

00387

3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA CICLOSPORINA - A SOBRE LA
EXPRESION Y ACTIVIDAD DE LA SINTASA DEL OXIDO
NITRICO EN TEJIDO MEDULAR LESIONADO DE RATA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A
M. en C. MARIA DE LOS ANGELES ARACELI DIAZ RUIZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. GABRIEL GUIZAR SAHAGUN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico el
contenido de mi trabajo.

MEXICO, D.F.

NOMBRE: Maria de los Angeles Araceli Diaz Ruiz
FECHA: 11-08-03
FIRMA: [Firma]

AGOSTO, 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



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 COORDINACIÓN

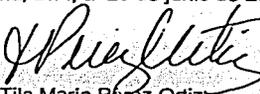
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de marzo de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado del Doctorado en Ciencias del alumno(a) María de los Angeles Araceli Díaz Ruiz, con número de cuenta 82359922 y número de expediente 3981114, con la tesis titulada: "Efecto de la ciclosporina-A sobre la expresión y actividad de la sintasa de óxido nítrico en tejido medular lesionado de rata.", bajo la dirección del (la) Dr. Gabriel Guizar Sahagún.

Presidente:	Dr. Gabriel Guizar Sahagún
Vocal:	Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Alvarez
Vocal:	Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Vocal:	Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia
Secretario:	Dr. Camilo Ríos Castañeda
Suplente:	Dr. José Juan Antonio Ibarra Arias
Suplente:	Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de junio de 2003


Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

RECONOCIMIENTO

A los miembros del comité tutorial:

Dr. Gabriel Guizar Sahagún
Investigador Titular
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas
Instituto Mexicano del Seguro Social.

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda
Director de Investigación
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"

Dr. José Juan Antonio Ibarra Arias
Investigador Asociado C
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas
Instituto Mexicano del Seguro Social.

Dr. Ignacio Camacho Arroyo.
Profesor Titular
Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dra. María Esther Cruz Boltrán.
Profesora Titular
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización de este proyecto y obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas, estuve becada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Registro No. 120655 y por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a:

Los miembros del comité tutorial por su orientación y sugerencias que fueron importantes para mi formación.

Los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones y comentarios que sirvieron para enriquecer este trabajo.

El Instituto Nacional de Neurología (laboratorio de Neuroquímica)

El Centro Médico Nacional IMSS Siglo XXI

El Centro de Estudios Avanzados (Unidad Norte)

El Centro de Investigación del Proyecto CAMINA

El Dr. José Segovia, Tec. Paula Vergara, Dra. Francisca Pérez,

QFB. Miriam Jaramillo y Oscar Eduardo Silva

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dedico esta Tesis

Con todo mi amor y admiración a Camilo Ríos Castañeda, por el apoyo recibido, el interés, el entusiasmo, la dedicación y por sus sabios consejos que fueron fundamentales para mi formación y para la realización de esta tesis. Por su ayuda incondicional en todo momento. Muchas Gracias.

A mis hijos:

Francisco Daniel, Amairani y Luis Eduardo

Por su amor y comprensión.

A mis padres

Reynaldo y María de los Angeles

Por su gran apoyo

A mis hermanos

Reynaldo, Gabriel, Juan Carlos, Patricia y Miguel Angel

A toda mi familia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	6
<i>Antecedentes.....</i>	6
<i>Fisiopatología de la lesión traumática de la médula espinal.....</i>	6
<i>Excitotoxicidad y radicales libres.....</i>	7
<i>Estrés oxidativo asociado al trauma medular.....</i>	9
<i>Moléculas blanco de los radicales libres.....</i>	11
<i>Fuentes enzimáticas de generación de radicales libres.....</i>	12
<i>Citotoxicidad y neurotoxicidad del óxido nítrico.....</i>	14
<i>Regulación de la actividad de la SON.....</i>	16
<i>Genotoxicidad del óxido nítrico.....</i>	20
<i>El óxido nítrico como neuroprotector.....</i>	21
<i>Antioxidante.....</i>	21
<i>Apoptosis.....</i>	22
<i>Neuroprotección después de una lesión</i>	
<i>traumática de la médula espinal.....</i>	24
<i>Factores de crecimiento, hormonas y Transplantes.....</i>	24
<i>Gliosis y regeneración abortiva.....</i>	24
<i>Factor de crecimiento neural. (FCN).....</i>	27

<i>El factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en ingles)</i>	27
<i>Factor de crecimiento básico de los fibroblastos (FCbF)</i>	28
<i>Hormonas</i>	29
<i>Transplantes</i>	30
a) <i>Neuronas derivadas del SNC</i>	31
b) <i>Oligodendrocitos</i>	32
c) <i>Células de Schwann</i>	32
d) <i>Astrocitos</i>	32
e) <i>Microglía</i>	33
f) <i>Células progenitoras multipotenciales (stem cells)</i>	33
g) <i>Fibroblastos genéticamente modificados</i>	34
h) <i>Glia envolvente del bulbo olfatorio (ensheating cells)</i>	35
<i>Farmacoterapia después de una lesión traumática de la médula espinal</i>	36
<i>Corticoesteroides</i>	36
<i>21 Aminoesteroides (Lazaroides)</i>	38
<i>Antagonistas de receptores α opioides</i>	41
<i>Gangliosidos</i>	42
<i>Regulación de canales de calcio</i>	43

<i>Antagonistas o bloqueadores de receptores</i>	
<i>NMDA y No-NMDA</i>	44
<i>Manejo de las reacciones de la inflamación</i>	46
<i>Modulación de la respuesta inflamatoria</i>	47
<i>Inmunosupresores</i>	48
<i>Antioxidantes</i>	48
<i>Regulación de la síntesis de NO</i>	49
<i>Otras posibles estrategias</i>	49
<i>Tratamiento en la etapa crónica de LTME</i>	51
<i>Ciclosporina-A</i>	53
<i>Metabolismo</i>	53
<i>Absorción</i>	54
<i>Distribución</i>	54
<i>Eliminación</i>	54
<i>Mecanismo de acción de la ciclosporina-A</i>	54
<i>Participación de la ciclosporina-A</i> <i>después de una lesión</i>	57
JUSTIFICACION.....	60
HIPÓTESIS.....	61
OBJETIVOS.....	62
<i>Objetivo General</i>	62
<i>Objetivos Particulares</i>	62

MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
<i>Determinación curso-temporal de la máxima actividad de la sintasa del óxido nítrico constitutiva e inducible después de una lesión traumática de la médula espinal.....</i>	<i>63</i>
<i>Determinación de la actividad de la sintasa del óxido nítrico constitutiva e inducible en las diferentes etapas del ciclo estral de la rata después de una lesión traumática de la médula espinal.....</i>	<i>64</i>
<i>Determinación de la actividad de la sintasa del óxido nítrico constitutiva e inducible en tejido medular lesionado de ratas tratadas con ciclosporina-A.....</i>	<i>65</i>
<i>Determinación de la expresión de las sintasas del óxido nítrico neuronal, endotelial e inducible en tejido medular lesionado de rata tratado con ciclosporina-A.....</i>	<i>65</i>
<i>Descripción de técnicas.....</i>	<i>66</i>
<i>Esquema de administración de ciclosporina-A.....</i>	<i>66</i>
<i>Modelo de lesión.....</i>	<i>66</i>
<i>Cuidados postoperatorios.....</i>	<i>67</i>
<i>Frotis vaginal.....</i>	<i>68</i>

<i>Proestro</i>	68
<i>Estro</i>	68
<i>Metaestro</i>	68
<i>Diestro</i>	68
<i>Cuantificación de la actividad de la sintasa del óxido nítrico</i>	69
<i>Cuantificación de proteínas por el método de Bradford</i>	71
<i>Determinación de la expresión de la sintasa del óxido nítrico (son) por Western Blot</i>	71
<i>Obtención del tejido</i>	71
<i>Extracción de la proteína total</i>	71
<i>Absorción</i>	71
<i>Bloqueo de la unión inespecífica</i>	72
<i>Inmunodetección</i>	72
<i>Revelado y análisis</i>	73
<i>Consideraciones éticas para el uso de animales en la experimentación</i>	73
<i>Estadística</i>	73
RESULTADOS	74
<i>Actividad de la SONc y SONi</i>	74
<i>Expresión de las isoformas de la SON por Western Blot</i>	84
DISCUSIÓN	91

CONCLUSIONES.....	108
REFERENCIAS.....	110

RESUMEN

El óxido nítrico (NO) juega un papel muy importante después de una lesión traumática de la médula espinal. Es generado a partir de L-arginina por dos diferentes sintetas del óxido nítrico (SON) constitutivas: la SON de células endoteliales (SONe) y la neuronal (SONn), su actividad es estimulada cuando las concentraciones de calcio intracelular se incrementan. La isoforma inducible independiente de calcio (SONi), se expresa después de señales de estrés. Diversos estudio señalan que el NO puede tener efecto protector o destructor dependiendo de su estado redox, tipo celular donde se produce y de su concentración. El NO reacciona rápidamente con el radical superóxido para formar el anión peroxinitrito (ONOO⁻), una molécula altamente reactiva, que tiene la capacidad de modificar a los residuos de aminoácidos como la cisteína y la tirosina que forman parte de diversas proteínas esenciales en la fisiología de las células nerviosas, además se ha reportado que el NO puede ocasionar otros efectos citotóxicos. Por otra parte se sabe que existen mecanismos protectores en los cuales el NO tiene participación, estos incluyen la dilatación del músculo liso del endotelio vascular, la neurotransmisión y la plasticidad sináptica. La ciclosporina-A (CsA) un fármaco inmunosupresor que al ingresar al citoplasma de la célula se une a la ciclofilina (CF), para formar el complejo CsA-CF capaz de inhibir a la calcineurina una fosfatasa dependiente de calcio. Por medio de este mecanismo de acción se podría regular la expresión y actividad de la SON, y probablemente disminuir el daño secundario generado después de una lesión medular. Para determinar el efecto del tratamiento con CsA sobre la expresión y la actividad de ambas isoformas de la SONc (SONn y SONe) y de la SONi después de una lesión se formaron cuatro grupos de ratas

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Wistar hembras tratadas con vehículo o con CsA a 2, 6 y 12 h después de ser sometidas a una lesión por contusión severa a nivel de la 9^a vértebra torácica. La expresión de la SON fue medida por el método de Western Blot y la actividad de las isoformas SONc y SONi se determinó por el método de Bredt y Snyder (1990). Los animales fueron sacrificados a las 4, 24 y 72 h después de la lesión. Los resultados obtenidos muestran que existe una disminución del 67% de la actividad de la SONc en el grupo tratado con CsA y sacrificado 4 h después del trauma cuando se compara con el grupo que únicamente fue lesionado. En los grupos tratados con CsA y sacrificados 24 h después de la lesión se observa un incremento en la actividad de la SONc en todos los grupos (57%, 50% y 33%). Con respecto a la actividad de la SONi, se observa un decremento solamente en el grupo tratado con CsA 12 h después del trauma y sacrificado a las 72 h. Estos resultados fueron correlacionados con el ensayo de Western Blot. Los resultados obtenidos en este último ensayo muestran que, existe un incremento de la expresión de la SONn por efecto del trauma del 25% y un decremento de dicha expresión por efecto del fármaco del 66%, esto con respecto al grupo control (laminectomizado) en los animales sacrificado a las 4 h después del daño. También pudimos observar un incremento del 57% en la expresión de la SONE por efecto del daño y un decremento del 20% por efecto de la CsA en los animales sacrificados a este mismo tiempo. Por otra parte, se observó un incremento en la expresión de la SONn por efecto del trauma del 41% y por efecto del fármaco administrado a 2, 6, y 12 h después de la LTME del 86, 71, y 84% respectivamente cuando fueron evaluados 24 h después del daño, así mismo se observó un incremento en la expresión de la SONE evaluada a este tiempo, en todos los grupos tratados con CsA (62, 82 y 82%) con respecto al control. Los resultados de la expresión de la SONi muestran un decremento en todos los

grupos tratados con CsA y sacrificados 72 h después de la lesión (123%, 125% y 126%) cuando son comparados con el grupo control. Como conclusión podemos decir que: la ciclosporina-A modula de manera selectiva la expresión y actividad de las diferentes isoformas de la sintasa del óxido nítrico en los distintos tiempos evaluados después de una lesión traumática de la médula espinal, lo que podría tener efectos benéficos durante el daño secundario, ya que, el NO tiene funciones diversas y su efecto neuroprotector o citotóxico probablemente depende de su concentración, estado redox y tipo celular donde se genere.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) plays a major role after spinal cord trauma. It is generated from L-arginine by two distinct calmodulin-dependent constitutive nitric oxide synthase (NOS) enzymes: NOS from endothelial cell (eNOS) and neurons (nNOS) whose activities are stimulated by increases in intracellular calcium, and a calcium-independent enzyme (iNOS), which is expressed after stress signals. Many reports show that NO can be either protective or destructive depending on its redox state, cell type where it is produced and its concentration. NO rapidly reacts with superoxide radical to form peroxynitrite anion (ONOO⁻) a highly reactive molecule. It can modify cysteine and tyrosine residues in neuronal proteins among other deleterious reactions. Protective effects of NO include relaxation of vascular endothelium, neurotransmission and synaptic plasticity. On the basis of its mechanism of action, cyclosporin-A (CsA), an immunosuppressive agent, may modulate the expression and activities of NOS and thus protect against secondary damage after spinal cord injury. In order to determine the effect of CsA treatment upon expression and activities of both cNOS (nNOS, eNOS) and iNOS after spinal cord (SC) injury, 4 groups of female Wistar adult rats were treated with either vehicle or CsA 2, 6 and 12 h after SC trauma by low thoracic contusion. Expression was assayed by western blot method. In addition cNOS and iNOS activities were assayed by the Bredt and Snyder method (1992). The animals were sacrificed at 4, 24 and 72 h after SC injury. Results showed that in the group treated with CsA a significant decrease of 67% in the constitutive NOS activity at 4h after the lesion was observed compared to injury alone. Animals treated with CsA increased their cNOS activity at 24h after the lesion in every group treated (57%, 50% and 33%). iNOS activity was decreased by 39% at 72h after the lesion only in the

group treated with CsA 12h after the spinal cord injury. Finally, those results were corroborated with the assay of western blot. The results of the last assay showed an increase in the expression of nNOS as an effect of trauma (25%) and a decrease of 66% against control, by effect of CsA in the animals killed 4 hours after lesion. We also observed an increase of 57% in the expression of eNOS due to lesion and a decreased of 20% after CsA in the animals killed at that time. On the other hand, an increase in the nNOS expression was observed after trauma (41%) and also by effect CsA administered at 2, 6 and 12 h after SC injury of 86, 71 and 84%, respectively, when evaluated 24 hours after the lesion. An increase in eNOS was also observed at that time in all of the groups treated with CsA (62, 82 and 82%) against control. Results of the expression of iNOS show a decrease in all of the groups treated with CsA and killed 72 hours after lesion (123, 125 and 126%) as compared with the control group. As a conclusion: CsA modulates in a selective way the expression and activity of the different isoforms of nitric oxide synthase at the different times evaluated after spinal cord traumatic injury. This effect may be neuroprotector after lesión.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes.

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) es un problema de salud pública muy complejo que afecta en la mayoría de los casos a la población en edad económicamente activa (20-35 años), tiene profundos efectos económicos, físicos y emocionales, se estima que el costo anual de atención médica para todos los pacientes con traumatismo medular rebasa los 6 billones de dólares en los Estados Unidos (Berkowitz y cols. 1992) En México, se ha reportado que la incidencia anual de traumatismos medulares en el Distrito Federal es de aproximadamente 18.1 casos por millón de habitantes, (Pardini, 1998) mientras que en los Estados Unidos se ha estimado que existen aproximadamente 20 nuevos casos por cada millón de habitantes por año, no obstante esta información, en un estudio realizado por Zeiling y cols., (2000) se demuestra que esta incidencia podría ser hasta de 27.1 casos por millón de habitantes.

Fisiopatología de la lesión traumática de la médula espinal.

La fisiopatología de la LTME aguda involucra una compleja cascada de eventos que comprometen la funcionalidad nerviosa por debajo del sitio de lesión. Esto se debe a una gran muerte neuronal y falla axonal como resultado del daño provocado.

Después de producirse una LTME existe una baja capacidad de regeneración espontánea de las fibras nerviosas debida principalmente a la presencia de diversos factores inhibidores de la regeneración que son sintetizados después del trauma, así como de un inadecuado balance en la producción de diversos factores tróficos (Taoka y Okajima, 1998).

FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL

Por otra parte se observa daño en la microcirculación y ruptura de la barrera hematoencefálica creando un microambiente dañino que lleva a la destrucción del parénquima medular. Finalmente es importante mencionar que los eventos bioquímicos iniciados inmediatamente después del trauma juegan un papel muy importante en este proceso, la pérdida de la regulación iónica, que lleva a la suspensión del impulso nervioso y a la formación de edema, (Lemke y cols. 1987; Young y Koreh, 1986), el incremento del calcio libre intracelular, que activa diversas proteasas y fosfolipasas que a su vez destruyen los componentes celulares, como la mielina, favoreciendo un proceso desmielinizante (Balentine, 1988); la liberación de grandes cantidades de glutamato y aspartato originando una intensa sobreexcitación de las neuronas viables, fenómeno que se conoce como excitotoxicidad, (Faden y Simon, 1988), el estrés oxidante, estado donde se pierde el balance entre la generación de radicales libres y la capacidad de las defensas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, etc.) para contrarrestarlos (Braugher y Hall 1992; Siegel y cols., 1998). Todos estos eventos promueven la muerte celular, ya sea por apoptosis o necrosis.

Excitotoxicidad y radicales libres

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más importante que se encuentra en el sistema nervioso central y juega un papel predominante en la transmisión sináptica del cerebro, se une a tres clases de receptores: Los metabotrópicos (mGluR), los activados por el agonista *N*-Methyl-D-aspartato (NMDA) altamente regulados por más de seis ligandos endógenos, (glutamato, glicina, poliaminas, Mg^+ , Zn^{2+} , e H^+) y los activados por el ácido

propiónico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA)/kainato (KA) (Siegel y cols. 1998).

Después de una LTME se observa liberación de glutamato en grandes cantidades generando un estado excitotóxico, que lleva a una excesiva estimulación de sus receptores, y como consecuencia al incremento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Choi, 1995). Durante este proceso se inicia la cascada de activación de las proteínas cinasas, alteraciones en el metabolismo y la generación de radicales libres (RL). Muchos de estos eventos inician tempranamente ocasionando la muerte celular. La elevada concentración de Ca^{2+} activa proteasas de cisteína como la calpaina que daña el citoesqueleto; además son activadas las endonucleasas que rompen el ADN disparando los procesos apoptóticos o de muerte celular programada. Este incremento de calcio desencadena la activación de cinasas, especialmente las que son dependientes de Ca^{2+} /calmodulina y las dependientes de Ca^{2+} que modifican muchos canales iónicos, algunos receptores como los NMDA, los AMPA/Kainato y los canales iónicos de Ca^{2+} sensibles a voltaje incrementando la concentración de Ca^{2+} intracelular.

Por otra parte se ha observado que durante el estado excitotóxico se genera un desacople en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria con la subsecuente generación de más RL (Reynolds y Hastings, 1995). Recientes estudios indican que la activación de receptores NMDA y AMPA/KA pueden mediar la excitotoxicidad y contribuir a incrementar los procesos neurodegenerativos después de una lesión traumática de la médula espinal (Feden y cols. 1988). El mecanismo de muerte neuronal disparado por glutamato se cree que es típicamente necrótico (Choi, 1996), pero el glutamato también puede inducir muerte por apoptosis (Portera-Cailliau y cols. 1997).

Estrés oxidativo asociado al trauma medular

En la mitocondria se lleva a cabo la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa, en este proceso, el oxígeno (O_2) es reducido hasta H_2O . El O_2 acepta electrones uno a la vez, en un evento secuencial, generando anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH^{\cdot-}$) y agua. En condiciones normales la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) es probablemente menor al 5%, sin embargo esta producción puede incrementarse, cuando la concentración de Ca^{2+} o Na^+ aumentan súbitamente como respuesta a un evento excitotóxico (Dykens, 1994), un exceso en $O_2^{\cdot-}$ puede llevar a la formación de muchas otras especies reactivas, incluyendo $OH^{\cdot-}$ y radicales libres de peroxihidroxilo (OH_2). A pH fisiológico el $O_2^{\cdot-}$ tiende a dismutarse formando H_2O_2 y oxígeno, a través de las diversas isoformas de la enzima superóxido dismutasa (SOD); el H_2O_2 , es destoxificado, por la catalasa, enzima que se encuentra localizada principalmente en los peroxisomas, proceso que también es catalizado por la glutatión peroxidasa.

El H_2O_2 no es un radical libre pero puede fácilmente difundirse a través de las membranas biológicas con un diámetro semejante al $O_2^{\cdot-}$, así estos pueden generar un daño citotóxico en sitios distantes de su generación, la reacción entre estas dos moléculas se a descrito como la reacción de Haber Weiss, proceso en el que se favorece la producción del radical $OH^{\cdot-}$, altamente reactivo, cuando el H_2O_2 se encuentra en presencia de metales de transición como fierro y cobre, se generan altas concentraciones de $OH^{\cdot-}$, a través de la reacción de Fenton (Aust y cols., 1985), sin embargo no todos los metales se encuentran libres, existen

algunos unidos a proteínas, como el hierro que se une a la ferritina, en esta forma el hierro no cataliza la reacción para formar radicales libres.

El radical OH^\cdot es considerado el más potente oxidante en los sistemas biológicos, por su alta reactividad, el OH^\cdot , tiene una vida media corta, y como consecuencia es limitada su capacidad de difusión (aproximadamente 0.01 del diámetro de la proteína), existen algunas defensas antioxidantes que tienen la capacidad de atrapar este radical como son la metalotioneína una proteína intracelular de bajo peso molecular que consta de 61 a 62 residuos de aminoácidos no aromáticos, con gran contenido de cisteínas (25-30%). Estas cisteínas no forman puentes disulfuro y tiene alta afinidad por los metales, se encuentran unidos de 5-7 átomos de zinc, 12 de cobre o 7 átomos de cadmio por mol de proteína (Ebadi y cols. 1995; Aschner, 1996). También se ha demostrado que el ácido salicílico es un potente atrapador de radicales OH^\cdot (Mohanakumar y Muralikrishnan, 2000), así como el α -tocoferol (vitamina E) y el ácido ascórbico que reaccionan directamente con el OH^\cdot para formar productos más estables, se sabe que el α -tocoferol previene el daño oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados y de proteínas con altos contenidos de grupos tioles que se encuentran en las membranas (Facchinetti y cols. 1998) mientras que el ascorbato es un atrapador soluble en agua que es requerido como cofactor de varias hidroxilasas (Padh, 1991), mas aún el ascorbato y el α -tocoferol pueden actuar sinérgicamente en la inhibición de las reacciones de oxidación.

Finalmente se ha reportado que el óxido nítrico y algunos donadores de NO^\cdot que tienen nitroglicerina pueden suprimir la generación de OH^\cdot , *in vivo e in vitro* (Mohanakumar y

cols. 2002), además indirectamente la acción de la SOD, peroxidasas y catalasas previenen la formación del radical hidroxilo.

Moléculas blanco de los radicales libres.

La lipoperoxidación de las membranas celulares puede iniciarse al estar en contacto con el radical OH^\cdot , que tiene la capacidad de sustraer un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados. El radical carbono (sin hidrógeno) puede reaccionar con el O_2^\cdot para formar el radical peroxilo, y este a su vez puede sustraer un átomo de hidrógeno del ácido graso adyacente para formar hidroperóxidos de lípidos y así de esta manera dar inicio a una reacción en cadena, causando alteraciones en la fluidez e integridad de las membranas permitiendo la salida de los iones y originando la pérdida del potencial de membrana (Facchinetti y cols. 1998).

Las ERO también pueden oxidar diversas proteínas alterando su estructura, con este proceso se inactivan diversas enzimas, receptores y proteínas estructurales. Los aminoácidos que contienen grupos tioles como la metionina, la histidina y el triptofano, se oxidan de manera preferencial. Dicha oxidación puede estar involucrada con la regulación y función de los receptores (Lei y cols. 1992), además, las proteínas que han sido modificadas por oxidación son más susceptibles a la degradación por proteasas (Davies y Goldberg, 1987). La ruptura de las hebras sencillas o dobles del DNA, el entrecruzamiento de DNA-DNA y DNA-proteínas así como la modificación de bases puede ocurrir como consecuencia del ataque de los radicales libre (Teebor y cols. 1988). De las cuatro diferentes bases nitrogenadas del ADN, la timidina es la más susceptible de sufrir

modificaciones por oxidación, en la etapa temprana de daño al DNA, se activan varios procesos de reparación, que incluyen a la poli (ADP-ribosa) sintetasa (PARS). Esta enzima transfiere monómeros de ADP-ribosa del NAD a las proteínas asociadas a la cromatina o a otras moléculas de ADP-ribosa para formar polímeros. Una gran cantidad de proteínas tal como la topoisomerasa, la DNA y la RNA polimerasas, DNA ligasas y endonucleasas pueden ser poli-ADP ribosiladas (Virág y Szabó, 2002.). La activación de PARS bajo condiciones de extenso daño al DNA puede causar una rápida disminución del NAD intracelular, lo cual genera un alto consumo de ATP, pues se sabe que, por cada molécula de NAD regenerada se consume una molécula de ATP. Una vez que la PARS está presente en grandes cantidades en el núcleo, se unen muchas unidades de ADP-ribosil a las proteínas nucleares, esta activación puede llevar a una rápida disminución en los depósitos de energía. Se ha observado en cultivos de células neuronales un incremento de la activación de PARS al administrar dosis tóxicas de glutamato o en presencia de donadores de NO (Cosi y cols. 1994; Zhang y cols. 1994). Así la ADP-ribosilación desencadenada a través de la fragmentación del DNA durante el estrés oxidante y la activación de PARS puede llevar a una severa baja energética y a la muerte celular (Dawson y Dawson, 1995).

Fuentes enzimáticas de generación de radicales libres.

La xantina deshidrogenasa (XD) se encuentra localizada principalmente en el endotelio de los vasos sanguíneos en el cerebro. (Terada y cols. 1991), esta enzima cataliza la oxidación de xantina a hipoxantina hasta ácido úrico. La XD, transfiere electrones de su sustrato a la NAD, y así de esta forma no se producen radicales libres, pero la XD puede ser convertida

FUENTES ENZIMÁTICAS DE GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES

a la forma oxidasa (XO) de manera irreversible por una proteólisis limitada o de manera reversible por una oxidación química o enzimática de grupos tioles (Della-Corte y Stirpe, 1968 y 1972) y producir O_2^- por transferencia de electrones directamente al oxígeno. En diversos eventos como la hipoxia (Terada y cols. 1991), la isquemia-reperusión (Engerson y cols. 1987) y la excitotoxicidad (Batelli y cols. 1995), se promueve la conversión de XD a XO. El uso de antagonistas de XO han demostrado tener efecto neuroprotector en modelos de excitotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* (Facchinetti y cols. 1992), así mismo se sabe que los inhibidores de XO son capaces de suprimir la generación de radicales libres en un modelo de isquemia cerebral en ratas (O'Regan y cols. 1994).

Durante el proceso de daño se libera ácido araquidónico esterificado (AA) a través del rompimiento de las membranas lipídicas por la activación de la fosfolipasa A_2 (PLA $_2$). Una vez que es liberado el AA ejerce diversas acciones biológicas, incluyendo la modulación de la liberación y recaptura de los neurotransmisores así como la modulación de la actividad de canales iónicos y proteínas cinasas. El AA sirve como precursor de eicosanoides, ya que este es metabolizado por la ciclooxigenasa, lipooxigenasa y citocromo P-450 oxigenasa (epooxigenasa), para formar prostaglandinas, leucotrienos y epóxidos respectivamente. Las tres enzimas producen O_2^- como producto de su actividad. Durante varias condiciones patológicas en el sistema nervioso, se ha considerado que al activarse la PLA $_2$ por el incremento de calcio intracelular (enzima que es activada por calcio), es una importante vía de generación de RL (Dugan y Choi, 1994), esta vía es explorada mediante el uso de fármacos que antagonizan el efecto neurotóxico del glutamato (Ciani y cols. 1996).

Otra fuente de generación de radicales libres es a partir de la activación de la sintasa de óxido nítrico.

Citotoxicidad y neurotoxicidad del óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es considerado un radical libre por que tiene un electrón desapareado, por si mismo tiene baja reactividad y baja toxicidad, se sabe que en muchos sistemas biológicos sirve como mensajero intra y extracelular (Moncada y cols. 1991). El NO es sintetizado a través de una reacción oxidativa catalizada por la sintasa del óxido nítrico utilizando como sustrato a la L-arginina (figura 1), diversos estudios han demostrado que en el sistema nervioso central existen tres isoformas de dicha enzima.

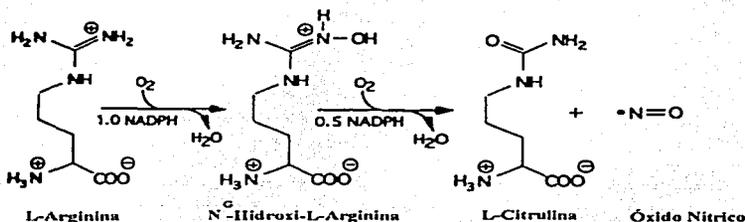


Figura 1. Esquema que muestra la síntesis de óxido nítrico a través de una reacción oxidativa, utilizando como sustrato a la L-arginina. Observe que existe una molécula intermedia la N^G-Hidroxi-L-arginina importante en la regulación de la arginasa en el ciclo de la arginina-citrulina (Diagrama modificado de Hemmens y Mayer, 1998).

La sintasa del óxido nítrico (SON) es una hemoproteína dependiente de Ca²⁺/Calmodulina, que para su activación necesita de cofactores como la nicotinamida-adenina-dinucleótido

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

fosforilada (NADPH), el flavín-mononucleótido (FMN), y el flavín dinucleótido que se unen estequiométricamente, a sitios específicos de reconocimiento. La SON también utiliza a la tetrahidrobiopterina para la transferencia de electrones. Se desconoce su función exacta pero es muy probable que establezca la unión de la L-arginina con la enzima, también tienen un sitio de regulación por fosforilación en un residuo de tirosina. Existen dos isoformas de la sintasa de óxido nítrico (SON) constitutivas, y que son dependientes de calcio: La endotelial (SONe) y la neuronal (SONn), y una isoforma independiente de calcio (inducible) que se expresa en una gran variedad de células y tejidos (SONi).

SONn o SON-1: La isoenzima neuronal, está codificada en el cromosoma 12 (humanos) y tiene un peso molecular de 160 kDa, se expresa en distintos tipos de neuronas en todo el sistema nervioso central (SNC), así como en terminales nitrérgicas periféricas (noadrenergicas, nocolinérgicas) que inervan el músculo liso y algunos otros tejidos. En el cerebro SONn se encuentra acoplada a un subtipo de receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA). La activación del receptor resulta en un influjo de iones de Ca^{2+} y la activación de SONn a través de la unión del complejo Ca^{2+}/CaM . La enzima fue primeramente aislada como una proteína soluble, pero estudios más recientes demuestran que existe una pequeña parte asociada a la membrana por medio de un dominio isoenzima-específico en el dominio N-terminal (Greenwood y cols. 1997).

SONe o SON-3: La isoenzima endotelial codificada en el cromosoma 7 en los humanos y tiene un peso molecular es de 134 kDa, parece estar unida a la membrana y ha sido localizada en el aparato de Golgi. Durante su maduración sufre modificaciones en el amino terminal (miristoilación y palmitoilación) que le permiten mantenerse ancladas a la membrana. Son poco conocidas las señales de regulación, pero se ha observado que

agonistas de receptores parecen modular su fosforilación, así como la unión de ácidos grasos acilados en el dominio N-terminal, que resultan en una translocación de la proteína y cambios en la actividad o cambios en sus propiedades bioquímicas (Greenwood y cols. 1997).

SONi o SON-2: La isoenzima inducible de peso molecular de 130 kDa y codificada en el cromosoma 17 (humanos), usualmente no se encuentra presente en la célula en condiciones fisiológicas normales, pero se expresa varias horas después de una estimulación en la célula por señales inflamatorias; tal como citocinas (interferón γ , factor de necrosis tumoral α e interleucina 1 β), o por endotoxinas (Hemmens y Mayer, 1998). La clave de inducción de SONi parece ser la activación del factor nuclear NF κ B. Se tienen reportes que indican que 2 h después del estímulo existe un aumento en la cantidad de la enzima.

Una de las principales características bioquímicas que distinguen a la SONi es su habilidad para unir calmodulina (CaM) a concentraciones bajas de Ca^{2+} ($\leq 30\text{nM}$). El $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está normalmente por encima de este nivel, por esta razón la SONi es fisiológicamente independiente de Ca^{2+} y no es regulada por señales que induzcan un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Greenwood y cols. 1997).

Regulación de la actividad de la SON

Recientemente se ha identificado una proteína inhibitoria de la SONn (PIN), varios estudios genéticos y bioquímicos sugieren que la proteína interactúa con los residuos de aminoácidos 165 y 245 de la SONn, la interacción de PIN con SONn resulta en la desestabilización de los homodímeros de SONn que inhibe su actividad. Aún más se ha

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SON

propuesto que la PIN funciona interfiriendo con la dimerización de los monómeros de la SONn (Greenwood y cols. 1997). En medula espinal su distribución es escasa.

Para la SONE se ha descrito una proteína inhibitoria de la actividad llamada ENAP-1, que al igual que la PIN interfiere con la dimerización.

La fosforilación de la SON es otro de los mecanismos de regulación de su actividad, se sabe que en estado fosforilado es inactiva, y las cinasas que la fosforilan son: la proteína cinasa C, la proteína cinasa dependiente de AMPc, la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina y la proteína cinasa dependiente de GMPc (Dawson y cols., 1993), así mismo, el efecto contrario la defosforilación a través de la calcineurina es otro mecanismo de regulación para activar a las isoformas de la SON (Morioca y cols., 1998).

Diversas evidencias han sugerido que las tres isoformas de la SON se pueden expresar en astrocitos (Caggiano y Kaig, 1998; Lohrl y cols. 1998), mientras que en la microglía y oligodendrocitos se ha determinado la expresión de SONi solamente (De Groot y cols. 1997; Merrill y cols. 1997). Con respecto a la SONn no existen datos firmes de su expresión en oligodendrocitos o en microglía. Además se ha sugerido que en neuronas sometidas a daño pueden responder a estímulos proinflamatorios y pueden participar en la inflamación cerebral. La expresión de SONi en neuronas ha sido descrita en diversos modelos experimentales incluyendo estimulación por citocinas en cultivos celulares de neuronas así como en modelos animales sometidos a daño y neurodegeneración (Heneka y Feinstein, 2001).

Las altas concentraciones de NO generadas por la SON_i tienen efecto directo a través de reacciones como: nitrosación, nitración y oxidación, el NO reacciona rápidamente con grupos tioles (SH), metales y otros radicales libres.

Una de las reacciones más frecuentes es con las metaloproteínas que tienen grupos heme, como por ejemplo la guanilil ciclasa soluble, el citocromo p450 y la SON. La reacción del NO con la guanilil ciclasa produce un complejo nitrosilo-ferro, que activa la formación de GMPc. Se ha demostrado que la cantidad de NO que se necesita para activar a la guanilil ciclasa es relativamente baja, por lo que se postula que el NO necesario para este proceso proviene del NO sintetizado por la SON_c (SON_n y SON_e).

La SON_c tiene efecto sobre el tono vascular y la función plaquetaria, neurotransmisión y una variedad de interacciones intercelulares. Las interacciones heme/NO con el citocromo p450 que es una familia de proteínas que están involucradas en la síntesis y catabolismo de diversas biomoléculas tal como ácidos grasos, hormonas, prostaglandinas, leucotrienos, así como en la síntesis de hormonas, posiblemente podría regular la síntesis de testosterona y la degradación de xenobióticos (función realizada también por algunas proteínas de la familia p450). Estos ejemplos ilustran que el NO[•] puede activar a enzimas como la guanilil ciclasa, pero también desactivar enzimas como el citocromo p450, por lo que la interacción del NO[•] puede resultar totalmente diferente dependiendo del blanco en el que el NO[•] interactúa.

El NO[•] reacciona con la catalasa que es una heme-proteína, el complejo Fe-NO previene la unión de H₂O₂ al ion metal, y así inhibe su actividad, se ha estimado que para este mecanismo de inhibición ocurra se necesita de 10 a 15 μM de NO[•], concentración que solo se alcanza cuando se activa la SON inducible (SON_i) (Wink y Mitchell, 1998).

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SON

Por otra parte, uno de los mecanismos citotóxicos del NO^\bullet , es la inhibición una enzima mitocondrial la aconitasa por acción del peroxinitrito ($\text{NO} + \text{O}_2^- = \text{ONOO}^-$), además se ha reportado que el NO^\bullet interactúa con la citocromo c oxidasa inhibiendo la respiración mitocondrial. En condiciones de daño o inflamación, el complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) y el complejo II (succinato: ubiquinona oxidoreductasa) son inhibidos de manera irreversible por el NO^\bullet (Madrigal y cols., 2001). Así mismo se sabe que la superóxido dismutasa de manganeso (SODMn) se encuentra en grandes cantidades en la mitocondria ($>5\mu\text{M}$) puede ser una enzima limitante en la producción de peroxinitrito disminuyendo la citotoxicidad mediada por esta molécula, sin embargo se ha demostrado que el peroxinitrito nitrta y desactiva a la SODMn (Murphy 2000). El NO^\bullet puede prevenir la activación de factores de transcripción como $\text{NF}\kappa\text{B}$ y AP-1 por una directa nitración que evita su asociación con el promotor. También se sabe que el NO^\bullet estabiliza a la proteína $\text{I}\kappa\text{B}$ y activa su transcripción. Por otra parte el NO^\bullet inhibe a la adenilil ciclasa tipo I, la proteína cinasa C, y la lipooxigenasa. La heme-proteína ciclooxigenasa (COX) es inhibida por altas concentraciones de NO^\bullet , pero es activada por bajas concentraciones (figura 2). Se ha reportado que la interacción del NO^\bullet con los receptores NMDA media la regulación de calcio intracelular y sirve como un mecanismo protector contra la muerte celular.

El NO^\bullet puede tener diversos efectos sobre la muerte celular programada iniciándola o protegiendo a las células de la apoptosis, esto dependiendo del tipo celular, de su concentración y de su estado redox (Brune y cols. 1998) (figura 2). Las caspasas son blanco del NO^\bullet que inhibe su actividad de una manera irreversible (Kim y cols. 1997). El NO^\bullet

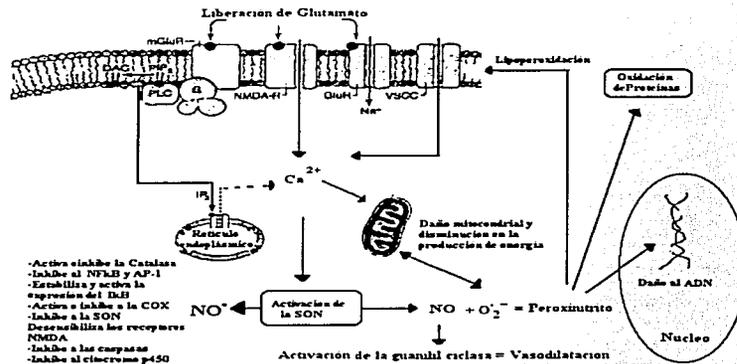


Figura 2. Posible participación del óxido nítrico como agente neuroprotector o neurotóxico después de una lesión traumática de la médula espinal. MGLuR: receptor metabotrópico de glutamato; NMDA-R: receptor N-metil-D-aspartato; GluR: receptor de glutamato; VSCC: canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje; PLC: fosfolipasa C; PIP₂: fosfatidilinositol 4,5 bifosfato; DAG: diacilglicerol; IP₃: inositol 1,4,5; trifosfato; G: proteína G; SON: Sintasa del óxido nítrico; COX: ciclooxigenasa (Diagrama modificado de Siegel y cols. 1998).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

puede ser proinflamatorio por que incrementa la liberación de citocinas como TNF α e IL-6. En un estudio realizado por Packer y Murphy (1995), se demostró que el eflujo de Ca²⁺ y la despolarización de la mitocondria ocurre cuando la producción de peroxinitrito excede los 0.99 \pm 0.03 nmol/min⁻¹/mg⁻¹ de proteína, que se producen en magnitud similar en condiciones patológicas *in vivo*.

Genotoxicidad del óxido nítrico.

Una importante biomolécula blanco para las especies reactivas del óxido nítrico (ERON) es el ADN; su alteración química tiene importantes consecuencias. Se ha postulado que el NO \cdot asociado con la inflamación es un probable candidato en los eventos de genotoxicidad del cáncer (Liu y Hotchkiss, 1995). Existen tres potenciales mecanismos, por los que el NO \cdot puede causar daño al ADN, el primero es la reacción directa de las ERON con la estructura del ADN, la segunda es a través de la inhibición de los procesos de reparación y la tercera es a través de la producción de especies genotóxicas (agentes alquilados y peróxido de hidrógeno). Se ha demostrado que las ERON causan mutaciones en células procariontes y eucariontes, aunque el NO \cdot por si mismo no tiene interacción con biomoléculas tal como el ADN o aminoácidos, sin embargo el trióxido de dinitrógeno (N₂O₃) y el peroxinitrito, alteran químicamente el ADN. Se ha demostrados que el NO \cdot en medio ambiente aeróbico puede causar el rompimiento de la hebra de ADN, así como desaminación de ácidos nucleicos (citocina, adenina y guanina) causando mutaciones. La desaminación resulta en la conversión de citosina a uracilo, guanina a xantina, metilcitosina en timina y adenina en hipoxantina, se ha propuesto que la autooxidación de NO \cdot es la responsable de este daño.

El óxido nítrico como neuroprotector.

Antioxidante.

Durante los procesos metabólicos celulares se generan radicales OH^\cdot al mismo tiempo que se produce NO^\cdot , a pH fisiológico se favorece la formación de ácido nitroso (HNO_2) y de esta manera se inhibe el efecto citotóxico ejercido por estos radicales, además puede ocurrir la reducción del NO^\cdot y generar aniones-nitroxil, que a su vez reaccionan con otra molécula de NO^\cdot para producir monóxido de dinitrógeno (N_2O) e OH^\cdot . Se ha reportado el efecto antioxidante del NO^\cdot en modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson (EP) y en cultivos celulares tratados con (MPTP), utilizando donadores de NO^\cdot (S-nitroso-glutatión (GSNO), S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP)) que bloquean de manera exitosa el estrés oxidativo, inducido en estos modelos de la EP. Por otra parte el nitroprusiato de sodio (SNP), que contiene fierro, no bloquea este proceso, a pesar de que la deferoxamina (quetante de fierro) bloquea la generación de OH^\cdot (Mohanakumar y cols. 2002).

También se tienen evidencias de que el NO^\cdot funciona como neuroprotector por tener la capacidad de atrapar radicales OH^\cdot , así como una alta reactividad con el radical peroxil, con el NO^\cdot mismo, con las hemoproteínas, con el H_2O_2 y con radicales de aminoácidos (Mohanakumar y cols. 2002).

Por otra parte Koh y cols., (1986) reportaron que las neuronas que expresan SON son particularmente resistentes a la neurodegeneración en la enfermedad de Huntington y en la neurotoxicidad mediada por aminoácidos excitatorios, el NO^\cdot puede ejercer efecto inhibitorio sobre los receptores NMDA.

Se ha observado que el NO^\cdot generado por la SONE durante el proceso de la inflamación, disminuye la motilidad de los leucocitos, demostrando que tiene una participación importante como antiinflamatorio (Cirino y cols. 2003), además tiene efecto activador sobre el factor de crecimiento del endotelio vascular por lo que resulta interesante saber que participa en el proceso de angiogénesis.

Apoptosis

En un modelo de cultivo celular (SH-SY5Y) con privación de suero para inducir apoptosis, se demostró que se producen radicales OH^\cdot y NO^\cdot y que el pretratamiento con atrapadores de radicales OH^\cdot como el salicilato de sodio, pero no inhibidores de la sintasa del óxido nítrico (L-NAME y 7-NI) previene el efecto apoptótico (Tsgunobu y cols. 2002), esto se debe probablemente a que el NO^\cdot en altas concentraciones tiene la capacidad de unirse directamente al residuo reactivo tiil (S-) de algunas cisteinas contenidas en las caspasas proapoptóticas y detener su acción, ejerciendo un efecto neuroprotector.

Contrario a lo que se menciona previamente, Shen y cols., (1998) reportaron que el óxido nítrico puede inhibir la apoptosis mediada por $\text{TNF}\alpha$ en células endoteliales humanas solamente cuando se encuentra en bajas concentraciones.

Recientemente se ha reportado la participación del peroxinitrito como una molécula neuroprotectora, capaz de inhibir la apoptosis desencadenada por NO^\cdot (que disminuye el glutatión reducido), en cultivo de neuronas. El peroxinitrito estimula la vía de las pentosas, por medio del incremento de la actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa; ésta activación genera un incremento en las concentraciones de NADPH que es un cofactor importante para la el restablecimiento del glutatión reducido (GSH) (García-Nogales y

cols., 2003). Se ha reportado la muerte de astrocitos en cultivo cuando la concentración de GSH disminuye en un 50% (García-Nogales y cols., 1999).

Finalmente se ha mencionado la participación de los estrógenos como hormonas neuroprotectoras. Se ha demostrado que protegen a las neuronas en cultivo del daño excitotóxico desencadenado por glutamato e incluso del estrés oxidante generado en un modelo de privación nutricional (Behl, 2002) Se ha propuesto que la pregnenolona un precursor directo de la progesterona favorece la recuperación motora en animales sometidos a una lesión traumática, además se sabe que la progesterona administrada en modelos de lesión en el sistema nervioso periférico promueve la formación de nueva mielina. El neuroesteroide sulfato de pregnenolona actúa como un modulador alostérico positivo en los receptores NMDA incrementando la concentración de calcio intracelular, en contraste también se ha reportado que el sulfato de pregnanolona inhibe la corriente de calcio inducida por la activación de los receptores

Como podemos observar la fisiopatología desencadenada después de una lesión es muy compleja, sin embargo con toda esta información generada se han desarrollado diversas estrategias neuroprotectoras para tratar de detener los mecanismos de daño secundario generados después de una lesión en la médula espinal.

Neuroprotección después de una lesión traumática de la médula espinal.

Factores de crecimiento, hormonas y Transplantes.

FACTORES DE CRECIMIENTO, HORMONAS Y TRANSPLANTES

Después de producirse una LTME se observa una pobre regeneración espontánea. Se han reportado diversos eventos que contribuyen con este proceso como la cicatriz glial, (Fawcett y Asher, 1999) la inhibición de la remielinización, (Huber y Schwab, 2000) la propia muerte celular (Beattie y cols. 2000) y la producción insuficiente de factores de crecimiento que permitan la regeneración axonal.

Gliosis y regeneración abortiva.

La activación de las células de la astrogliya y la microglia, (gliosis reactiva), se lleva a cabo después de una lesión al SNC. La gliosis reactiva controla el microambiente extracelular de la médula espinal, regulando la barrera hematoencefálica, la concentración iónica y juega un papel crucial en la regulación de la recaptura y metabolismo del glutamato (aminoácido excitatorio). Además, la glia reactiva también produce varios factores de crecimiento y citocinas, algunos de ellos neuroprotectores, que ayudan a la sobrevivencia de las neuronas dañadas. La microglia activada también promueve la neovascularización en el área de la lesión, un evento crítico en la restauración del daño, mediante este proceso se asegura la liberación de factores tróficos y nutrientes para la subsistencia de las células migrantes y su crecimiento dentro del área dañada (Rabchevsky y Smith, 2001). No obstante que la neuroglia reactiva puede ser benéfica para los procesos de regeneración, también expresa y secreta moléculas que son potencialmente perjudiciales para la regeneración (David, 1998). Se considera que existen dos principales sitios localizados en el SNC donde se encuentra la mayor síntesis de factores que inhiben la regeneración. El primero es donde se forma la cicatriz en la región de la lesión. Cuando se genera una lesión en el SNC, en el área de necrosis se infiltran células gliales y otras células no neuronales, formándose una cicatriz

fibrosa. Los axones no se pueden extender a través de esta y se inhibe su crecimiento. En la punta de los axones se forman estructuras denominadas "bulbos axonales" que pueden permanecer en el lugar por varios meses o años. Diversas moléculas pueden inhibir la regeneración e incrementar su síntesis en el sitio de la cicatriz estas incluyen; el proteoglicano sulfato de condroitina, la tenascina y la semaforina-3A (sintetizada por los fibroblastos). En cultivo de neuronas, se ha demostrado que su empleo inhibe el crecimiento axonal (Davies y cols. 1999; Pasterkamp y cols. 1999). Por otra parte se sabe que la mielina producida por los oligodendrocitos en el SNC es un sustrato que permite un pobre crecimiento axonal *in vitro*. Caroni y colaboradores demostraron que la mielina puede ser convertida en un sustrato más permisivo para el crecimiento axonal *in vitro*, adicionando al medio el anticuerpo monoclonal IN-1 (Caroni y Schwab, 1988). El IN-1 fue producido contra la proteína inhibitoria del crecimiento neurítico asociada a la mielina, un péptido de 250 kDa llamado NI-250, además este anticuerpo también reconoce a otra proteína pequeña inhibitoria del crecimiento neurítico denominada NI-35, encontrada en la mielina de rata pero no en la de humano. Se ha demostrado que el tratamiento con IN-1 en ratas sometidas a una LTME causa una mayor regeneración de los axones corticoespinales, así como un incremento en la recuperación funcional motora (Bregman y cols. 1995). En años recientes se han tenido importantes avances en la caracterización de una proteína sintetizada por los oligodendrocitos que al parecer juega un papel esencial en los procesos de inhibición de la regeneración la denominada proteína Nogo (Chen y cols. 2000). El gen Nogo codifica para tres proteínas (Nogo-A, -B y -C) originadas por splicing alternativo, se sabe que la proteína Nogo-A se localiza en la membrana interna y externa de la vaina de mielina y que tiene dos sitios específicos inhibitorios de la actividad mielinizante, el

fragmento amino terminal (amino-Nogo-A) y una región corta de 66 residuos de aminoácidos (Nogo-66) (GrandPre y cols. 2000). Por otra parte, se ha propuesto que la liberación del amino-Nogo-A podría requerir de la lisis de los oligodendrocitos, evento que ocurriría en el sitio de la lesión. Finalmente, se ha demostrado que existe un incremento en la regeneración de las células de la corteza cerebral y de las células de Purkinje cuando se administran tratamientos con anticuerpos NI-1 y Nogo-A respectivamente (Brittis y Flanagan, 2001).

A diferencia de la pobre regeneración que se observa después de una LTME, en el sistema nervioso periférico se ha observado regeneración axonal, y esta es favorecida por la participación de las células Schwann (CsS). Las CsS fagocitan los residuos de los nervios periféricos dañados, producen factores tróficos y secretan moléculas de la matriz extracelular que promueven el crecimiento axonal. Tomando en cuenta estos antecedentes, se han desarrollado diversas estrategias para aumentar la regeneración en la médula espinal donde se carece de CsS. Una de ellas es proveer al tejido nervioso de diversos factores tróficos. Se ha puesto especial énfasis en la familia de las neurotrofinas como el factor de crecimiento transformante (FCT), el factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT-4/5), además de otros factores de crecimiento como el factor β transformante que incluye el factor neurotrófico derivado de la glía (FNDG). Probablemente el uso de estos factores tróficos resulte efectivo en futuros estudios de lesión traumática de la médula espinal.

Factor de crecimiento neural. (FCN)

FACTOR DE CRECIMIENTO NEURAL (FCN)

El FCN es un potente estimulador del crecimiento axonal sensitivo después de una lesión. Una infusión continua de FCN en la médula espinal rostral promueve el crecimiento de axones sensitivos dentro de la substancia blanca de la columna dorsal (Oudega y Hagg, 1996; Ramer y cols. 2000).

En otros estudios se administró el FCN después de una LTME utilizando un trasplante de fibroblastos primarios que fueron modificados previamente para producir y secretar FCN dentro del sitio de la lesión, los resultados demuestran que el FCN promueve la regeneración (Tuszynski, 1997).

El factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en ingles).

El BDNF ejerce un efecto benéfico promoviendo la regeneración axonal entre los límites del tejido nervioso central y periférico. Novikov y cols., (1997) administraron 10 µg/día del BDNF a ratas. La cuantificación de las motoneuronas en el grupo control (no tratado) demuestra que solo el 10% de las células se preserva a las 12 semanas y del 20 al 40% presentan expresión de la sintasa de óxido nítrico, no así en el grupo tratado con BDNF durante las cuatro primeras semanas postoperación en las que se promueve un 40% la sobrevivencia de las motoneuronas y a las 12 semanas se bloquea completamente la expresión de la sintasa del óxido nítrico. Con estos estudios se ha demostrado que la administración del BDNF induce abundante regeneración de los axones de las motoneuronas.

Factor de crecimiento básico de los fibroblastos (FCbF)

Después de una LTME se ha observado que se incrementa la síntesis de FCbF y se ha propuesto su posible participación en los procesos de recuperación funcional. Con base en

FACTOR DE CRECIMIENTO BÁSICO DE LOS FIBROBLASTOS (FCbF)

estos antecedentes Novikov y cols., (1997) administraron una dosis de 3 o 6 $\mu\text{g}/\text{día}$ de FCbF en un modelo de lesión traumática de la médula espinal por contusión moderada en ratas. En este estudio los animales fueron evaluados durante 6 semanas postlesión. Los resultados indican que existe una mayor y más prolongada reactivación de los astrocitos y de la microglía en el grupo tratado cuando es comparado con el grupo control no-tratado. Además también se probó que la administración del factor por infusión intratecal reduce el daño y favorece la recuperación neurológica después de la lesión. Por otra parte Teng y cols., (1998 y 1999) demostraron que el tratamiento con el factor de crecimiento de los fibroblastos 2 (FCF-2) previene la deficiencia respiratoria después de una LTME a nivel torácico, disminuye la muerte de las neuronas del cuerno ventral, responsables de la innervación de los músculos del sistema respiratorio. Finalmente Lee y cols., (1999) encontraron un efecto neuroprotector del FGF en un modelo de lesión por contusión en ratas, midiendo el tejido preservado.

Hormonas

Las hormonas esteroides son secretadas por las glándulas adrenales y las gónadas, sin embargo también son sintetizadas en el sistema nervioso (neuroesteroides). Diversos estudios señalan que los esteroides tienen la capacidad de promover el crecimiento neurítico y la sinaptogénesis en el hipocampo (Foy, 2001), proteger a las células del estrés oxidativo ya que su estructura química semejante a los 21-aminoesteroides les permite reaccionar con el radical peroxil, además algunos como el 17α -estradiol, el 17β -estrone y el 17β -estriol actúan como atrapadores de radicales libres (Mukai y cols. 1990; Behl, 2002). En modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson donde se administra el

metabolito de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) el MPP+ se ha demostrado que los estrógenos previenen la neurotoxicidad ejercida por el MPP+. Los esteroides incrementan la actividad colinérgica al tener efecto directo en la expresión de la colina-acetiltransferasa (Inestrosa y cols. 1998) y son capaces de prevenir la muerte celular en modelos de daño excitotóxico con kainato un antagonista de los receptores de glutamato del tipo no-NMDA (Azcoitia y cols., 1998). Los esteroides incrementan la expresión de la proteína BCL₂ (antiapoptótica), favorecen la supervivencia neuronal al inducir la transcripción del factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado del cerebro, neurotrofina 3 y su receptor TRKA-C y p75 (Behl, 2002).

Uno de los hallazgos más interesantes son los diversos estudios que se han realizado en mujeres postmenopausicas que han recibido terapia de emplazamiento estrogénico, donde se ha observado que el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer disminuye (Tang y cols., 1996). Por otra parte se sabe, que los estrógenos proveen un soporte trófico para las neuronas y las células gliales después de un daño en el sistema nervioso. Varios trabajos de investigación sugieren que los progestágenos como la pregnenolona un precursor directo de la progesterona favorece la recuperación motora en animales sometidos a una lesión traumática, así como la progesterona administrada en modelos de lesión en el sistema nervioso periférico promueve la formación de nueva mielina, no obstante el neuroesteroide sulfato de pregnenolona actúa como un modulador alostérico positivo en los receptores NMDA incrementando la concentración de calcio intracelular, sin embargo se ha reportado que el sulfato de pregnanolona inhibe los la corriente de calcio inducida por la activación de los receptores NMDA.

Transplantes

Durante varios años se ha propuesto el posible efecto benéfico de los transplantes de tejido nervioso después de una LTME para promover una posible recuperación funcional (Zompa y cols. 1997) Los transplantes pueden estimular el crecimiento axonal, tal vez por la adecuada combinación de diversos tipos celulares y la interacción con varios factores de crecimiento (Taoka y Okajima, 1998a). Se han desarrollado diversos protocolos como cultivos celulares, transplantes de células progenitoras neuronales de embriones dentro del sitio de la lesión en etapas crónicas. En estos estudios se ha demostrado que los transplantes promueven una mayor recuperación funcional, sin embargo los mecanismos que favorecen la recuperación funcional son poco claros (McDonald, 1999).

a) Neuronas derivadas del SNC

Los circuitos neuronales en la médula espinal regulan una compleja función motora, existen al menos dos sistemas descendentes monoaminérgicos para controlar al sistema nervioso locomotor y al sistema nervioso autónomo, uno surge predominantemente del *locus ceruleus*, las neuronas son noradrenérgicas y sus prolongaciones se localizan a todo lo largo de la médula espinal, el otro sistema contiene principalmente células serotoninérgicas y se origina en el núcleo del Rafe de la médula oblonga, sus proyecciones se distribuyen en el cuerno dorsal y ventral de la médula espinal (Rossignol y cols. 1996). Tomando en cuenta esta información se han desarrollado algunos modelos experimentales con neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas derivadas del tallo cerebral de embriones de rata, transplantadas en la médula espinal lesionada por hemisección de ratas adultas, los resultados han demostrado que existen patrones de reinervación, y sinapsis típicas (Gimenez y Ribotta y cols. 1998). Por otra parte se sabe que después de una LTME se

incrementa la síntesis de GABA (neurotransmisor inhibitorio) y que los trasplantes de células embrionarias de Rafe regulan la función gabaérgica manteniendo los niveles normales de dicho neurotransmisor (Dumouli y cols. 2000). Finalmente Bamber y cols., (1999) transplantaron tejido fetal (13 a 15 días) de médula espinal de rata dentro del tejido medular lesionado por hemisección a nivel de T-8 en ratas adultas, utilizando canales miniguías de 1.25 mm de diámetro por 3.0 mm de largo, los resultados demuestran que las neuronas del trasplante del tejido embrionario extienden sus axones dentro del tejido del huésped hasta por 2 mm de longitud tanto en la interfase rostral como en la caudal.

b) Oligodendrocitos

Los trasplantes de los oligodendrocitos en el sitio de la lesión en la médula espinal pueden favorecer la remielinización de los axones para restablecer la transmisión normal del impulso nervioso y mejorar la función neurológica (Jeffery y cols. 1999).

Sin embargo los oligodendrocitos también tienen efecto negativo sobre la regeneración de los axones porque expresan moléculas inhibitorias (Tessier-Lavigne y Goodman, 2000).

c) Células de Schwann

Los trasplantes de nervio periférico promueven la regeneración de la médula espinal, y este efecto puede ser atribuido a la participación de las células Schwann responsables de la mielinización de los axones en el sistema nervioso periférico. Las células de Schwann que son transplantadas en la médula espinal lesionada inhiben la proliferación endógena de la glía y son capaces de remielinizar los axones de la médula espinal. Son además capaces de secretar diversos factores de crecimiento y por lo tanto restablecer la conducción apropiada del impulso nervioso (Menei y cols. 1998).

Chen y cols., (1996) investigaron si el crecimiento axonal aumenta cuando se administra un

tratamiento con metilprednisolona (30 mg/kg) conjuntamente con un trasplante de células de Schwann de nervio ciático periférico purificadas y posteriormente cultivadas dentro del tejido medular lesionado por sección, los resultados demostraron que el tratamiento con metilprednisolona favorece una mejor regeneración axonal.

d) Astrocitos

A pesar de que existe la teoría de que la proliferación astrocítica responsable de la formación de la cicatriz en la zona de lesión impide la regeneración axonal, se han probado trasplantes de astrocitos en la zona de lesión, los resultados demuestran que se incrementa la remielinización y se reduce la formación de la cicatriz (Franklin y cols. 1991), además se ha demostrado que el trasplante de astrocitos inmaduros en la zona de lesión puede estimular la regeneración (Kliot y cols. 1990).

e) Microglía

Otra línea celular que se ha probado para tratar de restablecer la función neurológica son los trasplantes de células de la microglía, y su efecto se ha investigado recientemente. Algunos autores proponen que las células de la microglía incrementan la lesión en el sistema nervioso central por que producen y secretan diversas moléculas citotóxicas, pero también secretan diversas citocinas benéficas y factores de crecimiento (Robchevsky y Streit, 1998). Con base en estos antecedentes los trasplantes de células de la microglía en el sitio de la lesión podrían favorecer la regeneración.

f) Células progenitoras multipotenciales (stem cells)

Estas células inmaduras se generan durante el desarrollo embrionario y han sido aisladas del cerebro (células embrionarias de mesencéfalo) o de la médula espinal. Con el propósito de obtener resultados eficientes en la reparación del tejido nervioso, estas células son

CÉLULAS PROGENITORAS MULTIPOTENCIALES (STEM CELLS)

manipuladas con métodos de ingeniería genética para inducir la síntesis de proteínas específicas como neurotrofinas, neurotransmisores, enzimas, moléculas de la matriz extracelular y moléculas de adhesión superficial (Barami y Díaz, 2000).

En un modelo experimental, se transplantaron células fetales de medula espinal de humano dentro de la sustancia gris dorsal de ratas adultas no lesionadas. Los resultados indican que la sobrevivencia de las células transplantadas es del 1 al 5% después de transcurrir 120 días de realizado el trasplante y el mayor número de células se localizó en la sustancia gris. Estos resultados no aportan evidencias de que las células se hayan diferenciado en neuronas, sin embargo se encontró un fenotipo glial por inmunohistoquímica (Zompa y cols. 1997).

También se han inyectado células precursoras multipotenciales derivadas de la médula fetal a través de la dura madre en el cordón torácico de ratas adultas. Los resultados obtenidos muestran que el tejido donador rellena los espacios en el epicentro de la lesión, además se extiende rostral y caudalmente más de 7 mm. Los estudios inmunohistoquímicos revelan la invasión del trasplante dentro de las fibras del huésped, sin embargo, los estudios de conducta evaluados a través del análisis de la base de soporte y la longitud de la zancada concluyen que la actividad motora espontánea no mejora, solamente se muestra una mejoría significativa 1 semana después del trasplante (Reier y cols. 1992).

En un estudio realizado recientemente se transplantaron células troncales dentro de la médula espinal torácica de rata 9 días después una lesión traumática. El análisis histológico de 2 y 5 semanas después muestra que las células transplantadas han migrado 8 mm alrededor del borde de la lesión y se han diferenciado en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. El análisis de la calidad de la marcha demuestra que los animales tienen

buen soporte del tren posterior y además la marcha es coordinada (McDonal y cols. 1999).

g) Fibroblastos modificados genéticamente.

Después de producirse una LTME se observa una disminución en la función neurológica causada principalmente por la desmielinización de los axones que sobrevivieron al trauma. Se sabe que *in vitro* las neurotrofinas tienen la capacidad de inducir oligodendrogliosis y remielinización axonal. Este efecto fue probado *in vivo* por McTigue y cols., (1998), utilizando transplantes de fibroblastos implantados de manera subcutánea en ratas lesionadas por contusión. Los fibroblastos fueron manipulados genéticamente para tener capacidad de sintetizar diversas neurotrofinas como la neurotrofina-3 (NT-3), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento neural, factor de crecimiento básico de los fibroblastos y como grupo control implantaron fibroblastos con capacidad para sintetizar beta-galactosidasa; 10 semanas después de la lesión, observaron que, todos los transplantes contenían axones, sin embargo los que contenían NT-3 y BDNF mostraron significativamente más axones cuando se compararon con el grupo control, o con los transplantes que producían otro tipo de factor de crecimiento, además se detectó mayor cantidad de proteína básica de la mielina en los transplantes que también sintetizaban NT-3 y BDNF, estos resultados sugieren un incremento en la mielinización. Finalmente para determinar si la mielinogénesis se asociaba con la proliferación de oligodendrocitos, se utilizó bromodeoxiuridina (BrdU) como marcador de la división celular. Los resultados demostraron que en los transplantes con NT-3 y FNDC se observó una mayor cantidad de oligodendrocitos positivos a BrdU que en el grupo control. Estos resultados sugieren que la NT-3 y el FNDC inducen mielinogénesis como resultado de un incremento en la proliferación de los oligodendrocitos.

h) Glía envolvente del bulbo olfatorio (ensheating cells).

Se sabe que la glía envolvente del bulbo olfatorio (ensheating cell) (EC) tiene propiedades fisiológicas y morfológicas similares a las células de Schwann. Se sabe que tienen la capacidad de reducir la cavitación quística postraumática así como disminuir la formación de la cicatriz astrocítica que se forma en el sitio de la lesión. De manera interesante se ha demostrado que en las cavidades de la médula espinal lesionada, ocurre un crecimiento axonal considerable a través de tubos poliméricos cubiertos con células de Schwann sembradas en una biomatriz especial, este crecimiento se incrementa cuando son coimplantadas con EC (Ramón-Cueto y cols. 1998). En la mayoría de los estudios se reporta una mejora funcional después de un trasplante de células de Schwann junto con EC, sin embargo también se ha observado recuperación funcional utilizando únicamente EC (Ramon-Cueto y cols. 2000).

Farmacoterapia después de una lesión traumática de la médula espina

Corticoesteroides

El uso de los corticoesteroides en el tratamiento de la lesión medular se ha estudiado ampliamente, se sabe que su empleo resulta benéfico por las propiedades antiinflamatorias de estos fármacos reduciendo la formación de edema generado a su vez por el proceso inflamatorio local (Ducker y Zeidman, 1994). La Metilprednisolona (MP) se considera el fármaco de elección para el tratamiento del paciente con LTME. Se sabe que la MP ejerce un efecto neuroprotector al suprimir la respuesta inflamatoria tisular vía la inhibición de la función de las células inflamatorias, incluyendo la quimiotaxis (Espersen y cols. 1989), la

FARMACOTERAPIA DESPUÉS DE UNA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÈDULA ESPINAL

fagocitosis (Becker y Grasso, 1985), la síntesis de mediadores inflamatorios y la liberación de enzimas lisosomales (Schleimer y cols. 1989; Bartholdi y Schwab, 1995). Además, la MP, tiene la capacidad de inhibir a la fosfolipasa A₂ (Hargreaves y Costella, 1990), enzima que cataliza la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana, que a su vez dan inicio a la formación de eicosanoides sintetizados por la activación de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa. La producción de eicosanoides exagera la respuesta inflamatoria y por lo tanto la producción de radicales libres (RL) (Williams y Higgs, 1988; Flowers, 1989). Se han realizado tres importantes estudios para evaluar la eficiencia de la MP en pacientes con LTME. En el primer estudio nacional (Estados Unidos) de lesión traumática de la médula espinal aguda (NASCIS-I por sus siglas en ingles), se trató a 330 pacientes y se evaluó la eficacia de la MP administrada en un bolo inicial de 1g i.v. seguido de una dosis de 100mg/día por 10 días, este grupo fue comparado con un grupo control que solo recibió placebo. Los resultados no fueron satisfactorios lo que llevó a cuestionar la eficacia del fármaco (Bracken y cols. 1984 y 1985). Posteriormente, se llevó a cabo el segundo estudio (NASCIS-II) donde se evaluó la eficacia de la MP con una dosis de un bolo inicial de 30mg/kg en los primeros 15 minutos y 45 minutos después una infusión continua de 5.4 mg/kg/h por 24 h (Bracken y cols. 1990 y 1992), sin embargo, nuevamente se produjo controversia en los resultados ya que existían tendencias de menor recuperación motora en los pacientes cuyo inicio del tratamiento fue después de las primeras 8 h, además, los criterios de evaluación usados en el NASCIS-II no permitieron a los investigadores determinar si la MP mejoraba la función neurológica en el nivel del sitio lesionado o si la recuperación neurológica era por debajo de la lesión. Los resultados confirmaron que el inicio del tratamiento con MP debe ser dentro de las primeras 8 h

FARMACOTERAPIA DESPUÉS DE UNA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL

después de la lesión, sin embargo, en pacientes con lesión medular completa no se observó mejoría alguna por el tratamiento (Bracken y cols. 1992). No obstante estos hallazgos, los resultados del NACIS-II fueron ampliamente cuestionados. En un tercer estudio (NASCIS-III) se desarrollo un nuevo tratamiento de 48 h con MP iniciando con un bolo de 30mg/kg i.v. seguido de una infusión continua de 5.4 mg/kg/h por 48 h que podría llevar a una mejor recuperación neurológica que la dosis anteriormente empleada (un bolo inicial de 30mg/kg en los primeros 15 minutos y 45 minutos después una infusión continua de 5.4 mg/kg/h por 24), además en este mismo estudio se probó la eficacia del mesilato de tirilasad (MT) un potente fármaco no glucocorticoide que tiene la capacidad de inhibir la lipoperoxidación, finalmente también se evaluaría la administración de la MP en pacientes con lesión completa y lesión incompleta. En este estudio no se incluyó un grupo de pacientes a los que solamente se les tratara con placebo ya que previamente se conocían los beneficios de la MP (Bracken y cols. 1997 y 1998), sin embargo, también en este estudio se excluyeron los pacientes con lesión por arma de fuego y los que presentaban un peso de más de 109 kg. Los resultados de este estudio indican que la MP se debe administrar en dosis altas y únicamente por 24 horas en los pacientes que inician el tratamiento dentro de las primeras 3 horas no así en los pacientes que iniciaron el tratamiento después de las 3 y hasta las 8 horas, ellos deben someterse a un tratamiento por 48 horas, finalmente en los pacientes tratados con mesilato de tirilasad por 48 horas presentaron mejoría funcional solo con la administración conjunta de MP por 24 horas (Bracken y cols. 1997), (tabla I). 2/ *Aminoesteroides (Lazaroides)*

En diversos reportes de la literatura se ha mencionado que los 21-aminoesteroides, parecen

tener un efecto neuroprotector después de una lesión al SNC con base en tres diferentes mecanismos de acción: a) actúan como atrapadores de RL, especialmente del radical lipoperoxilo e hidroxilo (Braugher y cols. 1988) inhibiendo la LP, b) funcionan como quelantes del hierro (Hall y cols. 1992; Coates y cols. 1995) y, c) mantienen los niveles de vitamina E, actuando sobre el núcleo hidrofóbico de las membranas celulares con un efecto estabilizador sobre estas (Hall y cols. 1992). En modelos experimentales de lesión medular se ha observado que favorecen la recuperación funcional y previenen la disminución del flujo sanguíneo consecuencia del traumatismo (Coates y cols. 1995). El 21-aminoesteroide U-74006F mesilato de tirilazad (MT) fue probado por Anderson y cols., (Anderson y cols. 1988) en un modelo experimental de LTME en gatos. En este estudio, se evaluó el efecto de diferentes dosis que van de 1.6 a 160 mg/kg/48 horas sobre la recuperación motora de los animales. Los resultados mostraron que existe una mayor recuperación funcional (hasta de un 75%) a las 4 semanas en todos los grupos tratados cuando fueron comparados con el grupo que solo recibió tratamiento placebo. Hall (Hall, 1988) comparó el efecto de dos diferentes dosis de MT (3 mg/kg y a 10 mg/kg) sobre el flujo sanguíneo en la médula espinal. En este estudio se observó que la segunda dosis fue más eficiente para mejorar el flujo sanguíneo.

Por otra parte, los metilaminocromanos son fármacos desarrollados a partir de los lazaroides, a los cuales les fue reemplazado una parte de su estructura química por la estructura cíclica antioxidante de la vitamina E (por ejemplo, el cromanol). Tienen acciones farmacológicas similares a los lazaroides pero con mayor potencia (cinco veces mas aproximadamente). Se ha demostrado un aumento en la recuperación neurológica en ratones con LTME tratados con este fármaco (Hall y cols. 1992).

TABLA 1

Tabla 1. Efecto del tratamiento con Metilprednisolona administrada sola o en combinación con otros fármacos en pacientes con LTME. Reportes de los tres estudios realizados por la National Acute Spinal Cord Injury Study.

Tipo de Investigación	Fármaco y dosis	Resultados
<p>NASCIS-1 Evaluación de 330 pacientes Condiciones del estudio: Dos tratamientos a) Dosis bajas de MP b) Dosis altas de MP</p>	<p>a) Dosis altas de MP. 1 bolo inicial de 1 g i.v. y 1 g /día por 10 días b) Dosis bajas de MP. 1 bolo inicial de 100 mg i.v. y 100 mg /día por 10 días</p>	<p>Se requiere de una dosificación intravenosa prolongada. La MP tiene una curva dosis respuesta bifásica Su dosificación debe ser mas frecuente.</p>
<p>NASCIS-2 Evaluación en 487 pacientes Condiciones del estudio: Dos tratamientos a) MP/23 h b) Naloxona/23 h Dos tiempos de inicio del tratamiento a) Dentro de las primeras 8 hrs. b) Después de las primeras 8 hrs</p>	<p>a) MP: 1 bolo inicial i.v. de 30 mg/kg durante 15 min., una pausa de 45 min e infusión continua por 23 h a una dosis de 5.4 mg/kg/h b) Naloxona: 1 bolo inicial de 5.4 mg/kg, pausa de 45 min. e infusión continua por 23 h a una dosis de 4 mg/kg/h.</p>	<p>Tratamiento con MP dentro de las primeras 8 h después de la LTME, mejor recuperación funcional a las 6 semanas y a los 6 meses. Inicio del tratamiento con MP después de las primeras 8 h, no existe recuperación funcional. Tratamiento con Naloxona no se observa recuperación funcional Complicaciones y mortalidad similar en todos los grupos</p>
<p>NASCIS-3 Evaluación de 499 pacientes Condiciones del estudio: Tres tratamientos c) MP/24 h d) MP/48 h e) MT/48 h Dos tiempos de inicio del tratamiento b) Dentro de las primeras 3 hrs. c) A partir de las 3 h y hasta 8 hrs.</p>	<p>a) MP: 1 bolo inicial i.v. de 30 mg/kg y una infusión continua por 24 o 48 h a una dosis de 5.4 mg/kg/h b) MT: 1 bolo de 2.5 mg/kg cada 6 h por 48 hrs.</p>	<p>Inicio del tratamiento con MP dentro de las primeras 3 h, mejor recuperación funcional en los tres grupos. Tratamiento con MP por 24 h, disminución de la recuperación funcional a las 6 semanas y a los 6 meses en los pacientes en los que se inició el tratamiento a partir de 3 h y hasta 8 h después de la LTME Tratamiento con MP por 48 h, mejor recuperación a las 6 semanas y a los 6 meses en los pacientes en los que se inició el tratamiento a partir de 3 h y hasta 8 h después de la LTME Los pacientes tratados con MT (48 h) mostraron una recuperación similar que la de los pacientes tratados con MP durante 24 hrs. Conclusiones: a) Inicio de la administración de MP dentro de las primeras 3 hrs., tratamiento por 24 h b) Inicio de la administración de MP entre 3 y hasta 8 h, tratamiento por 48 h</p>

NASCIS, National Acute Spinal Cord Injury Study; MP, Metilprednisolona; MT, Mesilato de tirilazad; LTME, Lesión traumática de la médula espinal.

Antagonistas de receptores a opioides

El incremento de los niveles endógenos de opioides después de una LTME en su fase aguda y la subsecuente activación de sus receptores puede contribuir a exacerbar el daño secundario. Por esta razón se han desarrollado estrategias farmacológicas utilizando antagonistas para los receptores opioides.

La naloxona, un antagonista no específico de receptores opioides es el agente farmacológico mas estudiado, su administración ha demostrado tener efectos benéficos en modelos experimentales de LTME severa, sin embargo no todos los estudios han confirmado estos beneficios (Olsson y cols. 1995). En el estudio realizado por el NASCIS-II con naloxona administrada en un bolo intravenoso a una dosis de 5.4 mg/kg seguida por una infusión de 4 mg/kg por 23 horas, indican que es un fármaco que no debe ser empleado en el manejo de pacientes con LTME (Bracken y cols., 1992). No obstante, también se ha descrito que en pacientes con lesión medular incompleta la administración de naloxona dentro de las primeras 8 horas después de la lesión favorece la recuperación funcional con respecto a los pacientes que solo recibieron placebo (Bracken y cols. 1993). En este trabajo se concluye que la administración de la naloxona requiere de mayores estudios en modelos experimentales y clínicos.

Mas recientemente se ha reportado que la administración de la naloxona en combinación con un antagonista para el receptor del factor activador de las plaquetas el BN52021 mejora la función neurológica, en un modelo experimental de LTME realizada en gatos a nivel de la sexta vértebra cervical (Xiao y cols. 1998).

Finalmente en un estudio realizado por Chang y cols., (2000) para tratar de esclarecer el mecanismo por el cual la naloxona tiene efecto neuroprotector en modelos de lesión medular, se evaluó el efecto de la naloxona sobre la producción de anión superóxido y NO en una línea celular de microglía murina (BV2) estimulada con lipopolisacárido y tratadas previamente con naloxona. Los resultados demuestran que el tratamiento con naloxona disminuye la producción de anión superóxido hasta en un 35% en las células de la microglía, evento que se traduce en una menor producción de peroxinitrito ($O_2^{\cdot -} + NO^{\cdot}$) y probablemente una disminución del estrés oxidante y del daño celular (tabla II).

Gangliosidos

Los gangliosidos son complejos de glicolípidos ácidos que están presentes en altas concentraciones dentro de las células en el SNC, como un componente importante de las membranas (Geisler y cols. 1991; Schwab y Bartholdi, 1996). El monosialotetrahexosilgangliosido (gangliosido GM-1) se encuentra en el sistema nervioso central principalmente en los axones de las neuronas, en la mielina y en las células gliales dentro de la sustancia blanca (Imanaka y cols. 1996). En los estudios realizados en animales utilizando el gangliosido GM-1 (Sygen) se observa un incremento en la velocidad del crecimiento neurítico y un estímulo de la regeneración axonal, además se ha reportado que el gangliosido GM-1 también protege de la degeneración retrógrada y anterógrada en modelos experimentales de lesión del SNC (Geisler y cols. 1991; Imanaka y cols. 1996). Así mismo se ha reportado que el gangliosido GM-1 tiene la capacidad de atenuar la liberación de aminoácidos excitatorios (Rhoney y cols. 1996). En un estudio realizado por Geisler y cols., (1991) administrando el gangliosido GM-1 dentro de las primeras 72 horas

a una dosis de 100mg/día i.v. durante 18 a 32 días, observaron que después de un año de evaluación se presentaba una mayor recuperación neurológica en los pacientes tratados con dicho fármaco.

Recientemente fueron publicados los resultados obtenidos de un estudio realizado en pacientes con LTME y tratados con Sygen administrado en dosis bajas de 300 mg seguida de una dosis de 100 mg/ día por 56 días y a dosis altas de 600 mg seguida de una dosis de 200 mg/día/56 días, estos dos grupos experimentales fueron comparados con el grupo control que solo recibió tratamiento placebo. Cabe mencionar que todos los pacientes recibieron tratamiento con metilprednisolona de acuerdo a la dosificación acordada en el NASCIS II. Los datos iniciales obtenidos de 28 pacientes muestran que existe una mejoría funcional (50% vs 7.1% $p=0.034$) cuando son sometidos a tratamiento con Sygen a las 8 semanas después de la lesión. La recuperación funcional fue evaluada con base en la eficiencia primaria utilizando diversas pruebas de toque ligero, la escala pinprick y las escalas motoras de la American Spinal Injury Association (ASIA). Además se observó una mejor función del intestino, de la vejiga, de la sensación sacral y la contracción anal. Finalmente, en los pacientes con lesión menos severa, se observó que no se obtiene ningún beneficio con dicho tratamiento, como conclusión de este estudio se indica que el tratamiento con Sygen solo proporciona beneficios a pacientes con lesión traumática severa (tabla II) (Geisler y cols. 2001).

Regulación de canales de calcio

El incremento excesivo en la concentración del calcio intracelular dispara mecanismos de daño que llevan a la muerte celular ya sea por apoptosis o necrosis. Diversos autores han

sugerido que la regulación de los mecanismos del transporte del calcio sería una buena estrategia terapéutica. Con base en este planteamiento se ha probado el efecto neuroprotector de la nimodipina (bloqueador de canales de calcio) fármaco que reduce la isquemia postraumática, pues se ha observado que la acumulación de calcio produce vasoespasmo (Fehlings y Tator, 1989).

En un estudio reciente realizado por Pointillart y cols., (2000) fue evaluado el efecto de la metilprednisolona ($30 \text{ mg/kg}^{-1}/\text{h}$ seguida de $5.4 \text{ mg/kg}^{-1}/\text{h}^{-1}$ por 7 días) y de la nimodipina ($0.015 \text{ mg/kg}^{-1}/\text{h}^{-1}$ por 2 h seguida de $0.03 \text{ mg/kg}^{-1}/\text{h}^{-1}$ por 7 días) administradas por separado o de manera conjunta en 48 pacientes con paraplegia y 58 con tetraplegia, estos tres grupos se compararon con un grupo control el cual no recibió ningún tipo de tratamiento. Los pacientes fueron sometidos a una evaluación neurológica con la escala de la ASIA (que evalúa las deficiencias motoras y sensitivas) durante un año. Los resultados obtenidos de este estudio indican que no se observa ningún efecto benéfico en los pacientes tratados con MP ni con nimodipina. En este estudio los autores sugieren que el tratamiento con metilprednisolona y con nimodipina en pacientes con LTME debería ser reconsiderado (tabla II).

Antagonistas o bloqueadores de receptores NMDA y No-NMDA

Después de producirse una LTME existe una liberación de gran cantidad de aminoácidos excitatorios, como el glutamato y el aspartato que al unirse a sus receptores desencadenan el fenómeno de la excitotoxicidad que juega un papel muy importante en los procesos de daño secundario. Los antagonistas competitivos pueden causar inhibición de los receptores glutamatérgicos del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) al unirse a los sitios de

ANTAGONISTAS O BLOQUEADORES DE RECEPTORES NMDA Y NO-NMDA

reconocimiento del glutamato; los fármacos antagonistas no competitivos se unen al canal asociado al receptor NMDA y producen inhibición del receptor. Existen además antagonistas del sitio de unión del coagonista glicina que igualmente causa la inhibición del receptor NMDA (Choi, 1987). Diversos fármacos han sido probados en modelos experimentales de lesión traumática; entre ellos la memantina, un antagonista de los receptores NMDA que tiene alta afinidad por los receptores NMDA de la médula espinal, esta capacidad fue evaluada por vonEuler y cols. (1997), sin embargo los autores reportan que no se observa ningún efecto neuroprotector en modelos de isquemia ni de LTME. Por otra parte, Liu y cols., (1997) y Haghghi y cols., (1996) evaluaron el efecto de la dizocilpina (MK-801) un antagonista de los receptores NMDA y el NBQX un antagonista de los receptores no-NMDA, en un modelo de excitotoxicidad por inyección intraspinal con NMDA y ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metiloxazol-4-propionico (AMPA). Los hallazgos demuestran que el modelo reproduce el efecto excitotóxico originado después de una LTME y que el MK-801 y NBQX inhiben el efecto del NMDA y del AMPA respectivamente, además proponen que el uso de estos fármacos podría ser benéfico como tratamiento terapéutico después de una LTME. Además Wada y cols., (1999) proponen que los antagonistas de los receptores NMDA tienen la capacidad de inhibir la apoptosis (muerte celular programada), observación que corrobora el trabajo de Anneser y cols., (1998) donde se concluye que la activación de los receptores NMDA incrementa la apoptosis en un cultivo celular de motoneuronas de embriones de pollo. Finalmente Lang-Landunzki y cols., (1999) proponen el uso del riluzol, un fármaco neuroprotector con capacidad para bloquear la neurotransmisión glutamatérgica. En su estudio los autores desarrollaron un modelo experimental de isquemia medular en conejos.

que recibieron una dosis de riluzol de 8 mg/kg i.v. antes de la isquemia, los resultados demostraron que el riluzol atenúa la necrosis, la apoptosis y la proteólisis del citoesqueleto inducida por la isquemia, esto de manera dosis dependiente (tabla II).

Manejo de las reacciones de la neuroinflamación.

Diversos autores han demostrado que los procesos inflamatorios pueden iniciar una cascada de daño secundario en el tejido nervioso, con la progresiva formación de cavidades quísticas y la producción de una cicatriz fibrilar, ellos sugieren que las moléculas específicas que promueven la inflamación tal vez juegan un papel muy importante en la neuropatología del daño secundario (Carlson y cols., 1998, Fitch y cols., 1999). Sin embargo, otros autores señalan que la respuesta inflamatoria podría tener efectos benéficos después del daño, como son: la limpieza de los *debris* celulares y la síntesis de factores tróficos y citocinas, se ha reportado, que la presencia de macrófagos y microglía activados promueve la regeneración axonal (Hauben y Schwartz, 2003) y probablemente podrían tener efecto neuroprotector durante el daño excitotóxico. Recientemente se demostró que la microglía tiene participación en la recaptura del glutamato (Nakajima y cols., 2001).

Por otra parte se ha comprobado que la presencia de los linfocitos T y B favorecen una mejor recuperación funcional después de un daño en el SNC (Moalem y cols., 2000).

Durante la respuesta inflamatoria generada después de una lesión en la médula espinal, se ha observado la presencia de receptores TrKA (para el NGF) y la síntesis de diversas neurotrofinas (NT3, NT4/5) en clones de linfocitos T del tipo CD-4 (Santambrogio y cols., 1994 Moalem y cols., 2000) así como, la síntesis del NGF en los linfocitos B, los macrófagos, la microglía, los mastocitos, los eosinófilos y los basófilos, (Torcia y cols.,

1996; Elkabes y cols., 1996; Heese y cols., 1998; Leon y cols., 1994; Solomon y cols., 1998; Burgi y cols., 1996), además se observó que los linfocitos B y los monocitos, tienen la capacidad de sintetizar BDNF. Con base en estos hallazgos se ha sugerido que el efecto neuroprotector de las células que participan en la respuesta inflamatoria se debe a la capacidad que tienen de sintetizar y secretar factores tróficos como el BDNF y NGF así como diversas neurotrofinas, sin embargo la autoinmunidad debe estar presente en el tiempo correcto y con la intensidad adecuada (Hauben y Schwartz, 2003).

Modulación de la respuesta inflamatoria

El enfoque propuesto de modular la respuesta inflamatoria después de la lesión ha llevado a desarrollar otras estrategias terapéuticas como la atenuación de la migración de los leucocitos. Con base en estos antecedentes se han utilizado anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra las moléculas de adhesión que incluyen la selectina-P (Taoka y cols. 1997a) e ICAM-1 (Hamada y cols. 1996), estos podrían tener efectos neuroprotectores, así como el empleo de anticuerpos monoclonales contra la integrina alfa-D, una proteína de adhesión al endotelio vascular para macrófagos y neutrófilos⁴⁹. Es bien conocido que, como resultado de la LTME se incrementa la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, alterando el flujo sanguíneo y favoreciendo la agregación plaquetaria lo que trae como consecuencia el fenómeno de isquemia. Para tratar de contrarrestar este fenómeno se han desarrollado estrategias terapéuticas para inhibir a las enzimas responsables de la síntesis de estas moléculas (ciclooxigenasa y lipooxigenasa). En un modelo experimental de LTME en gatos, se probó la eficacia de la naloxona comparada con una combinación de indometacina/heparina (4 mg/kg y 300 U/kg respectivamente) y

prostaciclina (200ng/kg/min), los tratamientos fueron iniciados 1 hora después de la lesión, los resultados demostraron que existe una recuperación neurológica significativamente mayor en todos los grupos tratados cuando se comparan con el grupo control al cual solo se le administró placebo, por otra parte la eficacia de los tratamientos fue similar en todos los grupos (tabla II) (Hallenbeck y cols. 1983).

Immunosupresores

El Tacrolimus (FK506) un inmunosupresor que es utilizado en la clínica en pacientes sometidos a transplantes, ha demostrado incrementar la velocidad de regeneración del nervio ciático de la rata (Gold y cols. 1995). Por otro lado Bavetta y cols., (1999) demostraron en un modelo experimental de LTME en ratas, que el FK506 administrado a una dosis de 0.5 o 2.0 mg/kg actúa como agente neuroprotector y regenerador sobre axones de la columna dorsal de la médula espinal, además los autores comparan al FK506 con la MP y concluyen que el FK506 es mejor neuroprotector que la MP.

Finalmente otros tratamientos incluyen el iloprost, el mesilato de gabexate que inhiben la activación de los leucocitos y disminuyen el disturbio motor después de una compresión de la médula espinal (tabla II) (Taoka y cols. 1997b).

Antioxidantes

Como ya se mencionó previamente, después de una LTME se incrementa la producción de radicales libres originando estrés oxidante, bajo estas condiciones se desencadena el fenómeno de lipoperoxidación que daña las membranas celulares, se ha sugerido que esto puede llevar a la degeneración celular postraumática. Así, numerosos estudios han evaluado

el uso de diversos agentes farmacológicos para inhibir el estrés oxidante. Kaptanoglu y cols., (1999), y Abe y cols., (1997), administraron el mexilatine y el OPC-14117 a dosis de 50 mg/kg i.p . y de 10 a 30 mg/kg, respectivamente para probar su capacidad antioxidante en un modelo experimental de LTME, los resultados demostraron que el tratamiento con dichos fármacos disminuye la lipoperoxidación y protege la ultraestructura del tejido medular después de la lesión, además el OPC-14117 tuvo la capacidad de preservar a las motoneuronas.

Otro fármaco que se ha propuesto como agente neuroprotector por su capacidad para atrapar diversos radicales libres como el radical hidroxilo, el peroxilo y el alcoxilo y prevenir la oxidación de los grupos tioles (SH) de las proteínas, es el pirudoindol estobadin, su capacidad antioxidante fue probada en diversos modelos experimentales de isquemia/reperfusión e hipoxia/reoxigenación. El tratamiento con pirudoindol estobadin mejoró la sobrevivencia de los animales, restauró la transmisión sináptica, mantuvo los niveles de grupos SH en el tejido y disminuyó la lipoperoxidación. Además mejoró el sistema intracelular de secuestro del calcio y disminuyó la oxidación de lipoproteínas de baja densidad que juegan un papel importante en el desarrollo de aterosclerosis (tabla II) (Horakova y Stolc, 1998).

Regulación de la síntesis de NO

Después de una LTME se incrementa la actividad de las tres isoformas de la sintasa del óxido nítrico, y por lo tanto las concentraciones de NO podrían ser citotóxicas. Diversos

estudios demuestran que el uso de inhibidores de la síntesis de óxido nítrico acelera la recuperación motora después de la lesión de la médula espinal. Nemoto y cols. (1997), demostraron que la administración de N(G)-monometil-L-arginina (L-NMMA) a una dosis de 10 mg/kg favorece la recuperación funcional en ratas. Así mismo Hamada y cols., (1996) administraron, durante la fase aguda de la lesión en un modelo experimental en ratas, NG-nitro-L-arginina metiléster (L-NAME). Los resultados mostraron que el uso de este fármaco promueve una mayor recuperación funcional que la observada en los animales que no fueron sometidos a dicho tratamiento, sin embargo la participación del óxido nítrico después de una lesión no solamente tiene efectos citotóxicos potenciales, sino también puede tener efectos benéficos como su participación en la vasodilatación, con base en estos antecedentes se han utilizado inhibidores específicos de las tres isoformas de la SON. Hu y cols. (1999), administraron aminoguanidina a una dosis de 1 μ mol, un fármaco que inhibe específicamente a la SON inducible (propuesta en la literatura como la isoforma productora del óxido nítrico citotóxico) y un inhibidor de la SON constitutiva neuronal, el 7-nitroindasol, a una dosis de 1 μ mol, en este trabajo se indujo el daño medular por la administración de dinorfina. Los resultados sugieren que la producción moderada de óxido nítrico en las células endoteliales tiene un aparente efecto neuroprotector mientras que la sobreproducción de óxido nítrico a nivel neuronal induce neurotoxicidad.

Así mismo Zang y cols. (2003), en un modelo de lesión de la médula espinal por compresión en ratas, demostraron que el tratamiento con aminoguanidina administrada 1 hora antes una lesión y 8, 24 y 36 horas después del daño, inhibe la apoptosis y mejora la función motora

Otras posibles estrategias

El clembuterol revierte la atrofia muscular después de una LTME cuando se administra a una concentración de 10mg/kg por día. Este fármaco es un agonista del receptor β adrenérgico, que al ser estimulado promueve que se expresen diversos factores tróficos, además se ha observado que por medio de este mecanismo se promueve tanto la regeneración como la neuroprotección (Zeman y cols. 1999).

El incremento de la actividad de los receptores GABAérgicos a través del uso del clometiazol (CMZ) es una estrategia terapéutica neuroprotectora propuesta por Farroque y cols., (1999) en un modelo de LTME. Los autores probaron el efecto neuroprotector del CMZ a una dosis de 150 mg/kg y evaluaron la recuperación motora después del daño. Los resultados demuestran el CMZ mejora la función motora y atenúa el daño morfológico.

Se ha probado la eficacia del sulfato de magnesio ($MgSO_4$) como agente neuroprotector después de una LTME sobre la función de los axones y la lipoperoxidación en modelos experimentales de lesión medular en ratas. Suzer y cols., (1999) probaron dos diferentes dosis de $MgSO_4$ (300 y 600 mg/kg) y demostraron que tiene un efecto neuroprotector sobre la transmisión eléctrica somatosensorial y sobre la lipoperoxidación de manera dosis dependiente.

Tratamiento en la etapa crónica de la LTME

El tratamiento con la 4-aminopiridina es una opción para el tratamiento en etapas crónicas de la LTME. Es un fármaco con efecto inhibitorio sobre los canales de potasio. Su administración promueve la recuperación de la función neurológica (tabla II) (Segal y cols. 1999).

TABLA II

TABLA II. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS EN LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL

Agente	Efecto	Modelo experimental	Referencia
Coricoesteroides Metilprednisolona	Antiinflamatorio, reduce la formación de edema, antioxidante. Inhibición de la fosfolipasa A ₂ . Tratamiento no beneficioso	En humanos y en animales	Bracken y cols., 1985,1985,1992,1997 y 1998. Pointillart y cols., 2000
21-Aminoesteroides (Lazaroides) U-74006F Mesilato de tirilazad	Antioxidante (inhiben la peroxidación), mantiene los niveles de vitamina E y previene la disminución del flujo sanguíneo..	En humanos y animales	Blaighler y cols., 1988Hall y cols., 1992 Coates y cols., 1995 Anderson y cols., 1988
Antagonistas de receptores opioides Naloxona	En pacientes no tiene efectos beneficios En modelos animales favorece la recuperación funcional y disminuye la producción de superóxido en la microglia	En humanos y en animales	Olsson y cols., 1995 Bracken y cols., 1992 y 1993 Xiao y cols., 1998 Chang y cols., 2000
Gangliosidos Monosialotetrahexo-silgangliosido (gangliosido GM-1)	Incrementa la velocidad de crecimiento neurítico y estimula la regeneración axonal. Atenúa la liberación de aminoácidos excitatorios	En humanos y en animales	Geisler y cols., 1991 Imanaka y cols., 1996. Rhoney y cols., 1996
Regulación de canales de calcio Nimodipina	Bloquea los canales de calcio, reduce la isquemia postraumática. Tratamiento no beneficioso.	En humanos y en animales	Fehlings y cols., 1989. Pointillart y cols., 2000
Antagonistas de receptores NMDA y no-NMDA Dizocilpina (MK-801) NBQX . Riluzol.	Inhiben la excitotoxicidad originada después de una LTME. Inhiben la apoptosis Bloqueo de la neurotransmisión glutamatergica	En animales	Haghighi y cols., 1996 Liu y cols., 1997 VonEuler y cols., 1997 Anneser 1998 Wada y cols., 1999 Lang-Landunzki y cols., 1999
Moduladores de la respuesta inflamatoria e inmunosupresores Naloxona Iloprost, mesilato de gabexate. Ciclosporina-A. Tacrolimus (FK-506)	Disminuye la respuesta inflamatoria. Inhiben la activación de leucocitos. Disminuye la lipoperoxidación Se incrementa la velocidad de regeneración	En animales	Hallerbeck y cols., 1983. Taoka y cols., 1997 Diaz-Ruiz y cols., 1999 y 2000 Gold y cols., 1995 Bavetta y cols., 1999
Antioxidantes Mexilatin, OPC-14117 Estobadin de pirudoindol	Disminuyen la lipoperoxidación, preservan a las motoneuronas, previenen la oxidación de grupos SH	En animales	Kaptanoglu y cols., 1999. Abe y cols., 1997. Horakova y cols., 1998.
Inhibidores de la SON N(G)-monometil-L-arginina (L-NMMA) NG-nitro-L-arginina metilester (L-NAME) Aminoguanidina, 7-nitroindasol	Aceleran la recuperación motora,	En animales	Nemoto y cols. 1997 Hamada y cols., 1996 Hu y cols., 1999
Clenbuterol	Agonista de receptores β_2 -adrenérgicos, estimula la síntesis de diversos factores tróficos.	En animales	Zeman y cols. 1999
Clometiazol (CMZ)	Incrementa la actividad de los receptores GABAérgicos, mejor recuperación motora	En animales	Farooque y cols., 1999
Sulfato de Magnesio	Disminuye la lipoperoxidación, mejora la transmisión eléctrica somatosensorial.	En animales	Süzer y cols., 1999
4-aminopiridina	Inhibe los canales de potasio, favorece la recuperación neurológica	En humanos y animales	Segal y cols., 1999

LTME: Lesión traumática de la médula espinal.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Ciclosporina-A

La ciclosporina-A es un fármaco inmunosupresor, lipofílico, neutral y cíclico de 11 aminoácidos, con un peso molecular de 1,202.6 extraído del hongo *Tolypocladium inflatum* Gams. Su sitio inmunosupresor se localiza en los aminoácidos colocados en las posiciones 11, 1, 2 y 3 (figura 3).

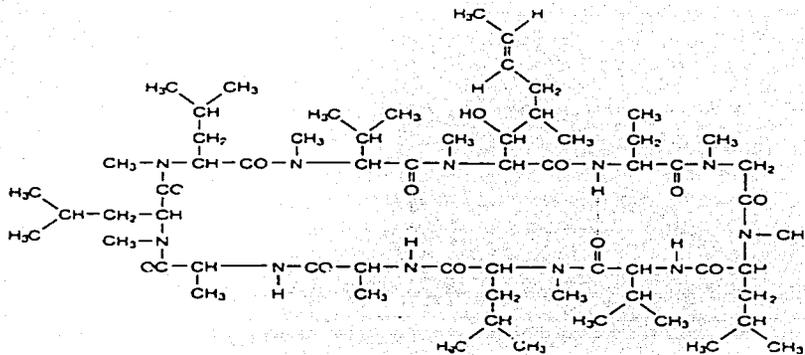


Figura 3. Estructura química de la ciclosporina-A. (Diagrama de Kahan, 1989)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Metabolismo

En el hígado la CsA es convertida por las isoenzimas de la superfamilia del citocromo P-450 en metabolitos que retienen la estructura y que son de alta polaridad. La coadministración de drogas que interactuen con el sistema de citocromo P-450 pueden afectar el metabolismo de la CsA.

Absorción

La absorción de todos los fármacos depende en gran parte de la dosis, así como también de sus propiedades físico-químicas y finalmente de la vía de administración. La absorción de la CsA administrada vía intravenosa es completa, mientras que la de la administrada vía oral es muy variable.

Distribución

La mayor parte de la CsA en la circulación se asocia con lipoproteínas de alta, baja y muy baja densidad (34, 34 y 10 respectivamente) y con quilomicrones (Ryffel B y cols. 1988). El lugar de mayor depósito de la CsA es en el hígado.

Eliminación

La CsA se elimina principalmente a través de la bilis mediante su metabolismo y una pequeña porción se elimina vía renal.

La CsA es un fármaco accesible, con un esquema de administración ya establecido en modelos de LTME (Ibarra y cols. 1996), además actualmente la CsA ha dejado de estar en fase experimental ya que una gran cantidad de estudios clínicos (Vries y cols. 1990; Hodgkinson y cols. 1990) y experimentales (Nakasasu y cols. 1990 y Green, 1988) apoyan su eficiencia.

Mecanismo de acción de la ciclosporina-A

Su efecto inmunosupresor fue descrito por Kahan en 1989 (figura 4) a través de su capacidad para inhibir la transcripción de la IL-2 y de su receptor en los linfocitos T CD4+.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CICLOSPORINA-A

Al ingresar al citoplasma celular se une a una proteína denominada ciclofilina (CP), este complejo (CP-CsA) inactiva a la calcineurina, una proteína fosfatasa 2B serina/treonina activada por Ca^{2+} /Calmodulina (CaM) expresada en el SNC, que tiene alta afinidad por el Ca^{2+} (Kissinger y cols. 1995), es degradada por la calpaína una proteasa dependiente de Ca^{2+} (Tallant y cols. 1988).

Al inhibirse la actividad de la calcineurina por efecto de la CsA se regulan diversos substratos banco de esta importante enzima, entre ellos el factor de transcripción NF-AT asociado con la expresión de un gran número de genes tales como el de la interleucina IL-2, la IL-3 y la IL-4 en los linfocitos T, la forma fosforilada se encuentra localizada en el citoplasma, pero la forma desfosforilada por la calcineurina en respuesta a un incremento en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se transloca al núcleo e interactúa con los elementos de AP1 Fos y Jun; desencadenando la activación de los linfocitos T (Jain y cols. 1993), por lo tanto, el uso de la CsA podría estar inhibiendo la respuesta inflamatoria, y reducir el estrés oxidativo, al disminuir la llegada de las células inflamatorias que son productoras de grandes cantidades de radicales libres (Winyard y cols. 1994).

Por otra parte la inhibición de la calcineurina podría tener efecto sobre la regulación de la actividad de la SON. Como se mencionó previamente esta enzima es regulada por fosforilación, en estado fosforilado su actividad disminuye mientras que desfosforilada (por calcineurina) se activa (Dawson y cols. 1993). Por lo tanto el tratamiento con CsA podría disminuir la actividad de la SON y reducir las concentraciones de NO (figura 4). Este efecto fue demostrado en el trabajo realizado por Trajković y cols., (1998), administrando CsA al medio de cultivo, se pudo observar la inhibición de la activación de la SONi en una línea celular de glioma C6.

Sin embargo no solo se pueden regular las concentraciones NO por inhibición de la enzima sin también por la expresión.

Se ha propuesto que el efecto inmunosupresor de la CsA podría tener acción directa sobre la inducción de la expresión de la SONi, pues se sabe que las citocinas (IFN- γ , TNF- α e interleucina 1) sintetizadas por las células inflamatorias inducen su expresión (Minc-Golomb y cols. 1994).

El efecto de la CsA no solo es a través de la calcineurina sino también de las ciclofilinas (A, B, C, D) también llamadas inmunofilinas (Gold, 2002), por lo que resulta pertinente conocer la participación de esta inmunofilina durante el daño en el sistema nervioso.

Como se mencionó previamente la ciclosporina-A ingresa al citoplasma y se une a la ciclofilina-A (CP-A) una proteína de 17kDa que tiene actividad *cis-trans* peptidil-prolil isomerasa y cataliza el plegamiento de las proteínas. La CP-A esta presente en altas concentraciones en el cerebro, se ha propuesto que la CP-A se encuentra relacionada con proteínas neuronales-específicas tales como receptores para diversos neurotransmisores. Goldner y Patrick (1996) realizaron un estudio de inmunohistoquímica, para determinar la distribución de la CP en el cerebro de la rata adulta y los resultados muestran que la CP se encuentra presente en todas las neuronas del cerebro, y es poco significativa su presencia en células gliales, también se observó la presencia de CP en las células endocitales o piales. Por otra parte se sabe que la ciclofilina forma parte del poro de transición de permeabilidad mitocondrial importante durante el inicio de la apoptosis.

Después de un daño al sistema nervioso la homeostasis del calcio se pierde, y el incremento en las concentraciones intracelulares de este puede tener efectos tóxicos que desencadenan el proceso denominado apoptosis, durante este proceso se observa una degradación

MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CICLOSPORINA-A

del DNA nuclear por activación de endonucleasas específicas (activadas por calcio), así como la activación de algunas fosfolipasas (fosfolipasa 2A y fosfolipasa C) cuya acción lleva a la generación de radicales libres, además se activan enzimas calcio-dependientes como la SON cuya activación incrementa las concentraciones de NO^\cdot , en este proceso aumenta la capacidad de generación de peroxinitrito ($\text{O}_2^\cdot + \text{NO} = \text{ONOO}^-$) molécula altamente citotóxica que inhibe algunas enzimas mitocondriales importantes en la generación de ATP lo que se traduce en un daño mitocondrial. Para entender este proceso es adecuado mencionar algunas características de la mitocondria. La mitocondria mantiene y regula la homeostasis y la concentración del Ca^{2+} intracelular por secuestro o liberación de Ca^{2+} usando varios mecanismos, entre estos un canal de Ca^{2+} electrogénico. La energía que se requiere para la acumulación de Ca^{2+} proviene del potencial de membrana mitocondrial. Este potencial es generado por el gradiente de protones establecido por la cadena transportadora de electrones, necesario para que se acople la respiración y la síntesis de ATP. Un daño en la integridad bioenergética de la mitocondria produce una muerte neuronal significativa, con la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP), lo que sugiere que este es un mediador clave en este proceso (Kristal y Dubinsky 1997). A través del MPTP se liberan moléculas que inician el proceso apoptótico como el citocromo c y factores inductores de la apoptosis que activan a las caspasa, (enzimas proteolíticas). Se ha demostrado que cuando la CsA se une a la CP-D (immunofilina que forma parte del MPTP) se inhibe la salida del citocromo c a través del MPTP y por lo tanto protege a las neuronas de la muerte por apoptosis (Ruiz y cols., 2000; Gold, 2002) (fig. 5).

Participación de la ciclosporina-A después de una lesión

Un estudio realizado en nuestro laboratorio (Ibarra y cols. 1995), se demostró que ratas con LTME severa que recibieron un tratamiento con CsA presentaron una recuperación funcional significativamente mayor que la observada en los animales no tratados.

Finalmente Díaz-Ruiz y cols., (1999 y 2000) demostraron que la CsA tiene la capacidad de inhibir la lipoperoxidación después de una LTME así como mejorar la respuesta motora de animales sometidos a tratamiento 12 h después de la lesión por 72 h, además se pudo comprobar que el tratamiento con CsA no tiene efectos secundarios que pongan en peligro la sobrevivencia de los animales.

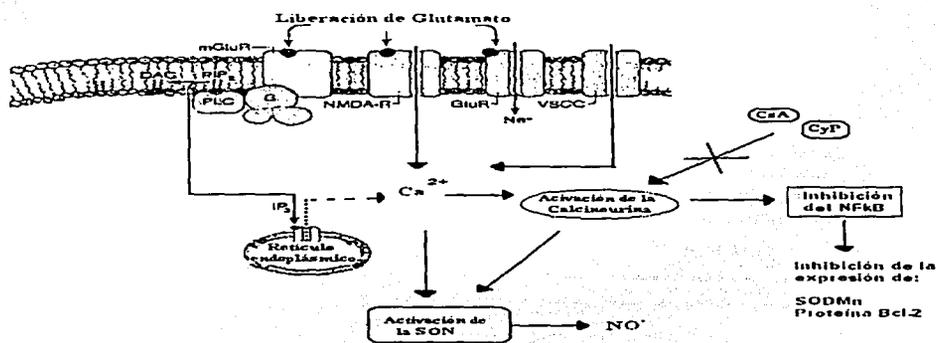


Figura 4. Posible efecto de la Ciclosporina-A después de una lesión traumática de la médula espinal sobre la actividad de la sintasa del óxido nítrico y el factor de transcripción NFκB. MGluR: receptor metabotrópico de glutamato; NMDA-R: receptor N-metil-D-aspartato; GluR: receptor de glutamato; VSCC: canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje; PLC: fosfolipasa C; PIP_2 : fosfatidilinositol 4,5 bifsfato; DAG: diacilglicerol; IP_3 : inositol 1,4,5; trifosfato; G: proteína G; SON: Sintasa del óxido nítrico; CsA: ciclosporina-A; CyP: ciclofilina; SODMn: superóxido dismutasa de manganeso. (Diagrama modificado de Siegel y cols. 1998)

PARTICIPACIÓN DE LA CICLOSPORINA-A DESPUÉS DE UNA LESIÓN

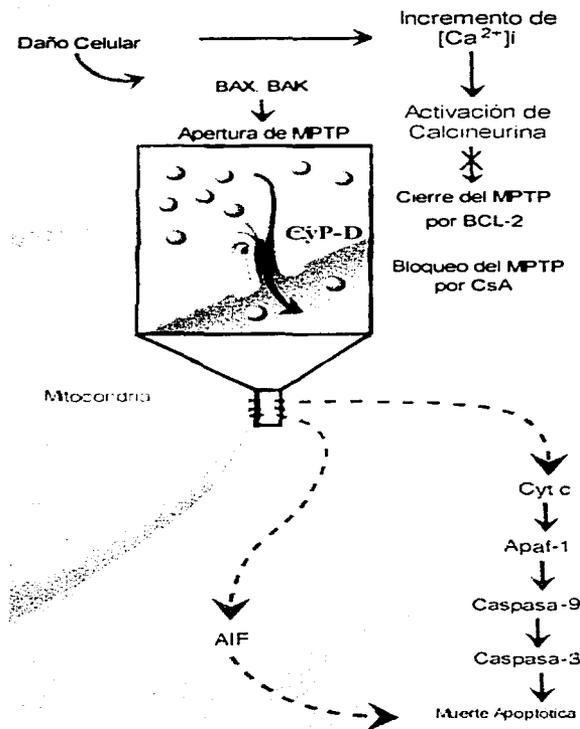


Figura 5. Posible efecto de la ciclosporina-A (CsA) sobre la inhibición de la calcineurina y la unión a la ciclofilina en la cascada apoptótica. CyP-D: ciclofilina-D; MPTP: poro de transición mitocondrial; BAX, BAK: proteínas apoptóticas; Bcl-2: proteína antiapoptótica; Cyt c: citocromo c; AIF: factores inductores de la apoptosis. (Diagrama modificado de Finkel, 2001).

JUSTIFICACIÓN

La lesión traumática de la médula espinal es un problema que tiene gran importancia, por sus implicaciones sociales y económicas. La falta de recuperación funcional después del daño es un problema que hasta el momento no tiene solución. A pesar de que se han desarrollado diversas estrategias neuroprotectoras, los resultados obtenidos no son satisfactorios. La fisiopatología de la lesión medular es muy compleja y eso se ve reflejado en los pocos avances que se tienen hasta el momento. Las diferentes líneas de investigación que se han desarrollado requieren información básica para tratar de entender y resolver cada uno de los mecanismos de daño. El NO por su gran reactividad y su capacidad de combinarse con otros radicales libres es capaz de modificar la estructura de las biomoléculas, y por lo tanto destruir el parénquima medular, disminuyendo la posibilidad de una recuperación funcional después de una lesión, además, de manera paradójica, el NO también tiene un efecto fisiológico importante, ya que es el responsable de la vasodilatación y su presencia podría ser benéfica después del trauma. El uso de fármacos como la metilprednisolona, y el L-NAME ofrecen algunas alternativas para disminuir el daño sin embargo, el tratamiento no es efectivo. Por tal razón es importante seguir estudiando nuevas opciones para tratar de encontrar mejores resultados. En este trabajo se propone el tratamiento con ciclosporina-A, un fármaco inmunosupresor que por su mecanismo de acción podría tener la capacidad de regular la actividad y expresión de la sintasa del óxido nítrico después de una lesión. Con base en la información de este trabajo, el tratamiento con ciclosporina-A podría tener efectos que favorezcan la preservación del tejido dañado y posiblemente esto se traduzca una regeneración axonal que se refleje en una recuperación motora. Finalmente hemos considerado que los resultados que aporte este trabajo pueden ser importantes para entender parte de la fisiopatología de la lesión medular.

HIPÓTESIS

1. Si la ciclosporina-A tiene efecto inhibitor sobre la actividad de la sintasa del óxido nítrico entonces se observará una disminución de dicha actividad en las diferentes isoformas de la SON después de una lesión traumática de la médula espinal.

2. Si la ciclosporina-A inhibe la respuesta inflamatoria y tiene efecto sobre la regulación de algunos factores de transcripción después de una lesión medular entonces se observará una disminución en la expresión de las diferentes isoformas de la sintasa del óxido nítrico después de una lesión traumática de la médula espinal.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la ciclosporina-A sobre la expresión y actividad de la sintasa del óxido nítrico en un modelo de lesión por contusión severa en ratas

Objetivos Particulares

- 1) Determinar los tiempos de actividad máxima de la sintasa del óxido nítrico constitutiva e inducible después de una lesión traumática de la médula espinal.
- 2) Determinar el efecto de los estrógenos y los progestágenos sobre la actividad de la sintasa del óxido nítrico constitutiva e inducible después de una lesión traumática de la médula espinal.
- 3) Evaluar el efecto de la ciclosporina-A administrada a diferentes tiempos sobre la actividad de la sintasa del óxido nítrico constitutiva e inducible en un modelo de lesión traumática de la médula espinal por contusión severa en ratas
- 4) Evaluar el efecto de la ciclosporina-A administrada a diferentes tiempos sobre la expresión de la sintasa del óxido nítrico constitutiva e inducible en un modelo de lesión traumática de la médula espinal por contusión severa en ratas

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se realizaron dos estudios:

1. Actividad de las dos isoformas de la sintasa de óxido nítrico (constitutiva e inducible)

1.1 Determinación de la máxima actividad de las dos isoformas de la sintasa del óxido nítrico a diferentes tiempos (2, 4, 8, 12, 24 y 72 h) después de la lesión.

1.2 Determinación de la actividad de las dos isoformas de la sintasa del óxido nítrico en las diferentes etapas del ciclo estral de la rata (proestro, estro, metaestro y diestro) sacrificadas 24 h después de la lesión.

1.3 Determinación de la actividad de las dos isoformas de la sintasa del óxido nítrico en animales lesionados y tratados con ciclosporina-A.

2. Expresión de las tres isoformas de la sintasa del óxido nítrico (neuronal, endotelial e inducible) por medio de la técnica de Western Blot.

2.1 Determinación de la presencia de las tres isoformas de la sintasa del óxido nítrico en el tejido medular lesionado de rata tratado con ciclosporina-A.

Determinación curso-temporal de la máxima actividad de la sintasa del óxido nítrico constitutiva e inducible después de una lesión traumática de la médula espinal.

Para poder establecer los tiempos de sacrificio de los animales lesionados y tratados con ciclosporina-A, fue necesario elaborar un diseño experimental para determinar el tiempo de actividad máxima de las dos isoformas de la sintasa del óxido nítrico en este modelo de lesión (contusión severa), ya que no se contaban con reportes previos en la literatura.

DETERMINACIÓN CURSO-TEMPORAL DE LA MÁXIMA ACTIVIDAD DE LA SON

Para estos experimentos se utilizaron 50 ratas de la cepa Wistar adultas hembras de 12 a 14 semanas de edad, entre 200 y 250 g de peso las cuales fueron divididas en siete grupos como sigue:

GRUPO 1 Ratas únicamente con laminectomía (n=8)

GRUPOS 2, 3, 4, 5, 6 y 7 Ratas lesionadas y sacrificadas a 2, 4, 8, 12, 24 y 72 h respectivamente después de la lesión (n=48).

Determinación de la actividad de la sintasa del óxido nítrico constitutiva e inducible en las diferentes etapas del ciclo estral de la rata después de una lesión traumática de la médula espinal.

Como se mencionó previamente, existen diversos reportes en la literatura que mencionan la participación de los estrógenos y los progestágenos sobre la regulación de la actividad de las isoformas de la SON. En este trabajo, se utilizaron ratas hembras para la realización de cada uno de los estudios, por lo tanto, consideramos pertinente comprobar si la actividad de la SON se modifica en las diferentes etapas del ciclo estral de la rata.

Para la realización de este estudio se utilizaron 24 ratas, las cuales fueron divididas en cuatro grupos:

GRUPO 1 Ratas en proestro (n=6)

GRUPO 2 Ratas en estro (n=6)

GRUPO 3 Ratas en metaestro (n=6)

GRUPO 4 Ratas en diestro (n=6)

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SON EN LAS ETAPAS DEL CICLO ESTRAL

Todos los animales fueron sometidos a un frotis vaginal previo a la lesión para poder identificar cada una de las diferentes etapas del ciclo estral, y fueron sacrificados 24 h después de la lesión.

Determinación de la actividad de la sintasa del óxido nítrico constitutiva e inducible en tejido medular lesionado de ratas tratadas con ciclosporina-A.

Se utilizaron 40 ratas las cuales fueron tratadas o no con CsA de acuerdo al siguiente diseño experimental:

GRUPO 1 Animales sometidos únicamente a laminectomía

GRUPO 2 Animales lesionados no tratados

GRUPOS 3, 4 y 5 Animales lesionados y tratados con ciclosporina-A administrada a 2, 6 y 12 h después de la lesión respectivamente.

Determinación de la expresión de las sintetas del óxido nítrico neuronal, endotelial e inducible en tejido medular lesionado de rata tratado con ciclosporina-A.

Se utilizaron 40 ratas las cuales fueron tratadas o no con CsA de acuerdo al siguiente diseño experimental:

GRUPO 1 Animales sometidos únicamente a laminectomía

GRUPO 2 Animales lesionados no tratados

GRUPOS 3, 4 y 5 Animales lesionados y tratados con ciclosporina-A administrada a 2, 6 y 12 h después de la lesión respectivamente.

*Descripción de técnicas**Esquema de administración de ciclosporina-A*

Los tiempos de inicio del tratamiento con CsA fueron a las 2, 6 y 12 horas poslesión. Se administraron 2.5 mg/kg/12h vía i.p. durante las primeras 72 h de acuerdo con lo reportado por Ibarra y cols., (1996) para obtener niveles en la circulación sanguínea que se encuentren dentro de la ventana terapéutica. La CsA utilizada en este estudio fue de solución intravenosa en presentación de 50mg/ml (Sandimmune^{MR} Sandoz), diluida en una solución de cloruro de sodio al 0.9%, previo a su administración, el fármaco fue mezclado mediante agitación a 2000 r.p.m. durante 2 min. De la suspensión se tomó la cantidad necesaria para inyectar la dosis correspondiente con una jeringa de insulina estéril.

Modelo de lesión.

Antes de realizar la cirugía las ratas fueron anestesiadas intraperitonealmente con pentobarbital sódico a una dosis de 2.1 mg/100g de peso, posteriormente, en condiciones de asepsia y antisepsia, se realizó la laminectomía a nivel de T9 exponiendo la médula espinal con la dura madre íntegra. Los animales fueron colocados en un equipo estereotáxico, donde se dejó caer un cilindro metálico de 15 g de peso de un diámetro de 2 mm, de una altura de 10 cm a través de un tubo guía para ocasionar una lesión tipo contusión severa, dicho método fue desarrollado por Allen en 1911 y posteriormente modificado para ratas (Díaz-Ruiz y cols., 1999). Finalmente se corroboró la presencia del hematoma en el área de impacto, los animales fueron suturados (fig. 5).

Cuidados postoperatorios.

Después de la cirugía, los animales fueron colocados en una cámara de cuidados intensivos para pequeñas especies (Schoer Manufacturing Co., Kansas City, MO) para que se recuperaran de la anestesia y del procedimiento quirúrgico, posteriormente se trasladaron de manera individual a cajas de acrílico con aserrín estéril y recibieron comida (purina, México) y agua *ad libitum*. Su intestino y vejiga fueron vaciadas por compresión manual dos veces al día hasta el sacrificio.

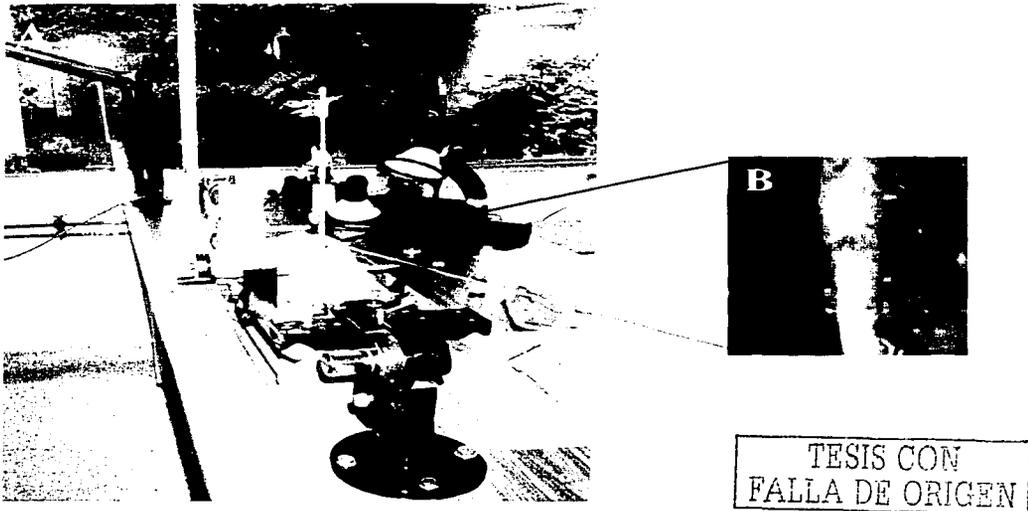


Figura 5. A) Fotografía en la que se muestra el equipo estereotáxico, en el cual se realizó la lesión traumática de la médula espinal por contusión severa en ratas. B) Médula espinal de rata donde se observa el hematoma a nivel de T-9.

Frotis vaginal.

Antes de la cirugía se les practicó a 24 ratas un frotis vaginal para determinar cada una de las etapas del ciclo estral.

Los animales fueron inmovilizados, se le introdujo en el orificio vaginal una pipeta Pasteur con 0.5 ml de solución salina fisiológica, la cual fue vaciada y absorbida dos o tres veces. Posteriormente se puso una gota del lavado en un portaobjetos y cubierta con un cubreobjetos. Las muestras se analizaron al microscopio.

Proestro: En la rata la duración de esta etapa del ciclo estral tarda aproximadamente 12 h. Durante esta etapa se secretan cantidades crecientes de estrógenos, principalmente el 17- β -estradiol, los niveles de progesteron son bajos. En el frotis vaginal se observan células epiteliales con forma y núcleos bien definidos.

Estro: La duración de esta etapa es de 12 h, en esta etapa se sintetizan altas cantidades de estrógeno. En el frotis vaginal se observan células epiteliales de descamación cornificadas, escamosas de forma irregular.

Metaestro: La duración de esta etapa es de 21 h. Durante este periodo los niveles de estrógenos son bajos. En el frotis vaginal encontramos leucocitos y pocas células de descamación cornificadas.

Diestro: Tiene una duración de 57 h. Durante esta etapa los niveles elevados de progesterona. El frotis vaginal se observan predominantemente leucocitos y pocas células epiteliales (Sorensen, 1982).

CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO

Cuantificación de la actividad de la sintasa del óxido nítrico

La actividad de la sintasa del óxido nítrico fue determinada mediante la técnica descrita por Bredt y Snyder (1990).

Para dicho ensayo se utilizaron los siguientes reactivos: HCl (J.T. Baker S.A. de C.V. México) pureza 99.5%, Tris (MERCK-México S.A.) pureza 99.5%, EDTA (J.T. Baker S.A. de C.V. México) pureza 100%, EGTA (SIGMA Chemical CO) pureza 98%, Mercaptoetanol (SIGMA Chemical CO) pureza 99%, Aprotinin (SIGMA Chemical CO), Leupeptin (SIGMA Chemical CO) pureza 96%, Fenilmetil sulfonilfluoride (SIGMA Chemical CO) pureza 98%, Inhibido de tripsina (SIGMA Chemical CO) pureza 99%, L-arginina (SIGMA Chemical CO) pureza 98%, Calmodulin (SIGMA Chemical CO) pureza 95%, Tetrahidrobiptin (SIGMA Chemical CO) pureza 99%, NADPH (SIGMA Chemical CO) pureza 97%, HEPES (SIGMA Chemical CO) pureza 99.5%, DOWEX-50W-X8 (Supelco), Naftaleno (J.T. Baker S.A. de C.V. México) pureza 99%, Dioxano (J.T. Baker S.A. de C.V. México) pureza 99%, PPO (MERCK-México S.A.) pureza 99%, POPOP (MERCK-México S.A.) pureza 99%, Metanol (J.T. Baker S.A. de C.V. México) pureza 99%, propilenglycol (J.T. Baker S.A. de C.V. México) pureza 99.9%.

Todas las ratas fueron sacrificadas por decapitación a diferentes tiempos (de acuerdo a lo descrito previamente en el diseño experimental) después de la LTME y se obtuvo una muestra de tejido de aproximadamente 1 cm del sitio de lesión, se homogeneizó en una solución buffer (50mM Tris-HCL, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA y 0.1% 2 de mercaptoetanol; pH 7.5), conteniendo un inhibidor de proteasas (2µM/ml de aprotinin, 100µM de leupeptin, 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoride, 10 µg/ml de inhibidor de

CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO

tripsina) y 0.1% NP-40, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido hasta ser utilizadas.

Para llevar a cabo la determinación de la actividad de la sintasa del óxido nítrico fue necesario realizar un ensayo previo de cuantificación proteica por medio de la técnica de Bradford (1976); para establecer la concentración de 500 μg de proteína requerida para este estudio. Las muestras fueron descongeladas y rehomogeneizadas, se tomó una alícuota de 500 μg , y se adicionó una mezcla con 10 μM L-arginina, 2,5 mM CaCl_2 , 10 μM calmodulin, 30 μM de tetrahydrobiopeptin, 1 mM NADPH, 0.2 μCi [3H] arginina, el volumen fue ajustado a 200 μl con solución homogeneizadora, se incubaron a 37°C, por 30 min para activar la reacción Finalmente las muestras fueron transferidas a hielo y se les adicionó una solución fría de (20 mM HEPES, 2 mM EDTA, 2mM EGTA; a pH 5.5) solución de terminación de la reacción (solución-stop). Los volúmenes totales de las muestras fueron pasados por columnas con 1 ml de resina de intercambio catiónico (Dowes-50W-X8), equilibradas con solución-stop. Los tubos prueba fueron lavados con 1 ml de agua destilada y la solución fue colectada dentro de viales con 5 ml de líquido de centelleo. La citrulina marcada con tritio fue evaluada en un contador de centelleo Beckman LS6500.

Nota. Mediante ésta técnica se evalúa la [3H] L-Citrulina, que es el producto final metabólico de la SONi con la L-Arginina.

Para poder diferenciar entre la actividad de la SONc y la SONi el medio fue incubado o no con calcio, pues se sabe que la SONc es dependiente de Calcio y la SONi no lo es..

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Reactivos utilizados: Albúmina (SIGMA Chemical CO) pureza 98%, Ácido fosfórico (SIGMA Chemical CO) pureza 85%, Alcohol etílico (J.T. Baker S.A. de C.V. México) pureza 99.5%, Azul de coomasie (SIGMA Chemical CO) pureza 92%.

Se elaboró una curva con diferentes concentraciones de proteína a partir de un estándar de albúmina sérica bovina a una concentración de 1mg/ml. Posteriormente se tomó una alícuota de 10 μ L del tejido homogeneizado, y se le agregaron 30 μ L de solución homogenizadora, de ésta solución se tomó una alícuota de 10 μ L misma que fue vertida en un tubo con 90 μ L de solución homogenizadora más 900 μ L de reactivo de Bradford, finalmente se dejó que la reacción se llevara a cabo durante 15 min. La lectura se realizó en un espectrofotometro de luz UV (Perkin Elmer, Lambda 20) a una longitud de onda de 540 nm. (Bradford, 1976). La concentración de proteínas contenida en cada muestra se determinó por extrapolación con una curva de albumina.

Determinación de la expresión de la sintasa del óxido nítrico (SON) por Western Blot

Obtención del tejido. Los animales lesionados y laminectomizados, fueron sacrificados por decapitación, en los tiempos previamente establecidos, posteriormente se obtuvieron las muestras de tejido medular y fueron almacenadas a -70° C hasta su análisis.

Extracción de la proteína total. Para la extracción de las proteínas totales de cada muestra se utilizó el reactivo de aislamiento TRIPURE (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim Germany), que es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina para aislar R.N.A, D.N.A y proteínas de la misma muestra (tejido o células en cultivo). La cuantificación

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA SON POR WESTERN BLOT

de las proteínas se hizo con el método del ácido bicinónico (Pierce) en placas de ELISA, las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro de luz visible a una longitud de onda de 540 nm de

Absorción. Electroforesis de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

En un gel de poliacrilamida desnaturante, con duodecil sulfato de sodio (SDS, Sigma, Co) al 8%, se depositó en cada pozo un volumen que contenía 50 µg de proteína total de cada muestra. La electroforesis se corrió a 150 V, y posteriormente se hizo la transferencia (110 mA) en papel de nitrocelulosa con un sistema de electrotransferencia semiseco (CBS-Scientific CO, Mod. # EBU-4000) durante 45 min. Después, el papel de nitrocelulosa se tiñó con el colorante rojo de Ponceau (0.5% en ácido acético glacial al 2%), para verificar que la transferencia de las proteínas. El papel de nitrocelulosa fue lavado con agua y tres veces más con un buffer de fosfatos (PBS 1X) estabilizado a un pH 7.4-Tween 0.05%, para eliminar al colorante.

Bloqueo de la unión inespecífica Para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos fue necesario embeber a las membranas de transferencia en una mezcla de leche descremada al 5% disuelta en PBS 1X, a pH 7.4-Tween 0.05%, la incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente.

Inmunodetección. El papel de nitrocelulosa se incubó con los anticuerpos primarios para nNOS, cNOS e iNOS en una proporción de 1:2500, 1:1200 y 1:1000 respectivamente, los anticuerpos utilizados fueron monoclonales de isotipo IgG anti ratón (reconocen los isotipos de rata), distribuidos por Transduction Laboratories, la incubación se llevo a cabo durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Posteriormente se hicieron varios lavados con PBS-Tween y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA SON POR WESTERN BLOT

monoclonal-cabra anti-ratón IgG acoplado a peroxidasa, en una relación de 1:6000 (Zymed laboratories Inc. San Francisco California USA.) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. Finalmente se realizaron varios lavados con PBS Tween a una concentración del 0.05 %. Las membranas fueron sometidas a un proceso de lavado para posteriormente incubarlas con anticuerpo monoclonal para β -actina (control) a una concentración de 1:100 y determinar los niveles de esta proteína en cada una de las muestras.

Revelado y análisis. La detección de las proteínas se hizo con un kit Chemiluminescence (NENTM Life Science Products) y película Kodak (X-OMAT). Las imágenes fueron capturadas en un equipo de cómputo con un software BioDoc-It System (UVP). El análisis densitométrico se realizó por medio del programa Lab WorksTM. 4.0 Image Acquisition and Analysis Software (UVP).

Consideraciones éticas para el uso de animales en la experimentación

Para la realización del presente proyecto, se tomaron en cuenta los lineamientos establecidos por el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud (Título séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación) (ley general de salud 1990).

Estadística

Los resultados, fueron analizados a través de la prueba estadística paramétrica ANOVA de una vía seguida de la prueba de T de Student, cuando únicamente se compararon dos grupos experimentales y la prueba estadística ANOVA de una vía seguida de la prueba de

Dunnett, cuando los grupos a comparar fueron más de dos. Los Datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

RESULTADOS

Actividad de la SONc y SONi

En la figura 6 y 7 se muestran los resultados obtenidos de la actividad máxima de cada una de las isoformas de la enzima de la sintasa del óxido nítrico constitutiva e inducible (SONc y SONi) después de la lesión. En el grupo control (laminectomía) se observa una actividad basal de la SONc y SONi de 24.56 ± 2.9 y 23.34 ± 2.7 respectivamente, valores que están expresados en ng de L-citrulina/mg de proteína/30 minutos. En esta figura se muestra que la actividad de las dos isoformas de la enzima tiende a incrementarse por efecto de la lesión, sin embargo se observa que la actividad máxima de la SONc se presenta 4 h después del daño (138% vs control) así como a las 8 h, donde el incremento de la actividad fue del 96% (con respecto al control). La actividad máxima observada para la SONi fue 103% mayor que la del grupo control en el grupo evaluado a las 72 h después del daño. Por otra parte los resultados obtenidos del ensayo donde evaluamos la actividad de la SON constitutiva e inducible a las 24 h en los diferentes estadios del ciclo estral de la rata lesionada (estro, proestro, metaestro y diestro) se muestran en las figuras 8 y 9. Como podemos observar no se presentó ningún efecto de las hormonas esteroideas en las 4 etapas del ciclo estral en los animales lesionados.

En el ensayo de la evaluación del efecto de la CsA administrada a diferentes tiempos (2, 6 y 12 h) después de una lesión sobre la actividad de la sintasa del óxido nítrico constitutiva e inducible evaluada a diferentes tiempos (4, 24 y 72 h) después de la lesión, se muestran en las figuras de la 10 a la 15. Con respecto a la actividad de la SON constitutiva en animales lesionados y tratados con CsA sacrificados 4 h después de la lesión, podemos observar que se presenta una disminución de la actividad del 27 % en el grupo tratado con CsA con

respecto al grupo laminectomizado y del 67 % con respecto al grupo lesionado no tratado (figura 10), por otra parte, en la actividad de la SONi no se observan cambios a este tiempo (figura 11).

Los resultados de la actividad de la SONc, evaluada 24 h después de la lesión demuestran que el tratamiento con CsA administrado a diferentes tiempos incrementa la actividad de dicha enzima, en todos los grupos tratados con CsA a 2, 6 y 12 h después de que la lesión, los incrementos fueron del 57, 50 y 33% respectivamente cuando se comparan con el grupo lesionado no tratado (figura 12). La actividad de la SON inducible se mantuvo sin cambios en todos los grupos estudiados cuando se comparan con el grupo lesionado no tratado y el grupo de laminectomía (figura 13), evaluada a las 24 h después del procedimiento quirúrgico. Finalmente, en el grupo de ratas sacrificadas 72 h después de la lesión y tratadas con CsA no se observan cambios en la actividad de la SONc en ninguno de los grupos tratados con CsA cuando son comparados con el grupo lesionado no tratado (figura 14), sin embargo la actividad de la SONi disminuye significativamente (37%) solamente en el grupo de ratas tratadas con CsA 12 h después de la lesión cuando se comparan con el grupo control (lesionado no tratado) (figura 15).

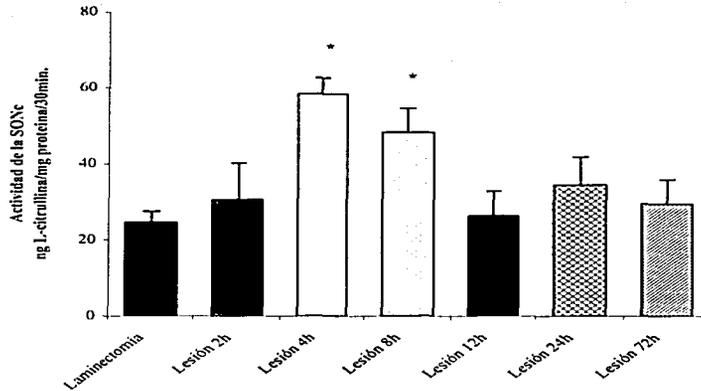


Figura 6. Actividad de la sintasa del óxido nítrico constitutiva (SONc) medida a diferentes tiempos después de una lesión traumática de la médula espinal (2, 4, 8, 12, 24 y 72 h). El grupo control fue sometido únicamente a una laminectomía y fue sacrificado 2h después del procedimiento quirúrgico. A los grupos lesionados se les practicó una lesión por contusión severa. Los resultados son expresados como medias \pm EE de 6-8 animales por grupo. * Diferentes del grupo control (laminectomía) ($p < 0.05$), ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

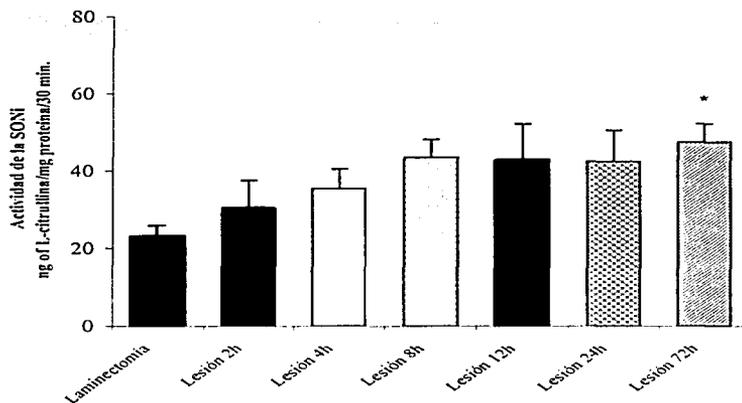


Figura 7. Actividad de la sintasa del óxido nítrico inducible (SONi) medida a diferentes tiempos después de una lesión traumática de la médula espinal (2, 4, 8, 12, 24 y 72 h). El grupo control fue sometido únicamente a una laminectomía y fue sacrificado 2h después del procedimiento quirúrgico. A los grupos lesionados se les practicó una lesión por contusión severa. Los resultados son expresados como medias \pm EE de 6-8 animales por grupo. * Diferente del grupo control (laminectomía) ($p < 0.05$). ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett.

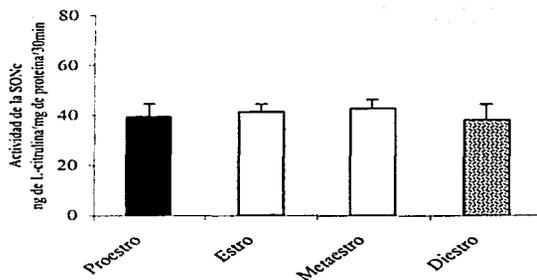


Figura 8. Actividad de la sintasa de óxido nítrico constitutiva evaluada en los diferentes estadios del ciclo estral (proestro, estro, metaestro y diestro) de ratas lesionadas y sacrificadas 24 h después de la lesión. Los resultados son expresados como medias \pm EE de 6 animales por grupo. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

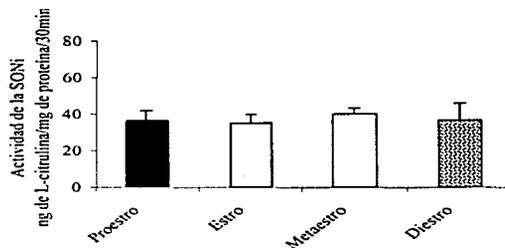


Figura 9 Actividad de la sintasa de óxido nítrico inducible evaluada en los diferentes estadios del ciclo estral (proestro, estro, metaestro y diestro) de ratas lesionadas y sacrificadas 24 h después de la lesión. Los resultados son expresados como medias \pm EE de 6 animales por grupo. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS NO SALE
BIBLIOTECA

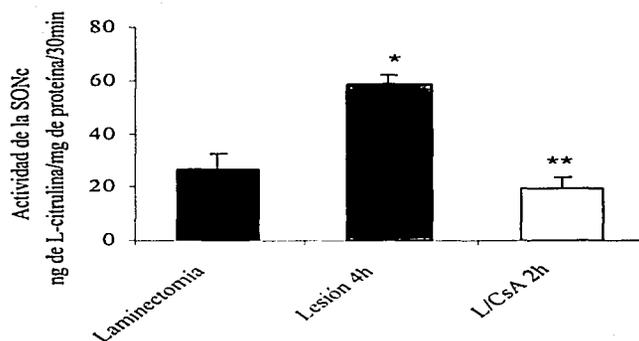


Figura 10. Actividad de la sintasa de óxido nítrico constitutiva (SONc) de ratas lesionadas y tratadas con ciclosporina-A (CsA) 2 h después de la lesión, sacrificadas 4h después del daño. Los resultados son expresados como medias \pm EE de 6 animales por grupo. *diferente del grupo con laminectomia, **diferente del grupo con laminectomia y del grupo lesionado ($p < 0.05$). ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

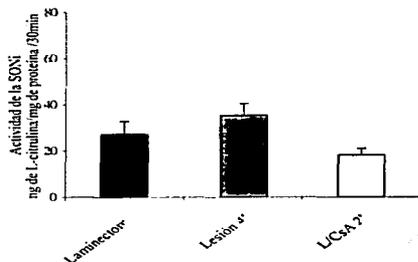


Figura 11. Actividad de la sintasa de óxido nítrico inducible (SONi) de ratas lesionadas y tratadas con ciclosporina-A (CsA) 2 h después de la lesión, sacrificadas 4h después del daño. Los resultados son expresados como medias \pm EE de 6 animales por grupo. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

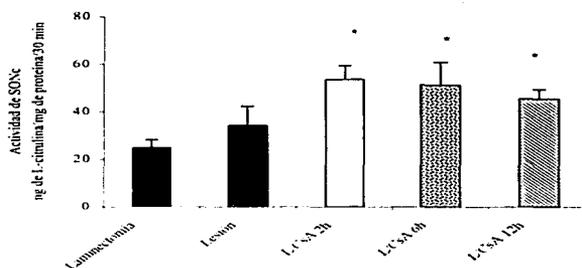


Figura 12. Actividad de la sintasa de óxido nítrico constitutiva (SONc) de ratas lesionadas y tratadas con ciclosporina-A (CsA) a diferentes tiempos (2, 6 y 12 h) después de la lesión, sacrificadas 24h después del procedimiento quirúrgico. Los resultados son expresados como medias \pm EE de 6 animales por grupo. *diferentes del grupo control con lesionado sin tratamiento ($p < 0.05$). ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

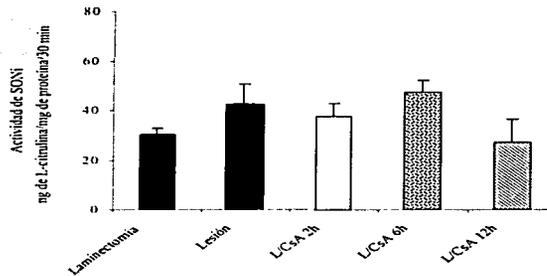


Figura 13. Actividad de la sintasa de óxido nítrico inducible (SONi) de ratas lesionadas y tratadas con ciclosporina-A (CsA) a diferentes tiempos (2, 6 y 12 h) después de la lesión, sacrificadas 24h después del procedimiento quirúrgico. Los resultados son expresados como medias \pm EE de 6 animales por grupo. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

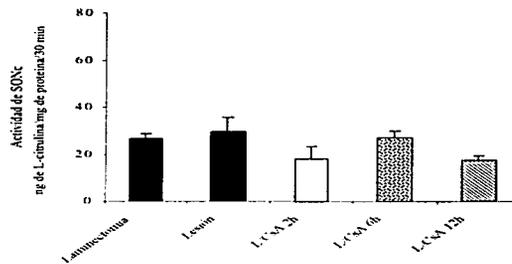
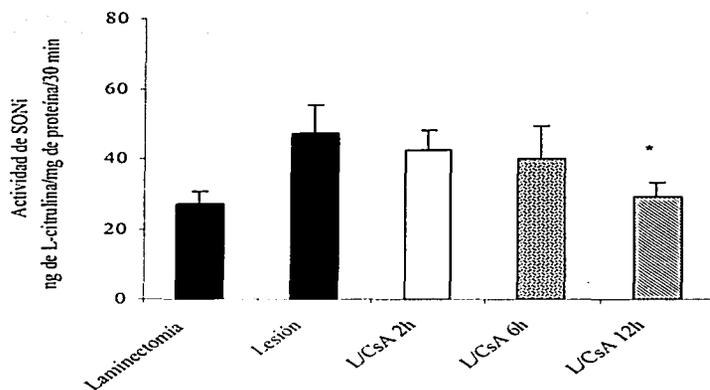


Figura 14. Actividad de la sintasa de óxido nítrico constitutiva (SONc) de ratas lesionadas y tratadas con ciclosporina-A (CsA) a diferentes tiempos (2, 6 y 12 h) después de la lesión, sacrificadas 72 h después del procedimiento quirúrgico. Los resultados son expresados como medias \pm EE de 6 animales por grupo. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



*Figura 15. Actividad de la sintasa de óxido nítrico inducible (SONi) de ratas lesionadas y tratadas con ciclosporina-A (CsA) a diferentes tiempos (2, 6 y 12 h) después de la lesión, sacrificadas 72 h después del procedimiento quirúrgico. Los resultados son expresados como medias \pm EE de 6 animales por grupo. *diferente del grupo control lesionado sin tratamiento ($p < 0.05$), ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Expresión de las isoformas de la SON por Western Blot.

En la figura 16 se muestra una imagen representativa del ensayo de Western blot para evaluar la expresión de las isoformas de la sintasa del óxido nítrico (SONn, SONE, y SONi) así como de la β -actina (usada como estándar) observadas en los diferentes grupos experimentales. En este ensayo también se incluyó un grupo con lipopolisacárido como control positivo de la inducción de la SON.

Los resultados del ensayo de Western blot que muestran el efecto de la ciclosporina-A administrada a diferentes tiempos después del daño (2, 6 y 12 h) sobre la expresión de las diferentes isoformas de la SON y evaluada a diferentes tiempos después de la lesión (4, 24 y 72 h) se muestran en las figuras 17, 18, 19, 20 y 21.

En la figura 17 se muestran los resultados densitométricos expresados como porcentajes de densidad óptica con respecto al grupo control (laminectomía). Como podemos observar, existe un incremento en la expresión de la SONn por efecto del trauma del 16% y un decremento del 66% por efecto del fármaco cuando se comparan con el grupo control solamente con laminectomía en los animales sacrificados 4 h después del trauma. También pudimos observar un incremento del 57% de la expresión de la SONE evaluada 4 h después del trauma en el grupo lesionado no tratado y un decremento en la expresión del 20% por efecto del fármaco, cuando fue comparado con el grupo lesionado no tratado (figura 18). Por otra parte, se observó un incremento de la expresión de la SONn evaluada a las 24 h después del trauma por efecto del daño (41%) así como en todos los grupos tratados con CsA a 2, 6 y 12 h después de la lesión (86, 71 y 84 % respectivamente) cuando se compararon con el grupo control (laminectomizado) (figura 19). Los resultados de la expresión de la SONE evaluada a las 24 h después del daño se muestran en la figura 20,

EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LA SON POR WESTERN BLOT

como podemos observar no se presenta incremento alguno de la expresión de la SONE por efecto del trauma, pero si se observó un incremento de la expresión en todos los grupos tratados con CsA cuando se comparan con el grupo con laminectomía (62, 82 y 82% respectivamente). Finalmente los resultados de la evaluación de la expresión de la SONi a las 72 h (figura 21), muestran que existe un incremento de dicha expresión del 272% por efecto del trauma y el tratamiento con CsA tiene la capacidad de disminuir este incremento, sin llegar a los niveles basales, en los grupos tratados con CsA (2, 6 y 12 h) también existe incremento en la expresión del 123, 125, 126 % respectivamente cuando se comparan con el grupo control únicamente con laminectomía.

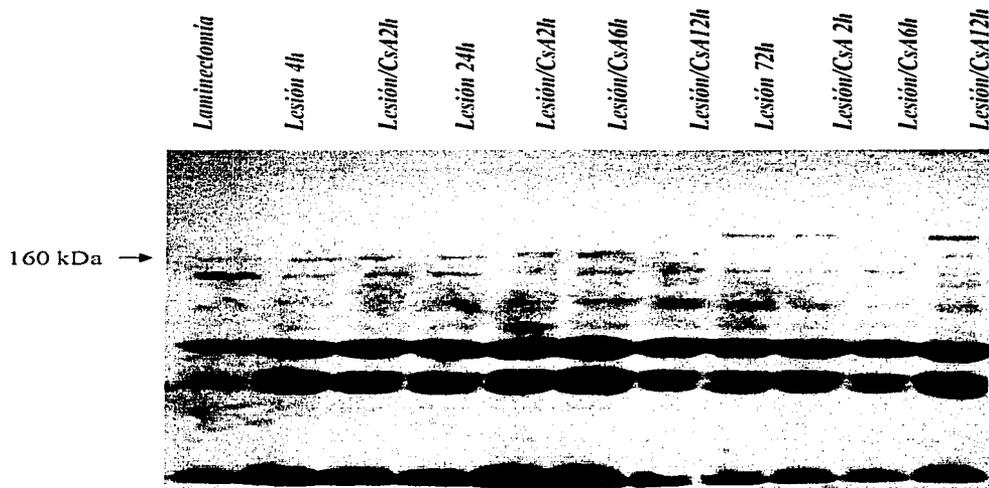
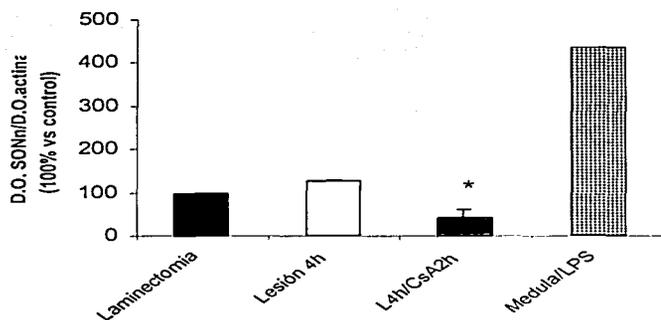


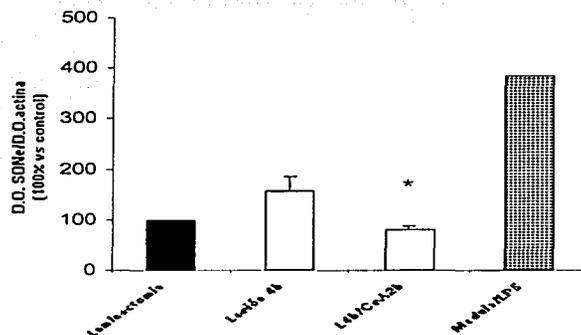
Figura 16. Ensayo representativo de Western Blot, donde se observa el corrimiento de las muestras para determinar la presencia de la sintasa del óxido nítrico neuronal (SONn) evaluada a las 24 horas después del procedimiento quirúrgico, en los diferentes grupos experimentales. CsA; ciclosporina-A.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*Figura 17. Expresión de la sintasa de óxido nítrico neuronal (SONn) de ratas lesionadas y tratadas con ciclosporina-A (CsA) 2h después de la lesión y sacrificadas 4 h después del procedimiento quirúrgico. DO; densidad óptica. LPS; lipopolisacárido (2.5 mg/kg) (Harada y cols. 1999). Los resultados son expresados como medias \pm EE de 3 animales por grupo. El control positivo con LPS (n=1). *diferente del grupo con lesión y sin tratamiento ($p < 0.05$), prueba de t de Student.*



*Figura 18. Expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial (SONe) de ratas lesionadas y tratadas con ciclosporina-A (CsA) 2 h después de la lesión y sacrificadas 4 h después del procedimiento quirúrgico. DO; densidad óptica, LPS; lipopolisacárido (2.5 mg/kg) (Harada y cols. 1999). Los resultados son expresados como medias \pm EE de 3 animales por grupo. El control positivo con LPS (n=1). *diferente del grupo con lesión y sin tratamiento ($p < 0.05$), prueba de t de Student.*

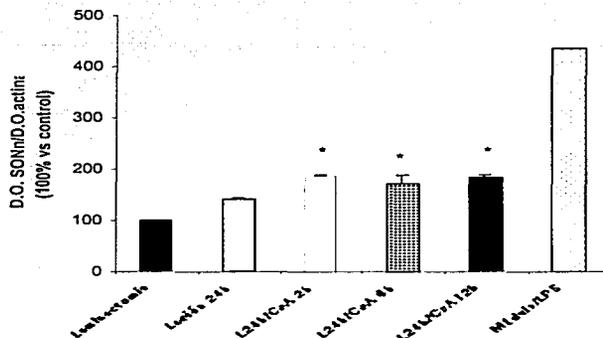


Figura 19. Expresión de la sintasa de óxido nítrico neuronal (SONn) de ratas lesionadas y tratadas con ciclosporina-A (CsA) a diferentes tiempos (2, 6 y 12 h) después de la lesión, sacrificadas 24 h después del procedimiento quirúrgico. DO; densidad óptica, LPS; lipopolisacarido (2.5 mg/kg) (Harada y cols. 1999). Los resultados son expresados como medias \pm EE de 3 animales por grupo. El control positivo con LPS (n=1). *diferente del grupo con lesión y sin tratamiento ($p < 0.05$), ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

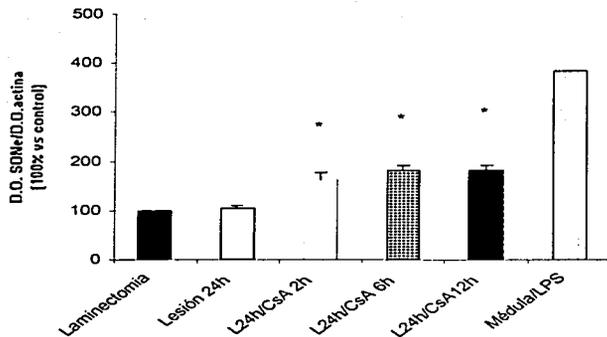


Figura 20. Expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial (SONe) de ratas lesionadas y tratadas con ciclosporina-A (CsA) a diferentes tiempos (2, 6 y 12 h) después de la lesión, sacrificadas 24 h después del procedimiento quirúrgico. DO; densidad óptica, LPS; lipopolisacarido (2.5 mg/kg) (Harada y cols. 1999). Los resultados son expresados como medias \pm EE de 3 animales por grupo. El control positivo con LPS ($n=1$). * diferente del grupo con lesión y sin tratamiento ($p<0.05$). ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

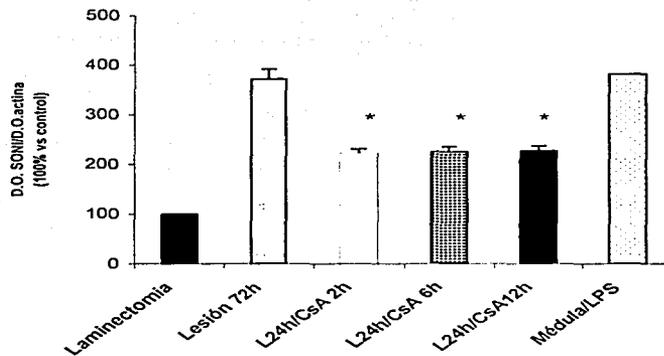


Figura 21. Expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible (SONi) de ratas lesionadas y tratadas con ciclosporina-A (CsA) a diferentes tiempos (2, 6 y 12 h) después de la lesión, sacrificadas 72 h después del procedimiento quirúrgico. DO; densidad óptica, LPS; lipopolisacrido (2.5 mg/kg) (Harada y cols. 1999). Los resultados son expresados como medias \pm DE de 3 animales por grupo. El control positivo con LPS ($n=1$). * diferente del grupo con lesión y sin tratamiento ($p<0.05$). ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

En este trabajo, se determinaron los tiempos de actividad máxima de la SONc y de la SONi, después de una lesión traumática de la médula espinal. Los resultados indican que el incremento de la actividad de ambas isoformas es dependiente del tiempo, observándose tiempos mas cortos de la actividad máxima para las isoformas constitutivas (4 h), que para la SONi en la cual observamos una actividad máxima hasta las 72 h. Estos resultados son similares a los obtenidos por Hu y cols., (2000), quienes encontraron un incremento en la expresión de ambas isoformas de la SON, en un modelo de lesión neurotóxica de la médula espinal en las primeras 48 h de la evaluación. Los máximos de actividad en el tiempo son ligeramente distintos a los encontrados en el presente estudio, pero, los diferentes modelos de lesión podrian ser los responsables de estas diferencias, debido a que los citados autores utilizaron un modelo de daño químico, que puede tener efecto sobre un mecanismo en particular, asociado con la substancia química empleada. Otros autores han reportado un incremento en la actividad de la SONi a partir de los 7 días en un modelo de lesión por contusión (Xu y cols., 2001) pero no a tiempos cortos (72 h), como fue encontrado en este estudio. Estas discrepancias pueden deberse también a la cantidad de muestra que se analizó en cada uno de los estudios, ya que este último grupo analizó la actividad de la SON en muestras de 5 mm rostral y 5mm caudal a partir del epicentro de la lesión, mientras que nuestras muestras se tomaron a partir del epicentro de la lesión de 2mm rostral y 2mm caudal, para enfocar nuestro estudio solamente en el sitio de la lesión. Es importante señalar que se necesitan futuras investigaciones para explorar los eventos generados en la periferia de la lesión. Los picos de actividad máxima de SONc y SONi encontrados en nuestro trabajo no coinciden con los picos de producción de NO medidos por Liu y cols., (2000) quienes, usando un electrodo selectivo para NO implantado en la médula espinal,

encontraron que existe un incremento en la producción de NO inmediatamente después del trauma, esta diferencia pudiera deberse a que existen otras fuentes de producción de NO como es el caso de los vasos sanguíneos (Bravo y cols., 1999), este NO generado en la vasculatura extra medular, al viajar a través de los vasos sanguíneos de la médula espinal podría favorecer un incremento en las concentraciones de NO a tiempos cortos. El incremento de la actividad de la SONc a corto plazo (4-8 h) después de la lesión se correlaciona con un incremento del calcio intracelular por efecto del glutamato durante el proceso de excitotoxicidad (Liu y cols., 1991), mientras que la inducción de la actividad de la SONi es probablemente el resultado de la respuesta inflamatoria y del reclutamiento de macrófagos que se dirigen al sitio de lesión, lo que resulta ser un proceso mas lento reflejado en el tiempo de actividad máxima para la enzima inducible (72 h).

Hallazgos mas recientes, en un estudio realizado por Nakahara y cols. (2002), demostraron que existe un incremento en las concentraciones de NO medido por microdiálisis entre 1 y 12 h después de una lesión por compresión y pudieron demostrar que existe un segundo incremento entre 24 y 72 h después del trauma. Esta información fue corroborada con técnicas de inmunocitoquímica que les permitieron observar un incremento en la cantidad de células reactivas a la SONn inmediatamente después del daño y hasta las 12 h, en tanto que la presencia de las células inmunoreactivas a la SONi se incrementó a partir de las 12 y hasta las 72 h después del trauma, por lo que sugieren que el primer incremento de NO se debe a un aumento en la actividad de SONn y el segundo a la SONi. Estos resultados corroboran ampliamente nuestros hallazgos de la actividad de la SONc y SONi (Díaz-Ruiz y cols., 2002).

Los resultados del segundo ensayo, en el que evaluamos el efecto de los estrógenos y los progestágenos sobre la actividad de las SONc y SONi, pudimos observar que no existen cambios de dicha actividad en las diferentes etapas del ciclo estral en la rata sometida a una LTME. Estos resultados se deben probablemente a que las concentraciones de estrógenos y progestágenos no son las suficientes para ejercer efecto alguno sobre la actividad de las isoformas de la SON. Si bien es cierto que se han descrito diversos efectos sobre la actividad y la expresión de las isoformas de la SON, estos se han observado solamente cuando los estrógenos y los progestágenos son administrados de manera exógena. En un trabajo realizado por Labombarda y cols. (2000) demostraron que la progesterona incrementa la actividad de la NADPH-diaforasa una enzima indistinguible de la sintasa del óxido nítrico que se localiza en los astrocitos; en un modelo de lesión por sección de la medula espinal, en animales que recibieron tratamiento de manera exógena con progesterona (4 mg/kg/día) durante 3 días, así mismo, en estudios de terapia hormonal en ratas, se observó que los estrógenos y la progesterona tienen la capacidad de incrementar la actividad y la expresión de la SONE, en vasos sanguíneos aislados de cerebro de ratas tratadas con 17beta-estradiol (McNeill y cols., 2002).

Los resultados del tercer ensayo en el que evaluamos el efecto de la CsA sobre la actividad de las diferentes isoformas de la SON después de una lesión traumática de la médula, indican que existe una disminución en la actividad de la SONc por efecto de la CsA cuando se administra 2 h después de la lesión en el grupo de animales sacrificados 4 horas después del daño. Este efecto pudo deberse a la capacidad que tiene la CsA para inhibir a la calcineurina. Como se mencionó anteriormente, la calcineurina es la fosfatasa responsable de desfosforilar a la SON y de esta manera producir una regulación negativa en ella

traduciéndose en una menor producción de NO (Dawson y cols. 1993). En contraste, los resultados obtenidos de la actividad de la SONc evaluada a las 24 h indican que existe un incremento en la actividad de la SONc en todos los grupos tratados con CsA. Este cambio en la actividad enzimática podría ser el resultado del efecto inhibitorio que tiene la CsA sobre la calcineurina a largo plazo, desencadenando un mecanismo de incremento intracelular del calcio. Se ha demostrado en modelos experimentales de isquemia cerebral, que la inhibición de la calcineurina favorece el estado fosforilado de algunos receptores y canales importantes en la regulación del calcio intracelular como son: los receptores NMDA, los canales de calcio sensibles a voltaje, los receptores IP_3 , y los receptores de rianodina todos ellos incrementan su función, en estado fosforilado, favoreciendo el aumento de las concentraciones de calcio intracelular, así como la salida de este de los depósitos intracelulares (retículo endoplásmico) a través de los receptores IP_3 y de rianodina (Morioca y cols., 1998). Diversos estudios señalan que la SONc es dependiente de calcio, y probablemente su actividad se incrementa por dicho efecto.

En relación con la actividad de la SONi, pudimos observar que existe una disminución de la actividad por efecto de la CsA cuando se administra 12 después de la lesión. Este evento podría ser explicado como consecuencia de la inhibición de la respuesta inflamatoria por el fármaco. Se sabe que después de una lesión se desencadena una intensa respuesta inflamatoria que genera a su vez acumulación de mediadores de la inflamación (citocinas, interleucinas, etc.) y activación de células endoteliales que incrementan la permeabilidad vascular generando edema y posteriormente la destrucción del tejido (Zhang y cols., 1997). La SONi se expresa durante el proceso de la inflamación desencadenada después del daño y cataliza la síntesis de grandes cantidades de NO (Wu, 1993). La CsA promueve una

disminución en la actividad de SONi probablemente a través del efecto inmunosupresor o por la inhibición de la fosforilación a largo plazo.

Los resultados del cuarto ensayo donde evaluamos el efecto de la CsA sobre la expresión de las SONn, SONE y SONi 4 h después de la lesión indican que existe un incremento en la expresión de las 2 isoformas constitutivas (SONn y SONE) por efecto de la lesión, estos resultados son similares a los reportados por Liu y cols. (2002a y 2002b) en un modelo de lesión por compresión, ellos demostraron que el pico máximo de expresión para la SONn y SONE se alcanza 6 h después de la lesión.

Por otra parte, en los animales lesionados y tratados con CsA existe un decremento de la expresión de ambas isoformas evaluadas a este mismo tiempo. Para tratar de explicar este evento primeramente es importante mencionar que el factor de transcripción asociados al gen de la SONn es el CREB, (proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc) (Sasaki y cols., 2000), mientras que el factor de transcripción asociado al gen de la SONE es el AP-1 (proteína-1 activadora) (Li y cols., 2002), con base en esta información nosotros sugerimos que la CsA podría tener efecto sobre la regulación de ambos factores de transcripción a corto plazo (4 h después de la lesión), a través de la capacidad que tiene de inhibir la apertura del poro de transición mitocondrial, se ha demostrado que la CsA interactúa con la ciclofilina (proteína que forma parte del poro de transición mitocondrial) para inhibir la salida de calcio de la mitocondria (evento temprano) (Ruiz y cols., 2000), la disminución en la concentración de Ca^{2+} intracelular podría disminuir la expresión de la SONn, que es regulada por Ca^{2+} a través del elemento de respuesta al AMPc (CRE) un elemento *cis*-regulatorio estimulado por Ca^{2+} (Sasaki y cols., 2000; Lonze y Gintly 2002). Por otra parte Schwaninger y cols., (1995) demostraron que la inhibición de la calcineurina

por efecto de la CsA disminuye la activación del CREB en cultivo de células pancreáticas, aun cuando la serina 119 se mantiene fosforilada. En este trabajo se sugiere que existe una fosforilación que inhibe la actividad transcripcional del CREB en la serina 128, que podría ser removida por la calcineurina (figura 21-A).

Con respecto al efecto regulador de la expresión de la SONe por la CsA, podemos mencionar que durante el evento de cierre del poro de transición mitocondrial por efecto de la CsA y la temporal baja de Ca^{2+} , se podría inducir una baja afinidad en la unión del AP-1 con el DNA, este evento regularía de manera negativa la expresión del gene, pues se sabe que este proceso también es dependiente de calcio (Angel y Karin M. 1991; Li y cols., 2002) (figura 21-B).

Por otra parte, los resultados de la expresión de la SONn evaluada a las 24 h después del daño, muestran que existe un incremento en todos los grupos lesionados que fueron sometidos al tratamiento con CsA. En la literatura no se tienen reportes del efecto de la CsA sobre la expresión de la SONn después de la lesión, sin embargo el estado inhibitorio de la calcineurina por la CsA favorece que diversos canales y receptores relacionados con la entrada de Ca^{2+} como son los receptores NMDA, los receptores para IP_3 , los receptores para rianodina y los canales de Ca^{2+} sensible a voltaje tipo L (VSCC por sus siglas en ingles) se mantengan fosforilados y activos por mas tiempo, de esta manera se favorece el incremento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares, y se podrían activar cinasas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina (CaMK) que fosforilan al CREB para activarlo (Morioka y cols., 1998; Carafoli y cols., 1999). El efecto que tiene la CsA para incrementar las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, también ha sido reportado por Frapier y cols. (2001) en un modelo de exposición crónica con CsA (24 horas) en cultivo de miocitos.

Finalmente se ha demostrado que existe un incremento en la actividad del CREB relacionado directamente con la activación de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje de tipo- L (Lonze y cols., 2002), Sasaki y cols., (2000) demostraron que el gene de la SONn es regulado por Ca^{2+} en cultivos de neuronas corticales de embriones. En este trabajo se identifico la existencia de una secuencia sensible a Ca^{2+} en el exon 2 del promotor (figura 22-A).

Los resultados obtenidos de la expresión de la SONE, demuestran que existe un incremento de dicha expresión por efecto de la lesión y por efecto de la CsA, este evento es similar a lo reportado por Su y cols., (1996) en células T de linfoma, en las cuales se demostró que la CsA tiene la capacidad de aumentar las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, favoreciendo el incremento en la unión de AP-1 con el DNA, y de esta manera llevar al subsecuente aumento en la expresión de la SONE.

En otro estudio, se investigó la participación de la CsA sobre la regulación de la expresión de la SONE en cultivo de células endoteliales de aorta de bovino (Navarro-Antolín y cols., 2000), se demostró que la CsA tiene la capacidad de incrementar la expresión de la SONE hasta 1.6 veces por tener la capacidad de incrementar la unión de AP-1 al DNA, así como de incrementar la transactivación del promotor de la SONE e incrementar los niveles del RNAm de *c-fos* y de la proteína (c-Fos). En este trabajo se demostró que mutagénesis en el elemento *cis*-regulatorio de AP-1 se traducía en una inhibición de la expresión de la SONE aún con el tratamiento con CsA, por lo que se sugiere que esta regulación es a nivel transcripcional y que involucra el sitio proximal de AP-1. Probablemente en el modelo de lesión medular la CsA estaría regulando la expresión de la SONE a través de este mismo

mecanismo (figura 22-B).

Finalmente, los resultados de la expresión de la SONi observados en este trabajo, muestran que existe un incremento de dicha expresión por efecto de la lesión y que la CsA fue capaz de disminuir este proceso sin llegar a los niveles basales, estos resultados podrían indicar que el incremento de la expresión de la SONi, es el resultado de la intensa respuesta inflamatoria, con la subsecuente síntesis de diversas citocinas ($TNF\alpha$) que inducen su expresión. Recientemente se demostró que después de una lesión traumática de la médula espinal se activa el factor de transcripción $NF\kappa B$ asociado con el gen de la SONi (Bethea y cols., 1998). El factor de transcripción $NF\kappa B$ está constituido por un complejo de dos proteínas (hetero u homodímeros) p50, p52, RelA (p65), que se encuentra asociado con una proteína inhibitoria: I κ B (Sun y cols., 1995). Las señales que inducen la activación de $NF\kappa B$ producen la fosforilación de la I κ B α en las serinas 32 y 36 iniciando el proceso de ubiquitinación y su degradación a través del proteasoma (Bowie y O'Neill, 2000). Posteriormente el $NF\kappa B$ se transloca al núcleo, para iniciar la transcripción de los diferentes genes asociados a dicho factor entre ellos el de la SONi. Se ha descrito que en condiciones *in vivo* la fosforilación de la I κ B no es suficiente para activar al $NF\kappa B$, si no que se requiere de la degradación de la proteína inhibitoria por el proteasoma (Alkalay y cols., 1995). A este respecto Meyer y cols., (1997) demostraron que la CsA es un inhibidor no competitivo de la actividad del proteasoma y por medio de este mecanismo se previene la activación del $NF\kappa B$. En el modelo de lesión medular probablemente la CsA está actuando de modo similar y este evento se traduce en una disminución de la expresión de

la SONi (figura 23).

Por otra parte, se sabe que una de las principales vías de fosforilación de la I κ B es por medio de la activación de la IKK (cinasa que fosforila a la I κ B), la activación de este complejo es regulado por PKC y calcineurina, evento que activa al factor NF κ B, por lo que la CsA resulta ser un efectivo inhibidor de la activación de la IKK (Trushin y cols., 1999).

En el modelo de daño por contusión medular posiblemente este efecto inhibitorio de la CsA sobre la IKK es uno de los mecanismos que disminuyan la expresión de la SONi.

Finalmente, Aitur y cols., (2000) demostraron que la ciclosporina (1-5 microg/ml) inhibe la expresión de la SONi a nivel del RNAm, en una línea celular de macrófagos REW 264.7 incubados con LPS, así mismo Hämäläinen y cols., (2002) observan este mismo efecto en células epiteliales humanas de colon (T84) y en macrófagos de una línea celular murina, sin embargo en este trabajo se observa que la inhibición de la expresión de la SONi es independiente de la activación del factor de transcripción NF κ B. A este respecto la información es discrepante, ya que en ensayos *in vivo* realizados por Altavilla y cols. (2001) en un modelo de choque hemorrágico hipovolemico en ratas, los autores demuestran que la CsA inhibe la cantidad de I κ B citosólica y bloquea la activación de factor NF κ B.

Los resultados de este trabajo indican que el efecto de la CsA sobre la actividad y la expresión de las isoformas de la SON tiene una regulación diferencial, que depende del tiempo.

El efecto que tiene la CsA sobre la producción de NO presente en el tejido durante la etapa aguda de la lesión podría tener diversas implicaciones. Se ha reportado en modelos de lesión traumática de la médula, que la actividad de las isoformas SONn, SONi, SONE, se mantiene en neuronas, microglía y células endoteliales respectivamente en todos los

estadios después del daño y se han podido determinar que la producción de peroxinitrito después de una lesión es de 3 a 5 veces mayor, sugiriendo que el peroxinitrito juega un papel importante en el daño secundario. Este incremento en la concentración de peroxinitrito es producto probablemente del incremento de O₂⁻ y NO Xu y cols., (2000). En este mismo estudio, se determinó la presencia de peroxinitrito por medio de la técnica de nitrotirosina y los resultados muestran que 6 h después de la lesión se observan células marcadas con un anticuerpo contra nitrotirosina que tienen su pico máximo a las 12h y declinan significativamente a las 24 h.

Por el método de HPLC, también demostraron que la concentración de nitrotirosina en proteínas es significativamente mas alta en el tejido lesionado que en el tejido control, esto indica que después de una lesión traumática de la médula espinal se induce la nitración de proteínas. Además del daño a las proteínas, las altas concentraciones de peroxinitrito pueden dañar las células por la oxidación de las membranas lipídicas por la formación directa de radicales hidroxilo. Se ha reportado previamente que los radicales libres y las especies reactivas de NO desencadenan el fenómeno de lipoperoxidación (Ginberg, 2001), estos resultados sugieren que la excesiva producción de NO y radicales libres tienen un efecto directo en el daño secundario originado después de una lesión.

El incremento en la formación de NO, peroxinitrito y la nitración de proteínas en la etapa aguda de la lesión por contusión severa podrían tener gran importancia en los mecanismos de daño y reparación que se originan después del trauma (Kröncke y cols., 1997).

La regulación que ejerce la CsA sobre la producción de NO podría tener efectos protectores en dos eventos importantes:

a) Cuando el incremento de NO es a través del aumento en la actividad y expresión de la

SONe, el NO generado por esta vía, probablemente favorecería una mejor oxigenación del tejido lesionado lo que se traduciría en una disminución de los eventos de daño por isquemia.

b) Cuando se observa un decremento del NO por disminución de la expresión y actividad de la SONi. Probablemente por este efecto se podría observar menor daño citotóxico, pues como se ha comentado ampliamente las altas concentraciones de NO generado por la SONi son las que favorecen la formación de peroxinitrito.

Finalmente, cabe mencionar que el tratamiento con CsA después de una lesión puede tener efectos muy interesantes en la regulación de diversos mecanismos de daño y regeneración que se desencadenan después de una LTME, como lo demuestran algunos trabajos.

La activación de la calcineurina inhibe la elongación neurítica por su efecto sobre la actina del citoesqueleto, además de otros componentes como la proteína asociada a microtúbulos MAP-1B que regulan la unión a microtúbulos y filamentos de actina y se favorece el crecimiento del axón de una manera dependiente de la fosforilación. En un trabajo realizado por Lautermilch y cols. (2000) se propone que la inhibición de la calcineurina por CsA promueve el crecimiento neurítico, ellos sugieren un modelo de señalización iniciado por la activación de la calcineurina durante las oleadas de Ca^{2+} que se originan durante el crecimiento neurítico. La calcineurina regula las proteínas del citoesqueleto por un estado de desfosforilación desestabilizando los filamentos de actina y por lo tanto inhibiendo la elongación neurítica, se observó que durante la disminución de la concentración de Ca^{2+} no se activa la calcineurina y se favorece el crecimiento. Otra proteína asociada con la regeneración es la GAP-43, una fosfoproteína localizada en la superficie interna de la membrana plasmática, especialmente en los conos de crecimiento nervioso, esta es

fosforilada por la PKC manteniendo una forma activa, desfosforilada por la calcineurina se promueve su inactivación (Lautermilch y cols. 2000).

En un trabajo realizado por Sullivan y cols., (1999) utilizando un modelo de contusión cortical controlado demostraron que la CsA tiene la capacidad de inhibir la apertura del MPTP, ya que se une a la ciclofilina localizada en el MPTP. Por otra parte se ha reportado que la CsA tiene efecto neuroprotector en modelos de isquemia-reperusión después de una lesión al cerebro, también, se ha demostrado este efecto en un modelo de excitotoxicidad mediada por receptores NMDA (Ruiz y cols., 2000). Este efecto neuroprotector de la CsA se debe a que este fármaco es capaz de mantener el potencial de membrana a través de la inhibición de la apertura del MPTP.

Con base en estos antecedentes la CsA podría tener una participación muy importante en la inhibición de la apoptosis a través de su unión a la ciclofilina.

Con toda esta información, el uso de la CsA en el modelo de lesión medular podría participar a través de la inhibición de la calcineurina:

- a) Reduciendo a tiempos cortos e incrementando a largo plazo la producción de NO por su posible participación en la regulación de la actividad de la SON por fosforilación así como por calcio.
- b) Reduciendo a tiempos cortos e incrementando a largo plazo la cantidad de proteína de las de la SONn y de la SONE a través de su participación sobre la regulación de la expresión.
- c) Reduciendo a tiempos cortos e incrementando a largo plazo la cantidad de proteína de las de la SONn y de la SONE a través de su participación sobre la regulación de la expresión.

- d) Reducción a largo plazo la cantidad de proteína de la SONi a través de su participación sobre la regulación de la expresión.
- e) Favoreciendo la regeneración mediante un mecanismo de regulación por fosforilación de los diversos componentes del citoesqueleto, así como de la proteína GAP-43 relacionada con procesos de regeneración después de daño al sistema nervioso central.
- f) Disminuyendo el estrés oxidante a través de su efecto inmunosupresor al inhibir la activación del factor de transcripción NF-AT.

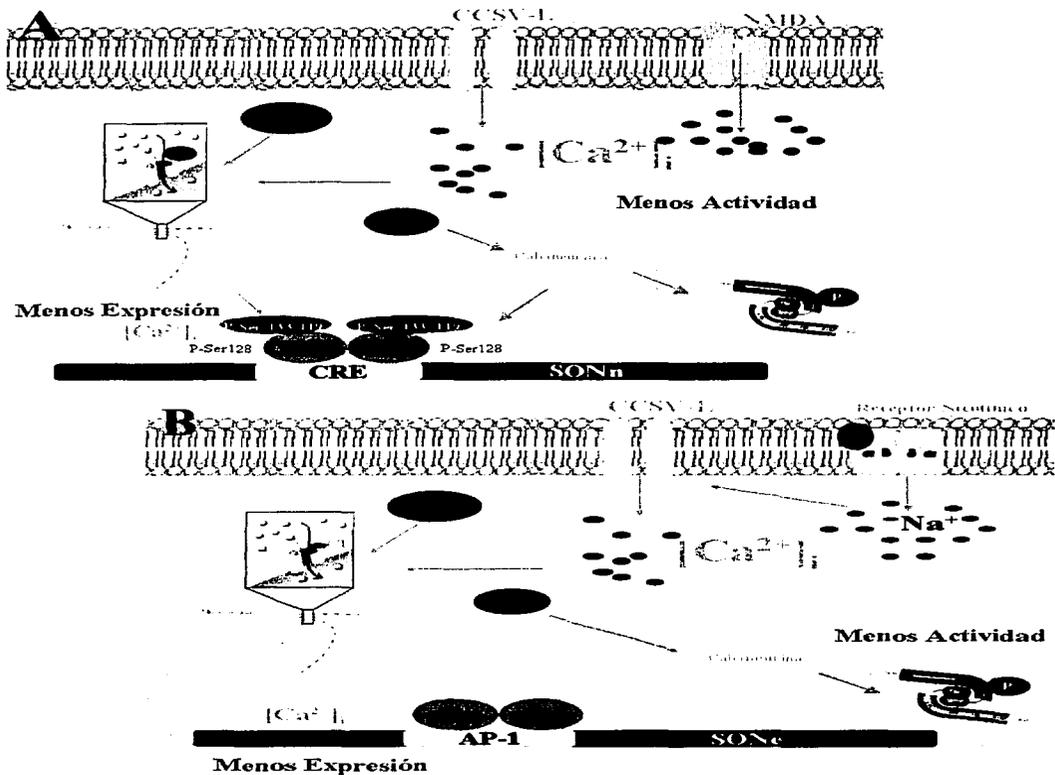


Figura 21. Posible efecto de la Ciclosporina-A, a corto plazo (4 h después del daño) sobre la expresión y la actividad de las isoformas de la sintasa del óxido neuronal y endotelial, A y B respectivamente, después de una lesión traumática de la médula espinal. NMDA: receptor N-metil-D-aspartato; CCSV-L: canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje tipo L; CsA: ciclosporina-A; CF: ciclofilina; CRE: elemento cis-regulador que responde a AMPc; CREB: Proteína que se une al elemento que responde a AMPc; AP-1: elemento cis-regulador que reconoce a la proteína -1 activadora; cFos: factor de transcripción cFos; cJun: factor de transcripción cJun; PKC: proteína inasa activada por Ca^{2+} y diacil glicerol; SONn: sintasa del óxido nítrico neuronal; SONe: sintasa del óxido nítrico endotelial.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

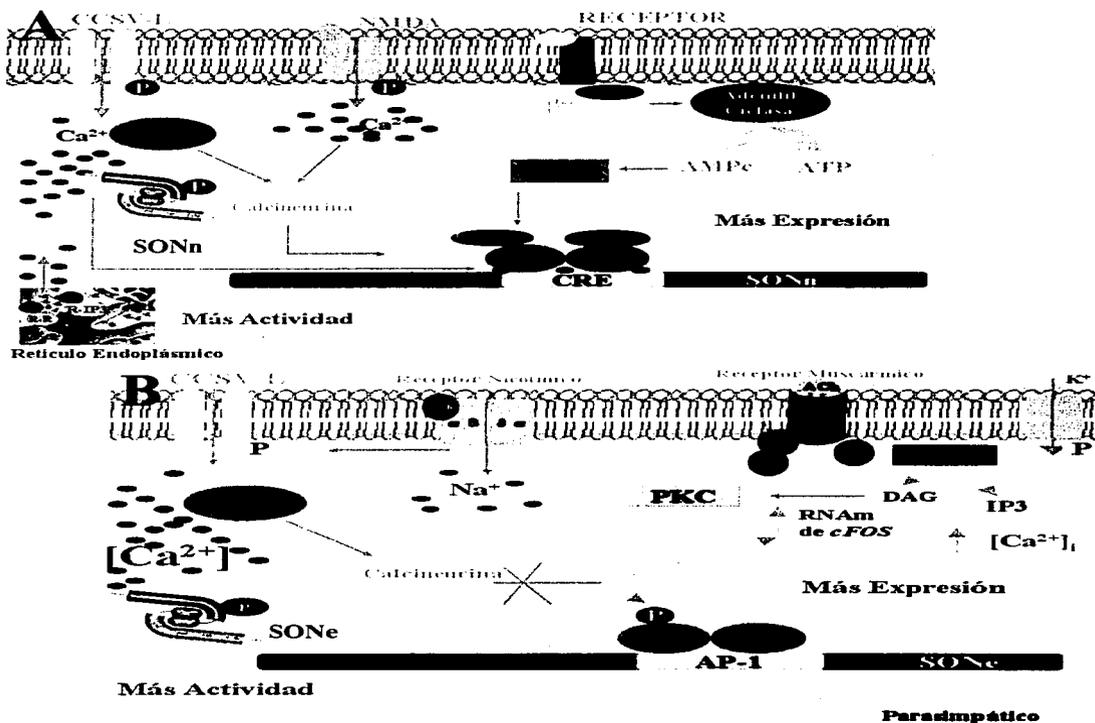


Figura 22. Posible efecto de la Ciclosporina-A, a largo plazo (24 h después del daño) sobre la expresión y la actividad de las isoformas de la sintasa del óxido neuronal y endotelial. *A* y *B* respectivamente, después de una lesión traumática de la médula espinal. NMDA: receptor N-metil-D-aspartato; CCSV-L: canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje tipo L; CsA: ciclosporina-A; CF: ciclofilina; CRE: elemento cis-regulador que responde a AMPc; CREB: Proteína que se une al elemento que responde a AMPc; AP-1: elemento cis-regulador que reconoce a la proteína -1 activadora; cFos: factor de transcripción cFos; cJun: factor de transcripción cJun; PKC: proteína cinasa activada por Ca²⁺ y diacil glicerol; PKA: proteína cinasa activada por AMPc; PLC: fosfolipasa C; R-R: receptor de rianodina; R-IP3: receptor para IP3; DAG: diacil glicerol; IP3: fosfatidil inositol trifosfato; SONn: sintasa del óxido nítrico neuronal; SONE: sintasa del óxido nítrico endotelial.

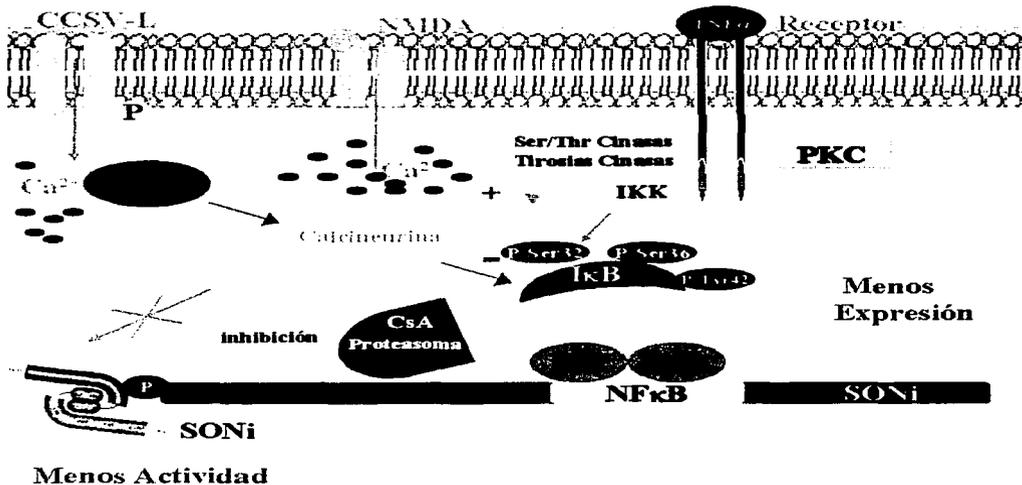


Figura 23. Posible efecto de la Ciclosporina-A, a largo plazo (72 h después del daño) sobre la expresión y la actividad de la sintasa del óxido inducible, después de una lesión traumática de la médula espinal. NMDA: receptor N-metil-D-aspartato; CCSV-L: canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje tipo L; TNF α : Factor de necrosis tumoral α ; CsA: ciclosporina-A; CF: ciclofilina; IKK: complejo de proteínas cinasas para la IκB; NFκB: Factor nuclear de transcripción κB; IκB: proteína inhibidora del NFκB; SONi: sintasa del óxido nítrico inducible.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la CsA mostró una capacidad para regular la expresión y la actividad de la SON después de una LTME en ratas, de la siguiente forma:

- a) Existe un incremento en la actividad de las diferentes isoformas de la SON por efecto de la lesión.
- b) El pico máximo de actividad para la SON constitutiva, se presenta 4 horas después de una LTME.
- c) El pico máximo de actividad para la SON inducible, se observa a las 72 horas después de una LTME.
- d) La variación y presencia de estrógenos y progestágenos en los diferentes estadios del ciclo estral de la rata, no modifican la actividad de la SON constitutiva e inducible.
- e) Existe un incremento en la expresión de la SON neuronal y de la SON endotelial por efecto de la lesión a las 4 horas después del daño.
- f) Existe un incremento en la expresión solamente de la SON neuronal por efecto de la lesión a las 24 horas después del daño.
- g) Existe un incremento en la expresión solamente de la SON inducible por efecto de la lesión a las 72 horas después del daño.
- h) La CsA disminuye la actividad y la expresión de la SON constitutiva a corto plazo, es decir, cuando es evaluada a las 4 horas después de la lesión.
- i) La CsA incrementa la actividad y la expresión de la SON constitutiva a largo plazo, cuando se evalúa 24 horas después de la lesión, en todos los grupos tratados.

CONCLUSIONES

- j) La CsA disminuye la actividad de la SON inducible solamente cuando se administra 12 horas después de la lesión y es evaluada 72 h después del daño.
- k) La CsA disminuye la expresión de la SON inducible en todos los grupos lesionados y tratados a diferentes tiempos (2, 6 y 12 h) después de la lesión.

Los resultados indican que, la CsA modula de manera selectiva la actividad y la expresión de las diferentes isoformas de la sintasa del óxido nítrico en los distintos tiempos evaluados después de una LTME. Esta modulación podría tener efectos benéficos durante el daño secundario, ya que el NO tiene funciones diversas y su efecto neuroprotector o citotóxico probablemente depende de su concentración, estado redox y tipo celular donde se genere.

REFERENCIAS

- Abe K, Morita S, Kikuchi T, Itoyama Y. Protective effect of a novel free radical scavenger, OPC-14117, on wobble mouse motor neuron disease. *J Neurosci Res.* 1997; 48: 63-70.
- Alkalay I, Yaron A, Hatzubal A, Jung S, Avraham A, Gerlitz O, Pashut-Lavon I, Ben-Neriah Y. In vivo stimulation of I κ B phosphorylation is not sufficient to activate NF κ B. *Mol. Cell Biol.* 1995; 15: 1294-1301.
- Altavilla D, Saitta A, Guarini S, Galeano M, Squadrito G, Santamaria LB, Venuti FS, Bazzani C, Bertolini A, Squadrito F. Nuclear factor-kappa B as a target of cyclosporin in acute hypovolemic hemorrhagic shock. *Cardiovasc Res.* 2001; 52: 143-152.
- Anderson DK, Braughler JM, Hall ED, Waters TR, McCall JM, Means ED. Effects of treatment with U-74006F on neurological outcome after spinal cord injury. *J Neurosurg.* 1988; 69: 562-567.
- Angel P y Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1072: 129-57
- Anneser JM, Horstmann S, Weydt P, Borasio GD. Activation of metabotropic glutamate receptors delays apoptosis of chick embryonic motor neurons in vitro. *Neuroreport.* 1998; 9: 2039-2043.
- Aschner M. The functional significance of brain metallothionein. *FASEB J.* 1996; 10: 1129-1136.
- Attur MG, Patel R, Thakker G, Vyas P, Levartovsky D, Patel P, Naqvi S, Raza R, Patel K, Abramson D, Bruno G, Abramson SB, Amin AR. Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE2 production. *Inflamm Res.* 2000; 49: 20-26.

- Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Rad Biol Med.* 1985; 1:3-25.
- Azcoitia I, Sierra A, Garcia-Segura LM. Estradiol prevents kainic acid-induced neuronal loss in the rat dentate gyrus. *Neuroreport.* 1998; 9: 3075-3079.
- Balentine JD. Spinal cord trauma: In search of the meaning of granular axoplasm and vesicular myelin. *J Neuropath Exp Neurol.* 1988; 47: 77-92.
- Bamber NI, Li H, Aebischer P, Xu XM. Fetal spinal cord tissue in mini-guidance channels promotes longitudinal axonal growth after grafting into hemisectioned adult rat spinal cords. *Neural Plast.* 1999; 6: 103-121.
- Barami K y Díaz FG. Cellular transplantation and spinal cord injury. *Neurosurgery.* 2000; 47:691-700.
- Bartholdi D y Schwab ME. Methylprednisolone inhibits early inflammatory processes but not ischemic cell death after experimental spinal cord lesion in the cat. *Brain Res.* 1995; 672: 177-186.
- Batelli MG, Bonamici L, Abbondanza A, Virgili M, Contestabile A, Stirpe F. Excitotoxic increase of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in the rat olfactory cortex. *Brain Res.* 1995; 86: 340-344.
- Bavetta S, Hamlyn PJ, Burnstock G, Lieberman AR, Anderson PN. The effects of FK506 on dorsal column axon following spinal cord injury in adult rats: neuroprotection and local regeneration. *Exp Neurol.* 1999; 158: 382-393.
- Beattie MS, Li Q, Bresnahan JC. Cell death and plasticity after experimental spinal cord injury. *Prog Brain Res.* 2000; 128: 9-21

REFERENCIAS

Becker J y Grasso RJ. Suppression of phagocytosis by dexamethasone in macrophage culture: Inability of arachidonic acid, indometacin and nordihydroguaiaretic acid to reverse the inhibitory response mediated by a steroid-inducible factor. *Int J Immunopharmacol.* 1985; 7: 839-847.

Behl C. Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nature Rev.* 2002, 8: 433-442.

Berkowitz M, Harvey C, Greene C, Wilson S. The economic consequences of traumatic spinal cord injury. New York. 1992.

Bethea JR, Castro M, Keane RW, Lee TT, Dietrich D, Yeziarski RP. Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor- κ B activation. *J Neurosci.* 1998; 9: 3251-32-60.

Bowie A y O'Neill LAJ. Oxidative stress and nuclear factor κ B activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol.* 2000; 59: 13-23.

Bracken MB, Collins WF, Freeman DF, Shepard MJ, Wagner FW, Silten RM, Hellenbrand KG, Ransohoff J, Hunt WE, Perot PL Jr, Gossman RG, Green BA, Eisenberg HM, Rifkinson N, Goodman JH, Meagher JN, Fischer B, Clifton GL, Flamm ES, Rawe SE. Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA.* 1984; 251: 45-52.

Bracken MB, Shepard MJ, Hellenbrand KG, Collins WF, Leo LS, Freeman DF, Wagner FC, Flamm ES, Eisenberg HM, Goodman JH; Perot PL Jr, Green BA, Grossman RG, Meagher JN, Young W, Fisher B, Clifton GL, Hunt WE, Rifkinson N. Methylprednisolone and neurological function 1 year after spinal cord injury study. *J Neurosurg.* 1985; 63:704-713.

Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon J, Marshall LF, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VKH, Wagner FC; Wilberger JE, Winn HR. A randomized controlled trial of

methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med.* 1990; 322:1405-1411.

Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF Jr, Holford TR, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon JC, Marshall LF Perrot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VKH, Wagner FC Jr, Wilberger JL, Winn HR, Young W. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg* 1992; 76: 23-31.

Bracken MB y Holford TR. Effect of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NACIS 2 J. *Neurosurg* 1993; 79: 500-507.

Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, NockelsRP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA* 1997; 277: 1597-1604.

Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Adrich EF, Fazl M, Fehlings MG, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL jr, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W. Methylprednisolone of tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury: 1-year follow up. Result of the third National Acute Spinal Cord Injury randomized controlled trial. *J Neurosurg.* 1998; 89: 699-706.

Bradford MM. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An Biochem.* 1976; 72: 248-254.

Braughler JM, Chase RL, Neff GL, Yonkers PA, Day JS, Hall ED, Sethy VH, Lahti RA. A new 21-aminoesteroid antioxidant Lacking glucocorticoid activity stimulates adrenocorticotropin secretion and block araquidonic acid release from pituitary tumor (AtT-20) cells. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1988; 244: 423-427.

Braughler JM y Hall ED. Involvement of lipid peroxidation in CNS injury. *J Neurotrauma.* 1992; 9 Suppl 1:S1-7.

Bravo G, Larios F, Rojas-Martinez R, Hong E, Salazar LA, Guizar-Sahagun G. Early changes in nitric oxide synthase activity in atrial intramural arteries following experimental spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett.* 1999; 271: 37-40.

Bredt DS y Snyder SH. Isolation of nitric oxide syntase a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 682-685.

Bregman BS, Kunkelbagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature.* 1995; 378: 498-501.

Brittis PA, Flanagan JG. Nogo domains and a Nogo receptor: Implications for axon regeneration. *Neuron.* 2001; 30:11-14.

Brune B, von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 1998; 351: 261-269.

Burgi B, Otten UH, Ochensberger B, Rihs S, Heese K, Ehrhard PB, Ibanez CF, Dahinden CA. Basophil priming by neutrophilic factor. Activation through the trk receptor. *J Immunol.* 1996; 157: 5582-5588.

REFERENCIAS

- Caggiano AO y Kraig RP. Neuronal nitric oxide synthase expression is induced in neocortical astrocytes after spreading depression. *J Cerebral Blood Flow Metab.* 1998; 18: 75-87.
- Carafoli E, Genazzani A, Guerini D. Calcium controls the transcription of its own transporters and channels in developing neurons. *Biochem Biophys Res Com.* 1999; 266: 624-632.
- Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dossett L. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol.* 1998; 151: 77-88.
- Caroni P y Schwab ME. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron.* 1988; 1: 85-96.
- Chang RC, Rota C, Glover RE, Mason RP, Hong JS. A novel effect of an opioid receptor antagonist, naloxone, on the production of reactive oxygen species by microglia: a study by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Brain Res.* 2000; 854: 224-229.
- Chen A, Xu XM, Kleitman N, Bunge MB. Methylprednisolone administration improves axonal regeneration into cell grafts in transected adult rat thoracic spinal cord. *Exp Neurol.* 1996; 138: 261-276.
- Chen MS, Huber AB, van der Daar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature.* 2000; 403: 434-439.
- Choi DW. Ion dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci.* 1987; 7: 369-379.

- Choit DW. Calcium: Still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* 1995; 18: 58-60.
- Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol.* 1996; 6: 667-672.
- Ciani E, Groneng L, Voltattorni M, Rolseth V, Constestabile A, Pausen RE. Inhibition of free radical production or free radical scavenging protects from the excitotoxic cell death mediated by glutamate in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 1996; 728: 1-6.
- Cirino G, Fiorucci S, Sessa W. Endothelial nitric oxide synthase: the cinerella of inflammation?. *TRENDS Pharmacol Sci.* 2003; 24: 91-95.
- Coates JR, Sorjonen DC, Simpson ST, Cox RN, Wright CJ, Hudson AA, Finn-Bodner ST, Brown SA. Clinicopathology effect of a 21-Aminoosteroid compound (U74389G) on high dose methylprednisolone on spinal cord function after stimulated spinal cord trauma. *Vet Surg.* 1995; 24: 128-139.
- Cosi C, Suzuki H, Milani D, Menegazzi M, Vantini G, Kanai Y, Skaper SD. Poly(ADP-ribose) polymerase: Early involvement in glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci Res.* 1994; 39: 38-46.
- David S. Axon growth promoting and inhibitory molecules involved in regeneration in the adult mammalian central nervous system. *Ment Retard Dev Disabilities Res Rev.* 1998; 4: 171-178.
- Davies KJ, Goldberg AL. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J Biol Chem.* 1987; 262: 8227-8234.
- Davies SJ, Goucher DR, Doller C, Silver J. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci.* 1999; 19: 5810-5822.

- Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Uhl GR, Snyder SH. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 9808-9812.
- Dawson TM, Dawson VL. ADP-ribosylation as a mechanism for the action of nitric oxide in the nervous system. *New Horiz*. 1995; 3: 85-92.
- De Groot CJA, Ruuls S, Theeuwes JWM, Dijkstra CD, Van der Walk P. Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesion. *J Neurophatol Exp Neurol*. 1997; 56: 10-20.
- Della-Corte E, Stirpe F. The regulation of rat liver xantina oxidase. Activation by proteolytic enzymes. *FEBS Lett*. 1968; 2: 83-84.
- Della-Corte E y Stirpe F. The regulation of liver xanthine oxidase. Involvement of thiolgroups in the conversion of the enzyme activity from deshydrogenase (Type D) into oxidase (Type O) and purification of the enzyme. *Biochem J*. 1972; 126: 739-745.
- Diaz-Ruiz A, Rios C, Duarte I, Correa D, Guizar-Sahagún G, Grijalva I, Ibarra A. Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett*. 1999; 266: 61-64.
- Diaz-Ruiz A, Ríos C, Duarte I, Correa D, Guizar-Sahagún G, Grijalva I, Madrazo I, Ibarra A. Lipid peroxidation inhibition in spinal cord injury: cyclosporin-A vs methylprednisolone. *Neuroreport*. 2000; 11: 1765-1767.
- Diaz-Ruiz A, Ibarra A, Perez-Severiano F, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Rios C. Constitutive and inducible nitric oxide synthase activities after spinal cord contusion in rats. *Neurosci Lett*. 2002; 319: 129-132.

- Ducker TB y Zeidman SM. Spinal cord injury. Role of steroid therapy *Spine* 1994; 19: 2281-2287.
- Dugan IL y Choi DW. Excitotoxicity, free radicals and cell membrane changes. *Ann Neurol*. 1994; 35: 517-521.
- Dumouli A, Privat A, Gimenez y Ribotta M. Transplantation of embryonic Rafe cells regulates the modifications of the gabaergic phenotype occurring in the injured spinal cord. *Neurosci*. 2000; 5: 173-182.
- Dykens JA. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^+ : Implication for neurodegeneration. *J Neurochem*. 1994; 63: 584-591.
- Ebadi M, Iversen PL, Hao R, Ceruti DR, Rojas P, Happe HK, Murrin LC, Pfeiffer RF. Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem Int*. 1995; 27: 1-22.
- Elkabes S, DiCicco Bloom EM, Black IB. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci*. 1996; 16: 2508-2521.
- Engenson TD, McKelvey TG, Rhyne DB, Boggio EB, Snyder SJ, Jones HP. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *J Clin Invest*. 1987; 79: 1564-1570.
- Espersen GT, Ernst E, Vestergaard M, Pedersen JO, Grunnet N. Changes in PMN leukocytes migration activity and complement C3d level in RA patients with high disease activity during steroid treatment. *Scand J Rheumatol*. 1989; 18:51-56

REFERENCIAS

Facchinetti F, Virgili M, Contestabile A, Barnabei O. Antagonists of the NMDA receptor and allopurinol protect the olfactory cortex but not striatum after intracerebral injection of kainic acid. *Brain Res.* 1992; 585: 330-334.

Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM. Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol.* 1998; 18: 667-682.

Faden AI y Simon R.P. A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol.* 1988; 23: 623-626.

Farooque M, Isaksson J, Jackson DM, Olsson Y. Clomethiazile (ZENDRA,CMZ) improves hind limb motor function and reduced neuronal damage after several spinal cord injury in rat. *Acta Neuropathol (Berl).* 1999; 98: 22-30.

Fawcett JW y Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* 1999; 49: 377-391.

Fehlings MG y Tator CH. The effect of nimodipine and dextran on axonal function and blood flow following experimental spinal cord injury. *J Neurosurg.* 1989; 71: 403-416.

Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE, Silver J. Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *J Neurosci.* 1999; 19: 8182-98.

Flowers RJ. Glucocorticoids and inhibition of phospholipase A2. En: *Anti-inflammatory Steroid Action: basic and clinical aspects.* Schleimer RP, Claman HN, Oronsky AL (eds). Academic Press: New York USA. 1989.

Franklin RJ, Crang AJ, Blakemore WF. Transplanted type-1 astrocytes facilitate repair of demyelinating lesions by host oligodendrocytes in adult rat spinal cord. *J Neurocytol.* 1991; 20:420-430.

Frapier JM, Choby C, Mangoni ME, Nargeot J, Albat B, Richard S. Cyclosporin A increases basal intracellular calcium and calcium responses to endothelin and vasopressin in human coronary myocytes. *FEBS letters.* 2001; 493: 57-62.

Foy MR. 17α -estradiol effect on CA1 hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem.* 2001; 76: 239-252.

Garcia-Nogales P, Almeida A, Fernandez E, Medina JM, Bolaños JP. Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to preventing nitric oxide-mediated glutathione depletion in cultured rat astrocytes. *J Neurochem.* 1999;72:1750-8.

Garcia-Nogales P, Almeida A, Bolaños JP. Peroxynitrite protects neurons against nitric oxide-mediated apoptosis. A key role for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in neuroprotection. *J Biol Chem.* 2003; 278:864-874.

Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP. Recovery of motor function after spinal cord injury—a randomized placebo-controlled trial with GM-1 ganglioside. *N Engl J Med.* 1991; 324: 1829-1838.

Geisler FH, Coleman WP, Grieco G, Poonian D, the Sygen study Group. The sygen multicenter acute spinal cord injury study. *Spine.* 2001; 26:S87-98

Gimenez y Ribotta M, Orsal D, Feraboli-Lohnherr D, Privat A. Recovery of locomotion following transplantation of monoaminergic neurons in the spinal cord of paraplegic rats. *Ann NY Acad Sci.* 1998; 860: 393-411.

REFERENCIAS

- Ginsberg MD. Role of free radical reactions in ischemic brain injury. *Drug News Perspect.* 2001; 14: 81-88.
- Gold BG, Katoh K, Storm-Dickerson T. The immunosuppressant FK506 increases the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. *J Neurosci* 1995; 15: 7509-7516.
- Gold BG. Immunophilin ligands in nerve regeneration. *Science & Medicine.* 2002; 32-41.
- Goldner FM, Patrick JW. Neuronal localization of the cyclophilin A protein in the adult rat brain. *J Comp Neurol.* 1996; 372: 283-93
- GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulon protein. *Nature.* 2000; 407: 963-970.
- Gree CJ. Experimental transplantation and cyclosporine. *Transplantation.* 1988; 46: S3-S10.
- Greenwood M.T, Guo Y, Kumar U. Distribution of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in rat brain. *J Biol Chem.* 1997; 238: 617-621.
- Haghighi SS, Johnson GC, de Vergel CF, Vergel Rivas BJ. Pretreatment with NMDA receptor antagonist MK801 improves neurophysiological outcome after an acute spinal cord injury. *Neurol Res.* 1996; 18: 509-515.
- Hall ED. Effect of the 21-aminosteroid U74006F on posttraumatic spinal cord ischemia in cats. *J Neurosurg* 1988; 68: 462-465.
- Hall ED, Yonkers PA, Andrus PK, Cox WJ, Anderson DK. Biochemistry and pharmacology of lipid antioxidants in acute brain spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1992; 9: S425-S442.

Hallenbeck JM, Jacobs TP, Feden AI. Combined PGI₂, indomethacin, and heparin improve neurological recovery after spinal trauma in cats. *J Neurosurg.* 1983; 58:749-754.

Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Nakauchi K, Niwa M, Kawai Y, Fukuzawa K. Involvement of an intercellular adhesion molecules, I-dependent pathway in the pathogenesis of secondary changes after spinal cord injury in rats. *J Neurochem.* 1996; 66:1525-1531.

Hämäläinen M, Lahti A, Moilanen E. Colcineurin inhibitors, cyclosporin A and tacrolimus inhibit expression of inducible nitric oxide synthase in colon epithelial and macrophage cell lines. *Eur J Pharmacol.* 2002; 448: 239-244.

Harada S, Imaki T, Chikada N, Naruse M, Demura Hiroshi. Distinct distribution and time-course changes in neuronal nitric oxide synthase and inducible NOS in the paraventricular nucleus following lipopolysaccharide injection. *Brain Res.* 1999; 821: 322-332.

Hargreaves KM, Costella A. Glucocorticoids suppress levels of immunoreactive bradykinin in inflamed tissue as evaluated by micro dialysis probes. *Clin Pharmacol Ther.* 1990; 48:168-178.

Hauben E y Schwartz M. Therapeutic vaccination for spinal cord injury: helping the body to cure itself. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24: 7-12.

Heese K, Fiebich BL, Bauer J, Otten U. NF-kappaB modulates lipopolysaccharide-induced microglial nerve growth factor expression. *Glia.* 1998; 22: 401-407.

Hemmens B y Mayer B. Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol Biol.* 1998; 100: 1-32.

Hencka MT y Feinstein DL. Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J Neuroimmunol.* 2001; 114: 8-18.

Hodgkinson SJ, Pollard JD, McLeod JG. Cyclosporin A in the treatment of chronic demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1990; 53:327-30

Horakova L y Stolc S. Antioxidant and pharmacodynamic effects of pyridoindole stobadine. *Gen pharmacol*. 1998; 30: 627-38.

Hu WH, Li F, Qiang WA, Liu N, Wang GQ, Xiao J, Liu JS, Liao WH, Jen MF. Dual role for nitric oxide in dynorphin spinal neurotoxicity. *J Neurotrauma* 1999; 16: 85-98.

Hu WH, Li F, Qiang WA, Li F, Liu N, Wang GQ, Wang H., Wan XS, Liao WH, Liu JS, Jen M. Constitutive and inducible nitric oxide synthase after dynorphin-induced spinal cord injury. *J Chem Neuroanat*. 2000 ; 17 : 183-197.

Ibarra A, Martínez S, Reyes J, Correa D, Guizar-Sahagún G, Kretsmen R, Grijalva I, Madrazo I. Clinical improvement of spinal cord injured rats subjected to cyclosporin-A treatment. *Soc Neurosci Abstr*. 1995; 21: 314.

Ibarra A, Reyes J, Martínez S, Correa D, Guizar-Sahagún G, Grijalva I, Castañeda-Hernandez G, Flores-Murrieta I, Franco-Bourland R, Madrazo I. Use of Cyclosporin-A in experimental spinal cord injury: Design of dosing strategy to maintain therapeutic levels. *J Neurotrauma*. 1996; 13: 567-570.

Imanaka T, Hukuda S, Maeda T. The role of GM-1 ganglioside in the injured spinal cord of rats: an immunohistochemical study using GM-1 antisera. *J Neurotrauma*. 1996; 13: 163-170.

Inestrosa NC, Marzolo MP, Bonnefont B. Cellular and molecular basis of estrogen's neuroprotection: Potential relevance for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 1998; 17: 73-86.

Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert J N, Verdine GI, Curran T, Rao A. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature*. 1993; 365: 352-355.

Jeffery ND, Crang AJ, O'Leary MT, Hodge SJ, Blakemore WF. Behavioral consequences of oligodendrocyte progenitor cell transplantation into experimental demyelinating lesion in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci*. 1999; 11: 1508-1514.

Kahan BD. Cyclosporine. *New Eng J Med*. 1989; 321: 1725-1738.

Kaptanoglu E, Caner HH, Surucu HS, Akbiyik F. Effect of mexiletine on lipid peroxidation and early ultrastructural findings in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg*. 1999; 91: 200-204.

Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide inhibition apoptosis by preventing increases in caspase-3 like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem*. 1997; 272: 31138-31148.

Kliot M, Smith GM, Siegal JD, Silver J. Astrocyte-polymer implants promotes regeneration of dorsal root fibers into the adult mammalian spinal cord. *Exp Neurol*. 1990; 109: 57-69.

Koh JY, Peters S, Choi DW. Neurons containing NADPH-diaphorase are selectively resistant to quinolinate toxicity. *Science*. 1986; 234: 17-76.

Kristal BS, Dubinsky JM. Mitochondrial permeability transition in the central nervous system: Induction by calcium cycling-dependent and independent pathways. *J Neurochem*. 1997; 69: 524-538.

Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where?. *Biol Chem*. 1997; 1: 107-120.

REFERENCIAS

Labombarda F, Gonzalez S, Roig P, Lima A, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. Modulation of NADPH-diaphorase and glial fibrillary acidic protein by progesterone in astrocytes from normal and injured rats spinal cord. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 73: 159-169.

Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Vaillant N, Widmann C, Lazdunski M. Riluzole prevents ischemic spinal cord injury caused by aortic crossclamping. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999; 117: 881-889.

Lautermilch NJ y Spitzer NC. Regulation of calcineurin by growth cone calcium waves controls neurite extension. *J Neurosci.* 2000; 20: 315-325.

Lee TT, Green BA, Dietrich WD, Yeziarski RP. Neuroprotective effects of basic fibroblast growth factor following spinal cord contusion injury in the rat. *J Neurotrauma* 1999; 16: 347-56.

Lei SZ, Pan ZH, Aggarwal SSK, Chen HSV, Hartman J, Sucher NJ, Lipton SA. Effect of nitric oxide production on the redox modulatory side of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron.* 1992; 8: 1087-1099.

Lemke M, Demediuk P, McIntosh TK, Vink R, Faden AI. Alterations in tissue Mg⁺⁺. Na⁺ and spinal cord edema following impact trauma in rats *Bioch Cioph Res Com.* 1987; 147: 1170-1175.

Leon A, Buriani A, Dal Toso R, Fabris M, Romanello S, Aloe L, Levi Montalcini R. Mast cell synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 3739-3743.

Ley General de Salud. Titulo 7º: De la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación. Ed Porrua. 6th de México D.F. 1990.

Li H, Wallareth T, Förstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*. 2002; 7: 132-147.

a-Liu C, Jin A, Zhou C, Chen B. Nitric oxide synthase gene expression in injured spinal cord tissue. *Chin Med J (Engl)*. 2002; 115: 740-742.

b-Liu C, Jin A, Zhou C, Min S. Gene expression of two kinds of constitutive nitric oxide synthase in injured spinal cord tissue. *Chin J Traumatol*. 2002; 5: 3-6

Liu D, Thangnipon W, Mc Adoo DJ. Excitatory amino acid rise to toxic levels upon impact injury to rat spinal cord. *Brain Res*. 1991; 547: 344-348.

Liu D, Xu G, Pan E, MacAdoo DJ. Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neurosci*. 1999; 93: 1383-1389.

Liu D, Ling X, Wen J, Liu J. The role of reactive nitrogen species in secondary spinal cord injury: formation of nitric oxide, peroxynitrite, and nitrate nitrated protein. *J Neurochem*. 2000; 75: 2144-2154.

Liu S, Ruenes GL, Yeziarski RP. NMDA and non-NMDA receptor antagonists protect against excitotoxic injury in the rat spinal cord. *Brain Res*. 1997; 756: 160-167.

Liu RH, y Hotchkiss JH. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide a review. *Mutat Res*. 1995; 339: 73-89.

Loihl AK y Murphy S. Expression of NOS-2 in glial associated with CNS pathology. *Prog Brain Res*. 1998; 118: 253-267.

Lonze BE y Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002; 35: 605-623

REFERENCIAS

Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J, Leza JC. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 2001; 24: 420-429.

McDonal JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DJ, Choi DW. Transplanted embrionic stem cell survive differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med*. 1999; 5: 1410-1412.

McDonald JW. Repairing the damage spinal cord. *Sci Am*. 1999; 281: 64-73.

McNeill AM, Zhang C, Stanczyk FZ, Duckles SP, Krause DN. Estrogen increases endothelial nitric oxide synthase via estrogen receptors in rat cerebral blood vessels: effect preserved after concurrent treatment with medroxyprogesterone acetate or progesterona. *Stroke*. 2002; 33: 1685-1691.

McTigue DM, Horner PJ, Stokes BT, Gage FH. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurosci*. 1998; 18:5354-5365.

Menei P, Montero-Menei C, Whittemore SR, Bunge RP, Bunge MB. Schwann cell genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci*. 1998; 10: 607-621.

Merrill JE, Murphy SP, Mitrovic B, Mackenzie-Graham A, Dopp J C, Ding M, Griscavage J, Ignarro LJ, Lowenstein CJ. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production by oligodendrocytes. *J Neurosci Res*. 1997; 48: 372-384.

REFERENCIAS

- Meyer S, Kohler G, Joly A. Cyclosporine A is an uncompetitive inhibitor of proteasome activity and prevents NF-kappaB activation. *FEBS Lett.* 1997 Aug 18;413(2):354-8.
- Minc-Golomb D, Tsarfaty I, Scheartz JP. Expression of inducible nitric oxide synthase by neurons following exposure to endotoxin and cytokine. *Br J Pharmacol.* 1994; 112: 720-722.
- Moalem G, Gdalyahu A, Shani Y, Otten U, Lazarovici P, Cohen IR, Schwartz M. Production of neurotrophins by activated T cells: Implications for neuroprotective autoimmunity. *J Autoimmun.* 2000; 15: 331-345.
- Mohanakumar KP y Muralikrishnan D. Neurochemical mechanisms underlying neuroprotective action of bromocriptine, salicylate, d-and l-deprenyl in neurodegeneration caused by MPTP. *In Neurotoxic Factors in Parkinson's Disease and Related Disorders* M.A. Collins & A. Storch Eds: 2000; 289-293. Kluwer Academic/Plenum, New York.
- Mohanakumar KP, Kochupurackal P, Thomas B, Sharma SM, Muralikrishnan D, Chowdhury R, Chiueh CC. Nitric Oxide: An Antioxidant and neuroprotector. *Ann N Y Acad Sciences.* 2002; 962: 389-401.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43: 109-142.
- Morioka M, Hamada JI, Ushio Y, Miyamoto E. Potential role of calcineurin for brain ischemia and traumatic injury. *Prog Neurobiol.* 1998; 58: 1-30.
- Mukai K, Daifuku K, Yokoyama S. Stopped-flow investigation of antioxidant activity of estrogen in solution. *Biochem Biophys. Acta.* 1990; 1035: 348-352.

REFERENCIAS

- Murphy S. Production of nitric oxide by glial cells: Regulation and potential roles in the CNS. *Glia*. 2000; 29: 1-14.
- Nakahara S, Yone K, Setoguchi T, Yamaura I, Arishima Y, Yoshino S, Komiya S. Changes in nitric oxide and expression of nitric oxide synthase in spinal cord after acute traumatic injury in rats. *J Neurotrauma*. 2002; 19: 1467-1474.
- Nakajima K, Tohyama Y, Kohsaka S, Kurihara T. Ability of rat microglia to uptake extracellular glutamate. *Neurosci Lett*. 2001; 307: 171-174.
- Navarro-Antolin J, Rey-Campos J, Lamas S. Transcriptional induction of endothelial nitric oxide gene by cyclosporine A. *J Biol Chem*. 2000; 275: 3075-380.
- Nemoto T, Sekikawa T, Suzuki T, Moriya H, Nakaya H. Inhibition of nitric oxide synthesis accelerates the recovery of polysynaptic reflex potentials after transient spinal cord ischemia in cats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1997; 355: 447-51.
- Novikov L, Novikova L, Kellerth JO. Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neurosci*. 1997; 79: 765-74.
- Olsson Y, Sharma HS, Nyberg F. The opioid receptor antagonist naloxone influences the pathophysiology of spinal cord injury. *Prog Brain Res*. 1995; 104:381-399.
- O'Regan MH, Smith-Barbour M, Perkins LM, Cao X, Phillis JW. The effect of amiflutizole, a xanthine oxidase inhibitor, on ischemia-evoked purine release and free radical formation in the rat cerebral cortex. *Neuropharmacology*. 1994; 33: 1197-120.
- Oudega M y Hagg T. Nerve growth factor promotes regeneration of sensory axons into the adult rat spinal cord. *Exp Neurol*. 1996; 140: 218-229.

REFERENCIAS

Padh H. Vitamin C, newer insights into its biochemical functions. *Nutr Rev.* 1991; 49: 65-70.

Packer MA y Murphy MP. Peroxynitrite formed by simultaneous nitric oxide and superoxide generation causes cyclosporin-A-sensitive mitochondrial calcium efflux and depolarization *Eur J Biochem.* 1995; 234: 231-239.

Pardini CM. Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal. Tesis de Doctorado de la Secretaría de Salubridad y Asistencia 1998.

Pasterkamp RJ, Holtmaat A, De Wit J, De Winter F, Verhaagen J. Expression of the gene encoding the chemorepellent semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS. *Mol Cell Neurosci.* 1999; 13: 143-163.

Pointillart V, Petitjean ME, Wiart L, Vital JM, Lassié P, Thicoipé M, Dabadie P. Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase. *Spinal Cord.* 2000; 38:71-76.

Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J Comp Neurol.* 1997; 378: 88-104.

Rabchevsky AG y Smith GM. Therapeutic interventions following mammalian spinal cord injury. *Arch Neurol.* 2001; 28:721-726.

Ramer MS, Priestley JV, McMahon SB. Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. *Nature.* 2000; 403: 312-316.

REFERENCIAS

- Ramon-Cucto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplant. *J Neurosci.* 1998; 18: 3803-3815.
- Ramon-Cucto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron.* 2000; 25: 425-435.
- Reier PJ, Stokes BT, Thomson FJ, Anderson DK. Fetal cell grafts into resection and contusion/compression injuries of the rat and cat spinal cord. *Exp Neurol.* 1992; 115: 177-188.
- Reynolds IJ y Hastings H. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 1995; 15: 3318-3327.
- Rhoney DH, Luer MS, Hughes M, Hatton J. New pharmacologic approaches to acute spinal cord injury. *Pharmacotherapy* 1996; 16: 382-392.
- Robchevsky AG y Streit WJ. Role of microglia in postinjury repair and regeneration of the CNS. *Ment Retard Dev Disabilities Res Rev.* 1998; 4: 187-192.
- Rossignol S, Chau C, Brustein E, Belanger M, Barbeau H, Drew T. Locomotor capacities after complete and partial lesion of the spinal cord. *Acta Neurobiol Exp (Warsz).* 1996; 56: 449-463.
- Ruiz F, Alvarez G, Ramos M, Hernandez M, Bogonez E, Satrustegui J. Cyclosporin A targets involved in protection against glutamate excitotoxicity. *Eur J Pharmacol.* 2000; 404:29-39.

REFERENCIAS

Ryffel B. Pharmacology of cyclosporine VI. Cell activation regulation of intracellular events by cyclosporine. *Pharmacol Rev.* 1989; 41: 404-416.

Santambrogio L, Benedetti M, Chao MV, Muzaffar R, Kulig K, Gabellini N, Hochwald G. Nerve growth factor production by lymphocytes. *J Immunol.* 1994; 153: 4488-4495.

Sasaki M, Gonzalez-Zulueta M, Huang H, Herring WJ, Ahn S, Ginty DD, Dawson VL, Dawson TM. Dynamic regulation of neuronal NO synthase transcription by calcium influx through a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *PNAS.* 2000; 97: 8617-8622.

Schleimer RP, Freeland HS, Peters SP, Brown KE, Derse CP. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation leukotriene B₄ by purified human neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989; 250: 598-605.

Schwab ME y Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev.* 1996; 76:319-370.

Schwaninger M, Blume R, Krüger, Lux G, Oetjen E, Knepel W. Involvement of the Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin in gene transcription that is stimulated by cAMP through cAMP response elements. *J Biol Chem.* 1995; 270: 8860-8866.

Segal JL, Pathak MS, Hernandez LP, Himber PL, Brunnemann SR, Charter RS. Safety and efficacy of 4-aminopyridine in humans with spinal cord injury: a long-term, controlled trial. *Pharmacotherapy.* 1999; 19: 713-723.

Shen YH, Wang XL, Wilcken DE. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. *FEBS Lett.* 1998; 433:125-31

REFERENCIAS

Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. Basic neurochemistry molecular, cellular and medical aspects. 6^a edition, Lippincott Raven; New York 1998.

Solomon A, Aloe L, Pe'er J, Frucht PeryJ, Bonini S, Levi Schaffer F. Nerve growth factor is preformed in and activies human peripheral blood eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 1998; 102: 454-460.

Sorensen A M. Reproducción animal principios y prácticas. Mc. Graw Hill. México 1982.

Su Q, Eugster HP, Ryffel B, Dumont F. Cyclosporin A enhances the calcium-dependent induction of AP-1 complex and c-fos mRNA in a T cell lymphoma. *Biochem Biophys Res Comm.* 1996, 229: 249-256.

Sullivan PG, Thompson MB, Scheff SW. Cyclosporin A attenuate acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 1999. 160: 226-234.

Sun SC, Maggirwar SB, Harhaj E. Activation of NFkB by phosphatase inhibitors involves the phosphorylation of Ikb α at phosphatase 2A-sensitive sites. *J Biol Chem.* 1995; 270: 18347-18351.

Suzer T, Coskun E, Islekel H, Tahta K. Neuroprotective effect of magnesium on lipid peroxidation and axonal function after experimental spinal cord injury. *Spinal Cord.* 1999; 37: 480-484.

Tallant EA, Brumley LM, Wallace RW. Activation of calcineurin-dependent phosphatase by a Ca²⁺ dependent protease. *Biochem.* 1988; 27: 2205-2211.

REFERENCIAS

Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R. Effect of estrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet*. 1996; 384: 429-432.

a Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Harada N, Johno M, Naruo M, Okabe H, Takatsuki. Gabexate mesylate, a synthetic protease inhibitor, prevents compression-induced spinal cord injury by inhibiting activation of leukocytes in rats. *Crit Care Med*. 1997; 25: 874-879.

b Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, Naruo M, Okabe H, Takatsuki K. Reduction of spinal cord injury by administration of iloprost a stable prostacyclin analog. *J Neurosurg*. 1997; 86:1007-1011.

Taoka Y y Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol*. 1998; 56: 341-358.

Teebor GW, Boorstein RJ, Cadet J. The reparability of oxidative free radical mediated damage to DNA. *Int J Radiat Biol*. 1988; 54: 131-150.

Teng YD, Mocchetti I, Wrathall JR. Basic and acidic fibroblast growth factors protect spinal motor neurons in vivo after experimental spinal cord injury. *Eur J Neurosci*. 1998; 10: 798-802.

Teng YD, Mocchetti I, Taveira-DaSilva AM, Gillis RA, Wrathall JR. Basic fibroblast growth factor increases long-term survival of spinal motor neurons and improves respiratory function after experimental spinal cord injury. *J Neurosci*. 1999; 19: 7037-47.

Terada LS, Guidot DM, Leff JA, Willingham IR, Hanley ME, Piermattei D, Repine JE. Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 89: 3362-3366.

REFERENCIAS

Terada LS, Willingham IR, Rosandich ME, Leff JA, Kindt GW, Repine JE. Generation of superoxide anion by brain endothelial xanthine oxidase. *J Cell Physiol.* 1992; 27: 620-625.

Tessier-Lavigne M, Goodman CS. Perspectives: neurobiology. Regeneration in the nogo zone. *Science.* 2000; 287: 813-814.

Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, Nencioni L, Labardi D, Rubartelli A, Cozzolino F, Aloe L, Garaci E. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell.* 1996; 85: 345-356.

Trajkovic V, Badovinac V, Jancovic V, Stojkovic M.M. Cyclosporin-A inhibit activation of inducible nitric oxide synthase in C6 glioma cell line. *Brain Res.* 1998; 816: 92-98.

Trushin SA, Pennington KN, Algeciras-Schimmich A, Paya CV. Protein kinase C and calcineurin synergize to activate I κ B kinase and NF κ B in T lymphocytes. *J Biol Chem.* 1999; 274: 22923-22931.

Tsugunobu A, Boon CP, Chiueh CC. Preconditioning-mediated neuroprotection: Role of nitric oxide, cGMP and new protein expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 962: 1-7.

Tuszynski M.H. Neurotrophic factors. Academic Press. New York. 1999; 109-159.

Tuszynski MH. Gene therapy for nervous system disease. *Ann NY Acad.* 1997; 835: 1-11.

Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev.* 2002; 54: 375-429.

REFERENCIAS

vonEuler M, Li-Li M, Whirtemore S, Seiger A, Sundstrom E. No protective effect on the NMDA antagonist memantine in experimental spinal cord injuries. *J Neurotrauma*. 1997; 14: 53-61.

Vries J, Baarsma GS, Zaal MJW, Boen-Tan TN, Rothova A, Buitenhuis HJ, Schweitzer CMC, de Keizer RJW, Kijlstra A. Cyclosporin in the treatment of severe chronic idiopathic uveitis. *Br J Ophthalmol*. 1990; 74: 344-349.

Wada S, Yone K, Ishidou Y, Nagamine T, Nakahara S, Niiyama T, et al. Apoptosis following spinal cord injury in rats and preventive effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Neurosurg*. 1999; (1Suppl): 98-104.

Williams KI, Higgs GA. Eicosanoids and inflammation. *J Pathol*. 1988; 156:101-110.

Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radicals. Biol Medicine*. 1998; 25: 434-456.

Winyard PG, Morris ChJ, Winrow VR, Zaidi M, Blake DR. Free radicals pathways in the inflammatory response. *NEW comprehensive Biochemistry NY*. 1994 vol. 28 p.361-379.

Wu W Expression of nitric oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry. *Exp Neurol*. 1993; 120: 153-159.

Xiao J, Zhao D, Hou T, Wu K, Zeng H. Synergetic protective effects of combined blockade by two kinds of autolesion mediator receptor on neurological function after cervical cord injury. *Chin Med J (Engl)*. 1998; 111: 443-446.

Xu J, Kim GM, Chen S, Yan P, Ahmed SH, Ku G, Beckman JS, Xu XM, Hsu CY. NOS and nitrotyrosine expression after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2001 ; 18 : 523-532.

REFERENCIAS

Xu M, Ng Y K, Leong SK. Neuroprotective and neurodestructive function of nitric oxide after spinal cord hemisection. *Exp Neurol.* 2000 ; 161: 472-480.

Young W, Koreh I. Potassium and calcium changes in injured spinal cords. *Brain Res.* 1986; 365: 42-53.

Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science.* 1994; 263: 687-689.

Zhang Z, Krebs CJ, Guth L. Experimental analysis of protective necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. *Exp Neurol.* 1997; 143: 141-152.

Zhang XY, Zhou CS, Jin AM, Tian J, Zhang H, Yao WT, Zheng G. Effect of aminoguanidine on the recovery of rat hindlimb motor function after spinal cord injury. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 2003; 23: 687-689.

Zeiling G, Dolev M, Weidarden H, Blumen N, Shemesh Y, Ohry A. Long-term and mortality after spinal cord injury: 50 years of follow-up. *Spinal Cord.* 2000; 38: 563-566.

Zeman RJ, Feng Y, Peng H, Etlinger JD. Clenbuterol, a β_2 adrenoreceptor agonist improves locomotion and histological outcomes after spinal cord contusion in rats. *Exp Neurol.* 1999; 159: 267-273.

Zompa EA, Cain LD, Everhart AW, Moyer MP, Hulsebosch CE. Transplant therapy: Recovery of function after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 1997; 14: 479-506.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Neuroscience
Letters

Neuroscience Letters 319 (2002) 129–132

www.elsevier.com/locate/neulet

Constitutive and inducible nitric oxide synthase activities after spinal cord contusion in rats

Araceli Díaz-Ruiz^{a,b,c}, Antonio Ibarra^{b,c}, Francisca Pérez-Severiano^a,
Gabriel Guizar-Sahagún^{b,c}, Israel Grijalva^{b,c}, Camilo Ríos^{a,*}

^aDepartamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez, Mexico City D.F., Mexico

^bUnidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, H.E., C.M.N. Siglo XXI, IMSS, Mexico City D.F., Mexico

^cLaboratorio de Neuroinmunología, Proyecto Camina A.C., Mexico D.F., Mexico

Received 29 August 2001; received in revised form 4 December 2001; accepted 4 December 2001

Abstract

Nitric oxide (NO) plays a role in the secondary damage after spinal cord (SC) injury. NO is produced by the activity of two classes of enzymes: calcium-dependent constitutive nitric oxide synthase (NOS) and calcium-independent inducible NOS. To determine the time course of both NOS activities after SC injury, 50 Wistar rats were submitted to severe SC contusion. NOS activities were assayed at the site of SC injury at several times after lesion. Results showed a significant increase of 138 and 96% in the constitutive NOS activity at 4 and 8 h after the lesion, respectively, as compared to sham-operated rats. iNOS activity was increased 72 h after lesion by 103% ($P < 0.05$). In conclusion, both isoforms of NOS increase their activity at different time periods after SC injury. © 2002 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Nitric oxide; Synthase; Inducible; Constitutive; Spinal cord injury

Traumatic lesion of the spinal cord produces a secondary damage that spreads the initial injury from the primary lesion to the surrounding tissue. Among the factors associated with this secondary lesion, reactive oxygen species are thought to be deeply involved as mediators of spinal cord damage [1]. As a free radical, nitric oxide seems to play a major role in the secondary lesion, because under certain conditions nitric oxide may act as a cytotoxic molecule [2]. The range of concentration, the redox state, the cell type source, and in general, the environment in which NO is produced may lead to either reactive cytotoxic or neuroprotective species derived from NO [12]. Among them, peroxynitrite is the most reactive against biological molecules [3] rendering alterations in proteins, lipids and DNA [11,18].

Nitric oxide is produced from L-arginine by two classes of enzyme proteins: constitutive nitric oxide synthase (cNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), the former dependent on intracellular calcium, while the latter independent. In the central nervous system, two different cNOS isoforms are expressed, one in neurons (ncNOS) and the

other in endothelial cells (ecNOS) [15]. iNOS is expressed in macrophages and glia, among other cells, after activation by cytokines [16].

Studies on NOS activity provide with relevant information about enhanced production of nitric oxide in the environment of the assessed tissue. There is scarce information about NOS activity in the site of lesion after SC injury. Hu et al. [9] showed a time-dependent differential increase in cNOS and iNOS after lesion produced by dynorphin microinjection to the rat spinal cord. Meanwhile, Xu et al. [19] reported increased activity of iNOS after traumatic spinal cord injury, although the activity of cNOS at the damage site has not been described for the latter model of trauma, which accurately resemble most human spinal cord injuries.

In the present study, we inflicted a contusion to the spinal cord as a model of traumatic injury of the spinal cord in order to characterize the temporal changes of both cNOS and iNOS activities in rats.

Animals were manipulated according to the ethical principles of our Institution and the National Institutes of Health standards.

Adult female Wistar rats (200–250 g) were used throughout the experiments. Animals were fed with Purina chow (Purina, Mexico) and drank water freely. Calcium chloride and Tris-HCl were purchased from E. Merck, Mexico. [11]

* Corresponding author. Dirección de Investigación, Av. Insurgentes Sur No. 3877, Mexico City 14269, D.F., Mexico. Tel.: +52-5-5528-8036; fax: +52-5-5424-0808.

E-mail address: crios@cuayatl.uam.mx (C. Ríos).

L-Arginine was obtained from Amersham International, all other reagents were from Sigma (St. Louis, MO).

For NOS activity studies, the rats were randomly allocated in two groups. Under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg i.p.), one group was submitted to a severe spinal cord contusion (T9) according with the weight drop method described by Allen and modified for rats as described previously [8]. In brief, under stereotaxic control, a 15 g stainless steel cylinder with a flat tip of 2 mm diameter was dropped from a height of 10 cm through a guide tube onto the exposed dura mater. The second group was only submitted to laminectomy (sham-lesioned group), also under pentobarbital anesthesia. NOS activities were assayed by measuring the conversion of [^3H]-L-arginine to [^3H]-L-Citrulline [6]. Both groups of rats were allowed to recover from anesthesia and surgical procedures in an intensive care unit for small animals (Schoer Manufacturing Co., Kansas City, MO), and were then housed in individual acrylic cages with sterile sawdust. Rats received chow and water ad libitum. Their intestine and bladder were handled with manual expression twice a day until sacrifice.

Animals were killed by decapitation at different time periods after surgery procedure (2, 4, 8, 12, 24 and 72 h). Spinal cord tissue obtained 2 mm rostral and 2 mm caudal from the injured site was frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until NOS activity was measured. Spinal cord tissue was homogenized over ice in 250 μl of the following buffer and protease inhibitors solution: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% 2-mercaptoethanol, 1 mM leupeptin, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 2 mg/l aprotinin, 10 mg/l soybean trypsin [7] inhibitor (SBTI) and 40% v/v Nonidet P-40. A volume of homogenate containing 500 μg of protein was incubated in

the presence of 10 μM L-arginine-HCl, 0.2 μCi [^3H]-L-arginine, 1 mM NADPH, 10 μM calmoduline and 2.5 mM CaCl_2 . The reaction volume was made up to 100 μl by adding homogenization buffer and incubated for 30 min at 37°C . The reaction was stopped by addition of 1 ml of stop buffer (2 mM EGTA, 2 mM EDTA and 20 mM HEPES; pH 5.5). The reaction mixture was then applied onto a 1 ml column of dowex resin (50 W, Na^+ form) that had previously been equilibrated with stop buffer. [^3H]-L-Citrulline was eluted with 1 ml of water and quantified by liquid scintillation in a Beckman LS6500 scintillation counter. Results were expressed as ng of L-citrulline/mg protein/30 min. In order to obtain both calcium-dependent (eNOS) and calcium-independent (iNOS) activities from the same tissue sample, enzyme activity was evaluated either in the presence (2.5 mM) or the absence of calcium in the incubation medium. Protein concentration in the homogenates was measured using Bradford reagent [4] with bovine serum albumin as a standard. Statistical significance of the differences in eNOS and iNOS activities at the different times after lesion was determined by analysis of variance followed by the Dunnet's test using the SPSS software.

Results of NOS activities are shown in Figs. 1 and 2. In control rats (sham-lesion group) the spinal cord presented basal eNOS and iNOS activities of 24.56 ± 2.9 and 23.34 ± 2.7 , respectively, expressed as ng of L-citrulline/mg protein/30 min. Interestingly, both enzymes presented a trend to increase their activity in injured animals. The eNOS activity after spinal cord injury was increased (see Fig. 1) in the injured animals in the groups of rats killed 4 (138%) and 8 h (96%) after the lesion. iNOS presented a trend to enhance in the whole groups of animals submitted to the lesion and evaluated at the different times

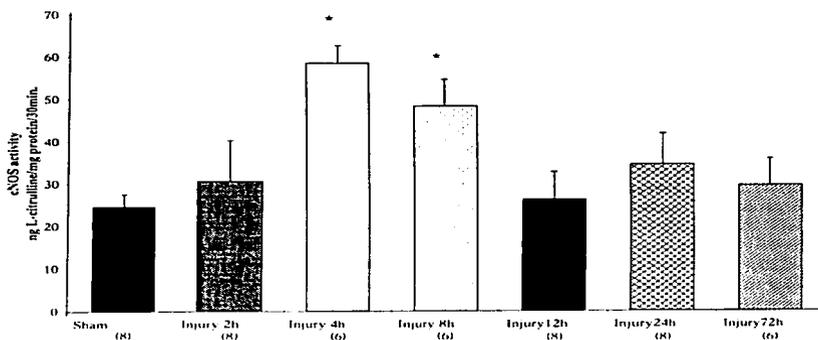
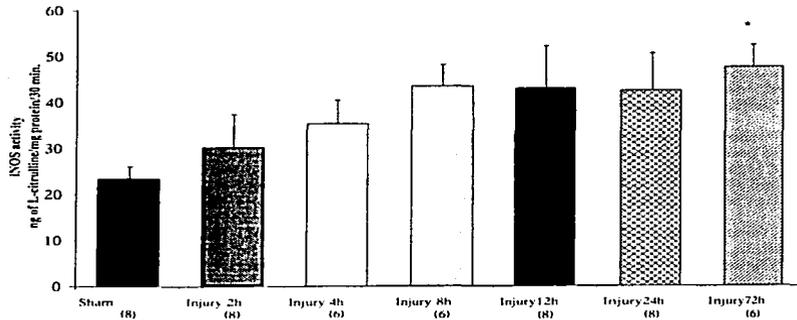


Fig. 1. Constitutive nitric oxide synthase (eNOS) activity measured at several time periods after spinal cord lesion (2, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 h). Sham group received only laminectomy and was sacrificed 2 h after surgery. The number of animals is given for each group within parenthesis. Lesion groups received severe spinal cord contusion. The results are expressed as means \pm SEM of 6–8 animals per group. * different from sham group ($P < 0.05$). ANOVA followed by Dunnet's test.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig. 2. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity measured at several time periods after spinal cord lesion (2, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 h). Sham group received only laminectomy and was sacrificed 2 h after surgery. The number of animals is given for each group within parenthesis. Lesion groups received severe spinal cord contusion. The results are expressed as means \pm SEM of 6–8 animals per group, * different from sham group ($P < 0.05$), ANOVA followed by Dunnett's test.

with increases ranging from 1 to 103% versus sham-lesioned animals, but only the group killed 72 h after the lesion was statistically different from sham-lesion group (Fig. 2).

In the present study, the activity of both isoforms of NOS was assessed in the injured site of the spinal cord at different time periods, trying to cover the time lapse in which occurs most acute events related with secondary damage. Results presented here indicate a time-dependent sequential increase in both cNOS and iNOS activities after spinal cord injury.

Our results are partially in agreement with data of Hu et al. [9], who showed an enhanced expression of both isoforms of NOS, as a result of a neurotoxic lesion of the spinal cord within the first 48 h after insult, however, the time course of the iNOS activity enhancement was detected earlier at 4 h after the insult and persisted up to 24–48 h in the ventral cord. Differences in the mechanisms of cord damage could be responsible for these discrepancies, as they used a chemically-based insult instead of a mechanical one. iNOS activity after traumatic cord lesion was reported increased at a late stage (7 days) of SC contusion [20], but not at early stages (72 h), as found in the present study. This is probably due to differences in the amount of tissue sampled, as they took 5-mm rostral and 5 mm caudal cord pieces from the center of injury for the NOS activity assays, while our samples were 2 mm rostral and 2 mm caudal from the same center, giving our sample more focused on the lesion core. However, it is important to remark that further experiments are needed to explore what happens in the areas remote to the lesion site. Interestingly, the peak activity of cNOS (4 h) and iNOS (72 h) showed in our results, are not in agreement with the peak production of NO measured by Liu et al. [13] who using a

NO-selective electrode in the SC injured site found the highest concentration of NO immediately after the injury. This discrepancy could be explained because many of the actual NO detectable in the site of injury, could be produced in other sources, probably in far blood vessels [5], and then reach the SC through the vascular bed.

Increased eNOS activity at short times (4–8 h) after spinal cord lesion is perhaps related to calcium dependent mechanisms evoked by the tissue response to injury, including enhanced glutamate release [14], while induction of iNOS activity is probably the result of inflammatory response and macrophages recruitment after damage [17], because the peak of iNOS activity was a later event (72 h) after spinal cord contusion. We considered that time periods chosen in our study are of significance for most of the experimental treatments used to prevent tissue damage after spinal cord injury [1].

The increased formation of nitric oxide, peroxynitrite and nitrated proteins short after spinal cord contusion [13] must play an important role in destructive and reparative events taking place following acute spinal cord injury, depending on the amount of NO produced [10] and the redox conditions of the environment [20] among other factors.

In conclusion, both isoforms of NOS seem to be involved in the tissue response to spinal cord injury by contributing to NO formation rate at the site of injury, at different times after insult, through diverse mechanisms and perhaps from varied cell sources.

We thank Dr Miguel Asai from the National Institute of Psychiatry for his kind support in the measurement of the ¹⁴H-l-arginine samples.

- [1] Amar, A.P. and Levy, M.L., Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury, *Neurosurgery*, 44 (1999) 1027–1039.
- [2] Beckman, J.S., Chen, J., Crow, J.P. and Yao, Z.Y., Reaction of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration, *Prog. Brain Res.*, 103 (1994) 371–380.
- [3] Beckman, J.S. and Willem, H.K., Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly, *Am. J. Physiol.*, 271 (1996) C1424–C1437.
- [4] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of protein dye binding, *Ann. Biochem.*, 72 (1976) 248–254.
- [5] Bravo, G., Larios, F., Rojas-Martinez, R., Hong, E., Salazar, L.A. and Guizar-Sahagun, G., Early changes in nitric oxide synthase activity in atrial intramural arteries following experimental spinal cord injury in rats, *Neurosci. Lett.*, 271 (1999) 37–40.
- [6] Bredt, D.S. and Snyder, S.H., Isolation of nitric oxide synthase a calmodulin-requiring enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (1990) 682–685.
- [7] Burnstock, G. and Ralevic, V., New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerve and endothelium, *Br. J. Plast. Surg.*, 80 (1997) 868–876.
- [8] Diaz-Ruiz, A., Rios, C., Duarte, I., Correa, D., Guizar-Sahagun, G., Grijalva, I. and Ibarra, A., Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats, *Neurosci. Lett.*, 266 (1999) 61–64.
- [9] Hu, W.H., Li, F., Qiang, W.A., Li, F., Liu, N., Wang, G.Q., Wang, H.Y., Wan, X.S., Liao, W.H., Liu, J.S. and Jen, M.F., Constitutive and inducible nitric oxide synthase after dynorphin-induced spinal cord injury, *J. Chem. Neuroanat.*, 17 (2000) 183–197.
- [10] Kröncke, K.D., Fehsel, K. and Kolb-Bachofen, V., Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where?, *Biol. Chem.*, 1 (1997) 107–120.
- [11] Lesk, M.L., Bao, F., Wu, L., Quian, H., Sun, D. and Liu, D., Protein and DNA oxidation in spinal injury: neurofilaments – an oxidation target, *Free Radic. Biol. Med.*, 30 (2001) 613–624.
- [12] Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., LeI, S.Z., Chen, H.-S.V., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J. and Stamler, J.S., A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds, *Nature*, 364 (1993) 626–632.
- [13] Liu, D., Ling, X., Wen, J. and Liu, J., The role of reactive nitrogen species in secondary spinal cord injury: formation of nitric oxide, peroxynitrite, and nitrate nitrated protein, *J. Neurochem.*, 75 (2000) 2144–2154.
- [14] Liu, D., Thangnipon, W. and Mc Adoo, D.J., Excitatory amino acid rise to toxic levels upon impact injury to rat spinal cord, *Brain Res.*, 547 (1991) 344–348.
- [15] Marletta, M.A., Nitric oxide synthase structure and mechanism, *J. Biol. Chem.*, 268 (1993) 12231–12234.
- [16] Moilanen, E. and Vapaatalo, H., Nitric oxide in inflammation and immune response, *Ann. Med.*, 27 (1995) 359–367.
- [17] Nussler, A.K. and Billiar, T.R., Inflammation immunoregulation and inducible nitric oxide synthase, *J. Leukoc. Biol.*, 54 (1993) 171–178.
- [18] van der Veen, R.C. and Roberts, L.J., Contrasting roles for nitric oxide and peroxynitrite in the peroxidation of myelin lipids, *J. Neuroimmunol.*, 95 (1999) 1–7.
- [19] Xu, J., Kim, G.-M., Chen, S., Yan, P., Ahmed, S.H., Ku, G., Beckman, J.S., Xu, X.M. and Hsu, C.Y., NOS and nitrotyrosine expression after spinal cord injury, *J. Neurotrauma*, 18 (2001) 523–532.
- [20] Xu, M., Ng, Y.K. and Leong, S.K., Neuroprotective and neurodestructive function of nitric oxide after spinal cord hemisection, *Exp. Neurol.*, 161 (2000) 472–480.