el GM-CSFR existe como una estructura de *dodecámero* que contiene dos complejos, cada uno compuesto por dos moléculas de GM-CSF, dos cadenas GM-CSFR $\alpha$  y dos cadenas GM-CSFR $\beta\gamma$ . La tirosin-cinasa JAK2 juega un papel esencial en la señalización de GM-CSF. El complejo *dodecámero* parece ser requerido para la fosforilación de tirosina de  $\beta\gamma$  por JAK2, para la activación del receptor y la iniciación de transducción de señales. Esta compleja organización estructural del receptor puede explicar en parte las funciones biológicas pleiotrópicas del GM-CSF (Egea et al., 2010). Las características generales y la participación del GM-CSF en la LTME se resumen en la tabla 7.

**Tabla 7.** Características generales y participación del factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos en la lesión traumática de la médula espinal

GM-CSF			
Células productoras principales	Células blanco	Características Generales	Participación en la LTME
Fibroblastos Células endoteliales Células T Macrófagos Células mesoteliales Células epiteliales <sup>2</sup>	Macrófagos/microglía Neutrófilos Eosinófilos DCs Células endoteliales <sup>1</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Inductores potentes del GM-CSF:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ IL-1</li> <li>○ IL-6</li> <li>○ TNF</li> <li>○ endotoxinas<sup>2</sup></li> </ul> </li> <li>● Participa en la entrada y progresión de células a través del ciclo celular</li> <li>● Participa en la mielopoyesis, diferenciación y maduración de progenitores blanco</li> <li>● Funciones de activación y en motilidad de células maduras<sup>1</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Reduce expresión de p53, p21 y Bax               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Previene la apoptosis en las neuronas</li> </ul> </li> <li>● Incrementa expresión de BDNF por los macrófagos               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Estimula la regeneración axonal</li> </ul> </li> <li>● Suprime la formación de cicatriz glia<sup>4</sup></li> <li>● Favorece a la recuperación funcional</li> <li>● Mejora la recuperación de la sensación al frío y dactilar</li> <li>● Reduce el crecimiento anormal de nervios sensoriales<sup>3</sup></li> </ul>

GM-CSF: factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos; LTME: lesión traumática de la médula espinal; DCs: células dendríticas; IL: interleucina; TNF; factor de necrosis tumoral; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro. (<sup>1</sup> Egea et al., 2010; <sup>2</sup> Griffin et al., 1990; <sup>3</sup> Kim et al., 2013; <sup>4</sup> Ren et al., 2018)

### 1.3.1.4.7. Interleucina 2

La interleucina 2 (IL-2) es una citocina proinflamatoria de 4 hélices  $\alpha$  típica. En las células T, la síntesis de IL-2 se regula a nivel del mRNA por señales de TCR y CD28 (Nelson, 2014). Después de sus síntesis, la IL-2 se une a su complejo receptor que consiste en 3 subunidades: IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  y la cadena común  $\gamma$ , las cuales se requieren para alcanzar una unión de elevada afinidad. Estos receptores están localizados en células T regulatorias y linfocitos T activados por antígeno. Para producir una respuesta dependiente de IL-2, esta citocina debe ser expresada junto a su receptor (IL-2R) dentro del mismo microambiente (Hellenbrand et al., 2021). La interacción de la IL-2 con su receptor conlleva a la estimulación de una serie de vías de transducción de señales complejas y en su mayoría desconocidas, que promueven la proliferación celular (Minami et al., 1993). Las características generales y la participación de la IL-2 en la LTME se resumen en la tabla 8.

**Tabla 8.** Características generales y participación de la interleucina 2 en la lesión traumática de la médula espinal

IL-2			
Células productoras principales	Células blanco	Características Generales	Participación en la LTME
<p>Células T CD4<sup>+</sup> activadas<sup>1</sup></p> <p>Células T CD8<sup>+</sup> vírgenes</p> <p>DCs</p> <p>Células tímicas<sup>2</sup></p>	<p>Células T</p> <p>Células B</p> <p>Células NK</p> <p>Oligodendrocitos<sup>3</sup></p> <p>Macrófagos/microglía<sup>1</sup></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Mantiene el balance de la coordinación en una respuesta inmune adecuada</li> <li>● Perpetúa la respuesta adecuada de las células T de memoria ante patógenos invasores</li> <li>● Vital para la supervivencia y la muerte de linfocitos</li> <li>● Capaz de eliminar células T autorreactivas               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Previene enfermedades autoinmunes<sup>1</sup></li> </ul> </li> <li>● Papel importante en la expansión clonal de linfocitos T activados</li> <li>● Crecimiento y diferenciación de células B</li> <li>● Generación de células asesinas activadas por linfocitos</li> <li>● Aumenta células NK</li> <li>● Proliferación y maduración de oligodendrocitos<sup>3</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Proliferación de células Th que a su vez influyen la proliferación de:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Células T citotóxicas</li> <li>○ Células NK</li> <li>○ Células asesinas activadas por linfoquinas</li> <li>○ Células B</li> <li>○ Macrófagos<sup>1</sup></li> </ul> </li> </ul>

IL: interleucina; LTME: lesión traumática de la médula espinal; DCs: células dendríticas, NK: asesinas naturales; Th: T cooperadoras; CD: grupo de diferenciación. (<sup>1</sup> Hellenbrand et al., 2021; <sup>2</sup> Nelson, 2014; <sup>3</sup> Minami et al., 1993)

#### 1.3.1.4.8. Interleucina 4

La IL-4 es una citocina que funciona como un regulador potente de la inmunidad. El efecto de la señalización de la IL-4 está mediado por la cadena- $\alpha$  de su receptor (IL-4R $\alpha$ ). Una vez que se une a su ligando, la IL-4R $\alpha$  se dimeriza con la cadena común  $\gamma$  para producir el complejo de señalización tipo 1, localizado en células hematopoyéticas o con IL-13R $\alpha$ 1 para producir el complejo tipo 2, que también se expresa en células no hematopoyéticas. El complejo de señalización tipo 1 es crucial para que las células T se inclinen a un perfil Th2 y para el desarrollo de macrófagos activados alternativamente, mientras que el complejo tipo 2 juega papeles complejos en las respuestas no hematopoyéticas de la IL-4 (Gadani et al., 2012). La IL-13 comparte un receptor común heterodimérico con la IL-4.

Una vez que se activa, el complejo tipo 1 manda sus señales mediante la familia de cinasas Janus (JAK1 y JAK3), las cuales fosforilan y crean sitios de ensamble para el factor de transcripción STAT6, el cual se dimeriza y transloca al núcleo celular. STAT6 promueve la transcripción de GATA3 (un inductor de células Th2) y complejos de histocompatibilidad molecular (MHC-II), e induce el cambio de clase a IgE en células B. JAK1 también fosforila al sustrato del receptor a insulina 1 y 2, el cual una vez activado promueve la supervivencia y crecimiento a través de las vías fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K)/AKT, PKB/mTOR, entre otras vías. Los receptores tipo 2 también señalizan mediante la familia de cinasas JAK (JAK1 y TYK2), pero no se expresan en células T sino que son usados por células no hematopoyéticas para responder a la IL-4. Así como para el tipo 1, la mayoría del mensaje enviado por los receptores tipo 2 es transportado por STAT6, el cual se fosforila y transloca al núcleo al unirse a su ligando. Los receptores tipo 2 también sirven como receptores a la IL-13, esta y la IL-4 se unen primero con el receptor a la IL-13 (IL-13R $\alpha$ 1) y luego se dimeriza con el IL-4R $\alpha$  para producir la cascada de señalización (Gadani et al., 2012). Las características generales y la participación de la IL-4 en la LTME se resumen en la tabla 9.

**Tabla 9. Características generales y participación de la interleucina 4 en la lesión traumática de la médula espinal**

IL-4			
Células productoras principales	Células blanco	Características Generales	Participación en la LTME
<ul style="list-style-type: none"> <li>Células Th2</li> <li>Mastocitos</li> <li>Eosinófilos</li> <li>Basófilos<sup>1</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Células B</li> <li>Células T<sup>1</sup></li> <li>Macrófagos/microglía</li> <li>Neuronas</li> <li>Oligodendrocitos<sup>2</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Actúa como mitógeno de células B</li> <li>● Participa en el cambio de clase a IgE en células B</li> <li>● Papel importante en la supervivencia de leucocitos bajo condiciones fisiológicas y patológicas<sup>1</sup></li> <li>● Promueve la activación alternativa de macrófagos M2                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Favorecen la reparación del tejido y la homeostasis<sup>2</sup></li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Regula positivamente a la IL-10</li> <li>● Reduce macrófagos/microglía CD11b<sup>+</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Reduce perfil inflamatorio</li> </ul> </li> <li>● Disminuye producción de iNOS</li> <li>● Aumenta población de:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Neuronas</li> <li>○ Oligodendrocitos</li> </ul> </li> <li>● Promueve:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Neuroprotección</li> <li>○ Regeneración axonal</li> <li>○ Recuperación funcional post-LTME<sup>2</sup></li> </ul> </li> </ul>

IL: interleucina; LTME: lesión traumática de la médula espinal; Th: T cooperadoras; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; CD: grupo de diferenciación. (<sup>1</sup>Gadani et al., 2012; <sup>2</sup>Lima et al., 2017)

#### 1.3.1.4.9. Interleucina 13

Originalmente se describió a la IL-13 como una citocina derivada de células T que inhibe la producción de citocinas inflamatorias, sin embargo desde entonces se le ha atribuido la mediación de varias otras funciones efectoras importantes (Wynn, 2003). El receptor a la IL-13 (IL-13R $\alpha$ 1) se expresa en las células gliales durante condiciones patológicas y también en subgrupos específicos de neuronas en el cerebro sano. Por ejemplo, se ha determinado la presencia de el IL-13R $\alpha$ 1 en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta y en el área ventral tegmental. Esto significa que los ligandos de el IL-13R $\alpha$ 1 (IL-4 e IL-13) son reguladores importantes de la función dopaminérgica y de la supervivencia celular y, pueden constituir un enlace directo entre el sistema inmune y la neurobiología de la recompensa, adicción y coordinación motora. El IL-13R $\alpha$ 1 se heterodimeriza con el IL-4R $\alpha$  formando un complejo capaz de unirse a la IL-13 o a la IL-4, que en el primer caso permite la transfosforilación de un residuo específico de tirosina ubicado en el segmento de activación de la cinasa JAK, el cual promueve la actividad de cinasa requerida para la fosforilación de sustratos corriente abajo en sus cascadas de señalización (Mori et al., 2016).

La IL-13 activa dos cascadas de señalización intracelular, la de JAK-STAT y la vía sustrato de receptor a insulina (IRS)-fosfatidilinositol-3-cinasa que conllevan a la inducción de la transcripción de genes con el elemento potenciador de respuesta a STAT6 (N6-GAS) localizado en su promotor y a la proliferación celular, respectivamente. Una vez que el IL-13R $\alpha$ 1 se activa, STAT1, 3 y 6 son fosforilados y forman un homodímero que migra al núcleo y se une a N6-GAS para provocar la transcripción. Las vías JAK-STAT y MAPK estimulan a la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa para producir ROS intracelulares que generalmente producen un bucle de retroalimentación positiva que facilita la fosforilación de STAT6 y de ERK. Además, se ha observado la producción de ROS estimulada por IL-13/IL-4 en la activación alternativa de monocitos/macrófagos mediante la activación de la monoamino oxidasa A. Las características generales y la participación de la IL-13 en la LTME se resumen en la tabla 10.

**Tabla 10.** Características generales y participación de la interleucina 13 en la lesión traumática de la médula espinal

IL-13			
Células productoras principales	Células blanco	Características Generales	Participación en la LTME
<ul style="list-style-type: none"> <li>Células Th2</li> <li>Eosinófilos</li> <li>Basófilos</li> <li>Mastocitos<sup>2</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Macrófagos/microglía<sup>5</sup></li> <li>Células T<sup>2</sup></li> <li>Células B</li> <li>Mastocitos</li> <li>Células epiteliales</li> <li>Fibroblastos</li> <li>Células de músculo liso<sup>1</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Participa en: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Expulsión de parásitos gastrointestinales e intracelulares</li> <li>○ Hiperreactividad de vías respiratorias</li> <li>○ Inflamación alérgica</li> <li>○ Eosinofilia del tejido</li> <li>○ Mastocitosis</li> <li>○ Producción de anticuerpos IgE</li> <li>○ Hiperplasia de células caliciformes</li> <li>○ Crecimiento de células tumorales</li> <li>○ Remodelaje de tejido</li> <li>○ Fibrosis<sup>1</sup></li> </ul> </li> <li>● Promueve la inflamación alérgica mediada por células Th2</li> <li>● Disminuye síntesis de citocinas pro-inflamatorias de las células Th<sup>2</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Ajusta respuestas macrófagos/microglía<sup>2,3</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Aumenta número de M2<sup>5</sup></li> <li>○ Aumenta macrófagos que expresan ARG-1</li> </ul> </li> <li>● Participa en la producción de TGF-<math>\beta</math><sup>5</sup></li> <li>● Modula respuesta de la microglía/macrófagos anti-inflamatorios e induce la muerte de la microglía/macrófagos inflamatorios <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Neuroprotección<sup>2,3</sup></li> </ul> </li> <li>● Mejora recuperación funcional</li> <li>● Disminuye: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Área de lesión</li> <li>○ Área desmielinizada</li> <li>○ Células de microglía residente</li> <li>○ Contactos macrófago-axón <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Reduce muerte axonal<sup>4</sup></li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>

IL: interleucina; LTME: lesión traumática de la médula espinal; Th: T cooperadoras; ARG: arginasa; M: Macrófagos; TGF: factor de crecimiento transformante. (<sup>1</sup> Wynn, 2003; <sup>2</sup> Mori et al., 2016; <sup>3</sup> Miao et al., 2020; <sup>4</sup> Dooley et al., 2016B; <sup>5</sup> Hellenbrand et al., 2021)

#### 1.3.1.4.10. Interleucina 10

La IL-10 juega un papel crucial en prevenir patologías autoinmunes e inflamatorias (Iyer & Cheng, 2012). Inicialmente se describió como una citocina derivada de linfocitos Th2 pero es producida por casi todos los leucocitos, entre varias otras células (Iyer & Cheng, 2012). Su actividad inmunosupresora está mediada por su receptor heterodimérico (IL-10R1, IL-10R2) (Thompson et al., 2013). A pesar de que el complejo receptor de la IL-10 se expresa en una gran variedad de tipos celulares, los monocitos y los macrófagos parecen ser los blancos principales de la IL-10 (Iyer & Cheng, 2012).

La IL-10 activa a JAK1 y a Tyk2, lo que a su vez inicia ya sea la transducción de señales y activación de STAT3, o la vía NF- $\kappa$ B y de la proteína activadora 1 (AP-1). La vía de STAT3 inhibe la inmunidad innata y adaptativa al inhibir a la IL-12 y a la IL-18 en APCs y células T. También, mediante la vía STAT3, la IL-10 tiene un efecto anti inflamatorio al inhibir la expresión de IL-2, IL-5, TNF, CXCR4 y al factor derivado de células estromales 1 (SDF-1). Mediante la vía NF- $\kappa$ B y AP-1, la IL-10 inicia la activación de células T citotóxicas y NK, incrementa los MHC-II en células B, lo que favorece la supervivencia y, genera el cambio de inmunoglobulinas a los linajes IgG1, IgG3 e IgA. También, a través de la vía PI3K-AKT, iniciada por la fosforilación de JAK1, la IL-10 ejerce un efecto neuroprotector en contra de la excitotoxicidad (Thompson et al., 2103).

Muchas de las acciones de la IL-10 en la LTME tiene lugar a través de la vía STAT3 que inicia respuestas indirectas y directas. La respuesta directa es neuroprotectora e inicia una cascada anti-apoptótica al bloquear a la caspasa 3 y la actividad del citocromo C, limitando con ello la muerte de neuronas motoras. La respuesta indirecta de la IL-10 es anti-inflamatoria y es la que disminuye la liberación de citocinas pro-inflamatorias por parte de la microglía al limitar los niveles de TNF, IL-1 $\beta$  y NOS. La reducción de TNF e IL-1 $\beta$  es neuroprotectora en contra de la inflamación secundaria que ocurre después de la LTME. Se ha propuesto el uso terapéutico de la IL-10 no solo debido a lo anterior, sino también a sus efectos tróficos

en las neuronas de la médula espinal, su capacidad para disminuir los factores apoptóticos Bax y caspasa 3 y para aumentar los factores anti apoptóticos Bcl2 y Bcl-xl, y por su efecto neuroprotector en contra de excitotoxicidad mediante la vía PI3K-AKT (Thompson et al., 2013). Las características generales y la participación de la IL-10 en la LTME se resumen en la tabla 11.

**Tabla 11. Características generales y participación de la interleucina 10 en la lesión traumática de la médula espinal**

IL-10			
Células productoras principales	Células blanco	Características Generales	Participación en la LTME
Células Th Monocitos/ macrófagos DCs Células B Células T citotóxicas Células NK Mastocitos Neutrófilos Eosinófilos Queratinocitos Células endoteliales <sup>2</sup>	Monocitos/ macrófagos <sup>1,2</sup> Células T Células B Mastocitos Células NK <sup>2</sup> Astrocitos Oligodendrocitos Microglía Neuronas <sup>3</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Suprime respuestas inflamatorias de macrófagos/monocitos</li> <li>● Disminuye producción de:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Citocinas pro-inflamatorias</li> <li>○ Moléculas de adhesión celular</li> <li>○ ROS</li> <li>○ Intermediarios de nitrógeno<sup>1</sup></li> </ul> </li> <li>● Disminuye presentación de antígenos y fagocitosis</li> <li>● Aumenta la tolerancia y las funciones inhibitorias y fagocíticas de los monocitos/macrófagos</li> <li>● Inhibe el desarrollo de células Th1</li> <li>● Suprime las células Th2 y respuesta alérgicas</li> <li>● Aumenta:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Función de células Treg</li> <li>○ Activación y proliferación de:                   <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Mastocitos</li> <li>■ Linfocitos T CD8<sup>+</sup></li> <li>■ Células NK</li> <li>■ Células B<sup>2</sup></li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Junto con el TGF-β, juega un papel muy importante en la LTME<sup>1</sup></li> <li>● Regula la activación de los macrófagos/microglia y astrocitos</li> <li>● Inhibe síntesis de MMPs y citocinas pro-inflamatorias:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ TNFα</li> <li>○ IL-1β</li> <li>○ ROS</li> <li>○ iNOS</li> <li>○ IL-2</li> <li>○ IFN-γ</li> <li>○ GM-CSF<sup>1,3,4</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Reduce la inflamación de la lesión secundaria<sup>3</sup></li> </ul> </li> </ul> </li> <li>● Efecto tróficos en neuronas de la médula espinal<sup>3</sup></li> <li>● Disminuye los factores apoptóticos Bax y caspasa 3 y aumenta factores anti-apoptóticos Bcl2 y Bcl-xl               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Antiapoptótico<sup>3</sup></li> </ul> </li> <li>● Disminuye excitotoxicidad mediante la vía PI3K-AKT               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Neuroprotección<sup>3</sup></li> </ul> </li> <li>● Promueve supervivencia neuronal</li> <li>● Mejora recuperación funcional<sup>3</sup></li> <li>● Reduce el dolor neuropático<sup>1,3,4</sup></li> </ul>

IL: interleucina; LTME: lesión traumática de la médula espinal; ROS: especies reactivas de oxígeno; DCs: células dendríticas; Treg: T reguladoras; NK: asesinas naturales; TNF: factor de necrosis tumoral; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; MMPs: metaloproteinasas de la matriz; IFN: interferón; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; TGF-β: factor de crecimiento transformante beta. (1 Kim et al., 2017; 2 Iyer & Cheng, 2012; 3 Thompson et al., 2013, 4 Bethea et al., 1999)

#### 1.3.1.5. Neutrófilos

La LTME incrementa de manera significativa los niveles en suero de moléculas de adhesión de células endoteliales, así como la ICAM-1 la cual produce factores de adhesión celular que median la adhesión entre leucocitos y el endotelio, y de esa manera se induce la infiltración de leucocitos en la zona lesionada (Zhang et al., 2013). Otras moléculas de adhesión celular endotelial que juegan un papel importante en la migración de leucocitos en la LTME incluyen a la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y a la P-selectina. La familia de integrinas  $\beta 2$  leucocitarias tienen un papel dominante en la mediación de la migración leucocitaria, por ejemplo, de la sangre al área de una LTME. Las subunidades  $\alpha$  de las integrinas  $\beta 2$  CD11a-d se unen a VCAM-1 mediante dominios tipo A, interacción que contribuye al tráfico de leucocitos (Bao et al., 2005), los cuales comienzan a acumularse en y alrededor de los microvasos de la zona isquémica, se infiltran a la médula espinal y estimulan células endoteliales, gliales y neuronales. Los leucocitos también producen factores inflamatorios (Barone et al., 1991), incluyendo citocinas que inician una cascada inflamatoria para producir aún más factores inflamatorios que afectan la expresión génica de las células gliales. La BCE se disrumpe como consecuencia de los eventos inflamatorios y contribuye al deterioro del tejido nervioso en el sitio de lesión (Ning et al., 2012).

Los neutrófilos se acumulan horas después de la LTME, alcanzando su pico máximo 3 días después, seguido de un segundo pico varias semanas más tarde. Los neutrófilos ofrecen soporte al proceso de recuperación mediante su habilidad de fagocitar residuos celulares y adicionalmente llaman a los macrófagos al tejido dañado (Trivedi et al., 2006). La invasión de neutrófilos requiere de P-selectina, un miembro de la familia de moléculas de adhesión leucocitaria endotelial que es rápidamente activada en la superficie de células endoteliales como respuesta a estímulos como trombina, histamina y ROS. La P-selectina es responsable de mediar las interacciones tempranas neutrófilo-endotelio que conllevan a el rodamiento de los neutrófilos en el endotelio y facilita la adhesión celular, la migración y el daño de tejido (Taoka et al., 1997). De esta manera, los neutrófilos se acumulan en la zona de la lesión y liberan citocinas,

quimiocinas y una variedad de proteasas incluyendo MMPs y elastasas, agravando así el edema tisular y la necrosis, promoviendo la apoptosis de neuronas y oligodendrocitos, y la cicatrización glial local (Trivedi et al., 2006).

Los neutrófilos infiltrados también liberan ROS como el  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$ , así como radicales nitrosilos en un esfuerzo para eliminar los microorganismos en la zona de la lesión (Bao et al., 2005; Trivedi et al., 2006), esto provoca estrés oxidante, lo que significa que el sistema antioxidante de defensa del cuerpo ya no puede hacer frente a la neutralización de radicales libres producidos por el cuerpo. El daño generado a las células y al cuerpo puede volverse irreversible con el tiempo (Urushitani et al., 2000). Además, el  $H_2O_2$  provoca activación de neutrófilos, y durante esta activación también se libera mieloperoxidasa (MPO). Subsecuentemente reaccionan el  $H_2O_2$  y la MPO con el  $Cl^-$  creando un sistema  $H_2O_2$ -MPO- $Cl^-$  que produce una sal altamente reactiva derivada del HOCl llamada hipoclorito. Este sistema es paradójicamente benéfico y detrimental para el hospedero. La producción de HOCl es necesaria para matar bacterias, pero el HOCl es el principal responsable del daño al tejido del hospedero posterior a la activación de células inflamatorias. También cataliza la desaminación y la descarboxilación de aminoácidos (Zgliczynski et al., 1971).

Adicionalmente, los neutrófilos y los macrófagos/microglía expresan la enzima oxidasa de NADPH-2 (NOX2), la cual es un productor primario de ROS en la médula espinal lesionada. El complejo enzimático NOX, contiene siete miembros de la familia conocidos, incluyendo NOX2. Esta enzima funciona transfiriendo electrones del NADPH al interior de la célula, a través de la membrana, y después a oxígeno extracelular, generando  $O_2^-$  (Khayrullina et al., 2015). El  $O_2^-$  puede ser convertido en  $H_2O_2$  en un proceso enzimático de la superóxido dismutasa (SOD) y puede, a su vez, ser convertido en radicales libres. La presencia de estos oxidantes en el tejido que está lesionado, inactiva a antiproteasas locales y activa a proteasas como MMPs de la matriz y colagenasas. Estas enzimas hidrolizan a su propio inhibidor y por lo tanto, el resultado es un ataque incontrolado de enzimas de neutrófilos, incluyendo elastasas,

colagenasas y gelatinasas, entre otras enzimas que tienen la capacidad de degradar tejidos fuera de la zona inflamada (Bao et al., 2005).

Hay factores endógenos antioxidantes, incluyendo a la SOD y al glutatión, que contribuyen a la defensa contra los ROS (Jing et al., 2015). La SOD es una familia de enzimas antioxidantes que convierten a  $O_2^-$  en  $H_2O_2$ , los que posteriormente son catabolizados a agua y oxígeno molecular por la catalasa y la glutatión peroxidasa. Se han identificado dos tipos de SOD en las células de los mamíferos: la SOD manganeso mitocondrial (MnSOD) y la SOD cobre/zinc citoplasmático (Cu/Zn SOD). Ambos tipos han sido implicados en la recuperación neuronal y el proceso de degeneración, pero sólo la MnSOD es inducida y modulada después de la LTME. La citocina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  sirve como una señal corriente arriba que inicia la inducción de MnSOD mediante la activación de NF- $\kappa$ B. Además del TNF- $\alpha$ , la MnSOD también es inducida por la IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN $\gamma$  (Yune et al., 2004).

### 1.3.2. Fase Aguda

#### 1.3.2.1. Macrófagos

El reclutamiento de monocitos sanguíneos al sitio de la lesión comienza 3 días después de la LTME y perdura por 7 días. También, en la fase subaguda, después de la primera semana de la lesión en médula espinal, comienza el recrecimiento axonal y la cicatrización por macrófagos antiinflamatorios (Faden et al., 2016). La activación de los macrófagos está en su pico máximo entre el día 7 y el día 14 después de la lesión y funcionan, no solo como fagocitos, sino también como reservas de colesterol derivado de la mielina fagocitada, el cual puede entonces ser utilizado durante la remielinización de los axones en el proceso de regeneración (Trivedi et al., 2006). La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) es una de las quimiocinas clave que regulan la migración y la infiltración de macrófagos/microglía (Deshmane et al., 2009) y muestra un aumento significativo en su regulación después de la LTME. Los macrófagos activados por IFN- $\gamma$  poseen efectos neurotóxicos, mientras que los macrófagos

activados por IL-4, pueden inhibir las respuestas inmunes dañinas, así como promover la reparación del daño (Shang et al., 2017).

En el sitio de la lesión, los macrófagos realizan roles multifuncionales para promover la curación de heridas al secretar factores de crecimiento que promueven la proliferación de células como fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos, y proteínas que promueven el remodelamiento de la matriz extracelular. Los macrófagos pueden producir varias enzimas que degradan agentes infecciosos e inducen fagocitosis (Bhavsar et al., 2015).

#### 1.3.2.2. Células Dendríticas

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno y por lo tanto expresan niveles elevados de proteínas del MHC-II, así como de citocinas pro-inflamatorias. Las DCs de la médula espinal se diferencian a partir de la microglía o son derivadas de la sangre y favorecen la respuesta inflamatoria, exacerbando la lesión secundaria. Sin embargo, tienen la habilidad de producir factores de crecimiento, incluyendo neurotrofina-3, así como de mejorar la neurogénesis (Trivedi et al., 2006). Además de los macrófagos, monocitos y células B, las células dendríticas también producen IL-12 (Yaguchi et al., 2008).

#### 1.3.2.3. Linfocitos

Las células B están presentes en el tejido adyacente al sitio del daño horas después de la LTME y persisten hasta por 1 semana. Se sabe muy poco del papel que tienen las células B en la médula espinal lesionada. Por su lado, las células T están presentes en bajas cantidades en la médula espinal no lesionada y su presencia incrementa progresivamente en paralelo con la activación de la microglía y el influjo de macrófagos periféricos durante la primera semana después de la lesión. Las células T tienen el potencial de promover el daño al tejido a través de su habilidad de reconocer antígenos específicos, así como la proteína básica de mielina, y proliferar en respuesta a estos antígenos. Sin embargo, es posible que las células T jueguen papeles

complejos tanto en la lesión como en los mecanismos de reparación (Trivedi et al., 2006).

De manera similar a otras células inflamatorias, las funciones de las células T están determinadas por señales moleculares que las atraen al sitio de la lesión y por el microambiente al que se enfrentan. Las quimiocinas son responsables de la migración de las células T y de modular su activación y potencial efecto en los sitios de inflamación. Dependiendo de su fenotipo (CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>), en el momento de su activación, las células T pueden eliminar células blanco, así como producir citocinas inflamatorias (IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$ ) y factores pro-regenerativos (IL-10, IL-4 e IL-13). La activación crónica de células T participa en la fibrosis patológica y la cicatrización. Sin embargo, hay estudios que apoyan el papel neuroprotector de las células T en modelos de lesión en el SNC y en procesos de neurodegeneración (Trivedi et al., 2006).

La interleucina 17 (IL-17), también conocida como interleucina 25 (IL-25), es sintetizada principalmente por las células T y sus precursores. La IL-17 ha mostrado ser deletérea y está estrechamente relacionada con el origen de una respuesta inmunitaria tipo 2, que se caracteriza por la diferenciación de Th2 y la producción de citocinas tipo 2 (Ren et al., 2018). La deficiencia de IL-17 mejora la recuperación locomotora y disminuye el reclutamiento de células B, DCs, neutrófilos (Hill et al., 2011) y células T, mientras que un incremento de IL-17 aumenta el tamaño de la lesión y la desmielinización (Dooley et al., 2016A).

### 1.3.3. Fases Intermedia y Crónica

La fase intermedia corresponde de dos semanas a seis meses posteriores a la LTME y se caracteriza por la maduración continua de la cicatriz astrogliar y por brotes de regeneración axonal (Hill et al., 2001). Durante la fase crónica, que inicia 6 meses después de la LTME, ocurren reacciones inflamatorias locales y sistémicas y subsecuentemente se estimula la formación de la cavidad y de la cicatriz glial en el parénquima medular, causando muerte neuronal y de las células gliales (Kong & Gao.,

2017). Esta fase se caracteriza por la maduración y estabilización de la lesión y se distingue por la formación de una cicatriz continua, quistes y/o siringomielia. También se observa degeneración Walleriana que constituye el rompimiento axonal, desmielinización y remoción de residuos que ocurre distalmente a la lesión (Barton et al., 2017). Las citocinas juegan un papel crítico durante las fases tempranas de la degeneración Walleriana ya que facilitan la invasión de macrófagos en el sitio de lesión para que estos puedan remover los residuos axonales y de mielina, lo cual constituye una precondition importante para la regeneración axonal (Dubový, 2017).

## 1.4. Neuroprotección de Hormonas Sexuales

El término neuroprotección se le puede atribuir a cualquier agente o compuesto que prevenga la muerte neuronal en procesos de lesión o isquemia, que proteja de neurotoxinas o de la neurodegeneración y que alente o detenga la progresión de la degeneración neuronal. Aunque existen evidencias experimentales que han mostrado los efectos neuroprotectores de las hormonas sexuales en diferentes modelos animales, el uso de estrógeno como neuroprotector en humanos ha sido cuestionado enfatizando el riesgo que presenta de padecer cáncer de mama y de endometrio (Pinto et al., 2017). Es por esto que modificar neuroesteroides para que no ejerzan efectos indeseables es un enfoque atractivo para producir agentes neuroprotectores para el tratamiento de varias patologías del sistema nervioso (Bansal & Singh, 2018).

El uso terapéutico de hormonas sexuales ha mostrado tener acciones neuroprotectoras, siendo el estradiol (E2) el estrógeno que provee mayor neuroprotección en el SNC (Bansal & Singh, 2018). En ratas macho con LTME, la administración de  $17\beta$ -estradiol mejoró la función motora en comparación con el grupo control, aumentó la expresión de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en la zona de la lesión a las 6 horas post-LTME (Ritz & Hausmann, 2008). Esto se debe quizá a los efectos neuromoduladores de la IL-1 en la neurogénesis (Kaneko et al., 2006; Liu & Quan, 2018). Además, animales con LTME tratados con una dosis supra fisiológica de E2,

mostraron una disminución en el área de la lesión, en la astrogliosis y en la migración de monocitos y macrófagos al sitio de lesión en comparación con los animales control, a los cuales únicamente se les administró solución salina y no el tratamiento, una semana después de la LTME (Ritz & Hausmann, 2008).

Sin embargo, a pesar de que el uso de E2 tiene beneficios, este debe ser administrado con precaución (Ray et al., 2016), ya que dosis elevadas de E2 administradas por un periodo largo se ha asociado a una reducción de la fertilidad o incluso a infertilidad, además de a varios tipos de cánceres en mujeres, y en hombres también está asociada al desarrollo de cáncer y a ginecomastia. A dosis bajas (2.5-25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), el E2 genera una respuesta anti-inflamatoria eficiente al disminuir los niveles de interleucinas, leptinas y TNF- $\alpha$  en ratas, acompañado de otros efectos benéficos incluyendo la disminución de MCP-1 y GRO-KC, una quimiocina que provoca la migración de los neutrófilos a la zona de la LTME y está asociada a la disfunción de la BCE y de la producción de NGF (Cox et al., 2015). Adicionalmente, el E2 previene la degradación de la BCE al disminuir la expresión del receptor 1 de sulfonilurea (SUR1)-receptor potencial transitorio melastatin 4 (TRPM4), el cual participa en la formación de edema posterior a un daño en el SNC, y al inhibir la actividad de la MMP-9 posterior a la LTME (Lee et al., 2015B). Más aún, su administración post-LTME puede prevenir daño en la médula espinal y favorecer la recuperación de la función motora en ratas con LTME crónica (Sribnick et al., 2010). Sin embargo, existen resultados que implican al tratamiento de E2, aun en bajas dosis, como un riesgo para los animales con ovarios intactos (Blank et al., 2008).

Por otro lado, la terapia con progesterona en un modelo de LTME redujo la inflamación, incrementó la cantidad de neuronas y demostró una mejora en la respuesta locomotora (Farahabadi et al., 2016). La progesterona también aumenta la supervivencia de motoneuronas en la médula espinal posterior a una contusión (Yu, 1989) y los animales que recibieron progesterona después de la LTME presentaron una mejor funcionalidad y resultados histológicos más favorables en comparación con las ratas que no recibieron tratamiento (Thomas et al., 1999). La progesterona atenúa la astro y la microgliosis, mientras potencia la diferenciación de los oligodendrocitos

después de la LTME (Labombarda et al., 2011). Además, De nicola et al mostraron que la progesterona promueve la remielinización y aumenta el número de progenitores de oligodendrocitos NG2<sup>+</sup> (De Nicola et al., 2003) y la expresión de BDNF neuronal en la médula espinal lesionada (De Nicola et al., 2006).

Sin embargo, el uso de progesterona como protector en el SNC posterior a una lesión es controversial, ya que la terapia de corto y largo plazo con progesterona en un modelo de LTME en ratas hembras y machos, no demostró efecto terapéutico significativo en la recuperación de la función locomotora o en las características morfométricas de la lesión después de un periodo de 21 días (Fee et al., 2007). Aunado a lo anterior, los progestágenos sintéticos (progestinas), han sido ligados a un aumento en el riesgo de padecer cáncer de mama (Trabert et al., 2020).

De la misma manera, existen varios estudios que sugieren que la testosterona también es neuroprotectora, ya que en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo, la testosterona redujo la muerte celular, mecanismo mediado por el receptor de andrógenos (Ahlbom et al., 2001). Ogata et al (1993) reportaron que *in vitro*, la testosterona protege a las neuronas de la médula espinal del daño neuronal inducido por el glutamato. También se han descrito acciones neurotróficas ejercidas por la testosterona (Bialek et al., 2004) y mejoras en la función locomotora en ratas (Yarrow et al., 2014).

El efecto de la testosterona en la expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias no ha sido explorado, pero en diversas enfermedades inflamatorias crónicas, se ha observado supresión inflamatoria con la administración de testosterona, generando un aumento en la IL-10, y una disminución de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en circulación (Mohamad et al., 2018). A pesar de que existen evidencias que sugieren que los cambios regresivos observados en las motoneuronas y en la morfología muscular después de la LTME, puede ser prevenida mediante el tratamiento con testosterona (Byers et al., 2012; Yarrow et al., 2014), dicho tratamiento no ejerce ningún efecto en el volumen de la lesión (Byers et al., 2012).

El uso terapéutico de la testosterona como neuroprotector se mantiene controversial ya que también hay evidencias en contra de la acción neuroprotectora de

esta (Sawada et al., 1998; Myers et al., 2003; Bialek et al., 2004). Además, la testosterona ejerce varios efectos secundarios, uno de los principales es la hiperplasia prostática benigna, lo cual limita la implementación clínica de la testosterona en la LTME (Yarrow et al., 2014).

## 1.5. Tibolona

La tibolona (TIB) es un esteroide sintético con acciones estrogénicas, androgénicas y progestagénicas que, a diferencia de las hormonas sexuales, no tiene actividad estrogénica en endometrio ni en mama. Este fármaco se usa como terapia de reemplazo hormonal (Pinto et al., 2017) y lleva en el mercado desde 1988. Es un tratamiento bien establecido para síntomas climatéricos al aliviar los bochornos, sequedad vaginal, mejorar el humor, la libido y prevenir la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas (Verheul et al., 2007; Kloosterboer, 2004). Una característica importante de la TIB es que no causa sangrado menstrual permitiendo tratar a mujeres mayores. Entre los efectos adversos más comunes de la administración de TIB se encuentra la leucorrea, el dolor abdominal, aumento de peso, sangrado vaginal y dolor en el tejido mamario. La TIB no afecta la función hepática ni renal y se encuentra disponible en más de 90 países, principalmente en Europa y América Latina, aunque no está disponible en los Estados Unidos de América (Campisi & Marengo, 2007).

La TIB se clasifica como un regulador de actividad estrogénica de tejido selectivo (STEAR) (Crespo et al., 2018). Su mecanismo de acción selectivo de tejido difiere del de estrógeno, progesterona y moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs) (Campisi & Marengo, 2007). La TIB es estructuralmente diferente del estradiol y de SERMs y, a diferencia de estos últimos, sus metabolitos juegan un papel clave en el mecanismo de acción. Los metabolitos de la TIB generan efectos agonistas en los receptores a estrógenos (ER); ER $\alpha$  y ER $\beta$ , receptores a andrógenos (AR) y receptores a progestágenos (PR), PRA y PRB (Kloosterboer, 2004), de tal forma que los efectos específicos de la TIB (progestagénica, androgénica o

estrogénica) en un tejido en particular depende de la presencia efectiva de uno de sus metabolitos activos y su asociación con su receptor (Campisi & Marengo, 2007).

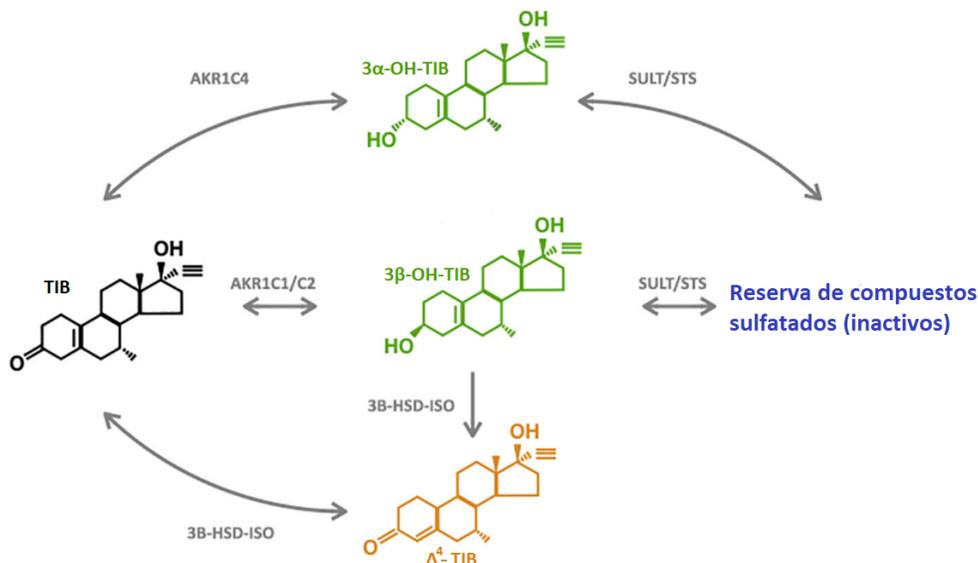
La TIB carece de un anillo-A aromático y el sustituyente 3-hidroxilo que normalmente se requiere para generar una actividad agonista en RE, y sin embargo presenta actividad tipo estrogénica en cerebro, hueso y vagina. Esto indica que la actividad estrogénica se debe a que su metabolismo genera metabolitos estrogénicos. La TIB puede metabolizarse en dos compuestos con propiedades estrogénicas, el 3 $\alpha$ -hidroxi TIB (3 $\alpha$ -OH-TIB) y el 3 $\beta$ -hidroxi TIB (3 $\beta$ -OH-TIB), además de su isoforma delta 4-tibolona ( $\Delta^4$ -TIB) con propiedades androgénicas y progestagénicas. El 3 $\alpha$ -OH-TIB y el 3 $\beta$ -OH-TIB son los metabolitos responsables de aliviar los síntomas climatéricos (Campisi & Marengo, 2007). Adicionalmente la TIB puede formar la  $\Delta^4$ -TIB en hígado, intestino y localmente en endometrio (Kloosterboer, 2004), misma que se puede formar a partir de los hidroxi metabolitos o de la TIB (Pinto et al., 2017). La formación local del  $\Delta^4$ -TIB es importante para la prevención de la estimulación del endometrio (Kloosterboer, 2004) ya que el  $\Delta^4$ -TIB ejerce los efectos progestágenos y andrógenos en endometrio, previniendo la estimulación estrogénica en este tejido (Campisi & Marengo, 2007). De manera que la actividad progestagénica del  $\Delta^4$ -TIB y el efecto de las enzimas inactivadoras de estrógeno, previenen la estimulación estrogénica en el endometrio (Kloosterboer, 2004).

Los hidroxi metabolitos de la TIB ejercen actividades estrogénicas mediante los RE, mostrando mayor selectividad para el RE $\alpha$  en comparación con la isoforma  $\beta$ . La TIB también se une al RE $\beta$  pero su actividad *in vivo* es aproximadamente 100 veces menor que la actividad ejercida por sus metabolitos. Por otro lado, el isómero de la TIB y la TIB activan a RA y RP (tipo B y A pero con menor afinidad), y no tienen efecto alguno en RE y en general, la TIB y sus metabolitos no se unen a receptores de glucocorticoides (Campisi & Marengo, 2007).

Es importante considerar que los metabolitos de la TIB también tienen un efecto regulatorio en actividades enzimáticas, especialmente en aquellas involucradas en el

metabolismo del E2. Estos eventos “pre-receptor” ocurren de una manera selectiva de tejido y determinan si un tejido es estimulado o no se ve afectado. La TIB es un inhibidor de enzimas metabolizadoras de esteroides e induce enzimas involucradas en suspender actividad estrogénica. Por lo tanto el efecto biológico de la TIB está determinado directamente por el metabolismo, la regulación enzimática y la activación de RE, RP y RA, que varía en diferentes tejidos. Esto explica por qué la TIB está activa en hueso, cerebro y vagina pero no estimula el endometrio ni el tejido de la mama. La TIB presenta actividad estrogénica en hueso, vagina, cerebro y en sistema cardiovascular (sin generar efectos estimulatorios en endometrio) (Kloosterboer, 2004), efectos progestágenos en tejido de mama y endometrio y efectos androgénicos en el hígado (Pinto et al., 2017).

La TIB se administra por vía oral a dosis de 1.25 y 2.5 mg/día (Huang & Baber, 2010), es rápidamente absorbida alcanzando su nivel máximo después de 90 minutos y su vida media de eliminación es de aproximadamente 45 horas (Pinto et al., 2017). Como la mayoría de los esteroides, la TIB es metabolizada principalmente en el hígado y en los intestinos y se excreta en orina y heces. El metabolismo del compuesto inicial es rápido y casi todo su producto son 3 $\alpha$ -OH-TIB y 3 $\beta$ -OH-TIB (Fig. 5). Ambos hidroxi-metabolitos tienen una vida media de aproximadamente 7 horas, pero los niveles en circulación del 3 $\alpha$ -OH-TIB son aproximadamente cuatro veces más elevados que los del 3 $\beta$ -OH-TIB, mientras que los niveles en circulación de la TIB y su isómero son muy bajos (Campisi & Marengo, 2007).



**Figura 5. Metabolismo de la tibolona.** Posterior a la administración oral, la TIB es metabolizada a nivel gastrointestinal y en el hígado a tres metabolitos principales, dos con propiedades estrogénicas (3α-OH-TIB y 3β-OH-TIB) y una con propiedades androgénicas y progestagénicas (Δ<sup>4</sup>-TIB). Ambos metabolitos estrogénicos están formados por enzimas AKR: AKR1C4 produce 3α-OH-TIB predominantemente y AKR1C1 y AKRC2 producen 3β-OH-TIB. El Δ<sup>4</sup>-TIB se forma principalmente a partir de la conversión del 3β-OH-TIB y, en menor medida, a partir de la TIB, mediante la enzima 3β-HSD-ISO. Ambos hidroximetabolitos son sustratos del sistema SULF/STS. SULT cataliza la sulfatación de estos metabolitos inactivandolos y STS promueve la hidrólisis local, activando los metabolitos. TIB: tibolona; 3α-OH-TIB: 3 alfa hidroxitiolona; 3β-OH-TIB: 3 beta hidroxitiolona; Δ<sup>4</sup>-TIB: delta 4 tibolona; AKR: aldocetoreductasa; 3β-HSD-ISO: 3 beta hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa; SULF: sulfotransferasa; SULT: sulfatasa. Tomada y traducida de Del Río et al., 2020.

Después del metabolismo inicial de la TIB, los productos son rápidamente sulfatados, y la mayoría de los metabolitos (>75%) circulan como mono o disulfatos. Estos metabolitos sulfatados son activados localmente por sulfatasas en los tejidos (Campisi & Marengo, 2007; Kloosterboer, 2004). Las sulfatasas, que convierten a las formas sulfatadas en activadas, y las sulfotransferasas, que a su vez las desactiva, están localizadas en el tejido y su actividad está determinada por el contexto celular, de tal forma que se puede inferir que la exposición del tejido a la estimulación estrogénica por acción de la TIB (Campisi & Marengo, 2007) está determinada y varía de acuerdo a la especificidad del tipo celular (Falany & Falany, 2007). Es importante notar que los metabolitos de la TIB tienen efectos regulatorios en las sulfatasas, las sulfotransferasas y en la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD), contribuyendo a la inhibición de la estimulación estrogénica en el endometrio. Estos metabolitos también previenen la conversión local para activar estrógenos en el tejido mamario, mecanismo de acción que se traduce en la inhibición de la proliferación celular y en la estimulación de

apoptosis en dicho tejido. Debido a que la TIB presenta este modo de acción selectivo único, esta fue clasificada como un STEAR (Campisi & Marengo, 2007).

#### 1.4.1. Tibolona como Agente Neuroprotector

Existen estudios que muestran evidencias de los posibles efectos neuroprotectores que puede ejercer la TIB en el SNC, de los cuales se comentarán algunos ejemplos. En el 2012, Pinto et al observaron que la TIB activa la vía de señalamiento AKT/GSK3 $\beta$  y reduce la hiperfosforilación de la proteína Tau neuronal en el hipocampo y en el cerebelo de ratas ovariectomizadas (Pinto et al., 2012). Posteriormente, obtuvieron resultados que sugieren que la TIB actúa como neuroprotector ante el estrés oxidante inducido por exposición a ozono, reduciendo marcadores de estrés oxidante y previniendo la muerte neuronal (Pinto et al., 2014). La TIB también ha mostrado prevenir la muerte neuronal inducida por privación de glutatión (Belenichev et al., 2012) y revierte la pérdida de espinas dendríticas causadas por la ovariectomía en neuronas piramidales del hipocampo en rata (Beltran et al., 2015). Además, la TIB ha mostrado efectos neuroprotectores al reducir el volumen del infarto e incrementar la expresión de Bcl-2, actuando como agente anti-apoptótico en el cerebro de ratas hembras adultas ovariectomizadas expuestas a isquemia cerebral (Tian et al., 2010).

Adicionalmente, la TIB también atenúa la respuesta del receptor GABA(B) en neuronas hipotalámicas (Qiu et al., 2008) y tiene efectos rápidos en la actividad de las neuronas hipotalámicas pro-opiomelanocortina (POMC), actuando en los ERs de membrana. En el 2002, Gibbs et al mostraron que la TIB reduce la actividad de la acetilcolinesterasa y de la acetiltransferasa colina en el septum medial del área de Broca en monos ovariectomizados, sugiriendo una modulación en las neuronas colinérgicas. Además, se han reportado efectos neuroprotectores de la TIB en lesión aguda del cerebro, donde una dosis alta de TIB por vía subcutánea es capaz de reducir el volumen del infarto en ratas hembras ovariectomizadas expuestas a isquemia cerebral focal (Vergouwen et al., 2000).

Más aún, la TIB también ha mostrado tener efecto en los astrocitos. Estudios previos han mostrado que los 3-hidroxi metabolitos de la TIB ejercen acciones agonistas en los astrocitos humanos a través de la activación de los receptores de estrógeno (Ávila et al., 2014). Crespo et al demostraron que la TIB reduce la gliosis reactiva generada por lesionar la corteza cerebral de ratones hembras, además el tratamiento con TIB aumentó en la supervivencia neuronal (Crespo et al, 2018). Por su lado, en el 2014, Avila et al demostraron que la TIB disminuye la fragmentación nuclear, la muerte celular, la concentración citoplasmática de calcio y la producción de  $O_2^-$  en cultivos de astrocitos. La TIB también ha mostrado estimular la fagocitosis en astrocitos de ratas de ambos sexos (Crespo et al., 2020), sugiriendo un efecto de la TIB en la inflamación.

Por su lado, estudios *in vitro* de microglía y monocitos/macrófagos han revelado que la TIB reduce el daño por estrés oxidante y ejerce acciones antiinflamatorias al disminuir la activación del NF-kB (Crespo et al., 2018), aumenta la viabilidad de la microglía y reduce la fragmentación nuclear inducida por exposición al ácido palmítico en cultivos celulares BV-2 (Hidalgo et al., 2017).

Los estudios mencionados anteriormente, sugieren que la TIB puede ejercer acciones anti-inflamatorias y neuroprotectoras *in vitro* e *in vivo*. En el año 2007, Verheul et al cuantificaron la concentración de TIB y sus metabolitos en diferentes regiones del cerebro en monos ovariectomizados tratados con TIB durante 36 días, reportando niveles elevados de los metabolitos estrogénicos de la TIB en hipotálamo, hipocampo, cerebelo, corteza cerebral y tronco encefálico en comparación con los niveles séricos. Estos niveles elevados de metabolitos estrogénicos en diferentes regiones del SNC podrían explicar los efectos de la TIB en las funciones cerebrales (Pinto et al., 2017). Desafortunadamente, a pesar de existir varios estudios que exploran el efecto de la TIB en el cerebro o en cultivos de células del SNC, sus efectos en la médula espinal no han sido evaluados.

## 2. Justificación

La LTME es un problema de salud pública muy importante para el cual actualmente no existe un tratamiento efectivo. Se ha propuesto el uso terapéutico de hormonas esteroides como una opción para el manejo de dicha patología ya que estas generan efectos neuroprotectores, aunque también pueden tener efectos secundarios indeseables.

La propuesta de usar una hormona sintética como la tibolona se debe a su capacidad para imitar el efecto neuroprotector de las hormonas esteroides, pero sin promover cáncer por estímulo estrogénico en tejidos susceptibles. Hay evidencia de que la TIB protege del estrés oxidante, muerte celular apoptótica, ejerce acciones anti-inflamatorias y promueve la supervivencia neuronal. Es por esto que es importante investigar el efecto de la tibolona en la regulación de la neuroinflamación y su impacto en el tejido preservado para relacionarlos con su efecto sobre la recuperación motora después de una LTME.

### 3. Hipótesis

La tibolona disminuirá la concentración de citocinas pro-inflamatorias e incrementará la cantidad de citocinas anti-inflamatorias, lo que ayudará a controlar la respuesta inflamatoria desencadenada por efecto de la lesión traumática de la médula espinal, aumentando el tejido preservado y favoreciendo la recuperación motora.

## 4. Objetivos

### **General:**

- Determinar el efecto de la tibolona sobre la respuesta inflamatoria, el tejido preservado y la recuperación motora, en un modelo de lesión traumática de médula espinal en rata.

### **Específicos:**

1. Evaluar el efecto de la Tibolona sobre la regulación de la respuesta inflamatoria después de una LTME, mediante la cuantificación de citocinas pro y anti-inflamatorias usando un kit MILLIPLEX.
2. Determinar el efecto de la Tibolona sobre la cantidad de tejido preservado en la médula espinal después de la LTME con tinción de Luxol Fast Blue.
3. Determinar el efecto de la Tibolona en la recuperación funcional de la LTME usando la escala de BBB.

## 5. Metodología

### 5.1. Animales

Se usaron 106 ratas macho de la cepa Sprague Dawley con un peso de 250 a 300 gramos obtenidas del bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Ciudad de México. A lo largo de la experimentación los animales se mantuvieron en cajas de acrílico de manera individual bajo condiciones de iluminación de 14 horas de luz por 10 horas de oscuridad y condición de temperatura de  $22 \pm 2$  °C. Las ratas tuvieron acceso a agua y alimento (dieta comercial) *at libitum*. Durante las primeras dos semanas post-LTME el agua contenía analgésico (5 mL de paracetamol).

- Para la cuantificación de citocinas, 76 animales se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos de estudio;

1. Laminectomía (Lam)
2. Lesión traumática de médula espinal sin tratamiento (LTME)
3. LTME con tratamiento de tibolona a dosis de 1 mg/Kg (LTME+TIB 1)
4. LTME con tratamiento de tibolona a dosis de 2.5 mg/Kg (LTME+TIB 2.5)

Los 3 grupos con LTME consistieron de cinco ratas y el grupo al cual solo se le realizó la laminectomía consistió en cuatro ratas. Se llevaron a cabo cuatro esquemas de tratamiento (sacrificados a las 3 horas, 3, 7 y 14 días).

- Para evaluar la recuperación funcional, se distribuyeron 30 ratas aleatoriamente en tres grupos; un grupo al cual solo se le realizó la laminectomía (Lam) (n=6), un grupo con lesión traumática de médula espinal sin tratamiento (LTME) (n=12) y un grupo con LTME y tratamiento de TIB a dosis de 1 mg/Kg (LTME+TIB 1) (n=12).
- Para el estudio del tejido preservado se usaron 18 ratas de las 30 usadas para evaluar la recuperación funcional, 6 ratas del grupo de Lam, 6 del grupo de LTME y 6 del grupo de LTME+TIB 1.

## 5.2. Lesión Traumática de Médula Espinal

El modelo de LTME por contusión es ampliamente usado en la investigación de esta patología. Este modelo genera daño en el tejido que se extiende en dirección rostral y caudal a partir del epicentro de la lesión, disrupción de la sustancia blanca y de la sustancia gris, hemorragia intraparenquimal, hipotensión, bradicardia, restos celulares, lesión axonal difusa, activación de glía, formación de cavidades y quistes, apoptosis de oligodendrocitos, infiltración de macrófagos y de microglía en el epicentro, distorsión de los nodos de Ranvier y desmielinización de los axones sobrevivientes (Anwar et al., 2016).

Todos los procedimientos quirúrgicos y experimentales se realizaron de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud (De la Madrid, 1998) y con autorización de la Comisión Nacional de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social. El número de registro del proyecto es: R-2021-785-011, aprobado por el Comité Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Así mismo, se siguieron las indicaciones y recomendaciones de las Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999; especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014; métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres y la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995; sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. (2015).

Inicialmente se anestesiaron las ratas con una mezcla de zoletil y de xilacina a razón de 75 y 25 mg/kg de peso corporal respectivamente. Después de aplicada la anestesia, se les realizó una tricotomía en la región dorsal y, bajo condiciones de asepsia y antisepsia, se llevó a cabo una laminectomía, para lo cual se realizó una incisión media sagital en la piel de la región torácica posterior para disecar los músculos paravertebrales. Una vez que quedaron expuestas las apófisis espinosas, se

extirpó la vértebra torácica nueve (T9), dejando libre la porción dorsal de la médula espinal con las meninges intactas en esa zona.

Posteriormente, a las ratas se les efectuó una LTME por contusión de intensidad moderada (excepto a los miembros del grupo de Lam) empleando para ello el estereotáxico *New York Impactor* (NYU), con el cual se produjo una lesión por impacto directo sobre la médula espinal con una barra de acero que tiene una superficie en su extremo inferior de 2 mm y un peso de 10 g, misma que se dejó caer de forma vertical guiada y controlada por sensores conectados a una computadora que registran el peso, la deformación de la médula espinal al momento del impacto, la altura de la caída (en este caso 2.5 cm) y la velocidad de la misma. El error calculado por el programa computacional debe ser igual o menor a 10 para ser incluido en el estudio.

Después de producida la lesión se suturaron tanto la piel como los músculos por planos con puntos separados utilizando suturas no absorbibles. Finalmente se administró 0.6 mL de bencilpenicilina procaínica con bencilpenicilina cristalina en suspensión inyectable de 800 000 UI (*AMSA laboratorios*) para prevenir infecciones.

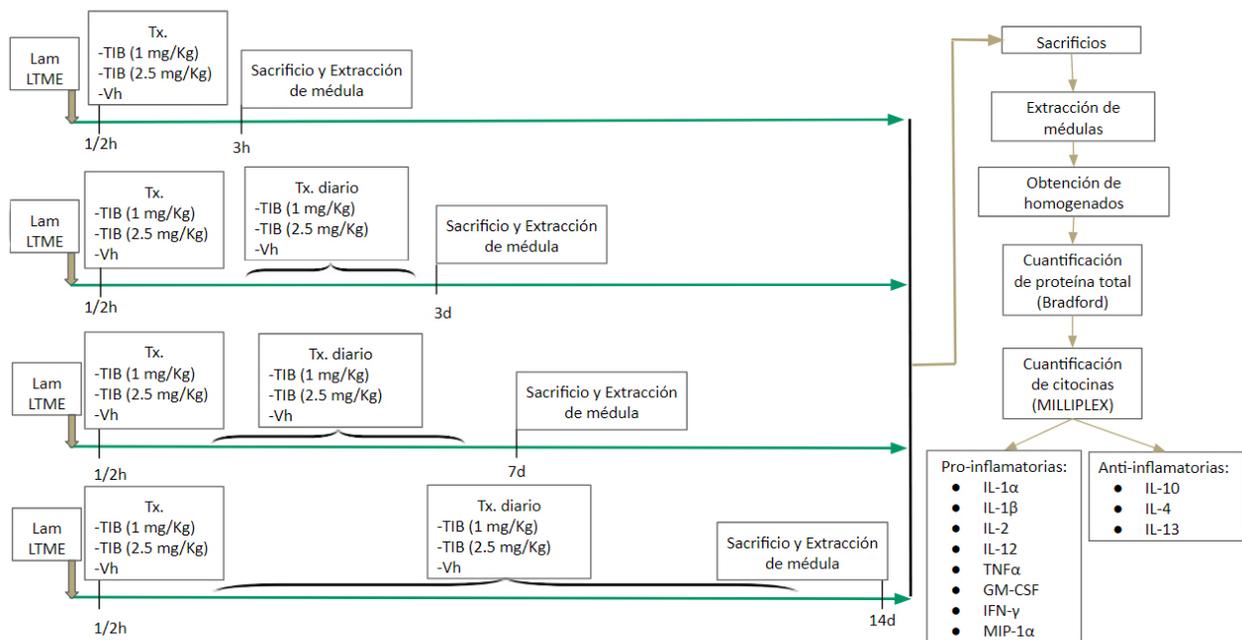
### 5.3. Tratamientos

El tratamiento de tibolona se administró como suspensión en agua potable de garrafón oralmente con una cánula esofágica. Diariamente, durante la aplicación de los tratamientos correspondientes para cada grupo, se revisó la herida quirúrgica, se vaciaron la vejiga y el intestino manualmente, se bañaron los animales con agua tibia y se verificaron las condiciones generales de salud de cada rata incluida en el estudio. A continuación se muestran los esquemas de tratamientos que se realizaron para evaluar el efecto de la tibolona en la inflamación post-LTME (Tabla 12) y en la recuperación motriz y en el tejido preservado post-LTME (Tabla 13). Adicionalmente se muestran los mismos resumidos en la figuras 6 y la figura 7 respectivamente.

**Tabla 12. Esquemas de tratamientos para la evaluación del efecto de la tibolona en la inflamación después de una lesión traumática de médula espinal**

Grupo de Estudio	n	Esquemas de tratamiento
1. Lam (Laminectomía)	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Única administración de Vh vía oral media hora después de la Lam.</li> <li>● Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la administración del Vh para extracción de la médula espinal.</li> </ul>
	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Primera administración de Vh vía oral media hora después de la Lam y posteriormente diario a la misma hora por 3 días.</li> <li>● Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la última administración del Vh para extracción de la médula espinal.</li> </ul>
	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Primera administración de Vh vía oral media hora después de la Lam y posteriormente diario a la misma hora por 7 días.</li> <li>● Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la última administración de Vh para extracción de la médula espinal.</li> </ul>
	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Primera administración de Vh vía oral media hora después de la laminectomía y posteriormente diario a la misma hora por 14 días.</li> <li>● Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la última administración del Vh para extracción de la médula espinal.</li> </ul>
2. LTME (Lesión traumática de médula espinal sin tratamiento)	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Única administración de Vh vía oral media hora después de la LTME.</li> <li>● Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la administración de Vh para extracción de la médula espinal.</li> </ul>
	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Primera administración de Vh vía oral media hora después de la LTME y posteriormente diario a la misma hora por 3 días.</li> <li>● Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la última administración de Vh para extracción de la médula espinal.</li> </ul>
	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Primera administración de Vh vía oral media hora después de la LTME y posteriormente diario a la misma hora por 7 días.</li> <li>● Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la última administración de Vh para extracción de la médula espinal.</li> </ul>
	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Primera administración de Vh vía oral media hora después de la LTME y posteriormente diario a la misma hora por 14 días.</li> <li>● Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la última administración de Vh para extracción de la médula espinal.</li> </ul>
3. LTME+TIB 1 (Lesión traumática de médula espinal con tratamiento de tibolona a dosis de 1 mg/Kg)	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Única administración de TIB (1 mg/Kg) vía oral media hora después de la LTME.</li> <li>● Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la administración de TIB para extracción de la médula espinal.</li> </ul>
	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Primera administración de TIB (1 mg/Kg) vía oral media hora después de la LTME y posteriormente diario a la misma hora por 3 días.</li> <li>● Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la última administración de TIB para extracción de la médula espinal.</li> </ul>
	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Primera administración de TIB (1 mg/Kg) vía oral media hora después de la LTME y posteriormente diario a la misma hora por 7 días.</li> <li>● Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la última administración de TIB para extracción de la médula espinal.</li> </ul>

	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>Primera administración de TIB (1 mg/Kg) vía oral media hora después de la LTME y posteriormente diario a la misma hora por 14 días.</li> <li>Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la última administración de TIB para extracción de la médula espinal.</li> </ul>
4. LTME+TIB 2.5 (Lesión traumática de médula espinal con tratamiento de tibolona a dosis de 2.5 mg/Kg)	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>Única administración de TIB (2.5 mg/Kg) vía oral media hora después de la LTME.</li> <li>Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la administración de TIB para extracción de la médula espinal.</li> </ul>
	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>Primera administración de TIB (2.5 mg/Kg) vía oral media hora después de la LTME y posteriormente diario a la misma hora por 3 días.</li> <li>Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la última administración de TIB para extracción de la médula espinal.</li> </ul>
	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>Primera administración de TIB (2.5 mg/Kg) vía oral media hora después de la LTME y posteriormente diario a la misma hora por 7 días.</li> <li>Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la última administración de TIB para extracción de la médula espinal.</li> </ul>
	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>Primera administración de TIB (2.5 mg/Kg) vía oral media hora después de la LTME y posteriormente diario a la misma hora por 14 días.</li> <li>Sacrificio por decapitación a las 2 y media horas después de la última administración de TIB para extracción de la médula espinal.</li> </ul>
N total:	76	
Vh: Vehículo (agua de garrafón) TIB: Tibolona LTME: Lesión traumática de médula espinal		

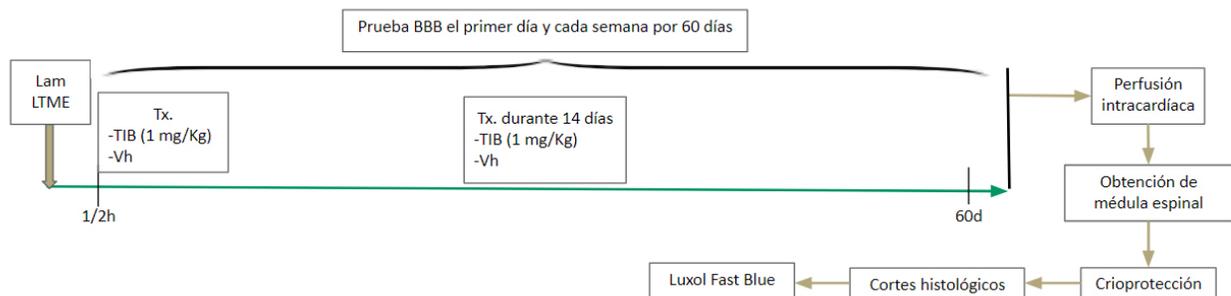


**Figura 6.** Resumen de los esquemas de tratamientos para la evaluación del efecto de la tibolona en la Inflamación después de una lesión traumática de médula espinal.

A partir de los resultados obtenidos en la evaluación de la inflamación se determinó usar la dosis de 1 mg/Kg de TIB para evaluar la recuperación funcional y tejido preservado dado a que a esta dosis se mostró una recuperación funcional de vejiga y motilidad en los animales a las dos semanas posterior a la LTME en comparación con el grupo que recibió una dosis de 2.5 mg/Kg de TIB.

**Tabla 13.** Esquemas de tratamiento para la evaluación del efecto de la tibolona en la recuperación motriz y en el tejido preservado después de una lesión traumática de médula espinal

Grupo de Estudio	n	Tratamiento
1. Lam (Laminectomía)	6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Administración de Vh vía oral 30 minutos después de la Lam y posteriormente diario hasta cumplir 14 días de tratamiento.</li> <li>• Evaluación de la recuperación funcional motora mediante la escala BBB el primer día después de la Lam y posteriormente de forma semanal durante 60 días.</li> <li>• Sacrificio después de la última evaluación.</li> </ul>
2. LTME (Lesión traumática de médula espinal sin tratamiento)	12	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Administración de Vh vía oral 30 minutos después de la LTME y posteriormente diario hasta cumplir 14 días de tratamiento.</li> <li>• Evaluación de la recuperación de la función motora mediante la escala BBB el primer día después de la LTME y posteriormente cada semana durante 60 días.</li> <li>• Sacrificio después de la última evaluación.</li> </ul>
3. LTME+TIB 1 (Lesión traumática de médula espinal con tratamiento de tibolona a dosis de 1 mg/Kg)	12	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Administración de TIB (1 mg/kg) vía oral 30 minutos después de la LTME y posteriormente diario hasta cumplir 14 días de tratamiento.</li> <li>• Evaluación de la recuperación de la función motora mediante la escala BBB el primer día después de la LTME y posteriormente cada semana durante 60 días.</li> <li>• Sacrificio después de la última evaluación.</li> </ul>
N total:	30	
Vh: Vehículo (agua de garrafón) TIB: Tibolona LTME: Lesión traumática de médula espinal BBB: Basso Beattie Bresnahan		



**Figura 7.** Resumen de los esquemas de tratamiento para la evaluación del efecto de la tibolona en la recuperación motriz y el tejido preservado después de una lesión traumática de médula espinal.

## 5.4. Cuantificación de Citocinas

Los animales usados para evaluar el efecto de la TIB en la modulación de citocinas pro y anti-inflamatorias fueron sacrificados por decapitación. Rápidamente se extrajo la médula en frío, tomando 1 cm en dirección caudal y 1 cm en dirección cefálica a partir del epicentro de la lesión. Los tejidos se guardaron inmediatamente después en tubos eppendorf individuales y se congelaron en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Los tejidos se descongelaron pero fueron tratados en hielo durante todo el procedimiento. A las muestras colocadas en sus respectivos tubos eppendorf se les agregaron 600  $\mu\text{l}$  de buffer para ELISA (Tris-HCl 50 mM pH=7.5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, EGTA 1mM, Tween 20 0.05% y el cocktail de inhibidor de proteasas *cOmplete™*). Posteriormente, los tejidos se homogeneizaron usando un vástago y se centrifugaron a 12 500 r.p.m. durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , al término de la cual se extrajo el sobrenadante y se pasaron a tubos eppendorf limpios para su cuantificación proteica mediante el método de Bradford.

Se prepararon stocks de solución de albúmina de suero bovino (BSA) como se describe en la tabla 14, para realizar la curva patrón para la cuantificación de proteínas en las muestras de estudio por el método de Bradford. Para esto se generaron seis soluciones con un volumen total de 255 $\mu\text{L}$  de los cuales 250 $\mu\text{L}$  eran reactivo de Bradford y 5 $\mu\text{L}$  provenían de los stocks de BSA 1 al 6. Una vez obtenida la curva patrón se prepararon 2 placas para medir la proteína total de todas las muestras usando 0.4  $\mu\text{L}$  de muestra, 4.6  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura y 250  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford, con un volumen total de 255  $\mu\text{L}$  por pozo. La lectura de la placa para obtener la curva patrón, así como las lecturas de las placas con muestras se realizaron en un equipo EPOC (*BioTek*) y el programa computacional *Gen5 3.0*.

**Tabla 14.** Preparación de stocks para la curva patrón de albúmina de suero bovino

Stock	BSA ( $\mu\text{g/mL}$ )	BSA 1X ( $\mu\text{L}$ )	H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )	Volumen Total ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O	0	0	1000	1000
1	2	102	898	1000
2	4	204	796	1000
3	6	306	694	1000
4	10	510	490	1000
5	15	765	235	1000
6	20	1000	0	1000

BSA: albúmina de suero bovino; H<sub>2</sub>O: agua.

Posteriormente, la evaluación de citocinas se realizó usando dos kits (MILLIPLEX MAP Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel-Immunology Multiplex Assay):

- 1) Kit milliplex con número de catálogo RECYTMAG-65K para IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12 (p70) y TNF- $\alpha$ .
- 2) Kit milliplex con número de catálogo RECYTMAG-65K para GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-13 y MIP1 $\alpha$ .

El procedimiento realizado se basó en las condiciones sugeridas en el protocolo del instructivo del kit MILLIPLEX descritas a continuación.

## **Preparación de los reactivos para el inmunoensayo**

### *A. Preparación de las perlas con anticuerpos inmovilizados*

Cada vial con las perlas con anticuerpos se sometió a ultrasonido y se agitó en vortex durante un minuto. Se agregaron 60  $\mu\text{L}$  de cada vial con perlas-anticuerpos en la botella de mezcla y se llevó a un volumen final de 3.0 mL con el diluyente de perlas. La mezcla de perlas se agitó bien en vortex.

#### *B. Preparación de controles de calidad*

Los controles de calidad 1 y 2 se reconstituyeron con 250  $\mu$ L de agua desionizada. El vial se invirtió múltiples veces para mezclar y agitar usando un vortex. Se permitió que el vial se asentara durante 5-10 minutos

#### *C. Preparación del amortiguador de lavado*

Se esperó a que el buffer de lavado 10X alcanzara una temperatura ambiente y se mezcló hasta que las sales estuvieran en solución. Se diluyó 60 mL del amortiguador de lavado 10X con 450 mL de agua desionizada.

#### *D. Preparación del estándar de citocinas/quimiocinas de ratas*

Antes de usarse, el estándar de citocinas/quimiocinas de ratas se reconstituyó con 250  $\mu$ L de agua desionizada. El vial se invirtió varias veces para mezclar y se agitó en un vortex durante 10 segundos. Se dejó asentar el vial de 5-10 minutos. Esta solución se usó como el estándar 7.

#### *E. Preparación de los estándares de trabajo*

Se etiquetaron 6 tubos eppendorf como estándar del 1 al 6. Se agregaron 120  $\mu$ L de buffer de ensayos a cada uno de los 6 tubos. Se realizó una serie de diluciones agregando 40  $\mu$ L del estándar 7 reconstituido al tubo estándar 6, se mezcló bien y se transfirieron 40  $\mu$ L del estándar 6 al tubo estándar 5, se mezcló bien y se transfirió 40  $\mu$ L del estándar 5 al tubo estándar 4, se mezcló bien y se transfirieron 40  $\mu$ L del estándar 4 al tubo estándar 3, se mezcló bien y se transfirieron 40  $\mu$ L del estándar 3 al tubo estándar 2, se mezcló bien y se transfirieron 40  $\mu$ L del estándar 2 al tubo estándar 1 y se agitó bien. El estándar 0 ng/mL (el fondo) fue el buffer de ensayo.

### **Procedimiento del inmunoensayo**

1. Inicialmente se permitió que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (20-25°C)

2. Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  del amortiguador de ensayo en cada pozo de la placa. Se selló y mezcló usando un agitador de placa durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Se decantó el amortiguador de ensayo y se removió el residuo de los pozos invirtiendo la placa y azotándola con cuidado pero firmemente con toallas absorbentes varias veces.
4. Se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de cada estándar o control en sus respectivos pozos. Se usó el amortiguador de ensayo como el estándar 0 ng/mL.
5. Se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de amortiguador de ensayo a cada pozo donde se colocaron las muestras.
6. Se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de buffer para ELISA a los pozos de fondo, estándares y control.
7. Se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de muestra en sus respectivos pozos.
8. La botella de mezcla se agitó en vortex y se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de las perlas mezcladas en cada pozo. Se agitó intermitentemente la botella para evitar que se asentaran las perlas-anticuerpo.
9. Se selló la placa, se envolvió con papel aluminio y se dejó incubando 24 horas en un cuarto frío.
10. La placa se sujetó en una placa magnética y se dejó descansar en el imán durante 60 segundos para permitir que las perlas magnéticas se asentaran completamente.
11. Se removió el contenido de los pozos decantando con cuidado el contenido de la placa y gentilmente se azotó la placa contra papel absorbente para remover el residuo de líquido.
12. Se lavó la placa con 200  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lavado, separando la placa del imán, agregando amortiguador de lavado, agitando 30 segundos, volviendo a asentar la placa en el imán durante 60 segundos y decantando el contenido de los pozos como se describió previamente. El lavado se realizó 2 veces.
13. Se dejó que los anticuerpos de detección alcanzaran la temperatura ambiente y se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de anticuerpos de detección a cada pozo.

14. La placa se selló y cubrió con papel aluminio para dejarla incubando con agitación 1 hora a temperatura ambiente.
15. Se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de Estreptavidina-Ficoeritrina a cada pozo que contenían anticuerpos de detección.
16. La placa se selló y cubrió con papel aluminio y se dejó incubando con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.
17. Con cuidado se removió el contenido de la placa y se lavó 2 veces repitiendo los puntos de 10 al 12.
18. Se agregaron 125  $\mu\text{L}$  de líquido envolvente a todos los pozos y se resuspendieron las perlas con un agitador de placa durante 5 minutos.
19. Se leyeron los resultados de la placa usando un equipo Luminex x<sup>®</sup> 200<sup>™</sup> con el software xPONENT.
20. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se analizó y registró usando el método de ajuste de curva para calcular la concentración de los analitos en las muestras.

### **Lavado de placa**

Durante los lavados se usó una placa magnética debajo de la placa para mantener fijas las perlas magnéticas a la superficie de los pozos. Primero se dejó que la placa descansara en el imán durante 60 segundos para permitir que las perlas magnéticas se asentaran completamente. Se removió el contenido de los pozos decantando con cuidado el contenido de la placa y gentilmente se azotó la placa contra papel absorbente para remover el residuo de líquido. Posteriormente, se lavó la placa con 200  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lavado, separando la placa del imán, agregando amortiguador de lavado, agitando 30 segundos, volviendo a asentar la placa en el imán durante 60 segundos y decantando el contenido de los pozos como se describió previamente.

## 5.5. Evaluación de Recuperación Funcional

La recuperación de la función locomotora después de la LTME se evaluó en una prueba de campo abierto de acuerdo a la escala funcional de Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) (Basso et al., 1995). Se grabaron videos con duración de 3-5 minutos de todos los animales al día siguiente después del procedimiento quirúrgico con el que se realizó la LTME y posteriormente una vez por semana durante 60 días. Se obtuvieron un total de 9 videos por animal, los cuales fueron evaluados por dos investigadores cegados y se procedió a obtener el promedio de los resultados de ambos.

La escala BBB categoriza combinaciones de los movimientos de las extremidades posteriores, movimientos de las articulaciones, soporte del peso, coordinación de extremidades anteriores y posteriores, posición y estabilidad del tronco, pisadas y colocación de la pata, colocación del dedo pulgar y posición de la cola de la rata, representando fases de recuperación secuencial que las ratas consiguen o no después de una LTME (Zhang et al., 2013). La escala BBB fue diseñada para reflejar la recuperación locomotora progresiva después de una LTME por contusión y provee una escala expandida para reflejar el comportamiento en fases tempranas, intermedias y tardías de la recuperación (Basso et al., 1995).

Durante las primeras fases de recuperación, al movimiento de las articulaciones se les encontró tres atributos: sin movimiento, movimiento ligero y movimiento extenso. A estos se les dió 8 divisiones calificativas (0-7) que incluyen todas las combinaciones de movimiento ligero y extenso de las articulaciones. Durante la fase intermedia de la recuperación, los tres atributos del movimiento identificados son el posicionamiento de la pata, la capacidad de dar pasos y la coordinación entre patas delanteras y traseras. A partir de estos se formaron 6 divisiones (8 al 13). La fase tardía de recuperación tiene cuatro atributos: separación de los dedos de la pata, posición predominante de la pata, estabilidad del tronco y la posición de la cola. Estas determinan las divisiones calificativas 14-21 (Tabla 15) (Basso et al., 1995).

**Tabla 15. Escala de 21 puntos para la evaluación locomotriz de Basso Beattie y Bresnahan**

<b>Fase Primaria de Recuperación</b>	
0	Sin movimiento de las extremidades posteriores observable.
1	Ligero movimiento de una o dos articulaciones, usualmente la cadera y/o la rodilla.
2	Movimiento extenso en una articulación o movimiento extenso en una articulación y ligero movimiento en otra articulación.
3	Movimiento extenso de dos articulaciones.
4	Ligero movimiento en las tres articulaciones de las extremidades posteriores.
5	Ligero movimiento de dos articulaciones y extenso movimiento en la tercera.
6	Extenso movimiento de dos articulaciones y ligero movimiento de la tercera.
7	Extenso movimiento en las tres articulaciones de las extremidades posteriores.
<b>Fase Intermedia de Recuperación</b>	
8	Arrastre sin soporte de peso, o coloca la planta de la pata sin soporte de peso.
9	Coloca la planta de la pata con soporte de peso sin moverse de posición, o puede dar pasos dorsales con soporte de peso ocasionales, frecuentes o consistentes sin pasos plantares.
10	Pasos plantares con soporte de peso ocasionales, sin coordinación de las extremidades posteriores con las anteriores.
11	Pasos plantares con soporte de peso frecuentes a consistentes sin coordinación de las extremidades posteriores con anteriores.
12	Pasos plantares con soporte de peso frecuentes o consistentes y con coordinación de las extremidades posteriores con las anteriores ocasionalmente.
13	Pasos plantares con soporte de peso frecuentes a consistentes con coordinación frecuente de las extremidades posteriores con anteriores.
<b>Fase tardía de recuperación</b>	
14	Pasos plantares consistentes con soporte de peso, coordinación de las extremidades posteriores con anteriores consistente y la posición predominante de la pata durante la locomoción se gira (interna o externamente) cuando hace contacto inicial con la superficie, así como justo antes de que se levante al final de la postura, o Pasos plantares frecuentes, coordinación de las extremidades posteriores con anteriores consistentes y pasos dorsales ocasionales.
15	Pasos plantares consistentes y coordinación de las extremidades posteriores con anteriores consistente, sin un ocasional despeje del pulgar durante el avance hacia adelante de la extremidad. La posición predominante de la pata está paralela al cuerpo durante el contacto inicial.
16	Pasos plantares consistentes y coordinación de las extremidades posteriores con anteriores consistente durante la caminata y ocurre despeje del pulgar frecuentemente durante el avance hacia adelante de la extremidad. La posición predominante de la pata está paralela al inicio del contacto y gira al levantarse.

17	Pasos plantares consistentes y coordinación de las extremidades posteriores con anteriores consistente durante la caminata, ocurre el despeje del pulgar frecuentemente durante el avance hacia adelante de la extremidad. La posición predominante de la pata está paralela al inicio del contacto y al levantarse.
18	Pasos plantares consistentes y coordinación de las extremidades posteriores con anteriores consistente durante la caminata, ocurre el despeje del pulgar de manera consistente durante el avance hacia adelante de la extremidad. La posición predominante de la pata está paralela al inicio del contacto y rota al levantarse.
19	Pasos plantares consistentes y coordinación de las extremidades posteriores con anteriores consistente durante la caminata, ocurre el despeje del pulgar de manera consistente durante el avance hacia adelante de la extremidad. La posición predominante de la pata está paralela al inicio del contacto y al levantarse, y la cola está abajo parte o todo el tiempo.
20	Pasos plantares, coordinación durante la caminata y despeje del pulgar consistentes, la posición predominante de la pata está paralela al inicio del contacto y al levantarse. La cola se encuentra arriba de manera consistente y el tronco está inestable.
21	Pasos plantares y despeje del pulgar consistente. Caminata coordinada, la posición predominante de la pata está paralela al estar parado, estabilidad del tronco consistente y la cola está levantada de manera consistente.

#### DEFINICIONES

**Ligero:** Movimiento parcial de la articulación de menos de la mitad del alcance de la movilidad de la articulación.  
**Extenso:** Movimiento de más de la mitad del alcance de la movilidad de la articulación.  
**Arrastre:** Movimiento rítmico de las extremidades posteriores en el cual todas las tres articulaciones son extendidas para luego ser flexionadas y extendidas nuevamente. El animal está usualmente acostado de lado, la superficie plantar de la pata puede o no estar en contacto con el piso y es evidente que no hay soporte de peso por parte de las extremidades posteriores.  
**Sin soporte de peso:** No hay contracción de los músculos extensores de las extremidades posteriores durante la colocación plantar de la pata, o no hay elevación del cuarto trasero.  
**Soporte de peso:** Hay contracción de los músculos extensores de las extremidades traseras durante la colocación plantar de las patas, o hay elevación del cuarto trasero.  
**Pasos plantares:** La pata tiene contacto *plantar* con soporte de peso, las extremidades posteriores avanzan hacia adelante y se reestablece el contacto *plantar* con soporte de peso.  
**Pasos dorsales:** El peso se soporta mediante la superficie dorsal de la pata en algún punto del ciclo del paso.  
**Coordinación de las extremidades posteriores con las anteriores:** Por cada paso de las extremidades anteriores, se lleva a cabo un paso de las extremidades posteriores y las extremidades posteriores se alternan.  
**Ocasional:** Menor que, o igual a la mitad (<50%).  
**Frecuente:** Más de la mitad pero no siempre (51-94%).  
**Consistente:** Casi siempre o siempre (95-100%).  
**Inestabilidad del tronco:** El peso lateral varía causando un movimiento de lado a lado o colapso parcial del tronco.  
**BBB:** Basso Beattie y Bresnahan

*Incluye las definiciones de las categorías y atributos (Basso et al., 1995).*

## 5.6. Evaluación de Tejido Preservado

Los animales incluidos para la evaluación del tejido preservado y la recuperación de la función motora fueron anestesiados con pentobarbital inyectable marca *Aranda* (65 mg/mL) administrado vía intraperitoneal (50 mg/kg) y xilacina marca *Virbac* (20 mg/mL) administrada vía intramuscular (10 mg/kg). Una vez que alcanzaron el plano anestésico se sacrificaron por perfusión intracardiaca, removiendo inicialmente la sangre del sistema circulatorio con PBS [1X] y posteriormente se fijaron los tejidos con paraformaldehído al 4%. Una vez fijados los tejidos, se extrajo la médula espinal considerando 1 cm en dirección caudal y 1 cm en dirección cefálica a partir del epicentro de la lesión y se colocaron individualmente en recipientes con paraformaldehído al 4% durante una semana para posfijarlos. Una vez pasado el tiempo se removió el paraformaldehído de los recipientes, se enjuagaron y se dejó la médula espinal otra semana más en los mismos recipientes pero sumergida en sacarosa al 30% (1:10 m/v) para su crioprotección.

Para la evaluación del tejido preservado de la médula espinal de los animales incluidos en el estudio, se realizaron bloques congelados del tejido en Tissue-Tek (Sakura Finetek USA inc.) para lo cual se colocó en un vaso de precipitado el reactivo 2-Propanol (*Sigma*) en “baño maría” sobre hielo seco. Una vez que la temperatura del alcohol alcanzó los -50°C se sumergieron las médulas directamente en el alcohol para congelarlas. Posteriormente, se agregó Tissue-Tec en moldes individuales de acetato hechos a la medida de las muestras y se colocaron las médulas congeladas, asegurando que estas estuvieran rectas y su parte dorsal hacia arriba. Se cubrió el resto del molde con Tisse-Tec teniendo cuidado de remover las burbujas. Finalmente, el molde se puso en contacto con hielo seco hasta que el bloque se congeló por completo. Los moldes con los bloques de los tejidos en su interior se almacenaron a -70°C en bolsas individuales hasta su procesamiento.

Para realizar los cortes histológicos se abrieron los moldes de acetato y se montaron los bloques con los tejidos en un portamuestras de aluminio con Tissue-Tek,

teniendo cuidado de que la orientación de la médula fuera correcta. Los cortes se realizaron con un grosor de 12 $\mu$  en un criostato (*LEICA CM 1510S*) que se mantuvo a -22°C. Los cortes se recogieron con portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina (0.001%).

A los cortes histológicos se les realizó la tinción de Luxol Fast Blue, el cual es un colorante de ftalocianina de cobre soluble en alcohol que es atraído por las bases que se encuentran en las lipoproteínas de la vaina de mielina (Bruce, 2018; Humphrey et al., 2008). Esta tinción en el tejido nervioso muestra las fibras de mielina de color azul, el neuropilo aparece de color rosa y las células nerviosas de color púrpura. El tejido se trató durante la noche y luego se diferenciaron con una solución de carbonato de litio (Humphrey et al., 2008). El procedimiento realizado se describe a continuación:

1. Se filtró el colorante Luxol Fast Blue y se recuperó el filtrado en un vaso de Coplin.
2. Se dejaron los cortes fijados en sus respectivos portaobjetos sumergidos en el colorante filtrado, durante 24 horas a temperatura ambiente.
3. Se enjuagaron las laminillas con agua destilada.
4. Se colocaron en alcohol al 96% durante 5 minutos y se enjuagaron con agua corriente y posteriormente con agua destilada rápidamente.
5. Se realizó la diferenciación sumergiendo las laminillas en carbonato de litio al 0.1% unos segundos, se enjuagaron con agua corriente y posteriormente con agua destilada rápidamente.
6. Se realizó la contratinción con violeta de cresilo sumergiendo las laminillas en dicho colorante durante 20 minutos, se enjuagaron con agua corriente y posteriormente agua destilada.
7. Se realizó la deshidratación de los tejidos sumergiendo las laminillas en alcohol al 96% 1 minuto, en alcohol al 100% 1 minuto y después se hicieron dos enjuagues con xilol de 1 minuto de duración.
8. Se eliminó el exceso de xilol y se realizó el montaje con Entellan (*NEW Merck Germany*).
9. Una vez secas las laminillas, se identificaron los 3 cortes con la mayor

destrucción del tejido más cercanos al canal endoneurial y se escanearon en su totalidad (2 cm) de forma independiente con un equipo *Aperio CS2*.

10. Para obtener el área ( $\text{mm}^2$ ) de tejido preservado para cada tejido, se obtuvo el promedio del área de los 3 cortes seleccionados, con el programa *Fiji*.

## 5.7. Análisis Estadístico

### 5.7.1. Estudio del Efecto de la Tibolona en la Expresión de Citocinas Pro y Anti-Inflamatorias en la Médula Espinal con Lesión Traumática

Para el estudio del efecto de la TIB en la expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias, a los resultados obtenidos para los 4 grupos de estudio (Lam, LTME, LTME+TIB 1 y LTME+TIB 2.5) se les realizaron estadísticas inferenciales, comprobando la esfericidad y homogeneidad de los datos, y un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para comparar los promedios de las concentraciones de las citocinas entre los grupos para cada periodo de tiempo estudiado (3 horas, 3, 7 y 14 días), seguido de una prueba post hoc de Tukey. Se usó el programa *GraphPad Prism 7* y se consideró como diferencia significativa una p menor o igual a 0.05.

### 5.7.2. Estudio del Efecto de la Tibolona en la Recuperación Funcional Motora de la Médula Espinal con Lesión Traumática

Para el estudio del efecto de la TIB sobre la recuperación funcional motora de las ratas con LTME, se aplicaron pruebas estadísticas inferenciales a los resultados para cada grupo de estudio, incluyendo la prueba de igualdad de varianzas de Levene para cada periodo de tiempo estudiado y la prueba de esfericidad de Mauchly. Posteriormente se realizó una ANOVA de medidas repetidas con el método de ajuste para la falta de esfericidad Greenhouse-Geisser usando el programa *JASP*.

La prueba de igualdad de varianzas de Levene mostró que en todos los periodos de tiempo estudiados, con la excepción de 24 horas post-LTME, momento en el que se confirmó que se hubiera realizado adecuadamente la LTME, hubo un valor de  $p > 0.01$ , lo que significa que los datos carecen de esfericidad y las varianzas entre los resultados a lo largo del tiempo no son homogéneas, por lo que se realizó un método de corrección para evitar que en el ANOVA de medidas repetidas las F aumentaran artificialmente.

El resultado de la prueba de esfericidad de Mauchly dió un valor de  $p < 0.001$ , indicando que no hay homogeneidad de varianzas entre los grupos, por lo que no se cumple con los supuestos estadísticos para la estadística paramétrica. Sin embargo, la violación de esta inferencia no es crítica al analizar los resultados de la escala de BBB ya que la varianza más elevada no fue cuatro veces mayor que la varianza más elevada y que los grupos tuvieron un tamaño de muestra similar (Howell, 1999). La esfericidad sostiene que la varianza entre promedios en cualquier nivel de los factores entre-sujetos es igual a la varianza de los promedios en cualquier otro nivel de ese factor. Sin embargo el ANOVA suele ser robusto aún y cuando se viola esta inferencia (Howell, 2002).

Adicionalmente es importante considerar que la escala BBB es ordinal y los sujetos sólo pueden obtener valores entre cero y 21, pues dependen de la categorización de las respuestas y de que los valores son asignados por convención. Una escala ordinal no tiene valores de intervalo iguales entre sus puntos, y la estadística paramétrica requiere de una escala de intervalo o de razón. La escala BBB también tiene la propiedad de que el intervalo entre los resultados no son uniformes, de manera que el progreso durante ciertas porciones de la escala puede ocurrir muy rápido. Sin embargo, a pesar que la escala BBB de 21 puntos es en su naturaleza ordinal, suele comportarse como variable numérica, por lo que se recomienda el uso de estadística paramétrica para evaluar los resultados de la recuperación locomotora promoviendo consistencia, comunicación y comparación de estudios entre laboratorios (Scheffe et al., 2002).

Considerando lo mencionado anteriormente, se aplicó a los resultados obtenidos para los 3 grupos de estudio (Lam, LTME y LTME+TIB 1) un ANOVA de dos vías de medidas repetidas (grupo x tiempo) con la corrección de Greenhouse-Geisser para compensar la falta de esfericidad de los datos. Los resultados del ANOVA mostraron valores de  $p < 0.001$ , indicando que hay diferencias significativas entre los grupos de estudio. A partir del análisis descrito, se concluyó que existen diferencias significativas atribuibles a los factores grupo, tiempo y su interacción. Adicionalmente, se evaluó el efecto entre-sujetos por el método de la suma de cuadrados. La chi cuadrada ( $X^2$ ) mostró que el apareamiento de los grupos con el factor tiempo es significativo ( $p < 0.001$ ), de manera que el análisis con la aproximación de las medidas repetidas es apropiado y la desigualdad de las varianzas univariadas no es relevante. Lo descrito anteriormente se realizó con el programa *JASP*.

Posteriormente, se llevó a cabo la prueba post-hoc de Bonferroni para poder identificar las comparaciones en las que existen diferencias significativas con respecto al factor grupo. Los resultados indicaron que los valores promedio de la escala BBB en los grupos de LTME y de LTME+TIB 1 son significativamente diferentes a los del grupo de Lam ( $p < 0.001$ ), sin embargo no es así entre el grupo de LTME y el grupo de LTME+TIB 1 ( $p < 0.295$ ). En el análisis post hoc de la interacción grupo x tiempo no se identificaron diferencias significativas entre los valores promedio de la BBB de los grupos LTME vs LTME+TIB 1 en ninguno de los periodos de tiempo estudiados.

Considerando la violación de la inferencia de esfericidad de Mauchly y que la escala de BBB es una escala ordinal, Scheffe et al (2002) recomiendan usar pruebas no paramétricas con el uso de datos ordinales, por lo que se decidió realizar pruebas no-paramétricas para evidenciar una diferencia significativa en caso de existir o comprobar la falta de diferencia significativa, entre el grupo de LTME y el grupo de LTME+TIB 1. Dado que no existe una prueba no-paramétrica para diseños con dos variables independientes, se calculó el área bajo la curva para los tres grupos de estudio obteniendo un dato por sujeto al remover el factor tiempo. Se realizó la prueba

de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. El resultado presentó una  $p < 0.05$  indicando nuevamente que hay diferencias significativas entre los promedios de los grupos de estudio, sin embargo la prueba de comparaciones múltiples de Dunn confirmaron la ausencia de una diferencia significativa entre el grupo de LTME y el de LTME+TIB 1. Se utilizó el programa *Prism 5.0*.

### 5.7.3. Estudio del Efecto de la Tibolona en la Preservación del Tejido de la Médula Espinal con Lesión Traumática

Para el estudio del efecto de la TIB sobre la preservación del tejido nervioso después de una LTME, inicialmente se comprobó la presencia de las inferencias estadísticas a los resultados obtenidos para los 3 grupos de estudio (Lam, LTME y LTME+TIB 1), y posteriormente se les realizaron ANOVAs de una vía para comparar los promedios de las áreas de tejido preservado entre los grupos. También se realizó una prueba post hoc de Tukey. Se usó el programa *GraphPad Prism 7* y se consideró como diferencia significativa una  $p$  menor o igual a 0.05.

## 6. Resultados

### 6.1. Efecto de la Tibolona en la Regulación de Citocinas Pro y Anti-Inflamatorias Después de una Lesión Traumática de Médula Espinal

Para estudiar el efecto de la TIB en la regulación de citocinas pro y anti-inflamatorias después de una LTME, se usaron 4 grupos de estudio; Laminectomía (Lam), LTME (lesión traumática de médula espinal sin tratamiento), un grupo con LTME y tratamiento de TIB a dosis de 1 mg/Kg de peso (LTME+TIB 1) y un grupo con LTME y tratamiento de TIB a dosis de 2.5 mg/Kg de peso (LTME+TIB 2.5). Cada grupo recibió su tratamiento diario correspondiente, descrito en la tabla 12, durante distintos periodos de tiempo; 3 horas, 3, 7 y 14 días. Posteriormente, los animales fueron sacrificados y se extrajo la médula para extraer proteínas, cuantificarlas y cuantificar la concentración de citocinas pro (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12, TNF $\alpha$ , GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ ) y anti-inflamatorias (IL-10, IL-4, IL-13) mediante un análisis inmunoenzimático usando kits MILLIPLEX. Los resultados se muestran en la figura 8 a la figura 18.

## 6.1.1. Efecto de la Tibolona en la Regulación de Citocinas Pro-Inflamatorias

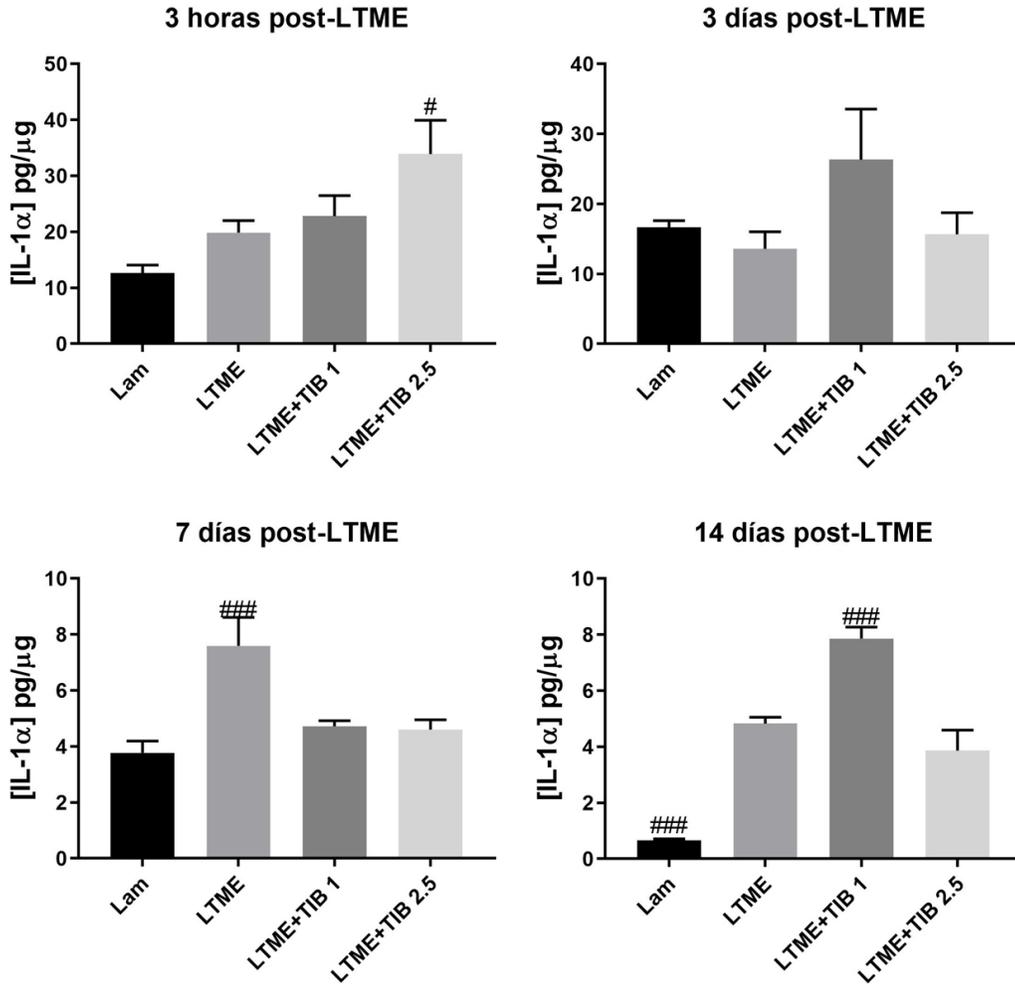
### 6.1.1.1. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Interleucina 1 Alfa

La concentración de IL-1 $\alpha$ , 3 horas después de la LTME fue menor en el grupo Lam en comparación con los grupos con LTME, siendo esta diferencia significativa únicamente entre el grupo de Lam con el grupo de LTME+TIB 2.5 (Fig. 8).

A los 3 días no hubo diferencias significativas en la concentración de IL-1 $\alpha$  entre los grupos de estudio, sin embargo los resultados sugieren que la LTME disminuye sutilmente la expresión de esta citocina en comparación con el grupo Lam y que el tratamiento con TIB a dosis de 1 mg/Kg aumenta la concentración (Fig. 8).

A los 7 días se mostró un aumento significativo en la concentración de IL-1 $\alpha$  provocado por la LTME, pero ese aumento fue prevenido con el tratamiento de TIB a ambas dosis estudiadas (Fig. 8).

A los 14 días el grupo Lam presentó una concentración significativamente menor de IL-1 $\alpha$  en comparación con los grupos de LTME, LTME+TIB 1 y LTME+TIB 2.5, mientras que el grupo de LTME+TIB 1 presentó una concentración significativamente mayor que los grupos Lam, LTME y LTME+TIB 2.5 (Fig. 8).



**Figura 8.** Efecto de la tibolona en la regulación de la interleucina 1 alfa en la lesión traumática de médula espinal. Se muestra el promedio de la expresión proteica de IL-1α en médula espinal a las 3 horas, 3 días (arriba), 7 y 14 días (abajo) post-LTME ± SEM. En el eje de abscisas de izquierda a derecha, se muestran los grupos: 1. Lam: laminectomía; 2. LTME: lesión traumática de médula espinal; 3. LTME+TIB 1: LTME con tratamiento de TIB (1 mg/Kg); 4. LTME+TIB 2.5: LTME con tratamiento de TIB (2.5 mg/Kg). Se realizaron ANOVAs de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. A las 3 horas, el grupo de LTME+TIB 2.5 presenta una concentración significativamente mayor en comparación con el grupo Lam ( $\#p \leq 0.05$ ). A los 7 días, el grupo de LTME presenta una concentración significativamente mayor en comparación con los grupos Lam, LTME+TIB 1 y LTME+TIB 2.5 ( $###p \leq 0.05$ ). A los 14 días, el grupo Lam presenta una concentración significativamente menor en comparación con los grupos de LTME, LTME+TIB 1 y LTME+TIB 2.5 ( $###p \leq 0.01$ ), y el grupo de LTME+TIB 1 presenta una concentración significativamente mayor en comparación con los grupos Lam, LTME y LTME+TIB 2.5 ( $###p \leq 0.01$ ). IL-1α: interleucina 1 alfa; TIB: tibolona.

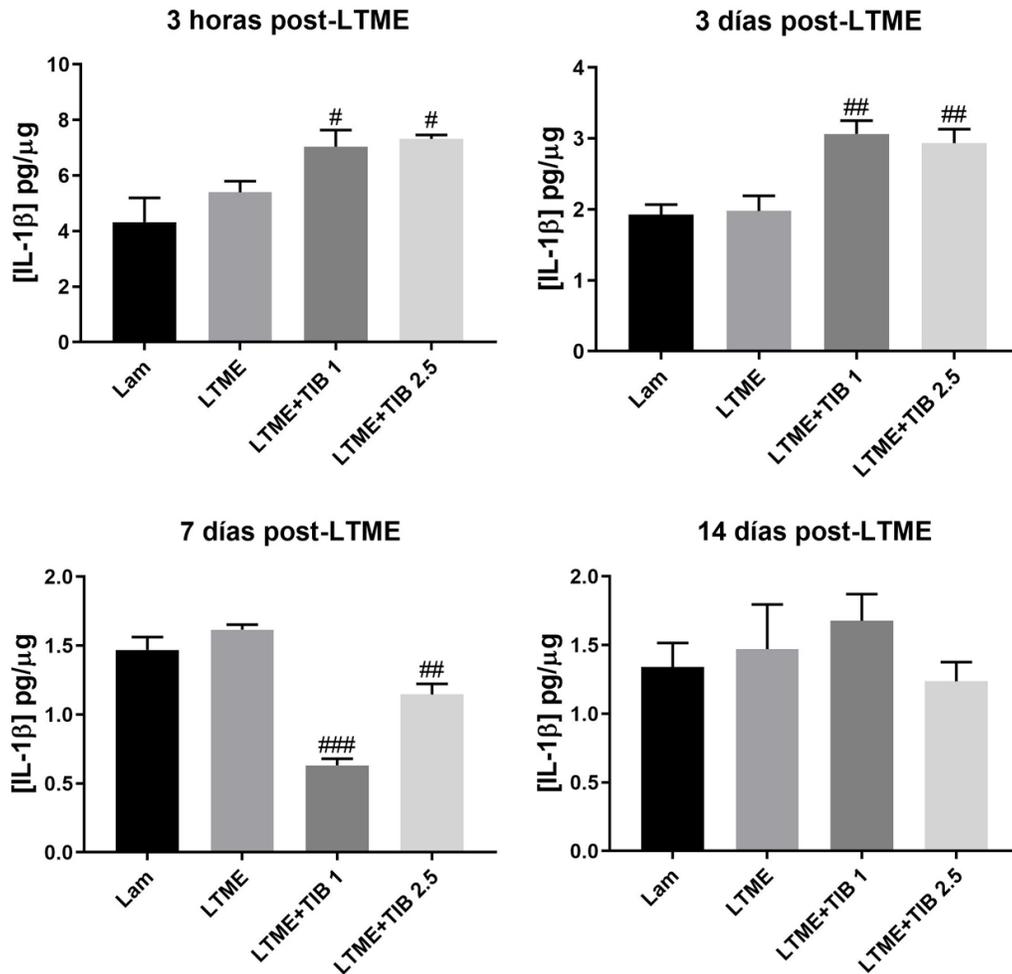
#### 6.1.1.2. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Interleucina 1 Beta

A las 3 horas, la concentración de la IL-1 $\beta$  fue significativamente mayor en los grupos con LTME que recibieron tratamiento con TIB a ambas dosis estudiadas comparado con el grupo de Lam (Fig. 9).

A los 3 días, la concentración de IL-1 $\beta$  fue significativamente mayor en los grupos con LTME que recibieron tratamiento de TIB a ambas dosis estudiadas, comparado con los grupos de Lam y LTME (Fig. 9).

A los 7 días después de la LTME, el grupo de LTME+TIB 1 presentaron una diferencia significativa en comparación los grupos de Lam, LTME y LTME+TIB 2.5, y el grupo de LTME+TIB 2.5 presenta una concentración de IL-1 $\beta$  significativamente menor en comparación con los grupos de Lam y LTME (Fig. 9).

A los 14 días después de la LTME la concentración de IL-1 $\beta$  no varió entre los grupos de estudio (Fig. 9).



**Figura 9.** Efecto de la tibolona en la regulación de la interleucina 1 beta en la lesión traumática de médula espinal. Se muestra el promedio de la expresión proteica de IL-1 $\beta$  en médula espinal a las 3 horas, 3 días (arriba), 7 y 14 días (abajo) post-LTME  $\pm$  SEM. En el eje de abscisas de izquierda a derecha, se muestran los grupos: 1. Lam: laminectomía; 2. LTME: lesión traumática de médula espinal; 3. LTME+TIB 1: LTME con tratamiento de TIB (1 mg/Kg); 4. LTME+TIB 2.5: LTME con tratamiento de TIB (2.5 mg/Kg). Se realizaron ANOVAs de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. A las 3 horas, los grupos de LTME+TIB 1 y LTME+TIB 2.5 presentan una concentración significativamente mayor en comparación con el grupo de Lam ( $\#p \leq 0.05$ ). A los 3 días, los grupos de LTME+TIB 1 y LTME+TIB 2.5 presentan una concentración significativamente mayor en comparación con los grupos de Lam y LTME ( $##p \leq 0.05$ ). A los 7 días, el grupo de LTME+TIB 1 presenta una concentración significativamente menor en comparación con los grupos de Lam, LTME y LTME+TIB 2.5 ( $###p \leq 0.001$ ), y el grupo de LTME+TIB 2.5 presenta una concentración significativamente menor en comparación con los grupos de Lam y LTME ( $##p \leq 0.05$ ). IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta; TIB: tibolona.

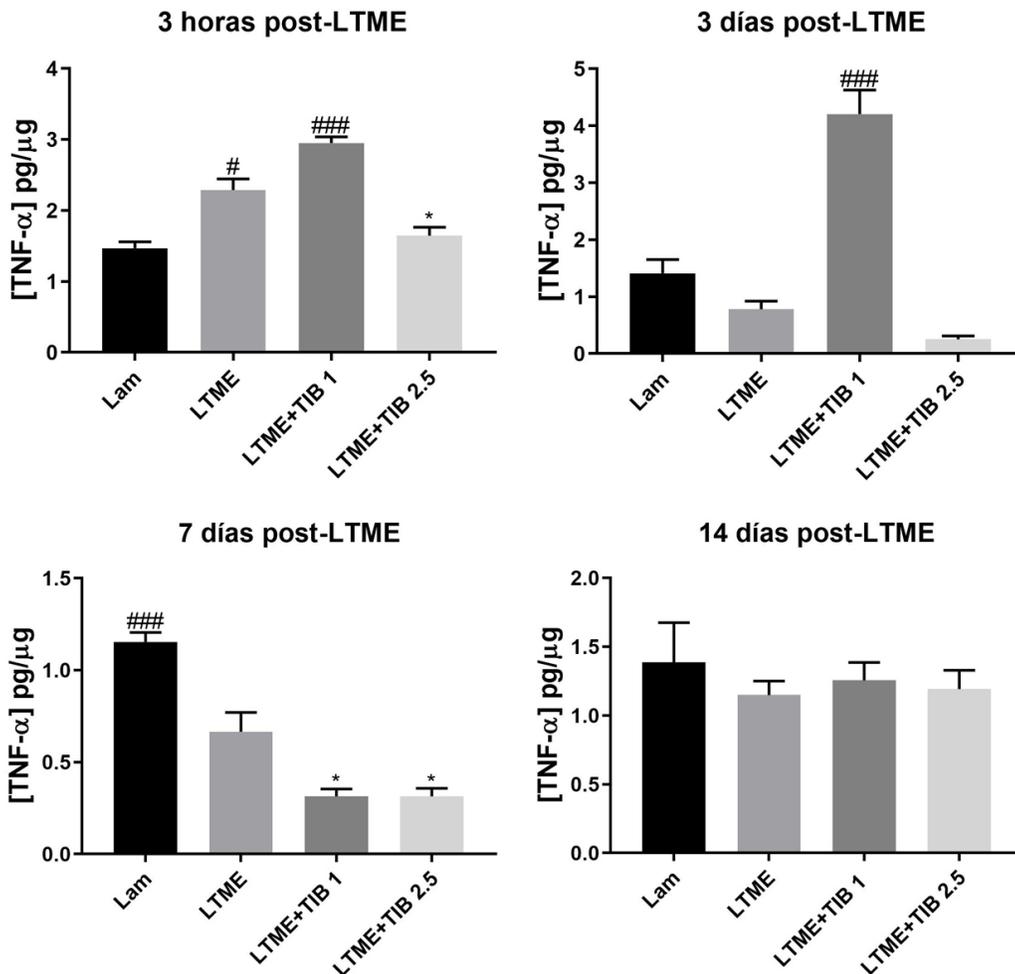
### 6.1.1.3. Efecto de la Tibolona en la Regulación del Factor de Necrosis Tumoral Alfa

A las 3 horas después de la LTME, la concentración del TNF- $\alpha$  aumentó de forma significativa en comparación con el grupo de Lam, sin embargo, en el grupo de LTME+TIB 2.5 se previno este aumento (Fig. 10). Por su parte, el grupo de LTME+TIB 1 tuvo una concentración significativamente mayor en comparación al grupo Lam, LTME y LTME+TIB 2.5.

A los 3 días post-LTME, el tratamiento con TIB (1 mg/Kg) incrementó la concentración de TNF- $\alpha$  en comparación con los grupos de Lam, LTME y LTME+TIB 2.5, reforzando la idea que a esta dosis, la TIB pudiera promover la expresión de TNF- $\alpha$  en la LTME en el periodo agudo de la LTME (Fig. 10).

A los 7 días, el grupo de Lam tuvo una concentración del TNF- $\alpha$  significativamente mayor en comparación con los demás grupos de estudio. El tratamiento con TIB disminuyó la concentración de esta citocina en ambas dosis estudiadas, en comparación con el grupo de LTME (Fig. 10).

A los 14 días no se presentó diferencia alguna en la concentración del TNF- $\alpha$  entre los grupos de estudio (Fig. 10).



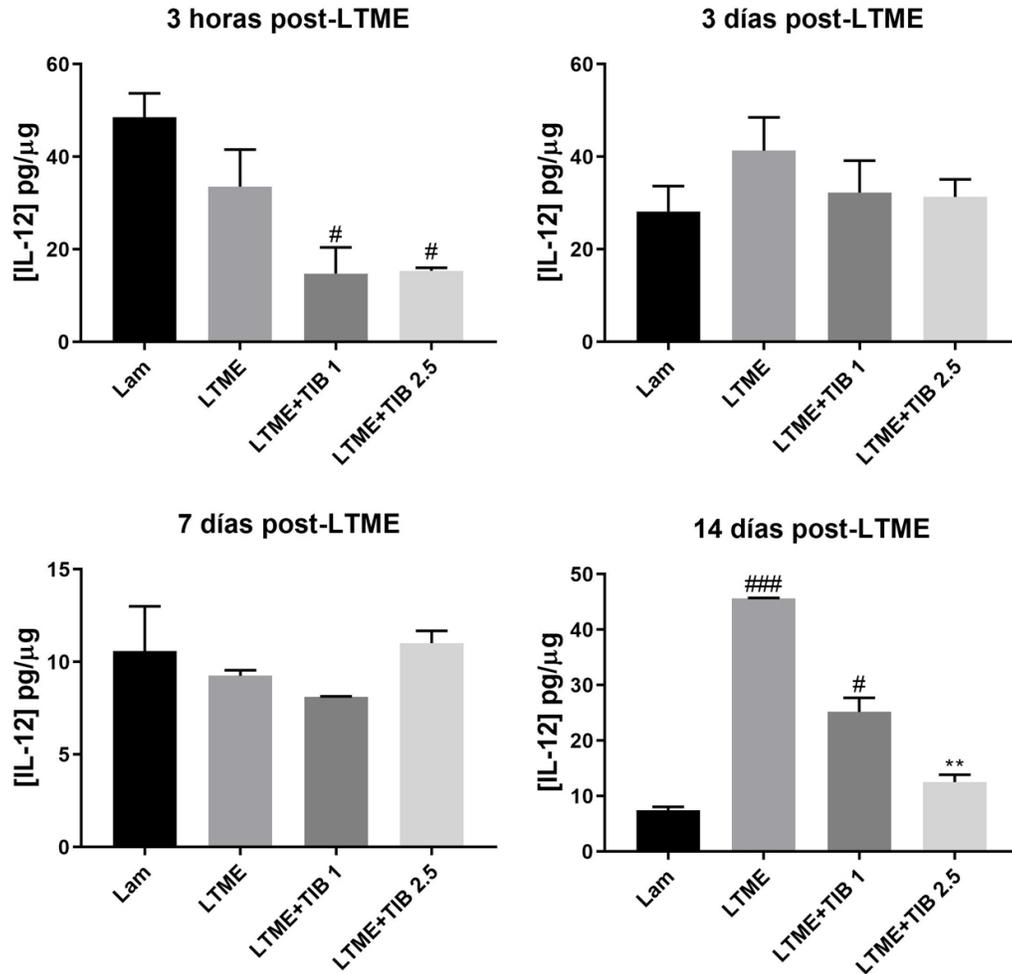
**Figura 10.** Efecto de la tibolona en la regulación del factor de necrosis tumoral alfa en la lesión traumática de médula espinal. Se muestra el promedio de la expresión proteica de TNF- $\alpha$  en médula espinal a las 3 horas, 3 días (arriba), 7 y 14 días (abajo) post-LTME  $\pm$  SEM. En el eje de abscisas de izquierda a derecha, se muestran los grupos: 1. Lam: laminectomía; 2. LTME: lesión traumática de médula espinal; 3. LTME+TIB 1: LTME con tratamiento de TIB (1 mg/Kg); 4. LTME+TIB 2.5: LTME con tratamiento de TIB (2.5 mg/Kg). Se realizaron ANOVAs de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. A las 3 horas, el grupo de LTME presenta una concentración significativamente mayor en comparación con el grupo sham ( $\#p \leq 0.01$ ), el grupo de LTME+TIB 1 presenta una concentración significativamente mayor en comparación con los grupos de Lam, LTME y LTME+TIB 2.5 ( $\###p \leq 0.05$ ), y el grupo de LTME+TIB 2.5 tiene una concentración significativamente menor en comparación con el grupo de LTME ( $*p \leq 0.05$ ), sugiriendo que a esta dosis la TIB a dosis de 2.5 mg/Kg disminuye los niveles de TNF- $\alpha$  en la LTME. A los 3 días, el grupo de LTME+TIB 1 presenta una concentración significativamente mayor en comparación con los grupos de Lam, LTME y LTME+TIB 2.5 ( $\###p \leq 0.0001$ ). A los 7 días, el grupo Lam presenta una concentración significativamente mayor en comparación con el grupo de LTME y los grupos de LTME+TIB 1 y LTME+TIB 2.5 ( $\###p \leq 0.0001$ ). Además, los grupos de LTME+TIB 1 y LTME+TIB 2.5 presentan una concentración significativamente menor en comparación con el grupo de LTME ( $*p \leq 0.005$ ), sugiriendo que en este periodo de tiempo el tratamiento con TIB (1 y 2.5 mg/g) disminuye el nivel de TNF- $\alpha$  en la LTME. TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa; TIB: tibolona.

#### 6.1.1.4. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Interleucina 12

A las 3 horas post-LTME, la concentración de la IL-12 es menor en los grupos con LTME con o sin tratamiento de TIB, en comparación con el grupo de Lam, sin embargo, esta diferencia sólo es significativa en los grupos que recibieron tratamiento con TIB (Fig. 11).

Ni a los 3 días ni a los 7 post-LTME se observaron diferencias significativas en la concentración de la IL-12 en ninguno de los grupos de estudio (Fig.11).

A los 14 días post-LTME, el grupo de LTME+TIB 1 presentó una concentración de IL-12 significativamente menor en comparación al grupo de LTME y mayor en comparación con el grupo de Lam y el grupo de LTME+TIB 2.5. Además, el grupo de LTME tuvo una concentración significativamente mayor de IL-12 en comparación con los grupos Lam y el grupo de LTME+TIB 2.5 (Fig. 11), sugiriendo que a los 14 días, una dosis de 2.5 mg/Kg de TIB es más efectiva que una de 1 mg/Kg en prevenir un aumento en la expresión de IL-12.



**Figura 11.** Efecto de la tibolona en la regulación de la interleucina 12 en la lesión traumática de médula espinal. Se muestra el promedio de la expresión proteica de IL-12 en médula espinal 3 horas, 3 días (arriba), 7 y 14 días (abajo) post-LTME  $\pm$  SEM. En el eje de abscisas de izquierda a derecha, se muestran los grupos: 1. Lam: laminectomía; 2. LTME: lesión traumática de médula espinal; 3. LTME+TIB 1: LTME con tratamiento de TIB (1 mg/Kg); 4. LTME+TIB 2.5: LTME con tratamiento de TIB (2.5 mg/Kg). Se realizaron ANOVAs de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. A las 3 horas, los grupos de LTME+TIB 1 y LTME+TIB 2.5 presentan una concentración significativamente menor en comparación con el grupo de Lam ( $\#p \leq 0.05$ ). A los 14 días, el grupo de LTME presenta una concentración significativamente mayor en comparación con grupos de Lam, LTME+TIB 1 y Lam y LTME+TIB 2.5 ( $###p \leq 0.001$ ), el grupo de LTME+TIB 1 presenta una concentración significativamente mayor con el grupo Lam ( $\#p \leq 0.001$ ) y el grupo de LTME+TIB 2.5 presenta una concentración significativamente menor en comparación con el grupo de LTME+TIB 1 ( $**p \leq 0.01$ ). Los resultados sugieren que en este periodo de tiempo el tratamiento con TIB (1 y 2.5 mg/g) disminuye el nivel de IL-12 en la LTME. IL-12: interleucina 12; TIB: tibolona.

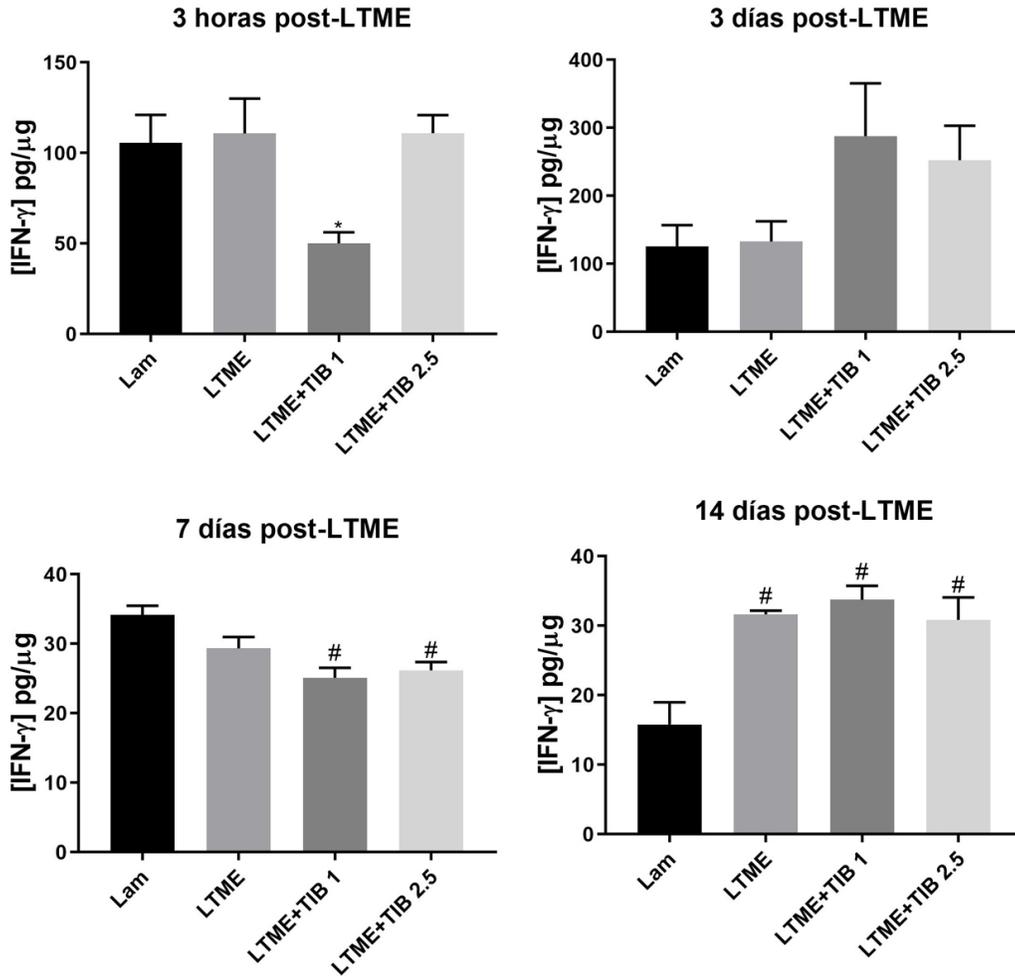
#### 6.1.1.5. Efecto de la Tibolona en la Regulación del Interferón Gamma

A las 3 horas y 3 días post-LTME, la concentración del IFN- $\gamma$  no cambia en el grupo de LTME en comparación con el grupo de Lam, sin embargo, a las 3 horas después de la LTME, el grupo que recibió un tratamiento de TIB a dosis de 1 mg/Kg tiene una concentración significativamente menor en comparación con el grupo de LTME (Fig. 12).

A los 3 días, los grupos que recibieron tratamiento de TIB a ambas dosis estudiadas tienen una concentración de IFN- $\gamma$  ligeramente mayor en comparación con los grupos de Lam y de LTME sin alcanzar significancia estadística (Fig. 12).

A los 7 días después de la LTME, la concentración de IFN- $\gamma$  disminuye significativamente con ambas dosis de tratamiento de TIB estudiadas en comparación con el grupo de Lam (Fig. 12).

A los 14 días, los grupos con LTME presentan una concentración de IFN- $\gamma$  significativamente mayor en comparación con el grupo Lam (Fig. 12).

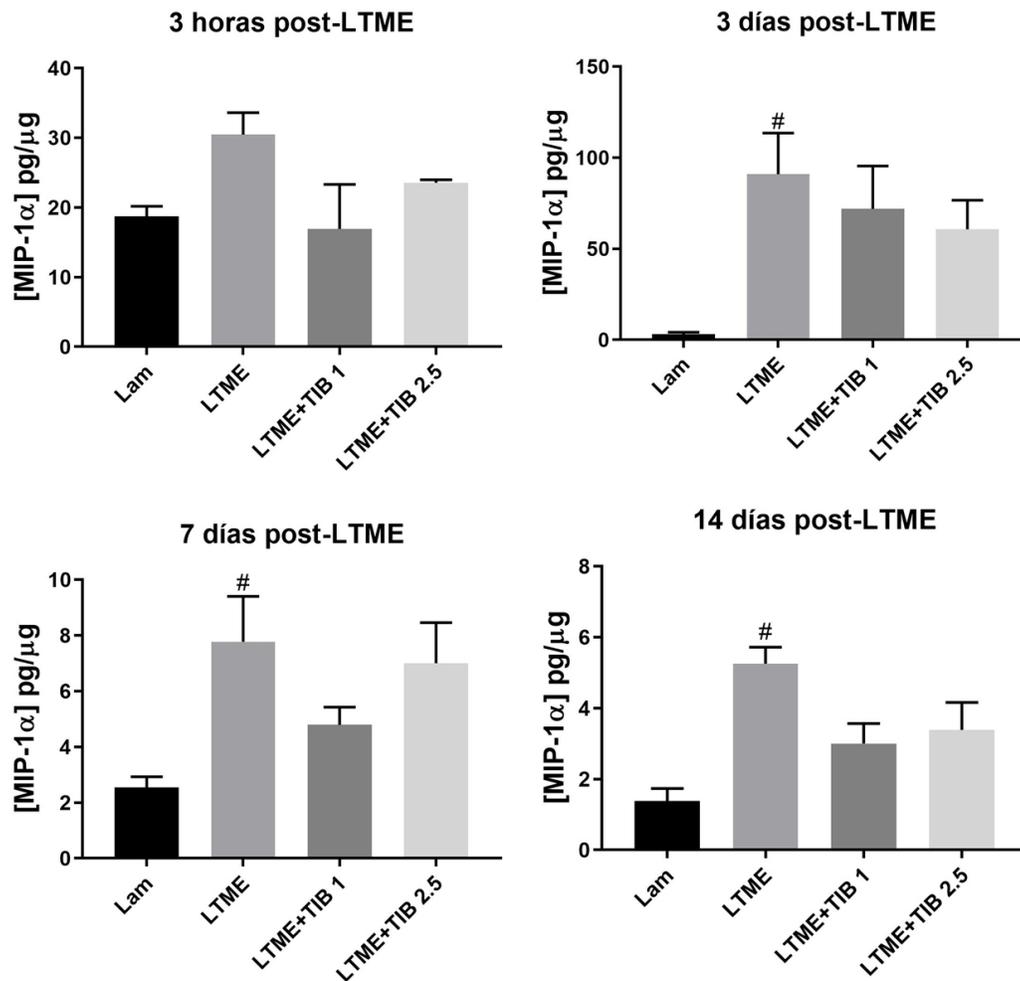


**Figura 12.** Efecto de la tibolona en la regulación del interferón gamma en la lesión traumática de médula espinal. Se muestra el promedio de la expresión proteica del IFN- $\gamma$  en médula espinal a las 3 horas, 3 días (arriba), 7 y 14 días (abajo) post-LTME  $\pm$  SEM. En el eje de abscisas de izquierda a derecha, se muestran los grupos: 1. Lam: laminectomía; 2. LTME: lesión traumática de médula espinal; 3. LTME+TIB 1: LTME con tratamiento de TIB (1 mg/Kg); 4. LTME+TIB 2.5: LTME con tratamiento de TIB (2.5 mg/Kg). Se realizaron ANOVAs de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. A las 3 horas, el grupo de LTME+TIB 1 presenta una concentración significativamente menor en comparación con el grupo de LTME (\* $p \leq 0.05$ ). A los 7 días, los grupos de LTME+TIB 1 y LTME+TIB 2.5 presentan una concentración significativamente menor en comparación con el grupo de Lam (# $p \leq 0.05$ ). A los 14 días, los grupos de LTME, LTME+TIB 1 y LTME+TIB 2.5, presentan una concentración significativamente mayor en comparación con el grupo de Lam (# $p \leq 0.01$ ). IFN- $\gamma$ : interferón gamma; TIB: tibolona.

### 6.1.1.6. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 Alfa

A las 3 horas post-LTME no hay diferencias significativas en la concentración de MIP-1 $\alpha$  entre los grupos de estudio (Fig. 13).

A los 3, 7 y 14 días post-LTME, la concentración de MIP-1 $\alpha$  es significativamente mayor en el grupo de LTME en comparación al grupo de Lam (Fig. 13).

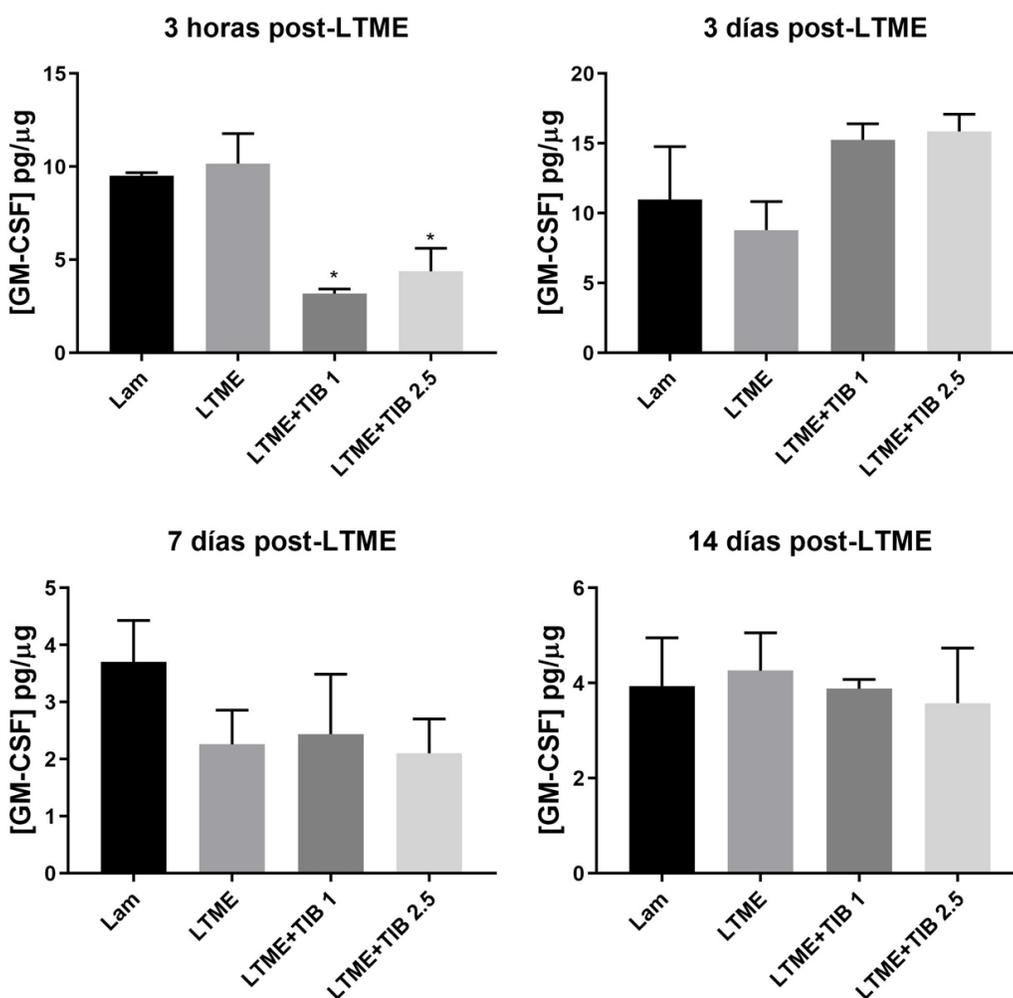


**Figura 13.** Efecto de la tibolona en la regulación de la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa en la lesión traumática de médula espinal. Se muestra el promedio de la expresión proteica de MIP-1 $\alpha$  en médula espinal a las 3 horas, 3 días (arriba), 7 y 14 días (abajo) post-LTME  $\pm$  SEM. En el eje de abscisas de izquierda a derecha, se muestran los grupos: 1. Lam: laminectomía; 2. LTME: lesión traumática de médula espinal; 3. LTME+TIB 1: LTME con tratamiento de TIB (1 mg/Kg); 4. LTME+TIB 2.5: LTME con tratamiento de TIB (2.5 mg/Kg). Se realizaron ANOVAs de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. El grupo de LTME presenta una concentración significativamente mayor en comparación con el grupo Lam a los 3, 7 y 14 días (#p<0.05). MIP-1 $\alpha$ : proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa; TIB: tibolona

### 6.1.1.7. Efecto de la Tibolona en la Regulación del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos

A las 3 horas post-LTME, la concentración del GM-CSF es menor en los grupos que recibieron tratamiento con TIB en comparación con el grupo de LTME (Fig. 14).

A los 3, 7 y 14 días, los resultados no mostraron un cambio significativo en la concentración del GM-CSF en ninguno de los grupos estudiados (Fig. 14).

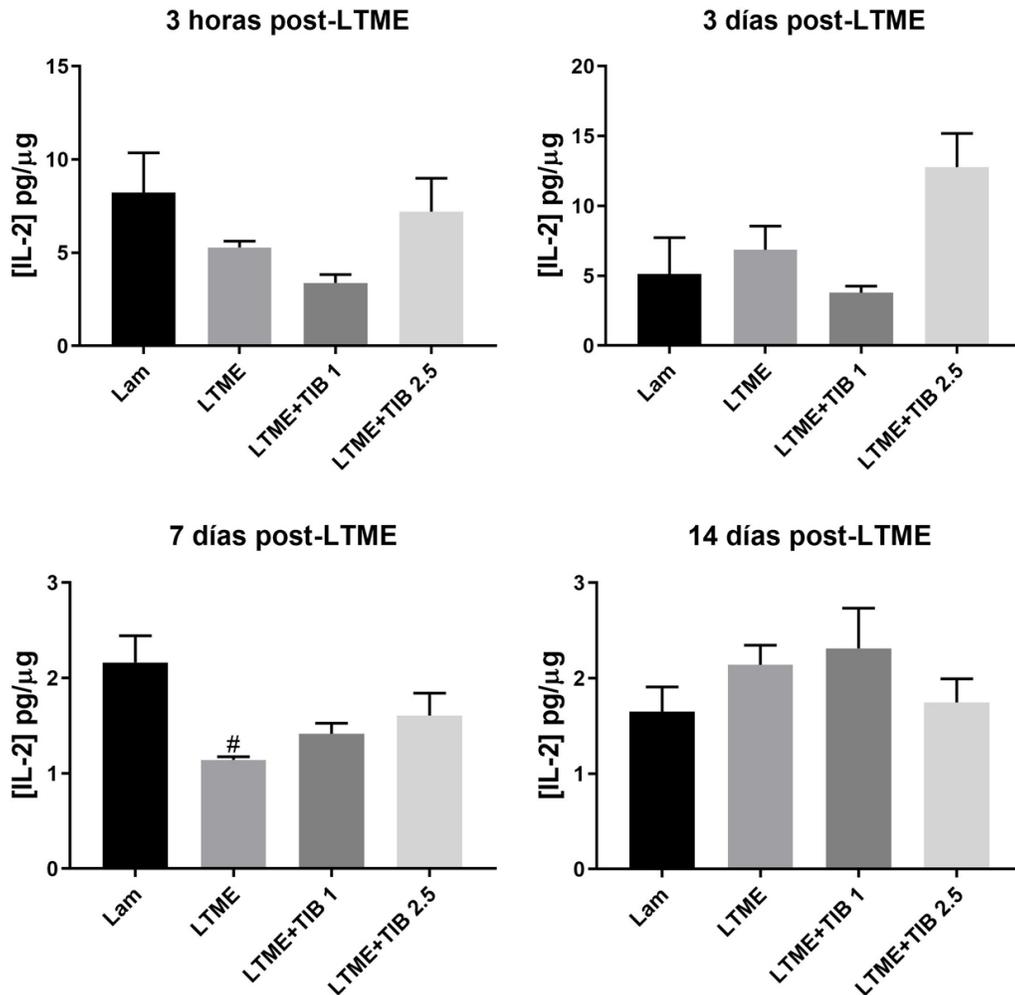


**Figura 14.** Efecto de la tibolona en la regulación del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos en la lesión traumática de médula espinal. Se muestra el promedio de la expresión proteica del GM-CSF en médula espinal a las 3 horas, 3 días (arriba), 7 y 14 días (abajo) post-LTME  $\pm$  SEM. En el eje de abscisas de izquierda a derecha, se muestran los grupos: 1. Lam: laminectomía; 2. LTME: lesión traumática de médula espinal; 3. LTME+TIB 1: LTME con tratamiento de TIB (1 mg/Kg); 4. LTME+TIB 2.5: LTME con tratamiento de TIB (2.5 mg/Kg). Se realizaron ANOVAs de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. A las 3 horas, los grupos de LTME+TIB 1 y LTME+TIB 2.5 presentan una concentración significativamente menor de GM-CSF en comparación con el grupo de LTME (\* $p \leq 0.05$ ). GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; TIB: tibolona.

### 6.1.1.8. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Interleucina 2

A las 3 horas, 3 y 14 días después de la LTME, la concentración de la IL-2 no cambió significativamente entre ninguno de los grupos estudiados (Fig. 15).

A los 7 días post-LTME, el grupo de LTME presenta una concentración de IL-2 significativamente menor en comparación con el grupo de Lam. A pesar de observarse un incremento en la concentración de la IL-2 en ambos grupos con LTME tratados con TIB, la diferencia no es significativa (Fig. 15).

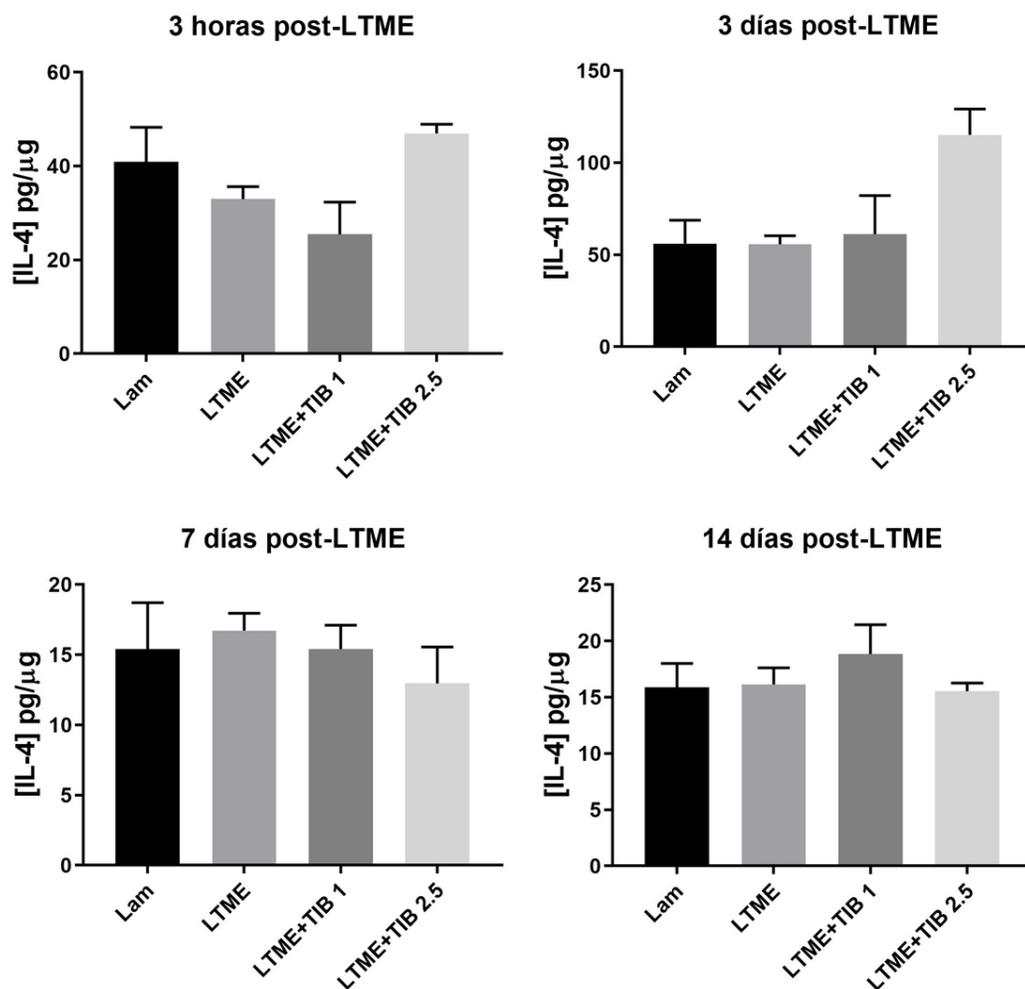


**Figura 15.** Efecto de la tibolona en la regulación de la interleucina 2 en la lesión traumática de médula espinal. Se muestra el promedio de la expresión proteica de IL-2 en médula espinal a las 3 horas, 3 días (arriba), 7 y 14 días (abajo) post-LTME  $\pm$  SEM. En el eje de abscisas de izquierda a derecha, se muestran los grupos: 1. Lam: laminectomía; 2. LTME: lesión traumática de médula espinal; 3. LTME+TIB 1: LTME con tratamiento de TIB (1 mg/Kg); 4. LTME+TIB 2.5: LTME con tratamiento de TIB (2.5 mg/Kg). Se realizaron ANOVAs de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. A los 7 días, el grupo de LTME tiene una concentración significativamente menor en comparación con el grupo de Lam (# $p < 0.01$ ). IL-2: interleucina 2; TIB: tibolona.

## 6.1.2. Efecto de la Tibolona en la Regulación de Citocinas Anti-Inflamatorias

### 6.1.2.1. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Interleucina 4

No se observaron cambios significativos en la concentración de la IL-4 en ninguno de los grupos de estudio a lo largo de los periodos de tiempo evaluados (Fig. 16).

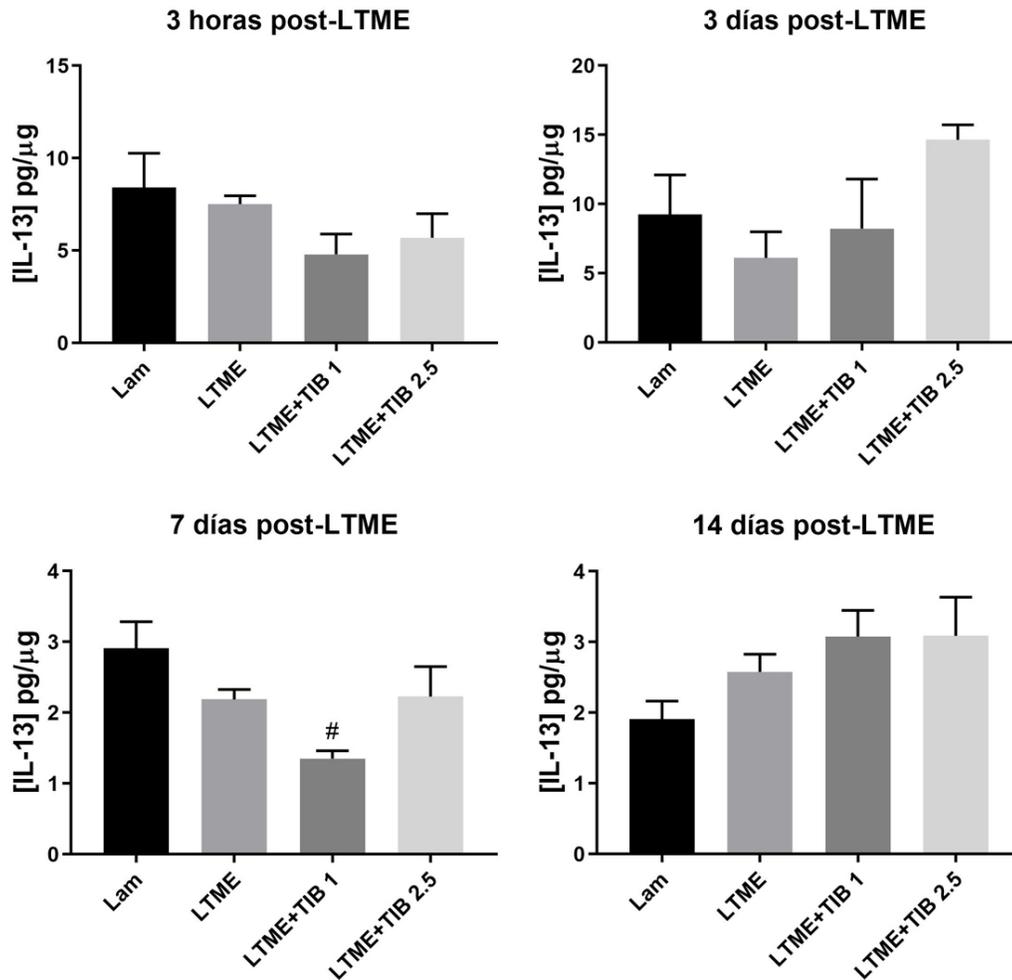


**Figura 16.** Efecto de la tibolona en la regulación de la interleucina 4 en la lesión traumática de médula espinal. Se muestra el promedio de la expresión proteica de IL-4 en médula espinal a las 3 horas, 3 días (arriba), 7 y 14 días (abajo) post-LTME  $\pm$  SEM. En el eje de abscisas de izquierda a derecha, se muestran los grupos: 1. Lam: laminectomía; 2. LTME: lesión traumática de médula espinal; 3. LTME+TIB 1: LTME con tratamiento de TIB (1 mg/Kg); 4. LTME+TIB 2.5: LTME con tratamiento de TIB (2.5 mg/Kg). Se realizaron ANOVAs de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. IL-4: interleucina 4; TIB: tibolona.

### 6.1.2.2. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Interleucina 13

A las 3 horas, 3 y 14 días después de la LTME los grupos de estudio no tienen diferencias significativas en la concentración de IL-13 (Fig. 17).

A los 7 días después de la LTME el grupo de LTME con tratamiento de TIB a dosis de 1 mg/Kg presentó una concentración significativamente menor comparada con el grupo de Lam (Fig. 17).



**Figura 17.** Efecto de la tibolona en la regulación de la interleucina 13 en la lesión traumática de médula espinal. Se muestra el promedio de la expresión proteica de IL-1 $\alpha$  en médula espinal a las 3 horas, 3 días (arriba), 7 y 14 días (abajo) post-LTME  $\pm$  SEM. En el eje de abscisas de izquierda a derecha, se muestran los grupos: 1. Lam: laminectomía; 2. LTME: lesión traumática de médula espinal; 3. LTME+TIB 1: LTME con tratamiento de TIB (1 mg/Kg); 4. LTME+TIB 2.5: LTME con tratamiento de TIB (2.5 mg/Kg). Se realizaron ANOVAs de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. A los 7 días, el grupo de LTME+TIB 1 presenta una concentración de IL-13 significativamente menor en comparación con el grupo de Lam (# $p \leq 0.05$ ). IL-13; interleucina 13; TIB: tibolona.

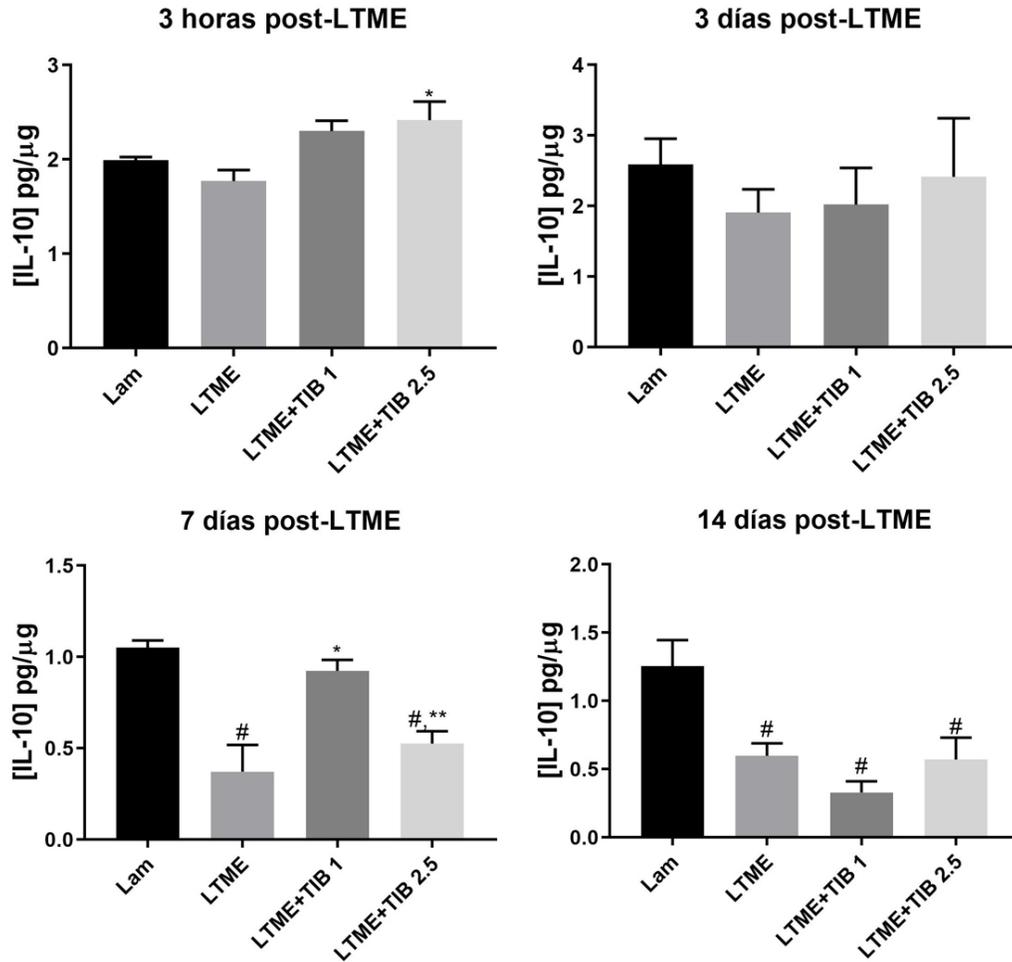
### 6.1.2.3. Efecto de la Tibolona en la Regulación de la Interleucina 10

A las 3 horas después de la LTME, la concentración de la IL-10 no se modifica por la LTME ni por el tratamiento con TIB a dosis de 1 mg/Kg, sin embargo, el grupo que recibió tratamiento de TIB a dosis de 2.5 mg/Kg muestra una concentración de IL-10 significativamente mayor en comparación con el grupo de LTME (Fig. 18).

A los 3 días post-LTME, no hay diferencias considerables en la concentración de IL-10 entre los grupos (Fig. 18).

A los 7 días después de la LTME, la concentración de IL-10 en el grupo de LTME es significativamente menor comparada con el grupo de Lam, el grupo de LTME con tratamiento de TIB a dosis de 1 mg/Kg tiene una diferencia significativamente mayor al compararlo con el grupo de LTME y el grupo de LTME con tratamiento de TIB a dosis de 2.5 mg/Kg tiene una diferencia significativamente menor en comparación con los grupos de Lam y LTME+TIB 1 (Fig. 18).

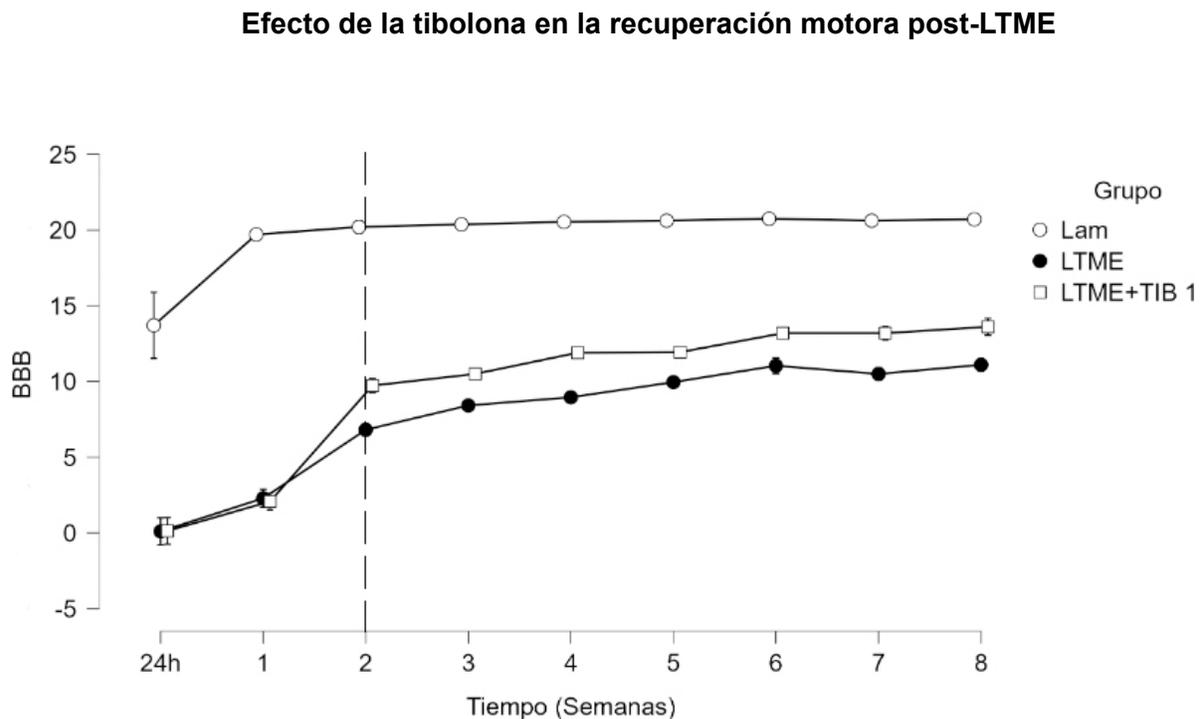
A los 14 días los grupos de LTME y LTME con tratamiento de tibolona a dosis de 1 y 2.5 mg/Kg presentan una concentración significativamente menor de IL-10 en comparación con el grupo de Lam (Fig. 18).



**Figura 18.** Efecto de la tibolona en la regulación de la interleucina 10 en la lesión traumática de médula espinal. Se muestra el promedio de la expresión proteica de IL-1 $\alpha$  en médula espinal a las 3 horas, 3 días (arriba), 7 y 14 días (abajo) post-LTME  $\pm$  SEM. En el eje de abscisas de izquierda a derecha, se muestran los grupos: 1. Lam: laminectomía; 2. LTME: lesión traumática de médula espinal; 3. LTME+TIB 1: LTME con tratamiento de TIB (1 mg/Kg); 4. LTME+TIB 2.5: LTME con tratamiento de TIB (2.5 mg/Kg). Se realizaron ANOVAs de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. A las 3 horas, el grupo de LTME+TIB 2.5 tiene una concentración significativamente más elevada que el grupo de LTME ( $\#p \leq 0.05$ ). A los 7 días, el grupo de LTME presenta una concentración significativamente menor en comparación con el grupo de Lam ( $\#p \leq 0.01$ ), el grupo de LTME+TIB 1 tiene una diferencia significativamente mayor en comparación con el grupo de LTME ( $*p \leq 0.05$ ), y el grupo de LTME+TIB 2.5 presenta una concentración significativamente menor en comparación con los grupos de Lam ( $\#p \leq 0.05$ ) y LTME+TIB 1 ( $**p \leq 0.05$ ). A los 14 días los grupos de LTME, LTME+TIB 1 y LTME+TIB 2.5 ( $\#p \leq 0.05$ ) presentan una concentración significativamente menor de IL-10 en comparación con el grupo de Lam. IL-10: interleucina 10; TIB: tibolona.

## 6.2. Efecto de la Tibolona en la Recuperación Motora Después de una Lesión Traumática de Médula Espinal

Para estudiar el efecto de la TIB en la recuperación de funcionalidad motriz post-LTME se usaron tres grupos de estudio; laminectomía (Lam), un grupo con lesión traumática de médula espinal sin tratamiento (LTME) y un grupo con LTME y tratamiento de TIB a dosis de 1 mg/Kg de peso (LTME+TIB 1). Cada grupo recibió su cuidado correspondiente descrito en la tabla 13. Cada semana se evaluó su desempeño motriz usando la escala de BBB, cuyos resultados se muestran en la Figura 19.



**Figura 19.** Efecto de la tibolona en la recuperación motora después de una lesión traumática de médula espinal. Se muestra el promedio de los valores de la escala Basso, Beattie y Bresnahan (BBB)  $\pm$  el SEM para cada grupo de estudio a lo largo del tiempo estudiado (24 horas a 8 semanas). La línea punteada muestra el punto donde se dejó de administrar tibolona (TIB). Los resultados para el grupo laminectomía (Lam) se muestran con círculos blancos, los resultados del grupo de lesión traumática de médula espinal (LTME) sin tratamiento se muestran con círculos negros y los resultados del grupo con LTME y tratamiento de TIB a dosis de 1 mg/Kg (LTME+TIB 1) se muestran con cuadrados blancos. Se realizó una ANOVA de medidas repetidas seguido de una prueba post-hoc de Bonferroni. A lo largo del tiempo, el grupo de Lam mostró una diferencia significativa en comparación a los grupos de LTME y LTME+TIB 1 ( $p < 0.05$ ).

Al día después de la LTME, el grupo con laminectomía obtuvo un promedio de  $13.708 \pm 6.00$  en la escala de BBB, ya que los animales de este grupo dieron pasos plantares consistentes con soporte de peso, presentaron coordinación de las extremidades posteriores y anteriores de forma consistente y la posición predominante de la pata durante la locomoción se giraba (interna o externamente) durante el contacto inicial con la superficie, así como justo antes de que se levantara al final de la postura, o dieron pasos plantares frecuentes, con coordinación de las extremidades posteriores con las anteriores de forma consistente y dieron pasos dorsales ocasionales. Los grupos de LTME y LTME+TIB 1, mostraron un resultado en la escala de BBB de 0, lo que significa que los animales de estos grupos presentaban paraplejia total al día siguiente al día después de la LTME.

A la semana post-LTME, el grupo de Lam obtuvo un promedio de  $19.708 \pm 1.336$  en la escala de BBB, dando pasos plantares siempre o consistentemente, coordinación de las extremidades posteriores con las anteriores siempre o consistentemente, durante la caminata despejaban el pulgar siempre o de manera consistente durante el avance hacia adelante de la extremidad. La posición predominante de la pata era paralela al inicio del contacto y al levantarse, y la cola estaba abajo parte o todo el tiempo, o arriba de manera consistente y el tronco se mostraba estable. Mientras tanto el grupo de LTME obtuvo un promedio de  $2.291 \pm 1.667$  en la escala de BBB y el grupo de LTME+TIB 1 obtuvo un promedio de  $2.076 \pm 1.592$ , mostrando ambos grupos movimiento extenso en una articulación o extenso movimiento en una articulación y ligero movimiento en otra articulación.

En la segunda semana post-LTME, el grupo de Lam obtuvo un promedio en la escala BBB de  $20.208 \pm 1.288$  por lo que los animales mostraban pasos plantares, coordinación durante la caminata y despeje del pulgar consistentemente, la posición predominante de la pata era paralela al inicio del contacto y al levantarse. La cola se encontraba arriba de manera consistente y el tronco estaba inestable. Por su parte los animales en el grupo de LTME obtuvieron un promedio de  $6.812 \pm 3.503$ , mostrando extenso movimiento de dos articulaciones y ligero movimiento de una tercera, y los

animales del grupo de LTME+TIB 1 obtuvieron un promedio de  $9.730 \pm 3.609$ , lo que significa que colocaban la planta de la pata sobre el piso y tenían soporte de peso sin moverse de posición, o daban pasos dorsales con soporte de peso ocasional, frecuente o consistentemente pero sin dar pasos plantares.

A partir de la tercera semana, los animales en el grupo Lam mostraron un promedio en la escala BBB superior a 20, por lo que desde este periodo de tiempo hasta el término del estudio a las 8 semanas post-LTME, este grupo presentó una marcha normal. En tanto que el grupo de LTME obtuvo un promedio de  $8.146 \pm 3.216$ , lo que significa que los animales se arrastraban sin soporte de peso, o colocaban la planta de la pata sobre el piso pero sin soporte de peso. El grupo de LTME+TIB 1 obtuvo un promedio de  $10.500 \pm 3.43$ , por lo que las ratas eran capaces de dar pasos plantares con soporte de peso ocasional, pero sin coordinación de las extremidades posteriores con las anteriores.

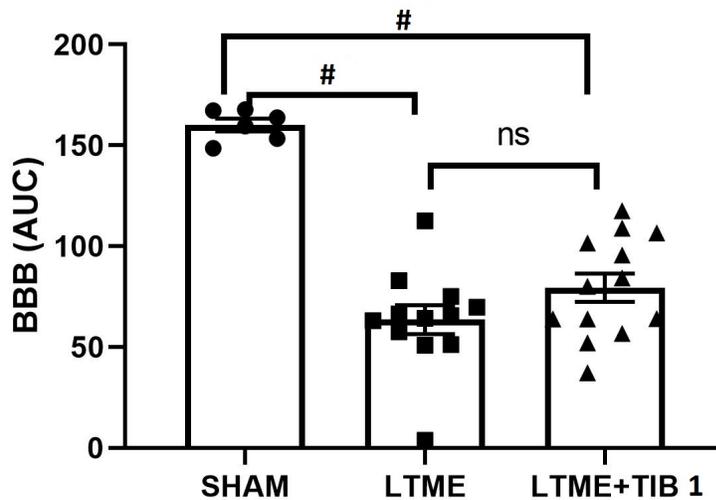
En la cuarta semana el grupo de LTME obtuvo un promedio de  $8.958 \pm 3.462$ , lo que significa que los animales colocaban la planta de la pata con soporte de peso sin moverse de posición, o podían dar pasos dorsales con soporte de peso ocasional, frecuente o consistente pero sin dar pasos plantares. El grupo de LTME+TIB 1 obtuvo un promedio de  $11.942 \pm 3.866$ , por lo que las ratas presentaban pasos plantares con soporte de peso frecuente o consistente y con coordinación de las extremidades posteriores con las anteriores ocasionalmente.

En la quinta semana post-LTME, el grupo de LTME presentó un promedio en la escala BBB de  $9.958 \pm 3.598$ , presentando pasos plantares con soporte de peso ocasional, sin coordinación de las extremidades posteriores con las anteriores, y el grupo de LTME+TIB 1 obtuvo un promedio de  $11.942 \pm 3.866$ , presentando pasos plantares con soporte de peso frecuente o consistente y coordinación de las extremidades posteriores con las anteriores ocasionalmente.

En la sexta semana post-LTME, el grupo de LTME obtuvo un promedio en la escala BBB de 11.041, presentando pasos plantares con soporte de peso frecuente a consistente sin coordinación de las extremidades posteriores con las anteriores, y el grupo de LTME+TIB 1 obtuvo un promedio de  $13.192 \pm 4.039$ , presentando pasos plantares con soporte de peso frecuente a consistente con coordinación de las extremidades posteriores con las anteriores de forma frecuente.

En la séptima semana post-LTME, el grupo de LTME obtuvo un promedio en la escala BBB de  $10.500 \pm 4.112$ , presentando pasos plantares con soporte de peso ocasionales, frecuentes a consistentes, con o sin coordinación de las extremidades posteriores con las anteriores. Por su lado el grupo de LTME+TIB 1 obtuvo un promedio de  $13.192 \pm 4.188$ , mostrándose con una locomoción igual a la semana 6 post-LTME.

En la octava semana post-LTME, el grupo de LTME obtuvo un promedio final en la escala BBB de  $11.104 \pm 4.221$ , mostrando pasos plantares con soporte de peso frecuente a consistente, pero sin coordinación de las extremidades posteriores con las anteriores, mientras que el grupo de LTME+TIB 1 obtuvo un promedio final de  $13.588 \pm 4.282$ , presentando pasos plantares consistentes con soporte de peso, coordinación de las extremidades posteriores con las anteriores de forma consistente y la posición predominante de la pata durante la locomoción se giraba (interna o externamente) cuando hacía contacto inicial con la superficie, así como justo antes de que la levantara al final de la postura, o pasos plantares frecuentes, coordinación de las extremidades posteriores con las anteriores de forma consistente y pasos dorsales ocasionales.



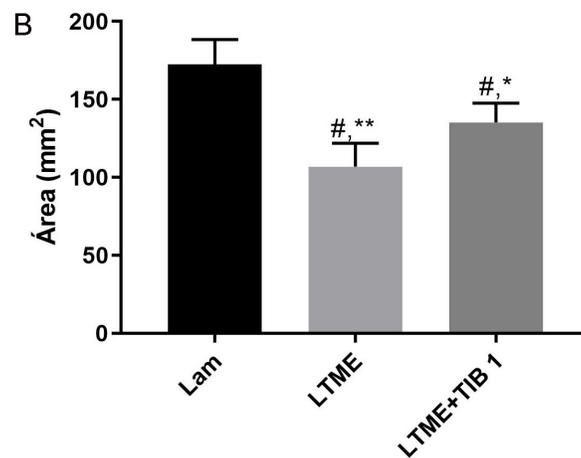
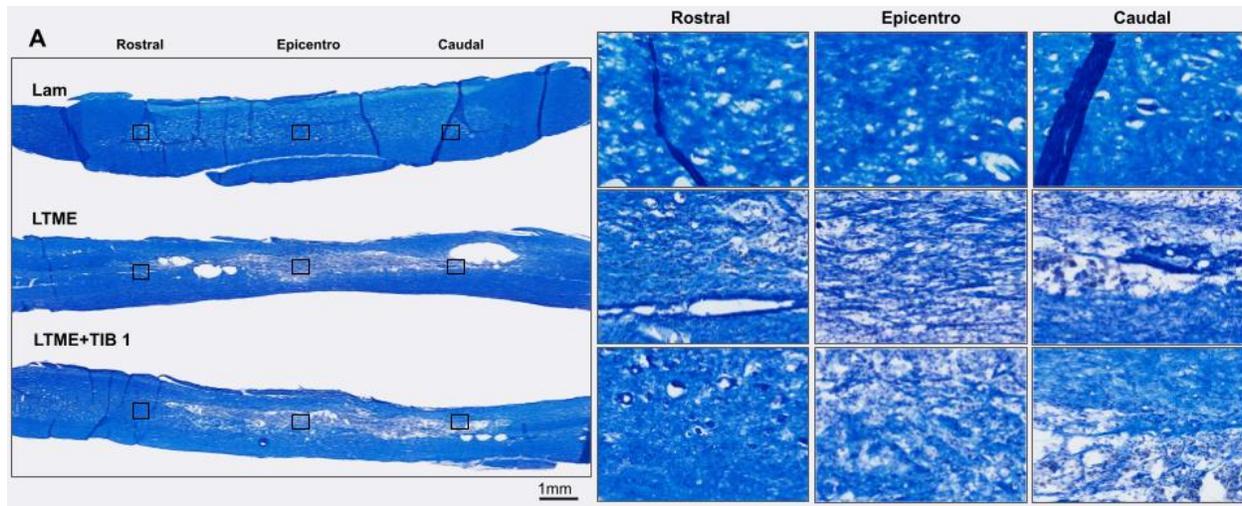
**Figura 20.** Área bajo la curva de los tres grupos de estudio mostrando el efecto de la tibolona en la recuperación motora después de la lesión traumática de médula espinal. Promedio del área bajo la curva que muestran los sujetos para los 3 grupos de estudio; laminectomía (Lam), LTME (lesión traumática de médula espinal) y LTME con tratamiento de tibolona (TIB) a dosis de 1 mg/Kg (LTME+TIB 1)  $\pm$  SEM. Se realizó una ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. Los grupos de LTME y LTME+TIB 1 presentaron una diferencia significativamente menor en comparación con el grupo de Lam (# $p < 0.01$ ).

La gráfica del área bajo la curva de los grupos de estudio (Figura 20), muestra que independientemente de la recuperación espontánea que ocurre con el tiempo, los resultados que obtuvieron en la escala BBB los animales del grupo de LTME y los de LTME+TIB 1 no son diferentes. Los resultados no presentan homogeneidad de varianzas y violan el criterio de la esfericidad. A pesar de que se utilice el método de corrección de Greenhouse, puede haber diferencias que no son identificadas. Con la AUC se confirma que hay una ligera diferencia pero esta es únicamente una tendencia. Prolongar el tiempo de estudio podría revelar una diferencia significativa.

### 6.3. Efecto de la Tibolona en el Tejido Preservado Después de una Lesión Traumática de Médula Espinal

Para estudiar el efecto de la TIB en la preservación del tejido medular después de una LTME se usaron tres grupos de estudio; Lam, en el cual los animales eran sometidos a una laminectomía pero no se realizó la LTME, LTME sin tratamiento (LTME) y un grupo con LTME y tratamiento de TIB a dosis de 1mg/Kg de peso (LTME+TIB 1). Cada grupo recibió los cuidados descritos en la tabla 13. Posteriormente, los animales fueron sacrificados mediante perfusión intracardiaca y se extrajo la médula para realizar cortes histológicos y analizar el efecto de la TIB en el área de tejido preservado.

En la figura 21 en la sección A se observan imágenes representativas de una médula espinal de cada grupo de estudio; Lam, LTME y LTME+TIB 1. En el grupo de Lam, el tejido presenta continuidad e integridad de sus componentes. En la médula espinal representativa del grupo de LTME se observa en la zona rostral el canal endimario y daño al tejido medular que se expande del epicentro a la zona caudal. Así mismo se observa daño en el tejido medular generado por la LTME en el grupo que recibió tratamiento de TIB pero el grupo de LTME+TIB 1 tiene un área de tejido preservado significativamente mayor en comparación con el grupo de LTME. Los resultados sugieren que el tratamiento con TIB tuvo un efecto positivo en el área de tejido preservado en la médula espinal lesionada.



**Figura 21.** Efecto de la tibolona en el tejido preservado después de una lesión traumática de médula espinal. A) Imágenes representativas de tinciones de cortes longitudinales de la médula espinal teñidos con Luxol Fast Blue (2X) de cada grupo de estudio. De arriba para abajo se muestran las imágenes para el grupo laminectomía (Lam), lesión traumática de médula espinal (LTME) y LTME con tratamiento de TIB 1 mg/Kg (LTME+TIB 1). De lado izquierdo se observa una imagen panorámica de la médula espinal a 20X y de lado derecho se muestran secciones representativas de la zona rostral, caudal y del epicentro de la lesión a 40X. Se observa el grado de destrucción del tejido en la médula espinal de animales representativos de cada grupo. B) Se muestra el promedio del área (mm<sup>2</sup>)  $\pm$  SEM del tejido preservado en los grupos de estudio (Lam, LTME y LTME+TIB 1). Se realizó una ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. El grupo de LTME tiene un área significativamente menor en comparación con el grupo de Lam ( $\#p \leq 0.001$ ) y el grupo de LTME+TIB 1 ( $**p \leq 0.05$ ), y el grupo de LTME+TIB 1 presenta una concentración significativamente menor en comparación con el grupo de Lam ( $\#p \leq 0.05$ ) y una mayor en comparación con el grupo de LTME ( $*p \leq 0.05$ ). TIB: tibolona.

## 7. Discusión

A pesar de ser prometedor, el uso terapéutico del E2, la progesterona y la testosterona en el contexto de LTME, se muestra limitado por sus efectos secundarios indeseables (Blank et al., 2008; Yarrow et al., 2014; Cox et al., 2015; Ray et al., 2016; Trabert et al., 2020) o sus resultados controversiales (Sawada et al., 1998; Myers et al., 2003; Fee., et al 2007; Byers et al., 2012), por lo que se ha propuesto el uso de esteroides sintéticos, que ejerzan los efectos neuroprotectores de las hormonas sexuales, pero sin los efectos negativos asociados a su uso como son el cáncer, la infertilidad o la hiperplasia prostática (Yarrow et al., 2014; Cox et al., 2015).

El esteroide sintético TIB, al ejercer acciones estrogénicas, androgénicas y progestagénicas, puede ejercer efectos neuroprotectores (Pinto et al., 2017). La administración de  $17\beta$ -estradiol, testosterona y progesterona (Ritz & Hausmann, 2008; Yarrow et al., 2014; Farahabadi et al., 2016), de forma similar a la administración de TIB, mejoran la recuperación de la función locomotora más rápido en comparación con el grupo control. Tanto el tratamiento de E2 y progesterona (Ritz & Hausmann, 2008; Thomas et al., 1999), como el de TIB, provocan una disminución significativa en el área de lesión, aumentando así la cantidad de tejido preservado.

El tratamiento con E2, así como con TIB, promueven un ambiente inflamatorio al aumentar a la  $IL-1\alpha$  y a la  $IL-1\beta$  en la fase aguda temprana (Ritz & Hausmann, 2008). De manera parecida a lo observado por Farahabadi et al en el 2016, al administrar progesterona en un modelo de LTME en rata, el tratamiento con TIB a dosis de 2.5 mg/Kg disminuyó la expresión de  $TNF-\alpha$  a los 3 días después de la lesión y a pesar de no haber datos del efecto de la testosterona en la expresión de citocinas en la LTME, al ser supresor de la inflamación (Mohamad et al., 2018) podría ejercer efectos similares al de la TIB en la expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias en la LTME en ratas.

El efecto de la TIB sobre la recuperación motora y en la cantidad de tejido preservado, de forma similar a lo observado con el tratamiento con E2 en la LTME (Sribnick et al., 2010) ya que observa que la TIB a dosis de 1 mg/Kg mejora ambas condiciones en comparación con el grupo de LTME. Por su parte, el efecto de la TIB en

la regulación de citocinas pro y anti-inflamatorias post-LTME, muestran cambios conforme al tiempo. En la figura 22 se resumen los resultados y tendencias observadas del efecto de la TIB en la regulación de citocinas pro y antiinflamatoria, entre el grupo control de LTME y el grupo que recibió tratamiento de TIB (1 mg/Kg) y las posibles vías implicadas.



**Figura 22.** Resultados y tendencias observadas del efecto de la tibolona en la lesión traumática de médula espinal en la regulación de citocinas pro y anti-inflamatorias, el tejido preservado y la recuperación funcional. 1) La TIB induce el aumento de IL-1 $\beta$  a los 3 días post-LTME promoviendo sus roles neuroprotectores y neuromoduladores en la neurogénesis e incrementando la fagocitosis para eliminar inhibidores del crecimiento presente en los restos celulares. A los 7 días la TIB disminuye la presencia de IL-1 previniendo una inflamación prolongada. A los 14 días la TIB (1 mg/Kg) estimula la expresión de IL-1 $\alpha$  promoviendo sus funciones no inmunológicas. 2) A las 3 horas post-LTME, la TIB (2.5 mg/Kg) disminuye la concentración del TNF- $\alpha$  previniendo muerte celular y migración de células inflamatorias. Además, a las 3 horas y 3 días post-LTME la TIB (1 mg/Kg) aumenta las concentraciones de TNF- $\alpha$ , promoviendo la muerte celular, pero a los 7 días, la TIB disminuye su expresión y la subsecuente muerte celular mediada por iNOS. 3) A las 3 horas la TIB tiende a disminuir la IL-12 previniendo neurogénesis y remielinización, así como la generación de IFN- $\gamma$ . A los 14 días, la TIB atenúa el aumento en la concentración de la IL-12 en la zona de la lesión, disminuyendo con ello la citotoxicidad de NK, NKT y CD8 $^+$ . 4) A las 3 horas la TIB (1 mg/Kg) disminuye la concentración de IFN- $\gamma$  con su subsecuente actividad de NK, apoptosis y producción de citocinas inflamatorias. A los 3 días la TIB tiende a aumentar al IFN- $\gamma$ , disminuyendo potencialmente CSPGs, inhibidores del crecimiento y aumentando fibras nerviosas y al mRNA de GDNF e IGF-I. 5) La TIB atenúa el aumento de los niveles de MIP-1 $\alpha$  que ocurre por la LTME a los 3, 7 y 14 días post-LTME, potencialmente disminuyendo la migración de células pro-inflamatorias y sus subsecuentes efectos citotóxicos. 6) La TIB disminuye la concentración de GM-CSF a las 3 horas previniendo su efecto neurogénico y antiapoptótico, pero a su vez previene la supervivencia y activación de neutrófilos. 7) A los 7 días post-LTME, la lesión perjudica la producción de IL-2, lo cual se ve atenuado con la TIB, aumentando la proliferación de células T citotóxicas, pero también favoreciendo la proliferación y maduración de oligodendrocitos, lo que implica remielinización. 8) A las 3 horas post-LTME la TIB (2.5 mg/Kg) aumenta la concentración de IL-10 en comparación al grupo de LTME, promoviendo sus efectos de inmunoprotección y neuroprotectores, y disminuyendo la inflamación y la apoptosis. A los 7 días, la LTME disminuye los niveles de IL-10, lo cual no ocurre con el tratamiento con TIB (1 mg/Kg), permitiendo que la IL-10 ejerza sus efectos anti-inflamatorios y anti-apoptóticos. TIB: tibolona; LTME; lesión traumática de médula espinal; IL-1: interleucina 1; IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta; TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa; IL-12: interleucina 12; IFN- $\gamma$ : interferón Gamma; MIP-1 $\alpha$ : proteína Inflamatoria de macrófagos 1 alfa; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; IL-2: interleucina 2; IL-10: interleucina 10; NK: células asesinas naturales; NKT: célula T asesina natural; CD: grupo de diferenciación; CSPGs: proteoglicanos de condroitín sulfato; GDNF: factor neurotrófico derivado de glía; IGF-I: factor de crecimiento tipo insulina-1; BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro. (Biorender)

Debido a la noción general que se tiene de la IL-1 (Liu & Quan, 2018), se esperaba observar un aumento en la concentración de las IL-1 $\alpha$  y  $\beta$  en el grupo con LTME en comparación con el grupo de Lam. Sin embargo, esta diferencia solo se observó a los 7 y 14 días post-LTME para la IL-1 $\alpha$  pero no para la IL-1 $\beta$ , donde en general la concentración de esta isoforma es menor en todos los periodos de tiempo estudiados al compararla con las concentraciones registradas para IL-1 $\alpha$ .

Considerando que el tratamiento de TIB mejora significativamente la recuperación funcional y el área de tejido preservado, el aumento de IL-1 $\beta$  inducido por la TIB observado a los 3 días post-LTME pudiera estar favoreciendo los efectos neurales positivos no inmunológicos de la IL-1 en dicho periodo de tiempo ya que se ha demostrado que la IL-1 también tiene efectos neuromoduladores en la neurogénesis (Kaneko et al., 2006; Liu & Quan, 2018). En este sentido, De Kosky et al observaron que el administrar un antagonista para el receptor de IL-1 suprime la respuesta reparativa mediada por NGF en el SNC después de un trauma, ya que el aumento de

este factor está mediado positivamente por la IL-1 $\beta$  (De Kosky et al., 1996), y Sato et al, sostienen que la IL-1 participa en la activación clásica y alternativa de la macrófagos/microglía después de una LTME (Sato et al., 2012), lo que significa que la presencia de macrófagos/microglía M2, que pueden inhibir las respuestas inmunes dañinas, así como promover la reparación del daño (Shang et al., 2017), también está influenciada positivamente por la presencia de IL-1.

A los 7 días post-LTME, la concentración de IL-1 $\alpha$  en los 4 grupos de estudio disminuyó considerablemente en comparación a los 3 días, lo que significa que la acción de esta citocina se limita al periodo agudo de la lesión secundaria de la LTME. Para ambas isoformas de la IL-1, a los 7 días post-LTME se observa una concentración menor en los grupos con tratamiento de TIB en comparación con el grupo de LTME, siendo significativo para ambas isoformas de IL-1 a ambas dosis. De manera que la disminución en IL-1 generada por el tratamiento de TIB en la fase sub aguda y no antes, podría estar generando una ventana de tiempo en donde se permite a la IL-1 ejercer acciones positivas, para luego limitar su actividad pro-inflamatoria.

A los 14 días post-LTME, el grupo que recibió tratamiento de TIB a dosis de 1 mg/Kg muestra una concentración mayor de la IL-1 $\alpha$  comparado con el grupo de LTME, quizá promoviendo nuevamente las acciones no inmunológicas de esta citocina en un punto más tardío. Para la IL-1 $\beta$ , a los 14 días post-LTME, el tratamiento de TIB no genera diferencias en su concentración.

Respecto al TNF- $\alpha$ , el grupo con tratamiento de TIB a dosis de 1 mg/Kg presenta a las 3 horas la mayor concentración de TNF- $\alpha$  en comparación con los demás grupos de estudio, alcanzando el máximo nivel a los 3 días. A los 7 días ambos grupos que recibieron el tratamiento de TIB a dosis de 1 y 2.5 mg/kg, mostraron una menor concentración de TNF- $\alpha$  significativa en comparación con el grupo control con LTME. A los 14 días el tratamiento de TIB no ejerció ningún efecto al comparar los resultados entre los grupos de estudio.

Estos resultados sugieren que el tratamiento de TIB a 1 mg/Kg potencia las acciones biológicas mediadas por el TNF- $\alpha$  en la LTME a las 3 horas y 3 días después de la lesión, sin embargo, a los 7 días previene la presencia de TNF- $\alpha$  que se observa

en el grupo de LTME y Lam. iNOS puede ser inducida por el TNF- $\alpha$ , el cual se expresa rápidamente en neuronas y células gliales posterior a una lesión, siendo posible que después de la LTME, el TNF- $\alpha$  medie la muerte celular vía apoptótica, en parte, mediante el incremento de NO a través de la inducción previa de NOS (Yune et al., 2003). De manera que, en el periodo subagudo de la LTME, la TIB administrada a razón de 1 mg/Kg, pudiera disminuir la muerte celular vía apoptótica y la neurotoxicidad mediada por la presencia prolongada de NO.

El tratamiento con TIB (2.5 mg/Kg) disminuye la concentración de TNF- $\alpha$  significativamente a las 3 horas después de la LTME, sugiriendo que a esta dosis la TIB tiene el potencial de prevenir el aumento de TNF- $\alpha$  observado en los demás grupos de estudio con LTME en este periodo de tiempo.

En cuanto al efecto de la TIB en la recuperación de la función motora y al área de tejido preservado, puede deberse a la regulación que ejerce la TIB en la expresión del TNF- $\alpha$  y a sus mecanismos biológicos, ya que el TNF- $\alpha$ , cuyo aumento es característico en el epicentro de la lesión después de una LTME (Yune et al., 2003), exacerba la muerte celular, el edema, la permeabilidad microvascular y el tamaño de la lesión (Sharma et al., 2003; Ferguson et al., 2008).

La IL-12 es una citocina que induce la proliferación y formación de colonias de células NK, NKT y células T (Trinchieri, 2003). La tendencia a disminuir la concentración de IL-12 en comparación con el grupo de LTME provocada por el tratamiento con TIB a ambas dosis estudiadas a las 3 horas y a los 3 días post-LTME pudiera disminuir la citotoxicidad ejercida por dichas células, viéndose esto reflejado en los resultados obtenidos que sugieren una tendencia a una recuperación funcional más rápida y el aumento del tejido preservado provocado por la TIB en el periodo agudo de la LTME. Además, dado que la IL-12 promueve la producción de IFN- $\gamma$  (Trinchieri., 2003), una disminución en concentración de IL-12 concuerda con la disminución que también se observa en la concentración de IFN- $\gamma$  en estos periodos de tiempo.

Según las observaciones realizadas por Yaguchi et al en el 2008, en un modelo de lesión de médula espinal, las DCs secretan IL-12 que a su vez promueve la recuperación funcional aumentando el número de macrófagos/microglía y DCs

activadas, así como la expresión de BDNF y la subsecuente activación de la neurogénesis y la remielinización (Ren et al., 2018), sin embargo a los 7 días no se observa que el tratamiento con TIB tenga un efecto en la concentración de IL-12 en este modelo de LTME.

A los 14 días se presentó un segundo aumento significativo, en el grupo control con LTME en comparación con los grupos con tratamiento de TIB. Este segundo pico de IL-12 en la LTME observada a los 14 días, concuerda con las observaciones reportadas en otros estudios (Yu & Fehlings, 2011), proponiéndose una segunda respuesta inflamatoria mediada por la IL-12, la cuál se redujo significativamente con el tratamiento de TIB.

Considerando que las características que promueven recuperación funcional observadas por Yaguchi et al (2008) se limitan al periodo agudo de la LTME, es probable que en la fase intermedia de la lesión secundaria, las actividades pro-inflamatorias de la IL-12 que incluyen proliferación y potenciamiento de citotoxicidad de células NK (asesinas naturales), NKT (célula T asesina natural) y células T (Trinchieri, 2003), ejerzan efecto. Debido a esto, se sugiere una relación entre la disminución en la concentración de IL-12 provocada por el tratamiento con TIB, en el periodo intermedio de la lesión secundaria de la LTME y la mejoría en el proceso de recuperación funcional y en el área de tejido preservado en los grupos que recibieron tratamiento con TIB.

En el presente estudio, los resultados para IFN- $\gamma$  muestran que a las 3 horas los grupos de Lam, LTME y LTME+TIB 2.5 muestran una concentración similar de IFN- $\gamma$ , mientras que el grupo de LTME+TIB 1 presenta una concentración menor, siendo esta diferencia significativa en comparación con el grupo de LTME. A los 3 días no hay diferencias significativas. A los 7 días la concentración de IFN- $\gamma$  se muestra bastante disminuida a como se observa en los periodos de tiempo más cortos y los grupos que recibieron tratamiento de TIB presentaron diferencias significativas en comparación al grupo Lam. A los 14 días la concentración de IFN- $\gamma$  en los 3 grupos de estudio con LTME con o sin tratamiento de TIB se muestra muy similar y presentan una diferencia significativa en comparación al grupo Lam.

Considerando que Roselli et al reportaron una mejora en la recuperación motora después de la LTME en quimeras incapaces de secretar IFN- $\gamma$ , en quienes la pérdida de IFN- $\gamma$  resultó en niveles de citocinas inflamatorias en la médula espinal y una polarización de macrófagos inclinada al fenotipo M1 pro-inflamatorio reducida (Roselli et al., 2018), y que en ratones TCR  $\delta^{-/-}$ , en los cuales no hay generación de células  $\gamma\delta$ , fuentes importantes de IFN- $\gamma$ , con LTME, hubo un grado mayor de recuperación funcional (Sun et al., 2018), la disminución de IFN- $\gamma$  que ocurre a las 3 horas post-LTME por el tratamiento con TB (1 mg/Kg) puede ser una de las razones por las cuales se observan mejores resultados en cuanto al tejido preservado y una tendencia a una recuperación funcional más rápida en animales que recibieron tratamiento con TIB a la dosis mencionada, limitando en este periodo de tiempo efectos detrimentales ocasionados por el IFN- $\gamma$ .

A los 3 días post-LTME, a pesar de no haber una significancia estadística, se observa una tendencia a aumentar la concentración del IFN- $\gamma$  en los animales del grupo de LTME+TIB 1 en comparación al grupo de LTME y Lam. El resultado se muestra interesante al existir observaciones contrastantes con aquellas hechas por Sun y Roselli et al, ya que la administración intraperitoneal de IFN- $\gamma$  en un modelo de LTME en ratones facilitó significativamente la recuperación funcional al disminuir los niveles de inhibidores de crecimiento axonal y aumentó los niveles de mRNA de GDNF y del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-I) (Fujiyoshi et al., 2010). Este contraste en observaciones destaca la dualidad y complejidad que presenta esta citocina en sus funciones durante una LTME.

Los niveles de MIP-1 $\alpha$  en el grupo de LTME no presentaron diferencias significativas en comparación con los grupos de LTME+TIB, sin embargo, a los 3, 7 y 14 días post-LTME, el tratamiento con TIB a ambas dosis estudiadas previene el aumento significativo en la concentración de MIP-1 $\alpha$  ocasionada por la LTME, lo cual representa una disminución en la migración de células pro-inflamatorias, sobre todo de neutrófilos y de células T CD8 $^{+}$ , junto con su subsecuente liberación de citocinas Th1 y/o efectos citotóxicos (Bhavsar et al., 2015).

Los grupos que recibieron tratamiento de TIB a dosis de 1 y 2.5 mg/Kg muestran una concentración significativamente menor de GM-CSF en comparación con el grupo de LTME a las 3 horas post-LTME. A los 3, 7 y 14 días después de la lesión la administración de TIB no parece ejercer algún efecto. A los 7 y 14 días los niveles de GM-CSF son considerablemente menores que en los tiempos cortos estudiados.

Otros investigadores observaron que la administración temprana de GM-CSF tiene efectos neuroprotectores, minimiza el crecimiento anormal de nervios sensoriales, incrementa la expresión de BDNF por macrófagos, inhibe la formación de la cicatriz glial post-LTME, induce la regeneración axonal, mejora la recuperación de sensación al frío y dactilar, y mejora la recuperación funcional después de una LTME (Ren et al., 2018; Kim et al., 2013; Chung et al., 2014). Sin embargo, a pesar de que la disminución del GM-CSF por efecto de la TIB puede representar la prevención de sus efectos anti-apoptóticos y neurogénicos, se debe considerar que esta citocina también participa en la supervivencia y activación de neutrófilos (Egea et al., 2010). La disminución en actividad por parte de esta célula puede representar un efecto anti-inflamatorio en este periodo de tiempo, disminuyendo subsecuentemente la lesión secundaria de la LTME.

A las 3 horas, 3 y 14 días post-LTME, el tratamiento con TIB no ejerció efecto alguno en la concentración de IL-2, sin embargo, los resultados muestran que a los 7 días la LTME disminuye la concentración de IL-2 en comparación con el grupo de Lam y esta disminución significativa se previene con el tratamiento de TIB a ambas dosis estudiadas, por lo que dicho tratamiento pudiera estar mejorando una producción de IL-2 comprometida por la LTME en dicho periodo de tiempo, aumentando como consecuencia la proliferación de células T que a su vez influyen la proliferación de células citotóxicas (Hellenbrand et al., 2021) las cuales pueden producir daño en la sustancia blanca y están asociadas con la pérdida de tejido nervioso y la disfunción motora post-LTME (Satzler et al., 2015), pero también favorecen la proliferación y maduración de oligodendrocitos, lo que implica remielinización (Minami et al., 1993).

La señalización de IL-4 promueve neuroprotección, regeneración axonal y recuperación funcional post-LTME y su falta de señalización en este mismo contexto

está asociado a una recuperación deficiente (Lima et al., 2017). Por su parte la IL-13 también es neuroprotectora (Mori et al., 2016, Miao et al., 2020), disminuye el área de lesión y el área desmielinizada y mejora recuperación funcional (Dooley et al., 2016B).

Dado que la TIB no ejerció efectos significativos para estas citocinas, los resultados sugieren que el mecanismo neuroprotector ejercido por la TIB que se reflejó como una tendencia a una recuperación funcional más rápida y una mejoría en el área de tejido preservado con el tratamiento de TIB (1 mg/Kg), no están mediados por la IL-4 ni la IL-13. Sin embargo, es interesante notar que la ausencia de un efecto en la concentración de la IL-4 y la IL-13 por el tratamiento con TIB empata con el hecho que ambas citocinas comparten un receptor común heterodimérico (Mori et al., 2016).

En cuanto a la IL-10, se observó que la LTME reduce su concentración favoreciendo un ambiente inflamatorio, siendo esta disminución en la concentración de IL-10 en el grupo de LTME en comparación con el grupo Lam significativa a los 7 y 14 días post-LTME, destacando la importancia de esta citocina. A las 3 horas post-LTME, la concentración de IL-10 se incrementó con el tratamiento de TIB a 2.5 mg/Kg en comparación con el grupo de LTME, al igual que a dosis de 1 mg/Kg a los 7 días post-LTME.

El comportamiento que se observa con el tratamiento de TIB (1 mg/Kg) sugiere que a esta dosis la regulación negativa de la inflamación no ocurre hasta la fase subaguda, permitiendo que la inflamación se presente en las fases inmediata y aguda temprana, ejerciendo con ello acciones necesarias para la recuperación, y permitiendo que la IL-10 presente actividad inmunosupresora y neuroprotectora en la LTME (Thompson et al., 2103) en fases subsecuentes previniendo daño adicional. Esta se muestra como otra posible explicación a los resultados positivos observados con la administración de TIB (1 mg/Kg) en el área de tejido preservado y la recuperación funcional post-LTME.

## 8. Conclusión

El tratamiento con tibolona (1 mg/Kg) en ratas Sprague Dawley machos con una lesión traumática de médula espinal generó una tendencia a tener una recuperación de la función motora más rápida e incrementó de forma significativa el área de tejido preservado en la zona de la lesión.

El incremento en la cantidad de tejido preservado podría estar asociado a la regulación del proceso de la neuroinflamación por el tratamiento con tibolona (1 mg/Kg) post-LTME, sin embargo, los resultados descritos revelan la complejidad del efecto de la tibolona en la regulación de la inflamación mediada por citocinas pro y anti-inflamatorias durante la lesión traumática de médula espinal, así como la dualidad del comportamiento de las mismas.

## 9. Perspectivas

Los resultados muestran que la tibolona incrementó el tejido preservado en la médula espinal de ratas Sprague Dawley macho después de una lesión traumática de médula espinal. Sin embargo, dicho tratamiento presentó únicamente una tendencia a mejorar la recuperación motora en comparación a las ratas no tratadas, al no haber presentado significancia. Debido a esto, se propone aumentar el n de los grupos y prolongar el tiempo de estudio hasta que las funciones motoras se estabilicen, lo que podría revelar una diferencia significativa en la recuperación motora de animales con LTME que recibieron el tratamiento con TIB y los animales que no.

Por otro lado, se ha descrito que las citocinas pueden modular algunos mecanismos necesarios para que ocurra la recuperación funcional después de una LTME y en esta tesis se observó que el tratamiento de tibolona a dosis de 1 mg/Kg regula la concentración de citocinas pro y anti-inflamatorias. Por lo tanto, considerando los efectos significativos, así como las tendencias ejercidas por el tratamiento con TIB post-LTME, se propone verificar experimentalmente los siguientes mecanismos:

1. Mecanismos propuestos que ejerce el tratamiento de TIB que involucran a la IL-1:
  - a. Neurogénesis y neuroprotección como consecuencia de la generación de NGF, BDNF y neurotrofina-3, cuyo aumento ocurre por la acción de la IL-1 $\beta$  proveniente de microglía/macrófagos y/o neutrófilos, la cual aumentó por efecto de la TIB a los 3 días post-LTME.
  - b. Incremento en fagocitosis y reparación de tejido por aumento de la activación alternativa de macrófagos por acción de la IL-1 $\beta$  proveniente de microglía/macrófagos a los 3 días post-LTME.
  - c. Prevención de inflamación prolongada a los 7 días post-LTME por una disminución de ambas isoformas de IL-1 proveniente de microglía/macrófagos y/o neutrófilos.
  - d. Neurogénesis y neuroprotección por aumento en la expresión de la IL-1 $\alpha$  por parte de la microglía/macrófagos a los 14 días post-LTME,

promoviendo funciones no inmunológicas de la IL-1 descritas anteriormente.

2. Mecanismo propuesto que ejerce el tratamiento de TIB que involucra al TNF- $\alpha$ :
  - a. Disminución en la concentración del TNF- $\alpha$  proveniente de células gliales a los 7 días post-LTME, atenuando subsecuentemente muerte celular mediada por iNOS y la migración de células inflamatorias.
3. Mecanismo propuesto que ejerce el tratamiento de TIB que involucra a la IL-12:
  - a. Disminución de la expresión de la IL-12 por parte de DCs, microglía, monocitos/macrófagos y/o neutrófilos a los 14 días post-LTME, reduciendo subsecuentemente la citotoxicidad de células NK, NKT y CD8<sup>+</sup>.
4. Mecanismos propuestos que ejerce el tratamiento de TIB que involucran al IFN- $\gamma$ :
  - a. Disminución de la expresión de IFN- $\gamma$  de células T, células NK y/o DCs a las 3 horas post-LTME, reduciendo el aumento de citocinas inflamatorias, la actividad de células NK y subsecuente apoptosis.
  - b. Aumento en la concentración de IFN- $\gamma$  a los 3 días post-LTME, disminuyendo inhibidores de crecimiento y aumentando GDNF, IGF-I y fibras nerviosas mielinizadas.
5. Mecanismo propuesto que ejerce el tratamiento de TIB que involucra a la MIP-1 $\alpha$ :
  - a. Atenúa la expresión de MIP-1 $\alpha$  de macrófagos/microglía, células T, DCs, células NK y/o neutrófilos, evitando la migración de neutrófilos y células CD8<sup>+</sup> y subsecuente citotoxicidad.
6. Mecanismo propuesto que ejerce el tratamiento de TIB que involucra al GM-CSF:
  - a. Disminución en la expresión de GM-CSF de macrófagos/microglía a las 3 horas post-LTME, reduciendo consecuentemente la supervivencia y activación de neutrófilos.
7. Mecanismo propuesto que ejerce el tratamiento de TIB que involucra a la IL-2:
  - a. Atenuación de la disminución de IL-2 a los 7 días post-LTME favoreciendo

la proliferación y maduración de oligodendrocitos, así como la remielinización.

8. Mecanismo propuesto que ejerce el tratamiento de TIB que involucra a la IL-10:
  - a. Inmunoprotección, neuroprotección y atenuación de la inflamación y apoptosis por el aumento de la expresión de IL-10 por parte de células T a los 7 días post-LTME.

## 10. Referencias Bibliográficas

Ahlbom E, Prins GS, Ceccatelli S. (2001). Testosterone protects cerebellar granule cells from oxidative stress-induced cell death through a receptor mediated mechanism. *Brain Res*; 892(2):255-62. doi: 10.1016/s0006-8993(00)03155-3

Akuzawa S, Kazui T, Shi E, Yamashita K, Bashar AH & Terada H. (2008). Interleukin-1 receptor antagonist attenuates the severity of spinal cord ischemic injury in rabbits. *Journal of Vascular Surgery*. 48(3):694-700. doi: 10.1016/j.jvs.2008.04.011

Alizadeh A, Dyck SM, Abdolrezaee SK. (2019). Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Front Neurol*. 2019; 10: 282. doi: 10.3389/fneur.2019.00282

Anwar MA, Al Shehabi TS, Eid AH. (2016). Inflammogenesis of Secondary Spinal Cord Injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 10:98 doi: 10.3389/fncel.2016.00098

Attwell D, Mishra A Hall CN, O'Farrell FM & Dalkara T. (2016). What is a pericyte? *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. v.36(2). doi: 10.1177/0271678X15610340

Atzeni F & Sarzi PP. (2013). Tumor Necrosis Factor. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. 2nd Edition. Elsevier Inc. pg: 229-231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01594-1>

Ávila MR, Garcia LMGS, Cabezas R, Torrente D, Capani F, Gonzalez J, Barreto GE. (2014). Tibolone protects T98G cells from glucose deprivation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 144 Pt B:294-303. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.07.009

Bansal R & Singh R. (2018). Exploring the potential of natural and synthetic neuroprotective steroids against neurodegenerative disorders: A literature review, *Medicinal Research Reviews*. 38(4):1126-1158. doi: 10.1002/med.21458

Bao F, Dekaban GA & Weaver LC. (2005). Anti-CD11d antibody treatment reduces free radical formation and cell death in the injured spinal cord of rats. *Journal of Neurochemistry*. 94(5):1361-1373. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03280.x

Bao G, Li C, Qi L, Wang N & He B. (2016). Tetrandrine protects against oxygen-glucose-serum deprivation/reoxygenation-induced injury via PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway in rat spinal cord astrocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 84:925-930. doi: 10.1016/j.biopha.2016.10.007

Baptiste DC & Fehlings MG. (2006). Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *Journal of Neurotrauma*. 23(3-4):318-334. doi: <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.318>

Barone FC, Hillegass LM, Price WJ, White RF, Lee EV, Feuerstein GZ, Sarau HM, Clark RK & Griswold DE. (1991). Polymorphonuclear leukocyte infiltration into cerebral focal ischemic tissue: myeloperoxidase activity assay and histologic verification. *Journal of Ethnopharmacology*. 139(2):504-12. doi: 10.1016/j.jep.2011.11.040

Barton MJ, St John J, Clarke M, Wright A & Ekberg J. (2017). The Glia Response after Peripheral Nerve Injury: A Comparison between Schwann Cells and Olfactory Ensheathing Cells and Their Uses for Neural Regenerative Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(2):287. doi: 10.3390/ijms18020287

Basso DM, Beattie MS & Bresnahan JC. (1995). A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats. *J Neurotrauma*. 12(1):1-21. doi: 10.1089/neu.1995.12.1

Belenichev IF, Odnokoz OV, Pavlov SV, Belenicheva OI & Polyakova EN. (2012). The Neuroprotective Activity of Tamoxifen and Tibolone during Glutathione Depletion in vitro. *Neurochem J*. 6:202–212

Beltran V, Díaz A, Padilla E, Aguilar H, Rios C & Diaz SC. (2015). Effect of tibolone on dendritic spine density in the rat hippocampus. *Neurologia*. 30(7):401–406. doi: 10.1016/j.nrl.2014.03.002

Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F, Marcillo AE, Loor K, Green J & Dietrich WD. (1999). Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor- $\alpha$  production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 16(10):851–863. doi: 10.1089/neu.1999.16.851

Bhavsar I, Miller CS & Al-Sabbag M. (2015). Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha (MIP-1 alpha)/CCL3: As a Biomarker. *General Methods in Biomarker Research and their Applications*. 223–249. doi: 10.1007/978-94-007-7696-8\_27

Białek M, Zaremba P, Borowicz KK, Czuczwar SJ. (2004). Neuroprotective role of testosterone in the nervous system. *J Mot Behav*; 42(3):151-5. doi: 10.1080/00222891003697921.

Bickenbach J, Boldt I, Brinkhof M, Chamberlain J, Cripps R, Fitzharris M, Lee B, Marshall R, Meier S, Neukamp M, New P, Nicol R, Officer A, Perez B, von Groote P, Wing P. (2013). : A global picture of spinal cord injury. *International Perspectives on Spinal Cord Injury*. pg.15. WHO.

Blank EW, Wong PY, Lakshmanaswamy R, Guzman R & Nandi S. (2008). Both ovarian hormones estrogen and progesterone are necessary for hormonal mammary carcinogenesis in ovariectomized ACI rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(9):3527-32. doi: 10.1073/pnas.0710535105.

Boato F, Rosenberger K, Nelissen S, Geboes L, Peters EM, Nitsch R & Hendrix S. (2013). Absence of IL-1 $\beta$  positively affects neurological outcome, lesion development and axonal plasticity after spinal cord injury. *Journal of Neuroinflammation*. 10(1). doi:10.1186/1742-2094-10-6

Bruce GJ. (2018). Técnicas histopatológicas. Goodwill Trading Co., Inc. pág. 241.

Burke SJ, Lu D, Sparer TE, Karlstad MD & Collier JJ. (2014). Transcription of the gene encoding TNF- $\alpha$  is increased by IL-1 $\beta$  in rat and human islets and  $\beta$ -cell lines. *Molecular Immunology*. 62(1):54-62. doi: 10.1016/j.molimm.2014.05.019

Byers JS, Huguenard AL, Kuruppu D, Liu NK, Xu XM, Sengelaub DR. (2012). Neuroprotective Effects of Testosterone on Motoneuron and Muscle Morphology Following Spinal Cord Injury. *J Comp Neurol*.; 520(12):2683-96. doi: 10.1002/cne.23066

Campisi R & Marengo FD. (2007). Cardiovascular Effects of Tibolone: A Selective Tissue Estrogenic Activity Regulator. *Cardiovascular Drug Reviews*. 25(2):132-45. doi: 10.1111/j.1527-3466.2007.00007.x

Cheng B, Christakos S & Mattson MP. (1994). Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron*. 12(1):139–153. doi: 10.1016/0896-6273(94)90159-7

Chung J, Kim MH, Yoon YJ, Kim KH, Park SR & Choi BH. (2014). Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on glial scar formation after spinal cord injury in rats. *J Neurosurg Spine*. 21(6):966-73. doi: 10.3171/2014.8.SPINE131090

Cox A, Varma A, Barry J, Vertegel A & Banik N. (2015). Nanoparticle estrogen in rat spinal cord injury elicits rapid anti-inflammatory effects in plasma, cerebrospinal fluid, and tissue. *J Neurotrauma*. 32(18):1413-21. doi: 10.1089/neu.2014.3730

Crespo CA, Yanguas CN, Arevalo MA, Azcoitia I, Barreto GE & Garcia SLM. (2018). The Synthetic Steroid Tibolone Decreases Reactive Gliosis and Neuronal Death in the Cerebral Cortex of Female Mice After a Stab Wound Injury. *Molecular Neurobiology*. 5(11):8651-8667. doi: 10.1007/s12035-018-1008-x

Crespo CA, Garcia SLM & Angeles AM. (2020). The synthetic steroid tibolone exerts sex-specific regulation of astrocyte phagocytosis under basal conditions and after an inflammatory challenge. *J Neuroinflammation*. 2020; 17: 37. doi: 10.1186/s12974-020-1719-6

Darain H, Arsh A, Zeb A, Ilyas SM, Muhammad D & Khan MN. (2018). Epidemiology, Clinical Features and Consequences of Spinal Cord Injury in Children. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*. 28(7):532-535. Recuperado de: <https://bit.ly/2RDQ6oD>

De Kosky ST, Styren SD, O'Malley ME, Goss JR, Kochanek P, Marion D, Evans CH, PD Robbins. (1996). Interleukin-1 receptor antagonist suppresses neurotrophin response in injured rat brain. *Ann Neurol*. 39:123. doi:10.1002/ana.410390118

De la Madrid MH. (1998). REGLAMENTO de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Recuperado de: <https://bit.ly/2RfQUkF>

De Nicola AF, Labombarda F, González SL, Deniselle MCG, Guennoun R & Schumacher M. (2003). Steroid effects on glial cells: detrimental or protective for spinal cord function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1007, 317–328. doi: 10.1196/annals.1286.030

De Nicola AF, Gonzalez SL, Labombarda F, Deniselle MCG, Garay L, Guennoun R & Schumacher M. (2006). Progesterone Treatment of Spinal Cord Injury. *J Mol Neurosci*. 28(1):3-15. doi: 10.1385/jmn:28:1:3.

Del Río JP, Molina S, Lanussa OH, Segura LMG & Barreto GE. (2020). Trends Endocrinol Metab. doi: 31(10):742-759. doi: 10.1016/j.tem.2020.04.007. Epub 2020 Jun 5.

Deshmane SL, Kremlev S, Amini S & Sawaya BE. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29(6): 313–326. doi: 10.1089/jir.2008.0027

Ditunno JF, Little JW, Tessler A & Burns AS. (2004). Spinal shock revisited: a four-phase model. *Spinal Cord*. 42(7):383–395. doi:10.1038/sj.sc.3101603

Donnelly DJ & Popovich PG. (2008). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Experimental Neurology*. 209(2):378–388. doi: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.06.009>

Dooley D, Lemmens E, Ponsaerts P & Hendrix S. (2016A). Interleukin-25 is detrimental for recovery after spinal cord injury in mice. *Journal of Neuroinflammation*. 13: 101. doi: 10.1186/s12974-016-0566-y

Dubový P. (2017). Cytokines and Their Implication in Axon Degeneration and Regeneration Following Peripheral Nerve Injury. In: Cytokine Effector Functions in Tissues. Chapter 9. Pp 139–148. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804214-4.00008-7>

Dooley D, Lemmens E, Vanganswinkel T, Le Blon D, Hoornaert C, Ponsaerts P & Hendrix S. (2016B). Cell-Based Delivery of Interleukin-13 Directs Alternative Activation of Macrophages Resulting in Improved Functional Outcome after Spinal Cord Injury. *Stem Cell Reports*. 7(6):1099-1115. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.11.005

Egea L, Hirata Y, MF Kagnoff. (2010). GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 4(6):723-31. doi: 10.1586/egh.10.73.

Elufioye TO, Berida TI & Habtemariam S. (2017). Plants-Derived Neuroprotective Agents: Cutting the Cycle of Cell Death through Multiple Mechanisms. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017: 3574012. doi: 10.1155/2017/3574012

Emre Y, Hurtaud C, Nubel T, Criscuolo F, Ricquier D & Cassard DAM. (2007). Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages. *Biochemical Journal*. 402(Pt 2): 271–278. doi: 10.1042/BJ20061430

Faden AI, Wu J, Stoica BA & Loane DJ (2016) Progressive inflammation-mediated neurodegeneration after traumatic brain or spinal cord injury. *Journal of Pharmacology*. 173(4):681-691. doi: <https://doi.org/10.1111/bph.13179>

Falany JL & Falany CN (2007) Interactions of the human cytosolic sulfotransferases and steroid sulfatase in the metabolism of tibolone and raloxifene. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 107(3-5):202-10. doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.03.046

Farahabadi A, Akbari M, Pishva AA, Zendedel A, Arabkheradmand A, Beyer C, Dashti N, Hassanzadeh G. (2016). Effect of Progesterone Therapy on TNF- $\alpha$  and iNOS Gene Expression in Spinal Cord Injury Model. *Acta Med Iran*. 54(6):345-51. Recuperado de: <https://bit.ly/3djxqcg>

Fee DB, Swartz KR, Joyd KM, Roberts KN, Scheff NN & Scheff SW. (2007). Effects of progesterone on experimental spinal cord injury. *Brain Res*. 1137(1):146-52. doi: 10.1016/j.brainres.2006.12.024.

Ferguson AR, Christensen RN, Gensel JC, Miller BA, Sun F, Beattie EC, Bresnahan JC & Beattie MS. (2008). Cell death after spinal cord injury is exacerbated by rapid TNF alpha-induced trafficking of GluR2-lacking AMPARs to the plasma membrane. *Journal of Neuroscience*. 28(44):11391-400. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3708-08.2008

Fujiyoshi T, Kubo T, Chan CC, Koda M, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M. (2010). *Interferon- $\gamma$*  decreases chondroitin sulfate proteoglycan expression and enhances hindlimb function after spinal cord injury in mice. *J Neurotrauma*. 27:2283–94. doi: 10.1089/neu.2009.1144

Gadani SP, Cronk JC, Norris GT & Kipnis J. (2012). IL-4 in the Brain: A Cytokine To Remember. *J Immunol*. 189(9):4213-9. doi: 10.4049/jimmunol.1202246

Gibbs RB, Nelson D, Anthony MS & Clarkson TB. (2002). Effects of long-term hormone replacement and of tibolone on choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in the brains of ovariectomized, cynomolgus monkeys. *Neuroscience*. 113(4):907–914. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00239-7

Gilgun YS, Melamed E & Offen D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*. 40(8):959-75. doi: 10.1016/s0028-3908(01)00019-3

Griffin JD, Cannistra SA, Sullivan R, Demetri GD, Ernst TJ & Kanakura Y. (1990). The Biology of GM-CSF: Regulation of Production and Interaction with Its Receptor. *Int J Cell Cloning*; 8 Suppl 1:35-44; discussion 44-5. doi: 10.1002/stem.5530080705.

Hellenbrand DJ, Roddick RM, Mauney SM, Elder RT, Morehouse CN, Hanna AS. (2021). The Role of Interleukins after Spinal Cord Injury. *Interleukins - The Immune and Non-Immune Systems' Related Cytokines*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.92961

Hidalgo OL, Ávila M, Baez EJ, Zamudio J, Echeverria V, Garcia LM & Segura BGE. (2017). Tibolone Reduces Oxidative Damage and Inflammation in Microglia Stimulated with Palmitic Acid through Mechanisms Involving Estrogen Receptor Beta. *Mol Neurobiol*. 55(7):5462-5477. doi: 10.1007/s12035-017-0777-y

Hill CE, Beattie MS & Bresnahan JC. (2001). Degeneration and sprouting of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat. *Experimental Neurology*. 171(1):153–169. doi: <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7734>

Hill F, Kim CF, Gorrie CA, Moalem-Taylor G. (2011). Interleukin-17 Deficiency Improves Locomotor Recovery and Tissue Sparing After Spinal Cord Contusion Injury in Mice. *Neurosci Letter*. 487(3):363-7. doi: 10.1016/j.neulet.2010.10.057

Howell DC (1999). *Fundamental Statistics for the Behavioral Sciences*, 4th ed. Duxbury: Pacific Grove.

Howell, DC (2002). *Statistical Methods for Psychology*, 5th ed. Duxbury: Pacific Grove.

Huang KE & Baber R. (2010). Updated clinical recommendations for the use of tibolone in Asian women. *Climacteric*. 13(4): 317–327. doi: 10.3109/13697131003681458

Humphrey PA, Dehner LP, Pfeifer JD. (2008). *El Manual de Patología Quirúrgica de Washington: Departamento de Patología e Inmunología, Facultad de Medicina de la Universidad de Washington*, St. Louis, Missouri. Lippincott Williams y Wilkins. pág. 681

Ishii H, Tanabe S, Ueno M, Kubo T, Kayama H, Serada S, Fujimoto M, Takeda K, Naka T, Yamashita T. (2013). ifn- $\gamma$ -dependent secretion of IL-10 from Th1 cells and microglia/macrophages contributes to functional recovery after spinal cord injury. *Cell Death Dis*; 4(7):e710. doi: 10.1038/cddis.2013.234.

Iyer SS & Cheng G. (2012). Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit Rev Immunol*; 32(1):23-63. doi: 10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30

Jiang W, Li M, He F, Bian Z, He Q, Wang X, Yao W & Zhu L. (2016). Neuroprotective effect of asiatic acid against spinal cord injury in rats. *Life Sciences*. 157:45-51. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.05.004>

Jing W, Chunhua M2, Shumin W (2015) Effects of acteoside on lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury via regulation of NF- $\kappa$ B pathway in vivo and in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 285(2):128-35. doi: 10.1016/j.taap.2015.04.004

Kaneko N, Kudo K, Mabuchi T, Takemoto K, Fujimaki K, Wati H, Iguchi H, Tezuka H & Kanba S (2006) Suppression of cell proliferation by interferon-alpha through interleukin-1 production in adult rat dentate gyrus. *Neuropsychopharmacology*. 31:2619. doi:10.1038/sj.npp.1301137

Khayrullina G, Bermudez S & Byrnes KR. (2015). Inhibition of NOX2 reduces locomotor impairment, inflammation, and oxidative stress after spinal cord injury. *J Neuroinflammation*. 12: 172. doi: 10.1186/s12974-015-0391-8

Kim GM, Xu J, Song SK, Yan P, Ku G, Xu XM & Hsu CY. (2001). Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J Neuroscience* 21(17):6617–6625. Recuperado de: 10.1523/JNEUROSCI.21-17-06617.2001

Kim JY, Oh CH, Huang X, Kim MH, Yoon SH, Kim KH, Park H, Park HC, Park SR, Choi BH. (2013). Improvement in sensory function via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rat spinal cord injury models. *J Neurosurg Spine*. 2013 Jan;18(1):69-75. doi: 10.3171/2012.9.SPINE1235

Kim JW, Mahapatra C, Hong JY, Kim MS, Leong KW, Kim HW & Hyun JK. (2017). Functional Recovery of Contused Spinal Cord in Rat with the Injection of Optimal-Dosed Cerium Oxide Nanoparticles. *Advanced Science (Weinh)*. 4(10): 1700034. doi: 10.1002/adv.201700034

Kloosterboer HJ. (2004). Tissue-selectivity: the mechanism of action of tibolone. *Maturitas*. 48 Suppl 1:S30-40. doi: 10.1016/j.maturitas.2004.02.012

Kong X & Gao J. (2017). Macrophage polarization: a key event in the secondary phase of acute spinal cord injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 21(5):941-954. doi: https://doi.org/10.1111/jcmm.13034

Labombarda F, González S, Lima A, Roig P, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. (2011). Progesterone attenuates astro- and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 231(1):135-46. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.06.001

Lawrence T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 1(6): a001651. doi: 10.1101/cshperspect.a00165

Lee KM, Kang BS, Lee HL, Son SJ, Hwang SH, Kim DS, Park JS & Cho HJ. (2004). Spinal NF-kB activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *European Journal of Neuroscience*. 19(12):3375-81. doi: 10.1111/j.0953-816X.2004.03441.x

Lee S, Choi SY, Choo YY, Kim O, Tran PT, Dao CT, Min BS & Lee JH. (2015A). Sappanone A exhibits anti-inflammatory effects via modulation of Nrf2 and NF-kB. *International Immunopharmacology*. 28(1):328-36. doi: 10.1016/j.intimp.2015.06.015

Lee JY, Choi HY, Na WH, Ju BG, Yune TY. (2015B). 17 $\beta$ -estradiol inhibits MMP-9 and SUR1/TrpM4 expression and activation and thereby attenuates BSCB disruption/hemorrhage after spinal cord injury in male rats. *Endocrinology*. 156(5):1838-50. doi: 10.1210/en.2014-1832

Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW & Levison SW. (2004). Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *Journal of Neurochemistry*. 89(5):1092-100. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02420.x

Lima R, Monteiro S, Lopes JP, Barradas P, Vasconcelos NL, Gomes ED, Silva RCA, Teixeira FG, Morais M, Sousa N, Salgado AJ, Silva NA. (2017). Systemic Interleukin-4 Administration after Spinal Cord

Injury Modulates Inflammation and Promotes Neuroprotection. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2017 Dec; 10(4): 83. doi: 10.3390/ph10040083

Lin ZH, Wang SY, Chen LL, Zhuang JY, Ke QF, Xiao DR & Lin WP. (2017). Methylene Blue Mitigates Acute Neuroinflammation After Spinal Cord Injury Through Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation in Microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 11:391. doi: 10.3389/fncel.2017.00391

Liu XY, Li CY, Bu H, Li Z, Li B, Sun MM, Guo YS, Zhang L, Ren WB, Fan ZL, Wu DX & Wu SY. (2008). The neuroprotective potential of phase II enzyme inducer on motor neuron survival in traumatic spinal cord injury in vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 28(5):769-79. doi: 10.1007/s10571-007-9219-0

Liu X & Quan N. (2018). Microglia and CNS Interleukin-1: Beyond Immunological Concepts. *Front Neurol*. 2018; 9: 8. doi: 10.3389/fneur.2018.00008

Louw AM, Kolar MK, Novikova LN, Kingham PJ, Wiberg M, Kjems J & Novikov LN. (2016). Chitosan polyplex mediated delivery of miRNA-124 reduces activation of microglial cells in vitro and in rat models of spinal cord injury. *Nanomedicine*. 12(3):643-653. doi: 10.1016/j.nano.2015.10.011

Ludwig PE, Patil AA, Chamczuk AJ & Agrawal DK. (2017). Hormonal therapy in traumatic spinal cord injury. *American Journal of Translational Research*. 9(9):3881–3895. Recuperado de: <https://bit.ly/2RenVNW>

Luo YP, Jiang L, Kang K, Fei DS, Meng XL, Nan CC, Pan SH, Zhao MR & Zhao MY. (2014). Hemin inhibits NLRP3 inflammasome activation in sepsis-induced acute lung injury, involving heme oxygenase-1. *International Immunopharmacology*. 20(1):24-32. doi: 10.1016/j.intimp.2014.02.017

Malerich P & Elston DM. (2006). Introduction to TNF/pathophysiology of TNF. In: Weinberg, J.M., Buchholz, R. (eds) *TNF-alpha Inhibitors. Milestones in Drug Therapy*. Birkhäuser Basel. [https://doi.org/10.1007/3-7643-7438-1\\_1](https://doi.org/10.1007/3-7643-7438-1_1)

Miao W, Zhao Y, Huang Y, Chen D, Luo C, Su W & Gao Y. IL-13 Ameliorates Neuroinflammation and Promotes Functional Recovery after Traumatic Brain Injury. *Immunol*; 204(6):1486-1498. doi: 10.4049/jimmunol.1900909

Minami Y, Kana T, Miyazaki T & Taniguchi T. (1993). THE IL-2 RECEPTOR COMPLEX: Its Structure, Function, and Target Genes. *Annu. Rev. Immunol.* 11:245-67. doi: 10.1146/annurev.iy.11.040193.001333

Mohamad NV, Wong SK, Hasan WNW, Jolly JJ, Farhana MFN, Nirwana SI, Chin KY. (2018). The relationship between circulating testosterone and inflammatory cytokines in men. *Aging Male*; 22(2):129-140. doi: 10.1080/13685538.2018.1482487

Molnar C & Gair J. (2013). The animal body: Basic Form and Function. In: *Concepts of Biology-1st Canadian Edition*. Rice University. Texas, USA. Chapter 14. Pp. 18.

Mori S, Maher P, Conti B. (2016), Neuroimmunology of the Interleukins 13 and 4. *Brain Sci*. 6(2):18. doi: 10.3390/brainsci6020018.

Morrison HW, Filosa JA. (2013). A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J Neuroinflammation*. 10:4. doi:10.1186/1742-2094-10-4

Myers RE, Anderson LI, Dluzen DE. (2003). Estrogen, but not testosterone, attenuates methamphetamine-evoked dopamine output from superfused striatal tissue of female and male mice. *Neuropharmacology*; 44(5):624-32. doi: 10.1016/s0028-3908(03)00043-1

Nelson BH (2014). IL-2, Regulatory T Cells, and Tolerance. *J Immunol*; 172:3983-3988. doi: 10.4049/jimmunol.172.7.3983

Ning N, Dang X, Bai C, Zhang C & Wang K. (2012). Panax notoginsenoside produces neuroprotective effects in rat model of acute spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Journal of Ethnopharmacology*. 139(2):504-512. doi: 10.1016/j.jep.2011.11.040

Norenberg MD, Smith J & Marcillo A. (2004). The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *Journal of Neurotrauma*. 21(4):429–440. doi: <https://doi.org/10.1089/089771504323004575>

Nukolova NV, Aleksashkin AD, Abakumova TO, Morozova AY, Gubskiy IL, Kirzhanova EA, Abakumov MA, Chekhonin VP, Klyachko NL & Kabanov AV. (2018). Multilayer polyion complex nanoformulations of superoxide dismutase 1 for acute spinal cord injury. *Journal of Controlled Release*. 270:226-236. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.11.044

Ogata T, Nakamura Y, Tsuji K, Shibata Y, Kataoka K. (1993). Steroid hormones protect spinal cord neurons from glutamate toxicity. *Neuroscience*; 55, 445–449.

Pekny M & Pekna M. (2016). Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1862(3):483-491. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.11.014

Pelisch N, Almanza JR, Stehlik KE, Aperi BV, Kroner A. (2020). CCL3 contributes to secondary damage after spinal cord injury. *J Neuroinflammation*. 2020 Nov 27;17(1):362. doi: 10.1186/s12974-020-02037-3

Pickett GE, Campos-Benitez M, Keller JL & Duggal N. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in Canada. *Spine (Phila Pa 1976)* (2006); 31: 799–805. doi: 10.1097/01.brs.0000207258.80129.03

Pineau I & Lacroix S. (2007). Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *Journal of Comparative Neurology*. 500(2):267–285. doi: <https://doi.org/10.1002/cne.21149>

Pinto AR, Calzada MCC, Campos LMG & Guerra AC. (2012). Effect of chronic administration of estradiol, progesterone, and tibolone on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta and the microtubule-associated protein tau in the hippocampus and cerebellum of female rat. *Journal of Neuroscience Research*. 90(4):878–886. doi: 10.1002/jnr.22808

Pinto AR, Rivas SA, Farfán EDG, Rodríguez EM, Guerra CA. (2014). Neuroprotective effects of tibolone against oxidative stress induced by ozone exposure. *Revista de neurología*. 58(10):441-8. Recuperado de: <https://bit.ly/3lcCilb>

Pinto AR, Segura UJJ, Farfán GED & Guerra AC. (2017). Effects of Tibolone on the Central Nervous System: Clinical and Experimental Approaches. *BioMed Research International*. 8630764. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/8630764>

Qiu J, Bosch MA, Ronnekleiv OK, Kloosterboer HJ & Kelly MJ. (2008). Tibolone rapidly attenuates the GABAB response in hypo-thalamic neurons. *Journal of Neuroendocrinology*. 20(12):1310–1318. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01789.x

Qu WS, Tian DS, Guo ZB, J Fang, Zhang Q, Yu ZJ, Xie MJ, Zhang HQ, Lü JG & Wang W. (2012). Inhibition of EGFR/MAPK signaling reduces microglial inflammatory response and the associated secondary damage in rats after spinal cord injury. *Journal of Neuroinflammation*. 9:178. doi: 10.1186/1742-2094-9-178

Quarles RH, Macklin WB & Morell P. (1999). Myelin Formation, Structure and Biochemistry. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 7th Edition. Elsevier Academic Press. Canada. Chapter 4. Pp. 51-71. Recuperado de: <https://bit.ly/2Gc3RWj>

Ray SK, Samantaray S & Banik NL. (2016). Future directions for using estrogen receptor agonists in the treatment of acute and chronic spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 11(9):1418-1419. doi: 10.4103/1673-5374.191212.

Ren H, Chen X, Tian M, Zhou J, Ouyang H & Zhang Z. (2018). Regulation of Inflammatory Cytokines for Spinal Cord Injury Repair Through Local Delivery of Therapeutic Agent. *Advanced Science (Weinh)*. 5(11): 1800529. doi: 10.1002/advs.201800529

Ritz MF & Hausmann ON. (2008). Effect of 17 $\beta$ -estradiol on functional outcome, release of cytokines, astrocyte reactivity and inflammatory spreading after spinal cord injury in male rats. *Brain Res*; 1203:177-88. doi: 10.1016/j.brainres.2008.01.091

Rodríguez MMV, Paredes CM, Grijalva I & Rojano MD. (2016). Clinical and demographic profile of traumatic spinal cord injury: a mexican hospital-based study. *Spinal Cord*. 54(4):266-269. doi:10.1038/sc.2015.164

Roselli F, Chandrasekar A Kossmann MCM. (2018). Interferons in Traumatic Brain and Spinal Cord Injury: Current Evidence for Translational Application. *Front Neurol*. 9: 458. doi: 10.3389/fneur.2018.00458

Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B & Fehlings MG. (2008). Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurgery Focus*. 25(5):E2. doi: <https://doi.org/10.3171/FOC.2008.25.11.E2>

Sato A, Ohtaki H, Tsumuraya T, Song D, Ohara K, Asano M, Iwakura Y, Atsumi T & Shioda S (2012) Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. *J Neuroinflammation*. 7;9:65. doi: 10.1186/1742-2094-9-65.

Satzer D, Miller C, Maxon J, Voth J, DiBartolomeo C, Mahoney R, Dutton JR, Low WC, Parr AM (2015) T cell deficiency in spinal cord injury: altered locomotor recovery and whole-genome transcriptional analysis. *BMC Neurosci*. 16: 74. doi: 10.1186/s12868-015-0212-0

Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Akaike A, Shimohama S: Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death. (1998). *J Neurosci Res*; 54(5):707-19. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19981201)54:5<707::AID-JNR16>3.0.CO;2-T.

Scanlon VC. & Sanders T. *The Nervous System*. In: *Essentials of Anatomy and Physiology*. 5th Edition. Davis Company. Philadelphia, USA. Chapter 8. Pp.166-167. Recuperado de: <https://bit.ly/30F70HE>

Scheffe SW, Saucier DA & Cain ME. (2002). A Statistical Method for Analyzing Rating Scale Data: The BBB Locomotor Score. *Journal of Neurotrauma*; 19(10):1251-60. doi: 10.1089/08977150260338038

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. (2004). Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 75(2):163-89. doi: 10.1189/jlb.0603252

Scivoletto G, Masciullo M, Pichiorri F & Molinari M. (2020). Silent post-traumatic syringomyelia and syringobulbia. *Spinal Cord Ser Cases.* 13;6(1):15. doi: 10.1038/s41394-020-0264-y

Shang AJ, Yang Y, Wang HY, Tao BZ, Wang J, Wang ZF & Zhou DB. (2017). Spinal cord injury effectively ameliorated by neuroprotective effects of rosmarinic acid. *Nutritional Neuroscience.* 20(3):172-179. doi: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2015.1103460>

Sharma HS, Winkler T, Stålberg E, Gordh T, Alm P & Westman J. (2003). Topical application of TNF-alpha antiserum attenuates spinal cord trauma induced edema formation, microvascular permeability disturbances and cell injury in the rat. *Acta Neurochirurgica Supplement.* 86:407-13. doi: 10.1007/978-3-7091-0651-8\_85

Sheikpranbabu S, Kalishwaralal K, Venkataraman D, Eom SH, Park J & Gurunathan S. (2009). Silver nanoparticles inhibit VEGF-and IL-1beta-induced vascular permeability via Src dependent pathway in porcine retinal endothelial cells. *Journal of Nanobiotechnology.* 7:8. doi: 10.1186/1477-3155-7-8

Sribnick EA, Samantaray S, Das A, Smith J, Matzelle DD, Ray SK, Banik NL. (2010). Postinjury estrogen treatment of chronic spinal cord injury improves locomotor function in rats. *J Neurosci Res.* 88(8):1738-50. doi: 10.1002/jnr.22337.

Stoll G, Jander S & Schroeter M. (2002). Detrimental and Beneficial Effects of Injury-Induced Inflammation and Cytokine Expression in the Nervous System. *Advancements in Experimental Medicine and Biology.* 513:87-113. doi: 10.1007/978-1-4615-0123-7\_3

Stoodley MA. (2000). Pathophysiology of syringomyelia. *Journal of Neurosurgery.* 92(6):1069–1073. Recuperado de: <https://bit.ly/2vtZUN>

Sun G, Yang S, Cao G, Wang Q, Hao J, Wen Q, et al. (2018).  $\gamma\delta$  T cells provide the early source of IFN- $\gamma$  to aggravate lesions in spinal cord injury. *J Exp Med.* 215:521–535. doi: 10.1084/jem.20170686

Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, Naruo M, Okabe H & Takatsuki K. (1997). Role of neutrophil in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience.* 79(4):1177-82. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00011-0

Tator CH & Koyanagi I. (1997). Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery.* 86(3):483–492. doi: <https://doi.org/10.3171/jns.1997.86.3.0483>

Tau G & Rothman P. (1999). Biologic functions of the IFN-c receptors. *Allergy.* 54(12):1233–1251. doi: 10.1034/j.1398-9995.1999.00099.x

Thomas AJ, Nockels RP, Pan HQ, Shaffrey CI, Chopp M. (1999). Progesterone is Neuroprotective After Acute Experimental Spinal Cord Trauma in Rats. *Spine (Phila Pa 1976);* 24(20):2134-8. doi: 10.1097/00007632-199910150-00013.

Thompson CD, Zurko JC, Hanna BF, Hellenbrand DJ, Hanna A. (2013). The Therapeutic Role of Interleukin-10 after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma;* 1;30(15):1311-24. doi: 10.1089/neu.2012.2651

Tian WY, Zhang HY, Su LK, Shen WZ. (2010). Effects of tibolone on apoptosis of neurons after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *AJSMMU.* 29(7):790-792. doi: 10.3724/SP.J.1008.2009.00790

Tonai T, Taketani Y, Ueda N, Nishisho T, Ohmoto Y, Sakata Y, Muraguchi M, Wada K, Yamamoto S. (1999). Possible Involvement of interleukin-1 in cyclooxygenase-2 Induction After Spinal Cord Injury in Rats. *Journal of Neurochemistry*. 72(1):302-9. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0720302.x

Tortora GJ & Derrickson B. (2011). La médula espinal y los nervios espinales. En: *Principios de Anatomía y Fisiología*. 11a Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. Capítulo 13. Pp.444-449.

Trabert B, Sherman ME, Kannan N, Stanczyk FZ. (2020). Progesterone and Breast Cancer. *Endocr Rev*; 41(2): 320–344. Recuperado de : <https://bit.ly/3zUHQa1>

Trinchieri G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 3(2):133-46. doi: 10.1038/nri1001.

Trivedi A, Olivas AD & Noble-Haesslein LJ. (2006). Inflammation and Spinal Cord Injury: Infiltrating Leukocytes as Determinants of Injury and Repair Processes. *Clinical Neuroscience Research*.. 6(5): 283–292. doi: 10.1016/j.cnr.2006.09.007

Urushitani M, Inoue R, Nakamizo T, Sawada H, Shibasaki H & Shimohama S. (2000). Neuroprotective effect of cyclic GMP against radical-induced toxicity in cultured spinal motor neurons. *J Neurosci Res*. 61(4):443-8. Doi: 10.1002/1097-4547(20000815)61:4<443::AID-JNR11>3.0.CO;2-W

Vergouwen MD, Anderson RE & Meyer FB. (2000). Gender differences and the effects of synthetic exogenous and non-synthetic estrogens in focal cerebral ischemia. *Brain Research*. 878(1–2):88–97. Doi: 10.1016/s0006-8993(00)02713-x

Verheul HAM, van Lersel MLPS, Delbressine LPC & Kloosterboer HJ. (2007). Selective Tissue Distribution of Tibolone Metabolites in Mature Ovariectomized Female Cynomolgus Monkeys after Multiple Doses of Tibolone. *Drug metabolism and disposition*. 35(7):1105–1111. doi: 10.1124/dmd.106.014118

Wang XJ, Kong KM, Qi WL, Ye WL & Song PS. (2005). Interleukin-1 beta induction of neuron apoptosis depends on p38 mitogen-activated protein kinase activity after spinal cord injury. *Acta Pharmacologica Sinica*. 26(8):934-42. Retrieved from: <https://bit.ly/2zz1hcG>

Wang X, de Rivero Vaccari JP, Wang H, Diaz P, German R, Marcillo AE & Keane RW. (2012). Activation of the nuclear factor E2-related factor 2/antioxidant response element pathway is neuroprotective after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*. 29(5):936-45. doi: 10.1089/neu.2011.1922

Weber A, Wasiliew P & Kracht M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Sci Signal*. 19;3(105):cm1. doi: 10.1126/scisignal.3105cm1.

Wei Z, Fei Y, Su W, Chen G. (2019). Emerging Role of Schwann Cells in Neuropathic Pain: Receptors, Glial Mediators and Myelination. *Front Cell Neurosci*. 2019; 13: 116. doi: 10.3389/fncel.2019.00116

Wrathall JR, Teng YD & Choiniere D. (1996). Amelioration of functional deficits from spinal cord trauma with systemically administered NBQX, an antagonist of non-N-methyl-D-aspartate receptors. *Experimental Neurology*. 137(1):119–126. doi: <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0012>

Wynn TA. (2003). IL-13 EFFECTOR FUNCTIONS. *Annu Rev Immunol*; 21:425-56. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141142

Xun C, Mamat M, Guo H, Mamati P, Sheng J, Zhang J, Xu T, Liang W, Cao R & Sheng W. (2017). Tocotrienol alleviates inflammation and oxidative stress in a rat model of spinal cord injury via suppression of transforming growth factor- $\beta$ . *Experimental and Therapeutic Medicine*. 14(1):431–438. doi: 10.3892/etm.2017.4505

Yaguchi M, Ohta S, Toyama Y, Kawakami Y & Toda M. (2008). Functional Recovery After Spinal Cord Injury in Mice Through Activation of Microglia and Dendritic Cells After IL-12 Administration. *Journal of Neuroscience Research*. 86(9):1972-80. doi: 10.1002/jnr.21658

Yarrow JF, Conover CF, Beggs LA, Beck DT, Otzel DM, Balaez A, Combs SM, Miller JR, Ye F, Aguirre JE, Neuville KG, Williams AA, Conrad BP, Gregory GM, Wronski TJ, Bose PK, Borst SE. (2014). Testosterone Dose Dependently Prevents Bone and Muscle Loss in Rodents after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*; 31(9):834-45. doi: 10.1089/neu.2013.3155

Yu WH (1989). Survival of motoneurons following axotomy is enhanced by lactation or by progesterone treatment. *Brain Res*. 49, 379–382. doi: 10.1016/0006-8993(89)90075-9

Yu & Fehlings. (2011). Fas/FasL-mediated apoptosis and inflammation are key features of acute human spinal cord injury: implications for translational, clinical application. *J Neuroinflammation*. doi: 10.1186/s12974-021-02337-2

Yune TY, Chang MJ, Kim SJ, Lee YB, Shin SW, Rhim H, Kim YC, Shin ML, Oh YJ, Han CT, Markelonis GJ & Oh TH. (2003). Increased production of tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis after traumatic spinal cord injury in rats. *Journal of Neurotrauma*. 20(2):207-19. doi: 10.1089/08977150360547116

Yune TY, Lee SM, Kim SJ, Park HK, Oh YJ, Kim YC, Markelonis GJ & Oh TH. (2004). Manganese superoxide dismutase induced by TNF-beta is regulated transcriptionally by NF-kappaB after spinal cord injury in rats. *Journal of Neurotrauma*. 21(12):1778-94. doi: 10.1089/neu.2004.21.1778

Zárate KB, Jiménez GA, Reyes SA, Robles OR, Cabrera AEE & Rosales OLM. (2016). Demographic and clinical characteristics of patients with spinal cord injury: a single hospital-based study. *Spinal Cord*. 54(11):1016-1019. doi:10.1038/sc.2016.41

Zendedel A, Johann S, Mehrabi S, Joghataei MT, Hassanzadeh G, Kipp M & Beyer C. (2015). Activation and Regulation of NLRP3 Inflammasome by Intrathecal Application of SDF-1a in a Spinal Cord Injury Model. *Molecular Neurobiology*. 53(5):3063-3075. doi: 10.1007/s12035-015-9203-5

Zgliczynski JM, Stelmaszynska T & Domanski J. (1971). Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by meloperoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 235(3):419-24. doi: 10.1016/0005-2744(71)90281-6

Zhang F, Li F & Chen G. (2013). Neuroprotective effect of apigenin in rats after contusive spinal cord injury. *Neurological Sciences*. 35(4):583-8. doi: 10.1007/s10072-013-1566-7

Zhang W, Cheng L, Hou Y, Si M, Zhao YP & Nie L. (2015). Plumbagin Protects Against Spinal Cord Injury-induced Oxidative Stress and Inflammation in Wistar Rats through Nrf-2 Upregulation. *Drug Research (Stuttg)*. 65(9):495-9. doi: 10.1055/s-0034-1389950