

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

INFLUENCIA DE LA DESFERROXAMINA SOBRE EL NIVEL
DE HIERRO DESPUES DE LESION TRAUMATICA DE LA
MEDULA ESPINAL EN RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MARCO ANTONIO PAREDES ESPINOSA

DIRECTOR DE TESIS: DR. GABRIEL GUIZAR SAHAGUN

MÉXICO D. F.

SEPTIEMBRE DE 2005

m347557



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.

Ciencias Biológicas

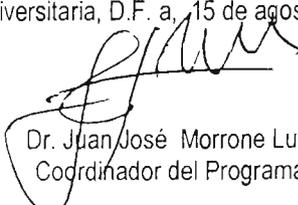
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

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 06 de junio del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Paredes Espinosa Marco Antonio** con número de cuenta **77398499** con la tesis titulada: "Influencia de la desferroxamina sobre el nivel de hierro después de lesión traumática de la médula espinal en rata", bajo la dirección del(a) **Dr. Gabriel Guízar Sahagún**.

Presidente: Dra. Limei Zhang Ji
Vocal: Dra. María Rosa Ávila Costa
Secretario: Dr. Gabriel Guízar Sahagún
Suplente: Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray
Suplente: Dra. Rebecca. Elizabeth Franco y Bourland

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 15 de agosto del 2005



Dr. Juan José Morrone Lupi
Cocrdinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

RECONOCIMIENTOS

A las autoridades del Instituto Nacional de Rehabilitación por todas las facilidades y el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme una beca para estudios de posgrado.

A mi director de tesis, Dr. Gabriel Guízar Sahagún por su constante apoyo y dirección para la realización de este trabajo.

A la Dra. Rebecca E. Franco y Bourland Jefa del Laboratorio de Bioquímica del I.N.R. y miembro del comité tutorial por todo el tiempo, las sugerencias y el apoyo que me otorgó para la realización de este trabajo.

A la Dra. Limei Zhang Ji, profesora titular “B” de T. C. de la Facultad de Medicina, miembro del comité tutorial por sus comentarios y apoyo para la realización de este trabajo.

A la Dra. Alicia E. Echegaray Hernández por sus sugerencias y comentarios.

A la Dra. María Rosa Ávila Costa por sus sugerencias y comentarios.

A la Dra. Matilde L. Enríquez Sandoval directora de Investigación y Enseñanza del I.N.R. por todo su apoyo y confianza.

DEDICATORIA

SUMMARY

TITLE: Influence of desferroxamine on the iron level at the injury site after a spinal cord contusion in rats.

OBJECTIVE

Determine the change in the amount of total iron (protein-bound iron plus free iron) at the site of injury after spinal cord contusion (SCC) in rats treated with desferroxamine (DFRM), an iron chelating agent.

BACKGROUND

After SCC a neurodegenerative process is triggered, which includes different pathophysiological mechanism such as: ischemia, excitotoxicity, edema, and oxidative stress. Free iron may contribute to the damage by favoring the production of free radicals, in particular the hydroxyl radical formed in the Fenton-Weiss reaction. The DFRM is widely used to treat hemochromatosis and patient who have received frequent blood transfusions.

HYPOTHESIS

After a SCC, total iron increases in the medullary parenchyma, but not in other tissues such as the liver. Treatment with DFRM decreases the amount of total iron in a dose dependent fashion by chelating iron.

METHODOLOGY

Male Long Evans rats of 250 to 350 g body weight were submitted to SCC, at a T-8 level, under general anesthesia, using a standardized procedure. After surgery, the animals were maintained in individual cages, with water and food *ad libitum*, with manual handling of neurogenic bladder. Twenty four hours after the lesion, two groups of rats (n=15 or 13) received DFRM intraperitoneally, 122 mg or 244 mg respectively; the control group received physiological saline solution (PSS). An hour after the injection, rats were sacrificed under general anesthesia, by means of intracardiac perfusion with 250 ml of PSS. Immediately after that, 1.5 cm long specimens of spinal cord were taken from the site lesion and approximately 15 mg of liver tissue for iron measurements specimens from healthy rats served as controls.

Iron was estimated by absorption spectrometry of stracts from tissues previously dried at 70 ° C for 90 min and digested with heat in 30% nitric acid. The spectrometer was calibrated with an iron standard.

RESULTS

Total iron at the site of injury in spinal cords from non-treated rats increased significantly compared to similar specimens from whole rats: $13.7 \pm 0.42 \mu\text{g/g}$ of tissue and $2.12 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$, respectively ($p < 0.001$); total iron in similar liver tissue specimens from both groups of rats were no significantly different: $21.06 \pm 2.01 \mu\text{g/g}$ of tissue and $17.59 \pm 1.04 \mu\text{g/g}$ respectively.

DFRM given at dose of 122 mg SCC rats significantly reduced total iron at the site of injury in the spinal cord to $9.28 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$ of tissue ($p < 0.001$); total iron in similar liver tissue specimens was also significantly reduced to $14.75 \pm 0.84 \mu\text{g/g}$. ($p < 0.01$).

Contrary to our expectations, DFRM given at the higher dose of 244 mg SCC rats the level of total iron in the site of injury in the spinal cord was significantly increased to $24.98 \pm 1.85 \mu\text{g/g}$ of tissue ($p < 0.001$) compared to similar specimens from injured non-treated rats and rats treated with 122 mg DFRM, as well spinal cord specimens from DFRM (244 mg) treated and untreated whole rats: $6.46 \pm 1.46 \mu\text{g/g}$ of tissue and $1.77 \pm 0.45 \mu\text{g/g}$, respectively. Total iron from similar liver tissue specimens of these injured rats were significantly higher ($46.61 \pm 3.15 \mu\text{g/g}$ of tissue) than that from the injured rats

that received 122mg DFRM, as well as liver tissue specimens from DFRM (244mg) treated and untreated whole rats: $36.63 \pm 1.48\mu\text{g/g}$ and $62.97 \pm 4.47\mu\text{g/g}$, respectively.

DISCUSSION:

DFRM given at a dose of 122mg /rat reduced the total iron level at the site of injury in the spinal cord and liver tissue specimens. Contrary to our expectations similar specimens from rats given 244mg DFRM, total iron was increased instead of further reduced. This increase may be attributing to a prooxidant action of DFRM that has been reported to free iron from blood cells and might have done so also from spinal cord parenchyma as well as from liver.

CONCLUSIONS

SCC raises total iron at the site of injury, which can be significantly reduced by treatment with DFRM al a dose of 122mg 24 h after injury.

Administration of DFRM at a dose of 244mg, contrary to what we expected, increased total iron levels at the site of spinal cord injury, thereby increasing the risk of free radical formation.

This is the first report on the potentially deleterious action of a high dose of DFRM after SCC.

Further studies are required to test the effectiveness of low doses of DFRM for recovery after a traumatic injury to the spinal cord and to evaluate the effectiveness of other iron chelating agents without the potentially toxic effect at DFRM given at higher doses.

RESUMEN

Título: Influencia de la desferroxamina sobre el nivel de hierro después de lesión traumática de la médula espinal en rata.

Objetivo: Determinar el cambio en la cantidad de hierro total ocasionado por lesión traumática de médula espinal (LTME) en el sitio de lesión y la cantidad de hierro quelable, mediante la administración de desferroxamina (DFRM) a diferentes dosis.

Antecedentes: Posterior a una LTME se desencadena un proceso neurodegenerativo ocasionado por diferentes mecanismos fisiopatológicos entre los que se incluyen: isquemia, excitotoxicidad, edema y estrés oxidativo. El hierro libre participa en el daño favoreciendo la producción de radicales libres, particularmente el radical hidroxilo formado en las reacciones de Fenton-Weiss.

La DFRM es un quelante de hierro libre, ampliamente utilizado en la clínica como tratamiento para enfermedades donde este metal está elevado, como en la hemacromatosis y en pacientes con transfusiones sanguíneas frecuentes.

Hipótesis: Después de una LTME, el hierro total se incrementará en el parénquima medular, mientras que en otros tejidos (hígado) no se modificara. La administración de DFRM disminuirá de manera dosis dependiente la cantidad de hierro total al eliminar el hierro quelable.

Metodología: Se usaron ratas macho *Long Evans* de 250 a 350 g de peso, sometidas a LTME, bajo anestesia general, mediante un modelo de contusión bien estandarizado, a nivel T-8. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales, con agua y alimento a su libre disposición y manejo manual de vejiga neurogénica. Veinticuatro horas post-lesión recibieron una dosis de DFRM intraperitoneal (122 mg o 244 mg) o solución salina fisiológica (SSF) como testigo. Una hora después de la inyección se sacrificaron, bajo anestesia general, mediante perfusión intracardiaca de 250 ml de SSF. Inmediatamente después se tomaron muestras de la médula espinal en la zona de lesión y del hígado para su análisis. Muestras de ratas íntegras sirvieron como testigos de normalidad. El hierro fue estimado mediante el estudio de espectroscopia de absorción atómica a la flama, en los tejidos secados previamente en un horno a 70 °C durante 90 minutos y digeridos con calor en un medio ácido (ácido nítrico GA) para lograr la destrucción de la materia orgánica y eliminación de los vapores nitrosos. Previamente se realiza la calibración con un blanco de reactivos y una curva de calibración con un estándar de hierro.

Resultados: El hierro total en médula espinal se incremento significativamente ($p < 0.001$) por la lesión medular de $2.12 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$ de tejido en ratas íntegras, a $13.7 \pm 0.42 \mu\text{g/g}$ de tejido en ratas con LTME tratadas con vehículo. El hierro total en hígado mostró un incremento insignificante por la lesión medular, al pasar de $17.59 \pm 1.04 \mu\text{g/g}$ en ratas íntegras, a $21.06 \pm 2.01 \mu\text{g/g}$ en ratas con LTME y vehículo.

La DFRM a dosis de 122 mg, en ratas lesionadas, disminuyó significativamente la cantidad de hierro total en médula ($p < 0.001$) de $13.7 \pm 0.42 \mu\text{g/g}$ a $9.28 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$ y en hígado ($p < 0.01$) de $21.06 \pm 2.01 \mu\text{g/g}$ a $14.75 \pm 0.84 \mu\text{g/g}$.

Contrario a lo esperado, la dosis alta de DFRM (244 mg), en ratas lesionadas e íntegras, produjo un incremento significativo en el hierro total tanto en médula como en hígado. En médula espinal las concentraciones fueron 1.77 ± 0.45 , 6.46 ± 1.46 y 24.98 ± 1.85

$\mu\text{g/g}$, para ratas íntegras sin tratamiento, íntegras con DFRM y lesionadas con DFRM respectivamente. En hígado, las concentraciones fueron 36.63 ± 1.48 , 62.97 ± 4.47 y 46.61 ± 3.15 respectivamente para los grupos antes mencionados.

Discusión. La dosis de 122 mg de DFRM disminuye el nivel de hierro en el sitio de lesión medular y en el tejido hepático. Contrario a lo esperado una dosis de 244 mg de DFRM en el sitio de lesión y en la médula espinal intacta, provocó un aumento del nivel de hierro. En la literatura se muestra que la DFRM posee un carácter bifásico, como antioxidante y como prooxidante, en esta última faceta también se ha reportado que libera el hierro de las células sanguíneas. Es nuestra hipótesis que la DFRM aumenta en el sitio de lesión la liberación de hierro no solo de las células de la sangre sino también del parénquima medular, para posteriormente situarse en el interior celular en la zona de lesión y en las áreas donde por la acción mecánica del impacto se presenta obstrucción del flujo sanguíneo evitando así su remoción.

Conclusiones: La lesión traumática de la médula espinal (LTME) induce elevación del hierro total y del hierro quelable en el sitio de lesión y en menor grado en hígado. Una dosis de 122 mg de DFRM a 24 hrs de la LTME disminuye significativamente el nivel de hierro total en el sitio de lesión medular y en hígado. La administración de 244 mg de DFRM a 24 hrs de la LTME, contrario a lo esperado, aumenta los niveles de hierro en el sitio de lesión medular, en la médula espinal intacta y en hígado de ratas íntegras y lesionadas. Este trabajo es el primer reporte sobre el efecto paradójico de la administración de dosis altas de DFRM al elevar los niveles de hierro después de una LTME experimental. Nuestros resultados sugieren que se requiere ampliar la investigación a dosis bajas de DFRM en la recuperación funcional después de una lesión traumática de la médula espinal y evaluar el efecto de otros quelantes de hierro que no posean efectos secundarios deletéreos.

INFLUENCIA DE LA DESFERROXAMINA SOBRE EL NIVEL DE HIERRO DESPUÉS DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MEDULA ESPINAL EN RATA.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| CAPITULO | CONTENIDO | PÁGINA |
|----------|---|--------|
| | ÍNDICE DE CONTENIDOS | 1 |
| | ÍNDICE DE FIGURAS | 5 |
| | ÍNDICE DE TABLAS | 7 |
| | ABREVIATURAS | 8 |
| | RESUMEN | 9 |
| 1.0 | INTRODUCCIÓN | 11 |
| 1.0.1 | Aspectos epidemiológicos de la lesión de la médula espinal. | 11 |
| 1.0.2 | Estructura y función de la médula espinal | 13 |
| 1.0.2.1 | Estructura de la médula espinal | 13 |
| 1.0.2.2 | Función de la médula espinal | 14 |

| | | |
|---------|---|----|
| 1.1 | FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL | 15 |
| 1.1.1 | Aspectos morfológicos | 15 |
| 1.1.2 | Mecanismos patofisiológicos de la lesión traumática de la médula espinal | 16 |
| 1.1.3 | El hierro en la médula espinal después de una lesión traumática. | 18 |
| 1.2 | DEFENSAS ANTIOXIDANTES | 18 |
| 1.2.1 | Defensas antioxidantes | 19 |
| 1.2.2 | Funciones neuroprotectoras de la hemoxigenasa en la lesión medular | 20 |
| 1.2.3 | El hierro en la generación de radicales libres | 21 |
| 1.2.4 | Quelantes de hierro | 21 |
| 1.2.5 | Mecanismos de protección celular por quelantes de hierro | 22 |
| 1.2.5.1 | Remoción del exceso de hierro | 22 |
| 1.2.5.2 | Neutralización del hierro libre | 23 |
| 1.2.6 | El empleo de la desferroxamina en la lesión de la médula espinal. | 23 |
| 1.2.6.1 | El quelante desferroxamina | 23 |

| | | | |
|-----|---------|---|----|
| | 1.2.6.2 | La desferroxamina en la lesión de la médula espinal | 24 |
| 1.3 | | METABOLISMO DEL HIERRO | 25 |
| | 1.3.1 | Almacenamiento del hierro: Ferritina y hemosiderina | 26 |
| | 1.3.1.1 | Ferritina | 26 |
| | 1.3.1.2 | Hemosiderina | 27 |
| | 1.3.2 | Control celular del metabolismo del hierro | 27 |
| | 1.3.2.1 | Regulación de la expresión del receptor a transferrina | 28 |
| | 1.3.2.2 | Regulación de la expresión de ferritina | 28 |
| | 1.3.2.3 | Regulación de la expresión de transferrina | 29 |
| | 1.3.3 | Homeostasis del hierro | 30 |
| | 1.3.3.1 | Adsorción intestinal del hierro inorgánico | 31 |
| | 1.3.3.2 | Endocitosis del hierro mediante el complejo hierro–transferrina | 32 |
| 2.0 | | JUSTIFICACIÓN | 34 |
| 3.0 | | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 34 |
| 4.0 | | HIPÓTESIS | 34 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.0 | OBJETIVOS | 35 |
| 5.1 | Objetivo general | 35 |
| 5.1.1 | Objetivos particulares | 35 |
| 6.0 | MÉTODOS Y MATERIALES | 35 |
| 6.1 | Método | 35 |
| 6.1.1 | Animales | 35 |
| 6.1.2 | Diseño experimental | 35 |
| 6.1.3 | Procedimiento para la realización de la lesión traumática de la médula espinal | 37 |
| 6.1.4 | Atención de los animales | 38 |
| 6.1.5 | Medición del hierro en las muestras de médula espinal e hígado mediante el procedimiento de espectroscopia de adsorción atómica a la flama | 38 |
| 6.1.6 | Tratamiento de las muestras de médula espinal e hígado para su análisis por espectroscopia de absorción atómica a la flama. | 38 |
| 6.1.7 | Procedimiento de lectura de las muestras | 39 |
| 6.2 | Materiales | 39 |
| 6.2.1 | Reactivos | 39 |
| 6.2.2 | Preparación del material | 39 |

| | | | |
|------|-------|--|----|
| | 6.2.3 | Equipo de espectroscopia de adsorción atómica a la flama | 39 |
| 7.0 | | ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 40 |
| 8.0 | | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 41 |
| | 8.1 | Resultados | 41 |
| | 8.1.1 | Efecto de dosis bajas de desferroxamina sobre el contenido de hierro tisular en médula espinal e hígado. | 41 |
| | 8.1.2 | Efecto de dosis altas de desferroxamina sobre el contenido de hierro tisular en médula espinal e hígado. | 44 |
| | 8.2 | Discusión | 46 |
| | 8.2.1 | Efecto de la lesión medular sobre el contenido de hierro total tisular. | 46 |
| | 8.2.2 | Efecto de dosis bajas de desferroxamina sobre el contenido de hierro tisular | 48 |
| | 8.2.3 | Efecto de dosis altas de desferroxamina sobre el contenido de hierro tisular | 48 |
| 9.0 | | CONCLUSIONES | 50 |
| 10.0 | | BIBLIOGRAFÍA | 51 |

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

| Ilustración | Contenido | Página |
|-------------|---|--------|
| 1 | La lesión traumática puede provocar daños devastadores en los pacientes. | 11 |
| 2 | La columna vertebral protege a la médula espinal | 13 |
| 3 | La médula espinal esta rodeada por las meninges | 14 |
| 4 | Neuronas motoras con núcleos apoptóticos en la médula espinal lesionada. | 15 |
| 5 | Mecanismos patofisiológicos en la lesión traumática de la médula espinal. | 17 |
| 6 | El metabolismo equilibra la producción y remoción de radicales libres. | 19 |
| 7 | Modelo de la formación del complejo hierro-desferroxamina | 22 |
| 8 | Desferroxamina B y E | 25 |
| 9 | Distribución de hierro en el cuerpo humano | 25 |
| 10 | Localización del hierro en la ferritina | 26 |
| 11 | Formación de hemosiderina en macrófagos | 27 |
| 12 | Regulación del receptor a transferrina | 28 |
| 13 | Regulación de la síntesis de ferritina | 29 |

| | | |
|----|--|----|
| 14 | Regulación de la expresión de transferrina | 30 |
| 15 | Absorción del hierro según el modelo Pac man | 31 |
| 16 | Absorción y distribución del ion férrico | 32 |
| 17 | Endocitosis de hierro | 33 |
| 18 | La formación de hemoglobina requiere de iones ferrosos | 34 |
| 19 | Esquema metodológico para examinar el efecto de 122 mg de desferroxamina en los niveles de hierro. | 36 |
| 20 | Esquema metodológico para examinar el efecto de 244 mg de desferroxamina en los niveles de hierro. | 36 |
| 21 | Equipo para producir experimentalmente la lesión traumática de la médula espinal | 37 |
| 22 | Detalle del equipo para la producción de la lesión traumática de la médula espinal | 37 |
| 23 | Detalle de la unidad de espectrofotometría Varian modelo AA-147553 | 40 |
| 24 | Medición del contenido de hierro tisular | 40 |
| 25 | Contenido del hierro tisular en la médula espinal a dosis bajas de desferroxamina | 42 |
| 26 | Contenido del hierro tisular en hígado a dosis bajas de desferroxamina | 43 |
| 27 | Contenido del hierro tisular en la médula espinal a dosis altas de desferroxamina | 45 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla | Contenido | Página |
|-------|---|--------|
| 1 | Etiología de la lesión medular en España | 12 |
| 2 | Etiología de la lesión medular en los EUA | 12 |
| 3 | Etiología de la lesión medular en el área Metropolitana de la ciudad de México | 13 |
| 4 | Nivel de hierro en la médula espinal a dosis bajas de desferroxamina | 41 |
| 5 | Nivel de hierro en hígado a dosis bajas de desferroxamina | 43 |
| 6 | Nivel de hierro en la médula espinal a dosis altas de desferroxamina | 44 |
| 7 | Nivel de hierro en hígado a dosis altas de desferroxamina | 45 |

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico
LTME: lesión traumática de la médula espinal
DFRM: mesilato de desferroxamina
LME: lesión de la médula espinal
RL: radicales libres
ME: médula espinal
ERO: especies reactivas de oxígeno
ERN: especies reactivas de nitrógeno
EOx: estado de estrés oxidativo
 O_2^- : radical superóxido
 O_2 : superóxido
 H_2O_2 : peróxido de hidrógeno
OH \cdot : radical hidroxilo
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
Fr: ferritina
TfR: receptor a transferrina
IRPs: proteínas reguladoras del hierro
IREs: elementos que responden al hierro

1.0 INTRODUCCIÓN

Las lesiones de origen traumático alcanzan importancia epidemiológica, económica y social, incluso en algunos países representa la primera causa de muerte durante el periodo mas productivo de un individuo, antes de las primeras cuatro décadas de la vida.

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) es un padecimiento con una incidencia en la población muy baja en comparación con otras patologías (Buchanan et al., 1987, Ibarra et al., 1998). Su principal importancia reside en las secuelas desencadenadas para el paciente como en su entorno socioeconómico.

La lesión a la médula espinal (LME) puede ser de tal magnitud que puede llevar a cambios devastadores en la persona que la sufre, ya que puede ocasionar paraplejia o cuadriplejia, incontinencia, impotencia sexual, alteraciones psicológicas y desajuste social así como un impacto en la sociedad por sus repercusiones socioeconómicas y medicas (Buchanan et al., 1987). Con frecuencia se agregan complicaciones como escaras de presión, infección urinaria, contracturas musculares y deformidades, espasticidad y osificaciones heterotópicas, etc. (Ibarra et al., 1998).

La disminución de la tasa de muerte de las personas que han sufrido una lesión de la médula espinal, y la adición de nuevos pacientes cada año conforman un padecimiento multidisciplinario de gran importancia (Buchanan et al., 1987.; foto 1).

La LME puede dividirse de acuerdo a diferentes criterios, como el fenómeno por el que se originó la lesión medular, algunas otras clasificaciones toman como referencia las consecuencias funcionales que se deriven de la lesión, y en otras la longitud de la médula espinal dañada (Buchanan et al., 1987).



Foto 1 El daño de la médula espinal es origen de diferentes necesidades que dependiendo de la gravedad de la lesión y las condiciones tanto del paciente como de su medio pueden impactar de una manera devastadora.

1.0.1 Aspectos epidemiológicos

Es un hecho importante que el origen de la lesión de la médula espinal (LME) en los diferentes países tenga elementos en común, respetando algunas diferencias entre cada país, por ello a manera de ejemplo se menciona la etiología de la LME en España y en los Estados Unidos de América y algunos datos referentes a México.

En España el origen de la LME se distribuye de la siguiente manera (www.discapnet.es, 2003; tabla 1).

Tabla 1

Etiología de lesión de la médula espinal en España

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Accidentes de coche | 35 % |
| Caídas | 16.5 % |
| Problemas médicos | 10.8 % |
| Deportes | 6.7 % |
| Otros accidentes de vehículos a motor | 6.2 % |
| Accidentes de trabajo | 5.3 % |
| Otros | 19.5 % |

Fuente (www.discapnet.es) 2003

En los Estados Unidos de América se ha reportado que los accidentes son la cuarta causa de muerte, de estas defunciones el 3% se relaciona a la lesión de la médula espinal, con una proporción de genero de 3 hombres por cada mujer. (Buchanan et al., 1987).

El tipo mas frecuente de lesión en la médula espinal lo ocupan las lesiones a nivel cervical con un 42%, comúnmente a nivel C2, seguido por lesiones a niveles de C5, C6. El 31% de lesiones son torácicas, y el 27% lumbares (www.montanabrain.com/pages/spinal.htm; tabla 2)

Tabla 2

Etiología de la lesión de la médula espinal en los Estados Unidos de América

| | |
|--------------------------|--------|
| Accidentes con vehículos | 47.7 % |
| Caídas | 20.8 % |
| Actos de violencia | 14.6 % |
| Deportes | 14.2 % |
| Otros | 11.9 % |

Modificada de Buchanan 1987

En México como en la mayor parte del mundo no se ha realizado un esfuerzo serio por conjuntar intereses y generar de manera concertada y organizada información sobre personas con alguna discapacidad, dentro de un marco conceptual homogéneo y a través de la complementación de diferentes fuentes estadísticas. Lo cual aumenta la dificultad para poder conocer el impacto sociodemográfico real de los lesionados medulares.

En México del censo de 1975 a 1982 se obtuvo la Encuesta Nacional de Inválidos de 1982 informando de una incidencia de lesión de la médula espinal de 1.4 por 100 000 habitantes, en otras fuentes se habla de una incidencia anual de 20 nuevos casos de lesionados medulares por millón de habitantes (INEGI censo de 1982).

En un estudio realizado en los principales hospitales de urgencias del área metropolitana de la ciudad de México en 1998 se informó que en un año se atendieron 211 casos nuevos de pacientes con una lesión de la médula espinal (LME), aproximadamente significa una incidencia de 14 casos por millón de habitantes. Comprendiendo un intervalo de edad de entre 21 y los 40 años, de estos el 91% correspondió al sexo masculino. Las principales causa de la LME se presentan en la tabla 3 (Ibarra et al., 1998)

Tabla 3

Etiología de la lesión de la médula espinal en el área metropolitana de la ciudad de México

| | |
|-----------------------------|-----------|
| Caídas | 33.17.5 % |
| Accidentes automovilísticos | 32.7 5 % |
| Heridas por arma de fuego | 24.17 % |
| Contusión directa | 5.68 % |
| Heridas por arma blanca | 4.28 % |

Tomada de Ibarra et al., 1998

Se podría decir que la lesión medular viene acompañando a nuestro estilo de vida urbano pues durante el año 2000 se reporto que el 72.6 % de la población con discapacidad habitaba en comunidades urbanas (INEGI censo del 2000).

En el censo de salud del 2000 el INEGI informó que existe un 2.35 % de personas con discapacidad, incluyendo entre estas a las personas con un padecimiento de lesión medular.

La Organización Panamericana de la Salud y el INEGI en el 2001 informaron que existían en México 944 285 personas con discapacidad motriz, la cual agrupa los padecimientos que afectan la capacidad músculo-esquelética, neuromotriz y lesionados medulares, pero no se informa sobre el número de casos exclusivamente con lesión medular.

1.0.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL

1.0.2.1 Estructura de la médula espinal

La médula espinal forma con el encéfalo el sistema nervioso central. Anatómicamente se encuentra en el interior de la columna vertebral que le da sostén y protección (figura 1).



Figura 1. La columna vertebral esta conformada por las vértebras las cuales reciben su nombre de acuerdo a la posición que ocupan.

La médula espinal es una estructura cilíndrica algo aplastada, que en la parte superior

pasa directamente a la médula oblongada, y por abajo a nivel de la segunda vértebra lumbar termina en el cono medular, del que parte la cauda equina, denominada así por su semejanza a la cola de caballo. (Prives et al., 1975, Kardong, 2002)

La médula espinal esta rodeado por tres membranas conjuntivas, las meninges, que proceden del mesodermo del tubo neural (Prives et al., 1975; Kardong, 2002, figura 2).

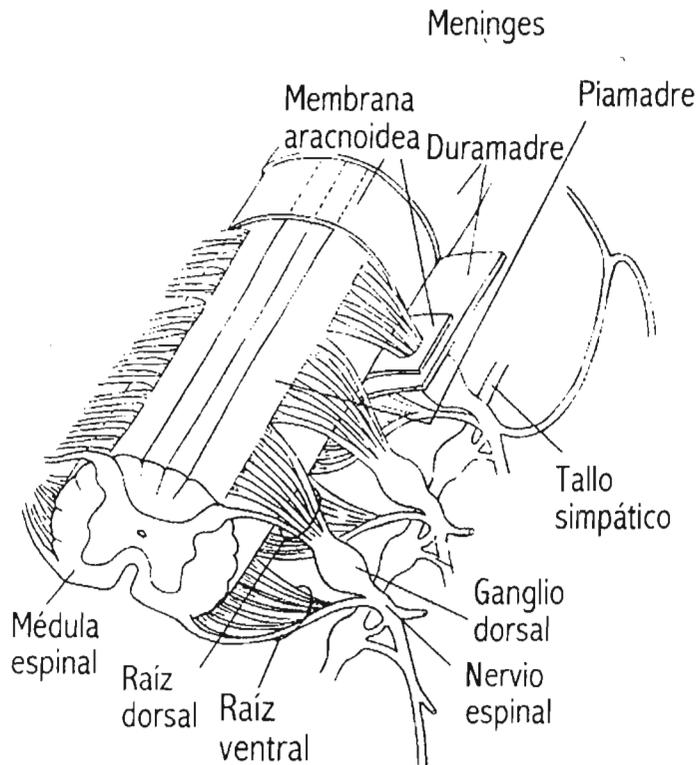


Figura 2. Estructura de la médula espinal, destacan las meninges que recubren la totalidad de la médula espinal. Las vías eferentes a través de las raíces ventrales y las vías aferentes por las raíces dorsales. (Modificado de Kardong, 2002).

La médula espinal se encuentra inmersa en el líquido cerebro espinal compuesto de diferentes electrolitos, proteínas, y glucosa. En promedio su volumen total en el adulto es de aproximadamente de 150 mililitros (Prives et al., 1975). Internamente la médula espinal la forman en la parte central la llamada materia gris, la cual consiste de los somas de las neuronas y una red intrincada de procesos nervioso, y células de neuroglia que dan forma a dos astas simétricas izquierda y derecha conectadas por la sustancia gris intermedia, en su conjunto recuerda a una mariposa o una letra H. Rodeando a la materia gris se encuentra la materia blanca, compuesta principalmente por la red de fibras nerviosas que corren a lo largo de la médula espinal.

El sistema de irrigación sanguínea de la médula espinal lo forman una vasta y compleja red de venas y arterias extra e intramedulares.

1.0.2.2 *Función de la médula espinal.*

La función primordial de la médula espinal es transmitir desde y hacia el cerebro información por medio de dos vías principales. Las vías motoras descendentes que

información por medio de dos vías principales. Las vías motoras descendentes que controlan los músculos lisos de los órganos internos y el músculo estriado y ayudan a regular la función del sistema nervioso autónomo. Las vías sensoriales ascendentes que transmiten señales recibidas desde las extremidades y los órganos hacia segmentos específicos de la médula y luego hacia el cerebro (Prives et al., 1975). La médula espinal también es una estructura en la que se llevan a cabo algunos procesos biofísicos complejos relacionados con el aprendizaje y almacenamiento de algunas tareas motoras aprendidas entre estos procesos se encuentra la potenciación a largo tiempo y el fenómeno de depresión a largo tiempo (Rossignol et al., 2002; Pockett et al., 1993).

1.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL.

1.1.1 Aspectos morfológicos

Una lesión traumática de la médula espinal produce alteraciones en áreas lejanas al sitio de lesión en el cual se inicia la muerte celular, en primera instancia debido al desarrollo progresivo de hemorragias en la región central de la médula espinal especialmente en la sustancia gris principalmente por la rotura de capilares, y vénulas y algunas arteriolas debido a la fuerza mecánica y distorsión del tejido por el impacto, compresión, estiramiento y laceración. Seguido de procesos auto destructivos como excitotoxicidad en los que intervienen los radicales libres

(Schwartz et al., 2002; Tator 1995; Noble et al., 1989; Ikonomidou et al., 1995; Wrathal⁽²⁾ et al., 1992; Faden 1989).

Morfológicamente se han reconocido dos áreas en el tejido lesionado, una en el sitio mismo del trauma denominada foco de lesión, en el que la muerte celular se genera por necrosis y apoptosis y otra alrededor denominada zona de penumbra en donde la muerte celular es primordialmente por apoptosis (Ikonomidou et al., 1995; Wrathal⁽¹⁾ et al., 1992; Gómez-Pinilla et al., 1989, Noble et al., 1985, Wrathal⁽²⁾ et al., 1992; Bao et al., 2004; foto 2).

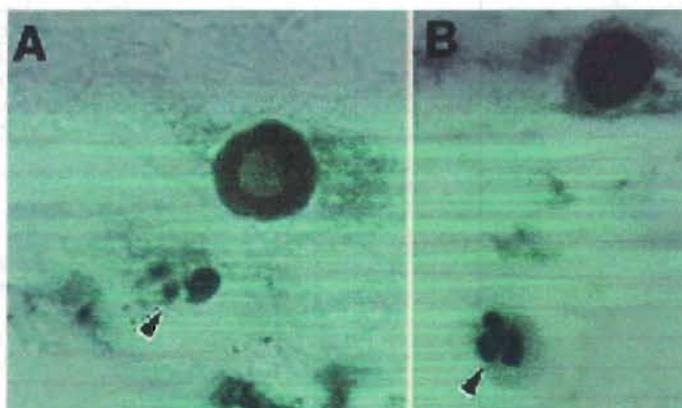


Foto 2 En esta fotografía se muestran núcleos apoptóticos (flecha) dentro de la médula espinal humana traumatizada teñida con cresil-violeta (<http://www.aans.org/education/journal/neurosurgical/october98/5-4-p1.asp>)

1.1.2 *Mecanismos patofisiológicos de la lesión traumática de la médula espinal.*

Dependiendo de la severidad del traumatismo y de las características del daño se han descrito dos procesos de lesión. Uno primario y otro secundario (Tator, 1995). La lesión primaria es el resultado directo de las fuerzas mecánicas del impacto sobre el parénquima medular (Tator 1995., Ikonomidou et al., 1995., Wrathal⁽¹⁾ et al., 1992), y varía de acuerdo al tipo e intensidad del impacto. La lesión secundaria que se produce horas después resulta en una cascada de mecanismos auto destructivos sobre el parénquima de la médula espinal, así como destrucción o atrofia de neuronas distantes a la zona de lesión. En la lesión secundaria los daños más severos progresan desde el centro hemorrágico, incidiendo principalmente en la sustancia gris, y continúan a considerable distancia proximal y distal al sitio de lesión, produciendo isquemia de la sustancia blanca y gris. Los daños menos severos involucran alguna alteración en la mielina que recubren a los axones (Tator 1995). Todo este cuadro contribuye a un estado neurodegenerativo crónico en donde el grado de isquemia alcanzado en el sitio de lesión incide en el descenso de la producción energética, afectando entre otros procesos al funcionamiento de las bombas de transporte de Na^+ / K^+ y Ca^{2+} , por lo que aumenta la presión osmótica intracelular favoreciendo la muerte celular (Azbill et al., 1997; Schwartz et al., 2002).

El sistema nervioso central es más susceptible que otros órganos al estrés oxidativo debido a su alto contenido de lípidos insaturados, alta actividad metabólica y un contenido reducido de enzimas antioxidantes (Hensley et al., 1996; Azbill et al., 1997). Uno de los principales desordenes bioquímicos en la médula espinal lesionada es la acumulación y subsiguiente daño por el neurotransmisor excitatorio glutamato, el cual eleva el ingreso de calcio al interior celular a través de los receptores N-metil, D-aspartato. El incremento del calcio intracelular activa proteasas dependientes de este elemento o lipasas las cuales causan daño celular al degradar los componentes del citoesqueleto incluyendo los neurofilamentos y disolución de las membranas (Tator 1995; Azbill et al., 1997). Además el ingreso excesivo de calcio a las mitocondrias produce un cambio en su potencial de membrana y alteración de la cadena de transporte de electrones, de tal forma que detiene la producción de energía e incrementa la formación de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido (Hensley et al., 1996; Hardingham et al., 2003; Azbill et al., 1997; Ikonomidou et al., 1995). A su vez el anión superóxido interactúa con el óxido nítrico para formar peroxinitrito (Azbill et al., 1997; Hensley et al., 1996), y el peróxido de hidrógeno, mediante las reacciones de Fenton-Weiss en las que el hierro es el agente catalítico, se forman radicales hidroxilo (Liu et al., 1993; Liu et al., 1999) la producción de estos radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno y la falta de la capacidad de los mecanismos para el control y equilibrio de estas moléculas forman globalmente un estado de estrés oxidativo (Faden 1983; Simic et al., 1987; Gomez-Pinilla et al., 1989; Nicotera et al., 1991; Edwards 1991, Hensley et al., 1997) en el cual se promueven la necrosis y apoptosis del parénquima medular (Zhang et al., 1996; Bao et al., 2004, Panahian et al., 2001; Liu, 1993; Liu⁽¹⁾, 2004; Liu et al., 1999; Figura 3).

Como se mencionó anteriormente la LTME altera el metabolismo del hierro en la médula espinal (Liu et al., 1993; Liu et al., 1999), en este sentido Koszyca y colaboradores por estudios inmunocitoquímicos han observado un incremento significativo en las células positivas a ferritina comparado al control y una correlación significativa entre el número de células positivas y la severidad del daño medular (Koszyca et al., 2002). Esto sugiere que al elevarse localmente el hierro en el medio extracelular, este metal ingresa al interior

celular controlando de esta manera cualquier reacción extracelular que facilite la formación de radicales libres como el hidroxilo y con ello el daño inicial a las membranas.

Con la progresión del proceso neurodegenerativo se presenta el fenómeno de reperfusión, en el que el aporte de oxígeno se eleva en el sitio de lesión, con lo que se produce un aumento de diferentes especies reactivas principalmente de oxígeno y nitrógeno (White et al., 2000). En forma paralela la actividad del sistema inmunológico produce una cascada de eventos que incrementan la neurodegeneración mediante la activación de fagocitos, los cuales también contribuyen al incremento en la formación de radicales libres.

Poco se sabe si el edema que se forma progresivamente en el sitio de lesión ejerce una influencia nociva por sí mismo o si es un epifenómeno de otro mecanismo como isquemia o toxicidad por el glutamato. El edema puede extenderse en la médula espinal desde el sitio de lesión a una distancia considerable rostral y caudal tanto en modelos experimentales como en casos clínicos (Tator 1995).

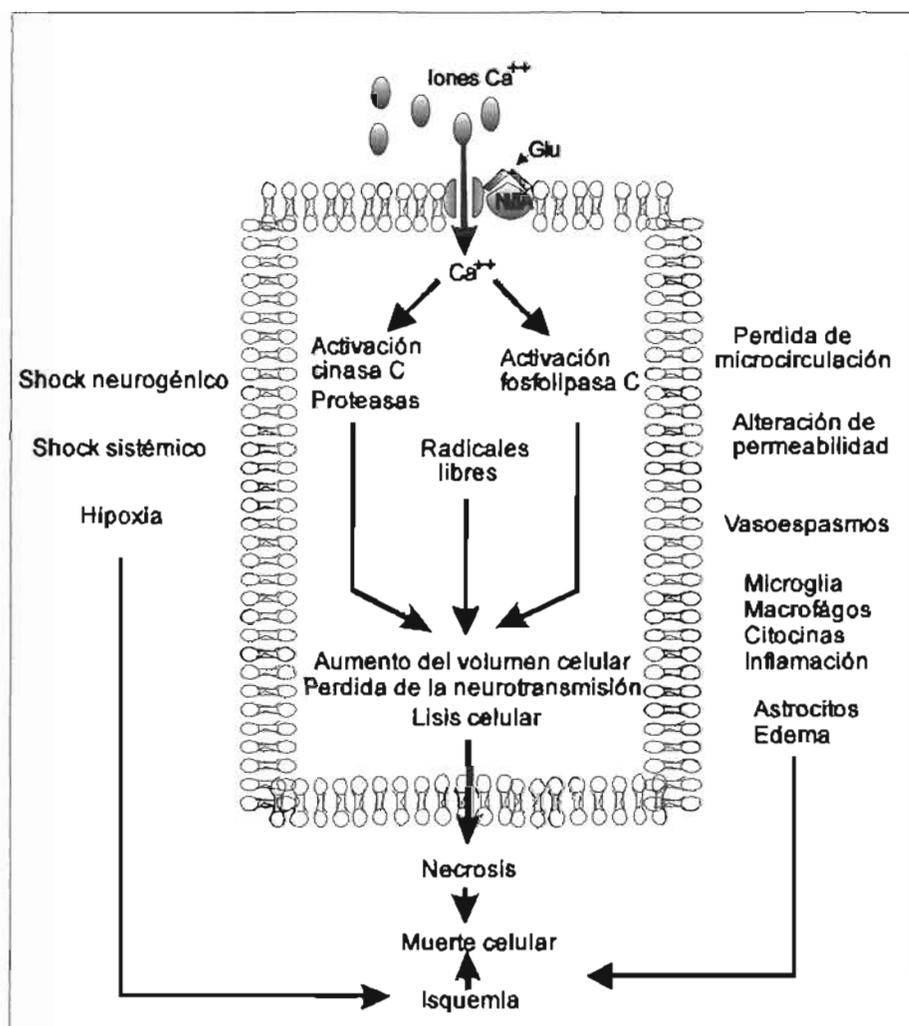


Figura 3. Principales mecanismos patofisiológicos de la lesión traumática aguda de la médula espinal. (Modificado de Tator, 1995).

1.1.3 *El hierro en la médula espinal después de una lesión traumática.*

Uno de los primeros reportes que claramente informa la posibilidad de la participación del hierro en la generación de radicales libres (RL) después de la lesión traumática de la médula espinal (LTME) por Danxia Liu y colaboradores mostró que al administrar mediante una doble microdiálisis intratecal con H_2O_2 y $FeCl_2$ simultáneamente, se generaban radicales hidroxilo (Liu et al., 1993). Zhang y colaboradores reportaron que en un cultivo de neuronas de la médula espinal en presencia de iones ferrosos se desarrollaba la peroxidación de lípidos de membrana (Zhang et al., 1996). En este sentido Danxia Liu y colaboradores demostraban que en la LTME se mantiene constante un incremento alcanzado por el H_2O_2 durante las siguientes 11 horas a la lesión, en este mismo trabajo también se demostró que la formación de radicales hidroxilo dependía de la infusión por microdiálisis de cloruro ferroso ($FeCl_2$) mediante las reacciones de Fenton con lo cual se planteo la hipótesis de que el daño secundario en la LTME estaba mediado por especies reactivas de oxígeno fundamentalmente, hoy sabemos que en la lesión secundaria participan no solo radicales de oxígeno (Liu et al., 1999).

Se han realizado estudios en la lesión medular para conocer si con la lesión de la médula espinal, el hierro de bajo peso molecular podría incrementar su nivel utilizando diferentes procedimientos, en este sentido De Castro y colaboradores empleando desferroxamina (DFRM) y espectroscopia de adsorción atómica para captar el hierro de bajo peso molecular extracelular quelable en el sitio de lesión determinando que el hierro de bajo peso molecular no se incrementa después de la LTME (De Castro et al., 1999). En otros estudios el grupo de Danxia Liu y colaboradores estudiando en un modelo de LTME en la rata y espectrofotometría de adsorción atómica determinaron que el hierro extracelular total se incrementa hasta un promedio de $1.32 \mu M$ al cabo de 30 minutos después de la LTME. Al emplear la DFRM a las dosis de 80 y 800 mg/Kg de peso se encontró que la actividad de lipoperoxidación en el tejido lesionado disminuye de manera significativa (Liu⁽²⁾ et al., 2003). El grupo de Jimbo Liu y colaboradores empleando un modelo de una LTME y el examen con bleomicina que determina indirectamente el nivel de hierro de bajo peso molecular, encontraron que a 0.5 horas el hierro libre se incrementa en forma significativa en los animales lesionados a un valor de $(4.98 \pm 0.86 \text{ molas/g proteína})$ con respecto a los controles $(2.57 \pm 0.45 \text{ molas/g proteína})$ y los animales que solo recibieron el procedimiento de lesión $(2.57 \pm 0.33 \text{ molas/g proteína})$. Al cabo de 6 horas el nivel de hierro descendió a valores similares a los controles (Liu⁽¹⁾ et al., 2004).

Con la administración de hierro intratecal en la ME según la cantidad previamente obtenida en la LTME se ha encontrado que estimula la formación de radicales hidroxilo, los cuales según estos autores estimulan la muerte neuronal y de astrocitos por inducción de apoptosis y necrosis (Liu et al., 2004; Bao et al., 2004).

La información presentada sugiere que en la muerte del parénquima celular de la médula espinal lesionada intervienen de manera importante la capacidad del hierro quelable para la formación de radicales libres mediante las reacciones de Fenton y Haber y Weiss y que el hierro podría incrementarse en la zona de lesión.

1.2 DEFENSAS ANTI OXIDANTES

1.2.1 Defensas antioxidantes

La posibilidad de los organismos para soportar numerosos factores tanto endógenos como exógenos de estrés oxidativo (estado generado por los radicales libres), esta dado por

numerosos sistemas de protección antioxidante regulables los cuales se organizan como diferentes barreras de protección que operan a diferentes niveles y están formados por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos (Wrathal⁽¹⁾ et. al., 1992; Zentella et al., 1990, Jacobson 1996; Hensley et al., 1997; Halliwell et al., 2001, Simic et al., 1987; figura 4).

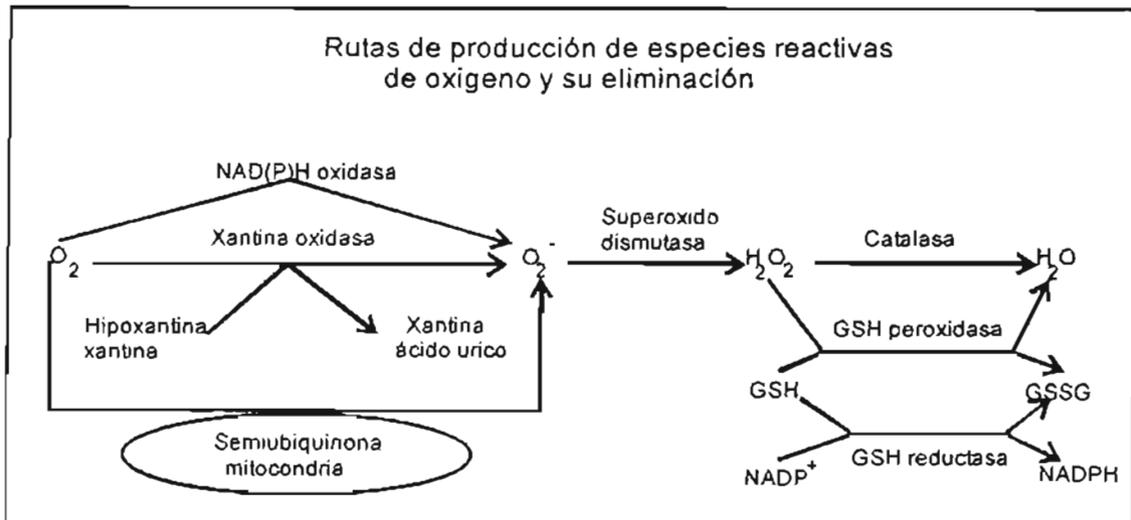


Figura 4 El metabolismo normal produce radicales libres así como sistemas protectores. (Modificado de Droge 2002)

La que se ha dado en llamar la primera línea de defensa esta formada por la enzima superóxido dismutasa dependiente de Mn y Zn, presente en la mitocondria y el citosol, esta enzima utiliza el O_2 para formar O_2^- y H_2O_2 , esta última molécula es altamente toxica, por ello la segunda línea de defensa lo constituye la enzima catalasa que lleva al H_2O_2 hasta H_2O y O_2 y se localiza principalmente en los peroxisomas (Zentella et al 1990, Jacobson 1996, Hensley et al 1997, Simic y Taylor 1987).

Superóxido dismutasa: SOD

Superóxido dismutasa descubierta por Mc Cord y Fridovich (1969) constituye la primera línea de defensa antioxidante. Cataliza la conversión del anión superóxido a peróxido de hidrógeno, de acuerdo a la reacción 1.



La SOD es una metalo enzima y en su sitio activo tiene cobre que por mecanismos redox, participa en las reacciones de dismutación. El zinc por su parte, actúa como estabilizador de la enzima. La variedad mitocondria de SOD contiene manganeso en su sitio activo. Mutaciones en este gen producen una variedad de esclerosis lateral amiotrófica familiar.

La catalasa: CAT

Esta enzima se encuentra ubicada preferentemente en los peroxisomas, cataliza la inactivación de peróxido de hidrogeno convirtiéndolo a agua y oxígeno. La CAT se encuentra en forma abundante en todos los tejidos, siendo escasa en cerebro, corazón y músculo esquelético. El sitio activo de la enzima es un grupo hemo (Fe^3) protoporfirina.

Glutación peroxidasa 3 plásmatica: GPX 3

La glutación peroxidasa 3, esta presente en mitocondrias, citosol y peroxisomas y cataliza la reducción de peróxidos a agua, aprovechando el potencial reductor del glutación reducido (GSH) que es transformado a glutación oxidado (Jacobson 1996, Faden 1983, White et al., 2000). La GPX 3 es una metaloproteína que contiene en su centro activo selenio.

Glutación sintetasa: GSS

La glutación sintetasa se encarga de restaura el glutación, esta molécula participa indirectamente en la eliminación de peróxido de hidrogeno a través de la GPX 3. también es un atrapador de radicales hidroxilo y del oxígeno singulete. Otras funciones del glutación son la de cofactor de diversas enzimas que participan en diferentes procesos metabólicos.

1.2.2 *Funciones neurprotectoras de la hemo oxigenasa en la lesión medular.*

Además de los mecanismos antioxidantes ya descritos se ha observado después de la lesión medular la inducción de la expresión de las enzimas hemo oxigenasa 1 (HO-1) y la elevación de la hemo oxigenasa 2 (HO-2). Estas proteínas forman parte de una familia de 3 isoenzimas encargadas de romper el anillo del grupo hemo en biliverdina, ion ferroso y monóxido de carbono. En turno la biliverdina atrapa radicales libres antes de ser convertida a bilirrubina, la cual también posee la propiedad de atrapar radicales libres, por lo que se les considera moléculas protectoras de la acción de los radicales libres. La expresión de las enzimas HO-1 y HO-2 se ha encontrado tanto en las neuronas como en la glía y en los macrófagos en la zona lesionada de la médula espinal (Mautes et al, 2000, Weinzierl et al.,), prácticamente alrededor de 24 horas después del inicio de la lesión de la médula espinal y hasta 42 días (Mautes et al., 2000; Mautes et al., 1998). En el sitio de lesión de la médula espinal se induce rostralmente un aumento en la expresión de HO-2 y caudalmente la expresión de HO-1, esta última se colocaliza con los factores de transcripción Fas asociado a la proteína de dominio de muerte celular (FADD), y el factor de necrosis tumoral (TNF) relacionado con la apoptosis. Estudios recientes ha propuesto que HO-1 protegería de daño posterior mediante el control de la muerte celular programada, en tanto que HO-2 estaría involucrada en suprimir la respuesta inflamatoria por radicales libres derivados de óxido nítrico (Panahian et al., 2001).

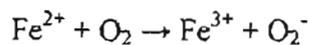
A pesar de las propiedades antes descritas es importante mencionar que existen reportes que indican propiedades deletéreas de las hemo oxigenasas, por ejemplo, en modelos experimentales como hemorragia intracerebral; siderosis superficial en conejo después de hemorragia subaracnoidea experimental, y en daño traumático de hipocampo en rebanadas se ha aplicado como medida terapéutica la inactivación de la hemoxigenasa (Schipper, 2004). Otros estudios indican que en la astrogliá la inducción de HO-1 actúa como una vía final que media el daño oxidativo en la mitocondria por la acumulación de hierro del tejido nervioso en degeneración o senescente (Schipper, 2004).

1.2.3 *El hierro en la generación de radicales libres*

El hierro, (número atómico 26 y peso atómico 55.847) se considera como un radical libre de baja actividad. Por su naturaleza en el organismo se restringe su actividad como radical libre al unirse a proteínas entre las que se incluyen ferritina, transferrina, lactoferrina, hemoglobina, mioglobina, hemosiderina, y ceruloplasmina (Halliwell et al., 2001; Chua-Anusorn et al., 1997; Simic et al., 1987).

El hierro posee dos estados de oxidación mas frecuentes, el ion férrico Fe^{3+} , y el ion ferroso Fe^{2+} , ambos se pueden encontrar en los organismos. Sin embargo, cuando se encuentra como ión ferroso (Fe^{2+}) de forma libre, participa como catalizador para la formación de radicales libres (RL) por un proceso denominado reacciones de Fenton debido a la descripción de ésta reacción por Fenton desde 1894, pero explicado hasta 1932 por Haber y Weiss (Kanner 1987; Simic et al., 1987; White, 2000; Baliga, 1993) De acuerdo a las reacciones de Fenton inicialmente se verifica la transferencia de un electrón al superóxido, acompañada por la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} para producir el radical $O_2^{\cdot -}$. (Halliwell et al., 2000; reacciones 2, 3).

Reacción 2



El superóxido por acción de la SOD genera peroxido de hidrogeno y oxígeno (Reacción 3)

Reacción 3



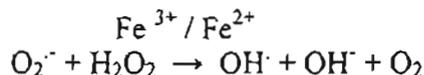
La reacción de Fe^{2+} con H_2O_2 produce el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (Reacción 4).

Reacción 4



La reacción de Haber- Weiss puede también formar OH^{\cdot} En una interacción entre $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 en la presencia de Fe^{2+} o Fe^{3+} (Reacción 5)

Reacción 5



En el sistema nervioso se ha demostrado que la generación de especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno es alta, particularmente en los oligodendrocitos y las células de microglía reactiva. Debido a estas condiciones la formación y eliminación de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno es alta y sus radicales libres correspondientes es crítica. (Markesbery 1997).

1.2.4 QUELANTES DEL HIERRO

Los quelantes son moléculas que se unen firmemente a los iones metálicos de una manera químicamente inerte, hechas por los organismos vivos. Predominantemente son moléculas sencillas, como el ácido etilendiaminotetrácético, la pulquerrimina, que es un pigmento rojo, la desferroxamina, otros son moléculas complejas por ejemplo los péptidos de la familia de las pioverdinas, la ferritina, hemosiderina, etc.

Una de las acciones más importantes de los quelantes es la desintoxicación para la prevención del daño, por ejemplo el quelante del calcio el EDTA es usado contra la hipercalcemia; el quelante que se utiliza para remover el hierro en exceso que se acumula en el organismo la DFRM es por cierto el único quelante de hierro indicado para su administración terapéutica en los Estados Unidos (Desferal) y recientemente en la Comunidad Europea (Figura 5).

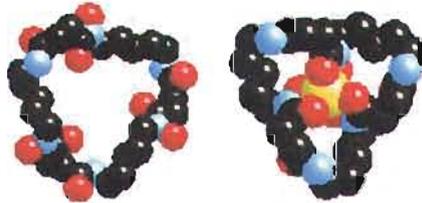


Figura 5 (A) Modelo del quelante DFRM, (B) complejo Fe-DFRM un giro del esqueleto de carbono permite al trío de oxígenos del oximato y tres oxígenos de los grupos carbonilo para formar una cavidad en donde se une el ion Fe^{3+} . (Modificado de http://pearl1.lanl.gov/external/Research/neu/actinide_research.htm)

Los quelantes se pueden clasificar de acuerdo a sus orígenes (sintéticos o biológicos), por su interacción con el agua, o su interacción estequiométrica.

En la clínica es importante el grado de absorción por el tracto gastrointestinal. Un quelante de una alta efectividad clínica como la DFRM tiene un inconveniente y es que es pobremente adsorbida por el tracto gastrointestinal. Debido a esto debe ser administrada en forma parenteral, como una infusión intravenosa continua o como una infusión subcutánea.

1.2.5 *Mecanismos de protección celular por quelantes de hierro.*

La protección que pueden brindar los quelantes de hierro consiste en dos formas: Remoción del exceso de hierro y la neutralización del hierro promotor de radicales libres, denominado hierro libre o quelable.

1.2.5.1 Remoción del exceso de hierro.

El procedimiento clínico ampliamente utilizado ante la acumulación de hierro es la protección mediante la remoción del exceso de hierro. Además el cuerpo posee mecanismos que pueden corregir hasta cierto punto el daño ocurrido. La capacidad de los quelantes para remover el hierro en exceso depende de al menos dos factores: (a) la velocidad a la cual el quelante disminuye el almacenamiento de hierro, y (b) la velocidad de acumulación de hierro.

En los pacientes que reciben transfusiones sanguíneas repetidas como en el tratamiento de anemias, en apoyo a trasplantes y en pacientes con hemacromatosis se incrementa la acumulación de hierro, la administración de desferroxamina remueve entre 30 mg a 70 mg de hierro por día disminuyendo de esta manera la acumulación de hierro en el

corazón, hígado y páncreas reduciendo con ello la inducción de muerte celular debido a la acción de radicales libres dependientes de hierro como el radical hidroxilo (Breuer et al., 2000).

1.2.5.2 Neutralización del hierro “libre”

La unión del quelante al hierro bloquea su capacidad para catalizar reacciones redox. Los iones de hierro forman 6 sitios de coordinación electroquímica. Consecuentemente una molécula de quelante que se pueda unir a los 6 sitios completamente inactiva al hierro “libre”, tales quelantes son llamados “hexidentados” como la DFRM.

1.2.6 El empleo de la desferroxamina en la lesión de la médula espinal.

1.2.6.1 El quelante desferroxamina.

La desferroxamina (DFRM) es un pequeño quelante hidrofílico (peso molecular 657 Da), producida por la bacteria *Streptomyces pilosus* formada por tres grupos hidroximato los cuales interactúan con el hierro, formando una asociación fuerte. La constante de estabilidad de la DRFM es de 10^{31} y excede comparativamente a la del complejo transferrina-hierro. Solo en presencia de citrato la DFRM puede unirse al hierro removido de la transferrina (Bridges 1990).

La DFRM es una molécula multidentada, con ligandos que donan oxígeno usualmente poseen hidroxamato, catecolato, o especies de carboxilato. Aunque con una afinidad muy alta para el Fe^{3+} . Estos sideróforos pueden unirse a otros iones, como Al^{3+} , Zn^{2+} , Ga^{3+} , Cr^{3+} , y $Pu^{3,4+}$, pero con una afinidad muy baja (Bridges 1990).

S. pilosus y *P. stutzeri* producen respectivamente los sideróforos desferroxamina B y desferroxamina E, cuya estructura se ilustra en la figura 28

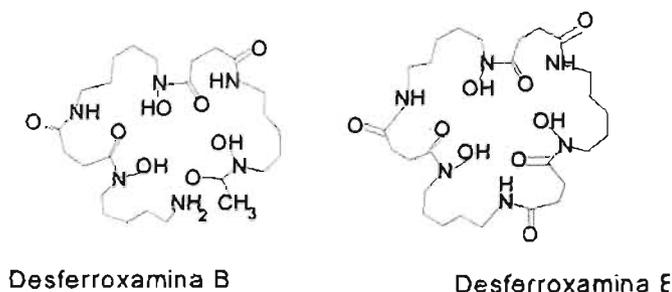


Figura 6 Sideróforos de hidroxamate. Se muestra la estructura química de dos sideróforos de desferroxamina, el lineal, desferroxamina B, es un trihidroxamato producido por *S. pilosus*; el trihidroxamato cíclico producido por *P. stutzeri*, desferroxamina E. (Modificado de http://pearl1.lanl.gov/external/Research/neu/actinide_research.htm)

A pesar de su estructura hidrofílica la DFRM ingresa al interior celular donde también ejerce su actividad quelante, de hecho se le ha encontrado predominantemente en los lisosomas (Richardson et al., 1994; Yu et al., 2003; Doulias et al., 2003) La DFRM se une preferentemente a los iones Fe^{3+} en una proporción de 1:1. (Gutteridge et al., 1994)

En la clínica la DFRM es el eje sobre el cual se constituyen los regímenes de tratamiento para las condiciones patológicas de una sobre carga de hierro. Sin embargo existen limitaciones a su uso debido a la necesidad de administración por vía parenteral, o como una infusión continua subcutánea, o una infusión intravenosa continua, cualquiera de estas vías presenta límites en las dosis administradas (Gutteridge et al., 1994; Bridges, 1990).

La DFRM se adsorbe pobremente por el tracto gastrointestinal (Callender et al., 1980). Hasta que alcanza el lecho sanguíneo la filtración renal de la droga es muy rápida. Cuando se administra en un bolo i.v. , la vida media de la DFRM es e solo 10 a 15 min. (Bridges, 1990). Esta droga ha mostrado ser efectiva limitando el daño en los tejidos en varios modelos animales en donde está fuertemente implicado el daño oxidativo dependiente de hierro. Hay sin embargo reportes de que la DFRM agrava la inflamación, y exacerba la toxicidad de ciertos xenobióticos. Los mecanismos estudiados han revelado que la DFRM tiene propiedades pro oxidantes involucrando alteración en la actividad enzimática de algunas proteínas y la generación de radicales libres por ciclos redox (Gutteridge et al., 1994)

1.2.6.2 La desferroxamina en la lesión de la médula espinal.

La desferroxamina (DFRM) se ha empleado para contrarrestar los efectos deletéreos del hierro en los pacientes con hemacromatosis, talasemia, en pacientes que requieren transfusiones frecuentes y en el tratamiento de algunos tipos de cáncer.

En un modelo experimental de paraplejía en el cerdo, por el bloqueo de la aorta, la administración simultánea de alopurinol y DFRM produjo reducción en la incidencia de la paraplejía. (Quayumi et al., 1994). Sin embargo poco se conoce acerca de la influencia de la DFRM sobre la recuperación funcional después de una lesión medular tanto desde el punto de vista experimental como clínico. De hecho la DFRM en el caso de lesión medular también se ha empleado con diferentes enfoques, en particular para el estudio de la hipótesis de la elevación del nivel de hierro libre después de la lesión medular, y el abatimiento de los efectos de los radicales libres dependientes de hierro en el tejido medular. En este sentido De Castro y colaboradores empleando un modelo experimental de LTME en la rata determinaron con el uso de la DFRM que en el medio extracelular en el sitio de LME el hierro libre no se incrementa (De Castro et al., 1999). Contrario a estos hallazgos se ha obtenido por dos grupos de investigadores recientemente que después de una LTME en la rata el nivel de hierro tanto extracelular como el hierro total se elevan, entre estos el grupo de Danxia Liu empleando desferroxamina en el espacio extracelular del sitio de lesión siguiendo un método comparable al grupo encabezado por De Castro (Liu⁽¹⁾ et al., 2004; Liu et al., 2003).

Además de examinar el nivel de hierro en la LTME estos trabajos mostraron que los radicales libres formados en dependencia al hierro libre también experimentan un incremento paralelo al aumento de la peroxidación de los lípidos de membrana y que el tratamiento con DFRM reduce la actividad catalítica del hierro en la producción de radicales libres (Liu⁽¹⁾ et al., 2004; Liu et al., 2003).

Son pocos los estudios entorno a la DFRM como un fármaco para el tratamiento de la médula espinal lesionada, no obstante en el año 2004 la Comisión de las Comunidades Europeas dictaminó la “aprobación del mesilato de desferroxamina como medicamento

poco conocido, con uso escaso y costoso (huérfano) indicado para el tratamiento de lesiones espinales medulares traumáticas” (número de registro EU/3/04/231), lo cual muestra la importancia que puede tener el empleo de este fármaco.

1.3 METABOLISMO DEL HIERRO

El hierro (del latín *iferrumi*) es un nutriente necesario en casi todos los organismos estudiados. Por su naturaleza interviene en procesos biológicos de oxidación y reducción en donde se requiere transferencia de electrones, como en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, como cofactor en algunas enzimas como la catalasas, peroxidasas o como grupo prostético como en la hemoglobina y mioglobina.

En los mamíferos los requerimientos de hierro varia con el desarrollo del individuo y con el sexo, siendo mayor en la menstruación y durante el embarazo.

En el ser humano el contenido total de hierro de un individuo normal es de aproximadamente de 3.5 a 4 g en la mujer y de 4.5 a 5 g en el hombre. En individuos con un estado nutricional óptimo alrededor del 65% se encuentra formando parte de la hemoglobina, el 15 % está contenido en las enzimas y la mioglobina, el 20 % como hierro de depósito y solo entre el 0.1 y 0.2 % se encuentra unido con la transferrina como hierro circulante (figura 7).

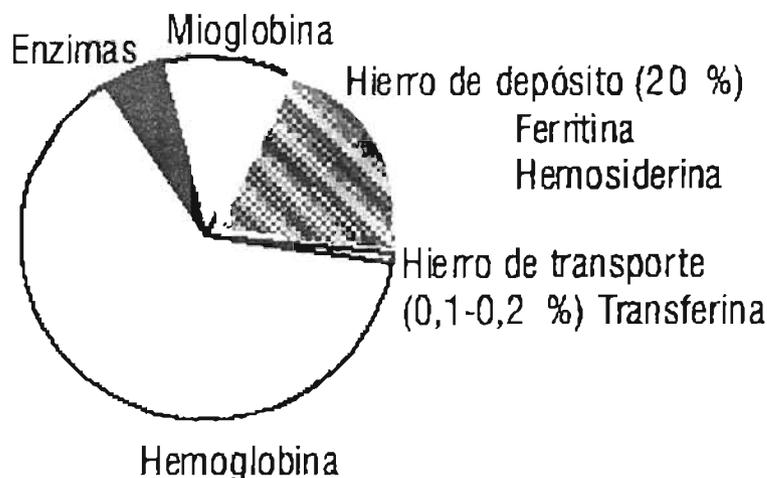


Figura 7 Distribución del hierro en el ser humano (de Forrellat et al., 2000)

En el organismo el hierro se encuentra distribuido en 2 compartimientos: uno funcional, formado por numerosos compuestos, entre los que se incluyen la hemoglobina, la mioglobina, la transferrina, y las enzimas que requieren hierro como cofactor o como grupo prostético, ya sea en forma iónica o como grupo hemo, y el compartimiento de depósito, constituido por la ferritina, y la hemosiderina, que dan lugar a las reservas corporales de este metal (Forrellat et al., 2000; Aisen, 2001). Los requerimientos de hierro

varían con el desarrollo del individuo y con el sexo, siendo mayor en la menstruación y durante el embarazo.

El flujo de hierro entre estos 2 compartimientos se produce a través de un ciclo prácticamente cerrado y muy eficiente. Del total del hierro que se moviliza diariamente, sólo se pierde una pequeña proporción a través de las heces, la orina y el sudor. La reposición de esta pequeña cantidad se realiza a través de la ingesta, la cantidad de hierro que se absorbe de los alimentos es muy baja, entre 1 y 2 mg (aproximadamente el 10 % de la ingesta total). (Forrellat et al., 2000)

La principal diferencia entre el metabolismo del niño y del adulto está dada por la dependencia que tienen los primeros del hierro proveniente de los alimentos. En los adultos, aproximadamente el 95 % del hierro necesario para la síntesis de la hemoglobina proviene de la recirculación del hierro de los hematíes destruidos. En contraste, un niño entre los 4 y 12 meses de edad, utiliza el 30 % del hierro contenido en los alimentos con este fin, y la tasa de reutilización a esta edad es menos significativa. (Forrellat et al., 2000).

1.3.1 Almacenamiento del hierro: Ferritina y Hemosiderina

1.3.1.1 Ferritina

La ferritina (Fr) es una de las proteínas más antiguas del metabolismo del hierro. Filogenéticamente se encuentra sustancialmente conservada desde bacterias, en las plantas y hasta el hombre. En los mamíferos todas las ferritinas son heteropolímeros de 24 subunidades de dos tipos, designados H (del inglés heavy: pesada, masa aproximada de 21000), y L (del inglés light: ligera, masa aproximada de 19500). La proteína completa forma una estructura esférica, con un hueco de 70 a 80 Å, diámetro capaz de acomodar hasta 4500 átomos de hierro, no obstante la ferritina no se encuentra saturada (Aisen et al., 2001). Después de que el hierro ingresa a la Fr, los iones son convertidos al estado férrico, estos iones forman cristales al interactuar con fosfato e iones hidróxido (figura 8).

Zona donde se almacena el hierro

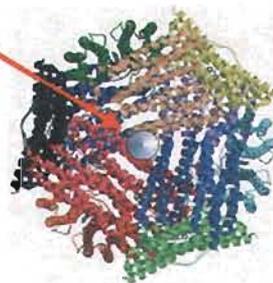


Figura 8 En esta ilustración se han retirado algunas porciones de la ferritina para poder apreciar la localización del hierro y se observa como se encuentra el hierro en forma de cristales en el interior de la ferritina. (modificado de www.itqb.unl.pt/.../news/DN_Bfr.htm)

Debido al arreglo estructural que adquiere la Fr, cada molécula podría contener hasta 4500 iones de hierro en su interior, de tal manera que se cree que es necesario desensamblar el complejo para poder liberar el hierro. En el hombre se encuentra almacenado alrededor de 1 gramo de hierro en la Ferritina.

1.3.1.2 Hemosiderina

La hemosiderina es un complejo insoluble en agua, formado por productos de degradación de la ferritina y otros materiales, al parecer podría originarse por un procesamiento lisosomal incompleto. Debido a su limitada solubilidad y abundancia ha sido difícil su estudio. El núcleo de hierro de la hemosiderina es menos efectivo para la generación de radicales libres en comparación a la Fr mediante la reacción de Haber y Weiss (Aisen et al, 2001). La hemosiderina es comúnmente encontrada en los macrófagos y especialmente abundante en situaciones de hemorragia, sugiriendo que su formación puede estar relacionada a fagocitosis de células sanguíneas y hemoglobina (Aisen et al., 2001; foto 3).

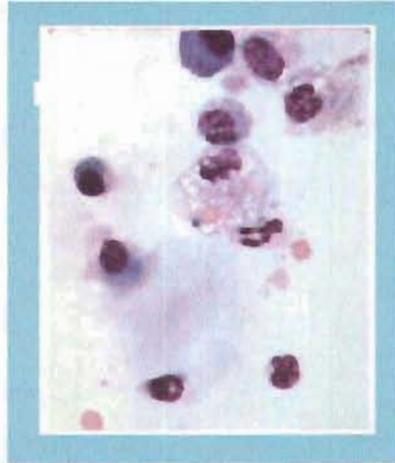


Foto 3. Se muestra un macrófago fagocitando un eritrocito el cual se localiza en una vacuola citoplásmica. Con el tiempo, la degradación de la hemoglobina se asocia con la formación de un pigmento color café, la hemosiderina. Esta estructura también puede encontrarse en el espacio extracelular. Tinción de Wrigth, 500X (tomado de <http://www.medvet.umontreal.ca/clinpath/banq-im/cytology/erythophagieE.htm>)

1.3.2 *Control celular del metabolismo del hierro*

A través de la cantidad de receptores a transferrina (TfR) la célula puede regular el nivel intracelular de hierro mediante la recaptura de la transferrina. La regulación de la expresión del TfR es postranscripcional y depende fundamentalmente del nivel de hierro intracelular y de la participación de las llamadas proteínas reguladoras del hierro (IRPs) que controlan también la síntesis de ferritina y del TfR (Aisen et al., 2001, De Freitas et al., 2001). Además de las proteínas reguladoras participan los denominados elementos que responden al hierro (IREs); los cuales están constituidos por regiones del ARNm tanto para la ferritina como del TfR y que forman estructuras en forma de asas que median la regulación de la traducción de la Fr y del TfR.

Se ha identificado dos IRPs: El IRP1 que participa en la regulación de la expresión de Fr y la IRP2, la cual es la mejor conocida de las dos IRPs y que participa directamente en la regulación de la síntesis del TfR.

1.3.2.1 Regulación de la expresión del receptor a transferrina.

En ARNm del receptor a transferrina, posee en el extremo no traducido 3' los elementos que responden al hierro (IREs) para la unión de las proteínas reguladoras del hierro (IRPs), también contiene un elemento inestable que hace a este extremo sensible a degradación ribonucleasa (Figura 9). En las condiciones de bajo nivel de hierro, las IRP2 no están oxidadas y se unen a los IREs en la región tallo y protegen al ARNm de la degradación, resultando en un incremento de la síntesis del TfR permitiendo un incremento en el ingreso de hierro unido a Tf por la célula.

En las condiciones de altos niveles de hierro las IRP2 se encuentran oxidadas y no se unen a las IREs, lo que permite la degradación del ARNm del TfR (Aisen et al., 2001), y con ello una disminución de la traducción del TfR lo que limita el ingreso al interior celular del hierro unido a la Tf.

Las IRP2 oxidadas son degradadas rápidamente por el proteosoma.

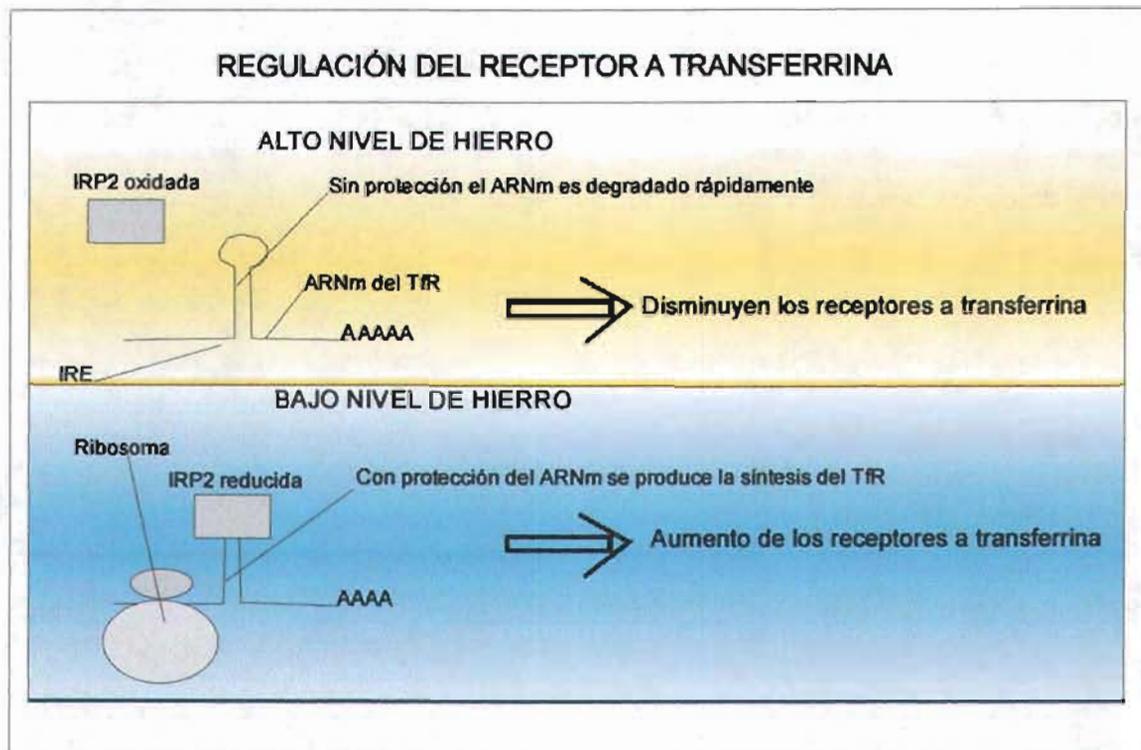


Figura 9. El nivel de hierro intracelular es influenciado por la síntesis del receptor a transferrina (TfR). En condiciones de altos niveles de hierro se bloquea la síntesis del TfR, ya que la proteína reguladora de hierro (IRP2) se encuentra oxidadada y con ello se permite la degradación del ARNm para el TfR. En condiciones de bajo nivel de hierro la IRP2 se encuentra reducida y con ello puede unirse al asa estructural del RNAm impidiendo su degradación, asegurando con ello la síntesis de los TfR (modificado de Aisen et al , 2001).

1.3.2.2 Regulación de la expresión de la ferritina.

Las proteínas reguladoras del hierro (IRPs) también regulan a la ferritina. En condiciones de un nivel intracelular bajo de hierro, la IRP1 se une a el tallo de los elementos que

responden al hierro (IREs) cerca del extremo 5' CAP del sitio de inicio del ARNm de la ferritina evitando su traducción. Bajo condiciones de alto nivel de hierro intracelular, es necesario sintetizar ferritina para atrapar todo el hierro y prevenir el daño oxidativo. En estas condiciones el hierro se une al IRP1 lo que impide que se una al ARNm permitiendo de esta manera la traducción de la apoferritina (Aisen et al., 2001; figura 10).

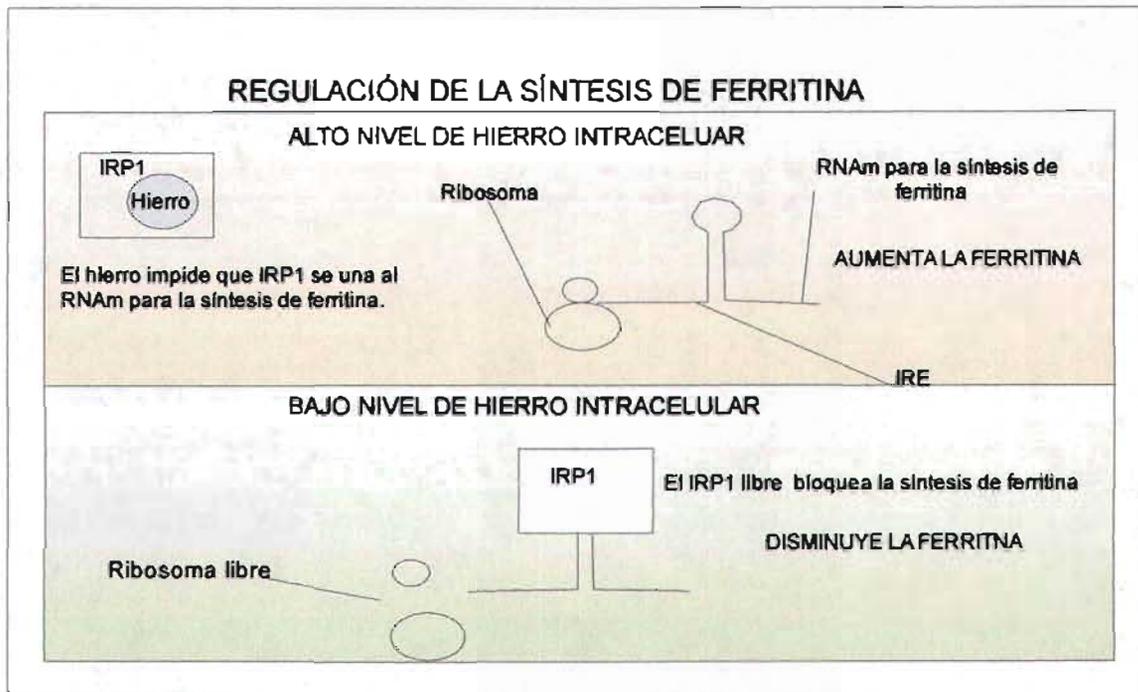


Figura 10 La síntesis de ferritina depende de los niveles de hierro intracelular. La región que responde al hierro del RNAm (IRE) posee un asa estructural de la que depende el inicio de la síntesis de la ferritina. Un exceso de hierro impide que la proteína reguladora del hierro (IRP1) se una al RNAm de tal forma que se sintetiza ferritina. Si existe un nivel intracelular bajo de hierro, la IRP1 se une al asa estructural impidiendo la síntesis de ferritina y con ello su almacenamiento, permitiendo su disposición para procesos metabólicos (modificado de Aisen et al., 2001).

1.3.2.3 Regulación de la expresión de la transferrina

La transferrina a diferencia de la ferritina y del propio receptor a transferrina no sigue una regulación dependiente directamente de los niveles de hierro, su regulación es más compleja ya que intervienen directamente el control de la expresión genética mediada por diferentes factores celulares que de hecho no se encuentran completamente caracterizados (Zakin, 1992; Bassel et al., 1995).

Esencialmente sintetizada en el hígado, la Tf también se produce en bajas cantidades en los testículos y el cerebro. En función del tipo celular se ha encontrado que la expresión del gen a Tf emplea diferentes combinaciones de proteínas nucleares para activar específicamente a este gen. La función de la Tf se relaciona con procesos fisiológicos de diferentes funciones celulares como la diferenciación y la proliferación (Zakin, 1992).

En estudios en la rata se ha encontrado que la expresión de Tf en el hígado es constitutiva y no esta sujeta a regulación por hormonas esteroideas incluyendo los niveles de hierro, si embargo en las células de Sertoli en la rata, la expresión del ARNm de Tf al parecer requiere del efecto combinado del (monofosfato cíclico de adenosina) AMPc y otras vías de transducción como las generadas por la insulina. En el SNC la serotonina también incrementa los valores de ARNm de Tf.

Esto sugiere que la producción y secreción de la proteína también puede ser regulada por hormonas y neurotransmisores en el caso del SNC.

Se ha determinado la organización estructural del gen de la Tf tanto en células de hepatoma así como en las células de Sertoli lo que ha generado un modelo de regulación de la transcripción activada por una combinación de múltiples factores nucleares (Zakin, 1992; figura 11)

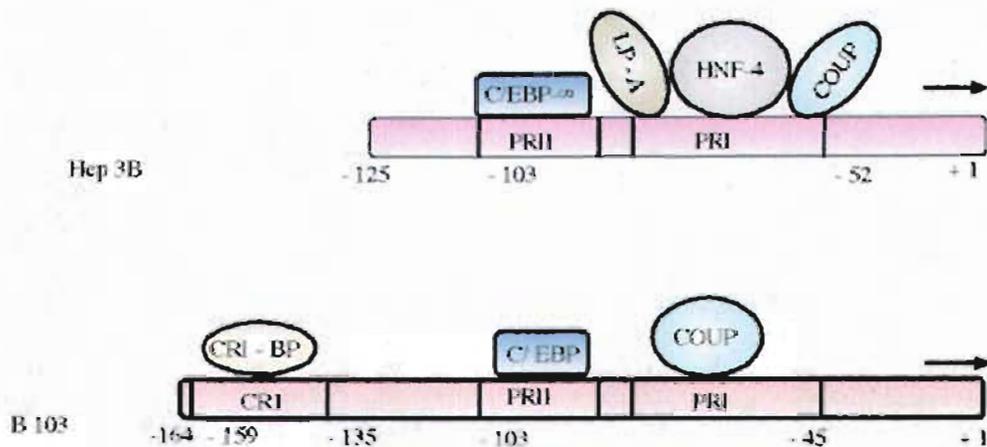


Figura 11 Representación esquemática de los elementos de la región promotora y factores que regulan la transcripción del gen de Tf en células cerebrales (B103), comparada con células de hepatoma 3B (Hep 3B), el factor HNF4, el factor COUP-TF, lipoproteína del hígado A (LP-A) y la familia de proteínas C/EBP interacciona con la región de los promotores PRI y PRII. En oligodendrocitos y en neuronas B103, la interacción se realiza entre COUP-TF, C/EBP y CRI-BP con los sitios PRI, PRII y CRI, respectivamente, la flecha indica la región de inicio de la transcripción, los números indican la distancia en bases al sitio de inicio.

(COUP-TF): factor promotor de la transcripción de albúmina de pollo el cual se une a la región promotora I, realizando la función de represor de la transcripción. (HNF-4): factor nuclear de hepatocito 4. C/EBP: CCAAT/ proteína que se une al sitio para incrementar la transcripción. (CRI): región central I. (CRI-BP): proteína que se une al sitio de los elementos de respuesta. (PRI): región promotora I. (PRII): región promotora II. (modificado de Bassel et al., 1995)

1.3.3 Homeostasis del hierro

El funcionamiento del ciclo del hierro dentro del organismo se centra en la adsorción intestinal de una pequeña fracción del hierro ingerido antes de que sea excretado o

eliminado a través de las heces, la sangre y los tegumentos. A nivel celular el control de los niveles de hierro se vincula con la regulación de la transcripción de la ferritina y el receptor a transferrina.

1.3.3.1 Adsorción intestinal del hierro inorgánico.

Algunas sustancias como el ácido ascórbico, ciertos aminoácidos y azúcares pueden formar quelatos de hierro de bajo peso molecular que facilitan su absorción intestinal. Aunque el hierro puede absorberse a lo largo de todo el intestino, su absorción es más eficiente en el duodeno y la parte alta del yeyuno (Muir et al., 1985). La membrana de la mucosa intestinal tiene la facilidad de atrapar el hierro y permitir su paso al interior de la célula, debido a la existencia de un par de transportadores para los dos estados de oxidación del hierro en la membrana celular del borde en cepillo (Simovich et al., 2003). Se han descrito dos vías para la captura e ingreso del hierro en los enterocitos. La primera de ellas se denominó Modelo *Pac man* (Simovich et al., 2003; figura 12). La otra vía la conforma el transportador para los iones ferrosos (divalent metal transporter-1) DMT-1 (también conocido como Nramp2 o DCT1) el cual puede transportar también iones de zinc, manganeso, aluminio, cobre y cobalto (De Freitas et al., 2001; Figura 13).

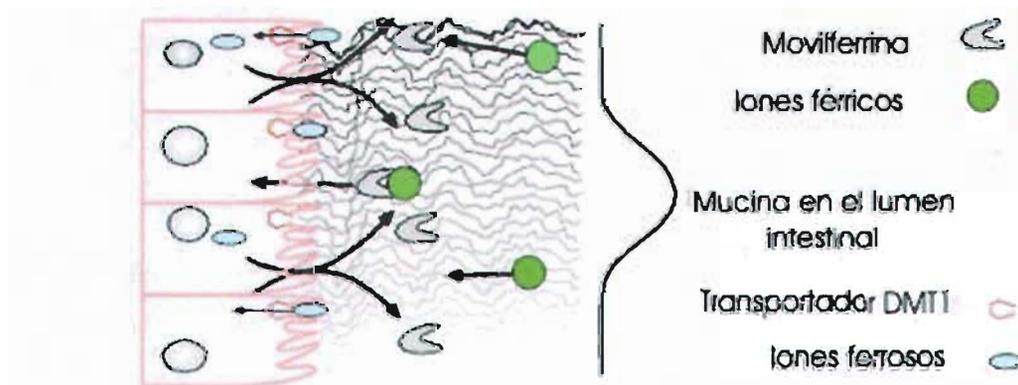


Figura 12 La figura ilustra una sección del intestino delgado en el que se muestra un modelo del mecanismo de ingreso del hierro del lumen intestinal al interior de las células intestinales. En este modelo la capa de mucina del lumen intestinal tiene la función de ser una matriz que amplía el área de adsorción. La proteína moviferrina participaría como un sideróforo atrapando a los iones férricos, para luego acarrearlos hasta las microvellosidades en donde se realizaría su internalización. En tanto que los iones ferrosos serían transportados al interior celular mediante el transportador DMT1 (Modificado de Simovich et al., 2003)

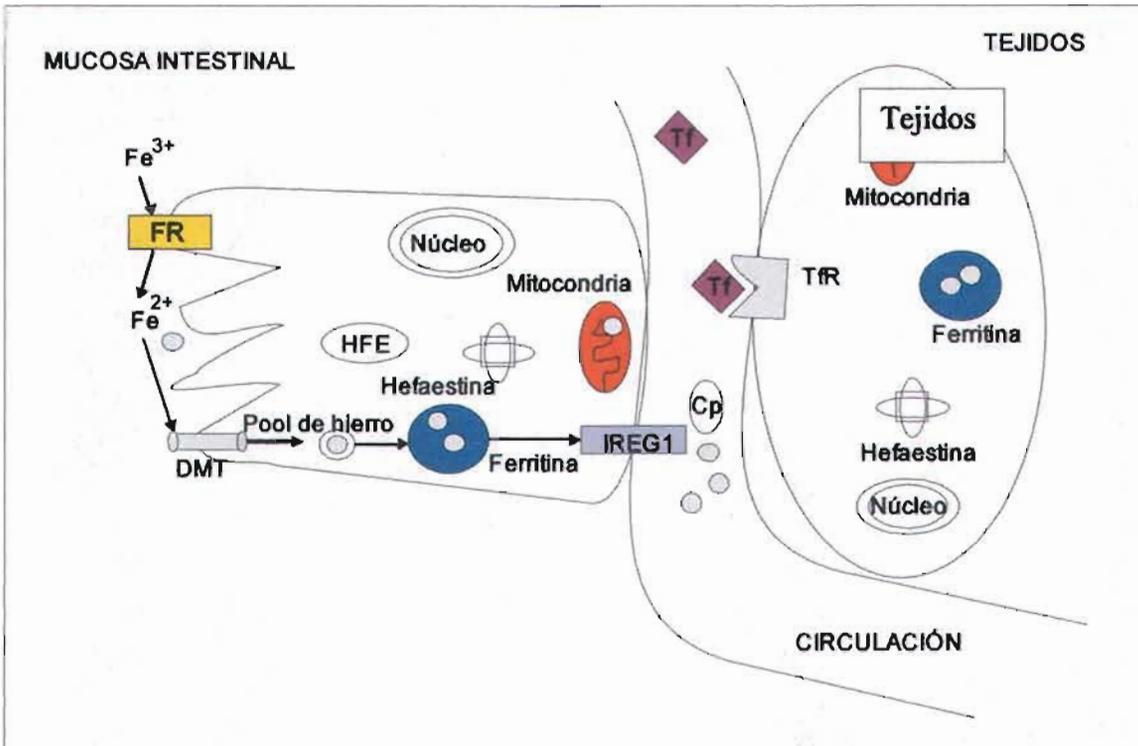


Figura 13 En esta figura se presenta esquemáticamente un mecanismo involucrado en la absorción y distribución del ion férrico. El hierro férrico en el lumen intestinal es reducido por una reductasa férrica (FR) y transportado por DMT1 en los enterocitos. Estas células incorporan y almacenan el hierro en la forma de ferritina. El hierro es liberado a la circulación a través de IREG1 y la ceruloplasmina (Cp), pudiendo unirse el hierro en su forma férrica a la transferrina la cual viaja en la circulación hasta el acoplamiento a su receptor (TfR) permitiendo así su ingreso a las células de los diferentes tejidos. Dentro de las células es de nuevo almacenado en la ferritina y posiblemente en la frataxina. La hefaestina y HFE son proteínas involucradas en el metabolismo del hierro pero sus funciones son materia de especulación (Modificado de De Freitas et al., 2001)

1.3.3.2 Endocitosis del hierro mediante el complejo hierro-transferrina.

En la adquisición celular de hierro una vez que este ha sido adsorbido por las células intestinales y ha sido vertido a la sangre donde la transferrina puede llevarlo al resto de los tejidos interviene un proceso generalizado en el que por endocitosis el complejo hierro-transferrina ingresa a la célula (Figura 14)

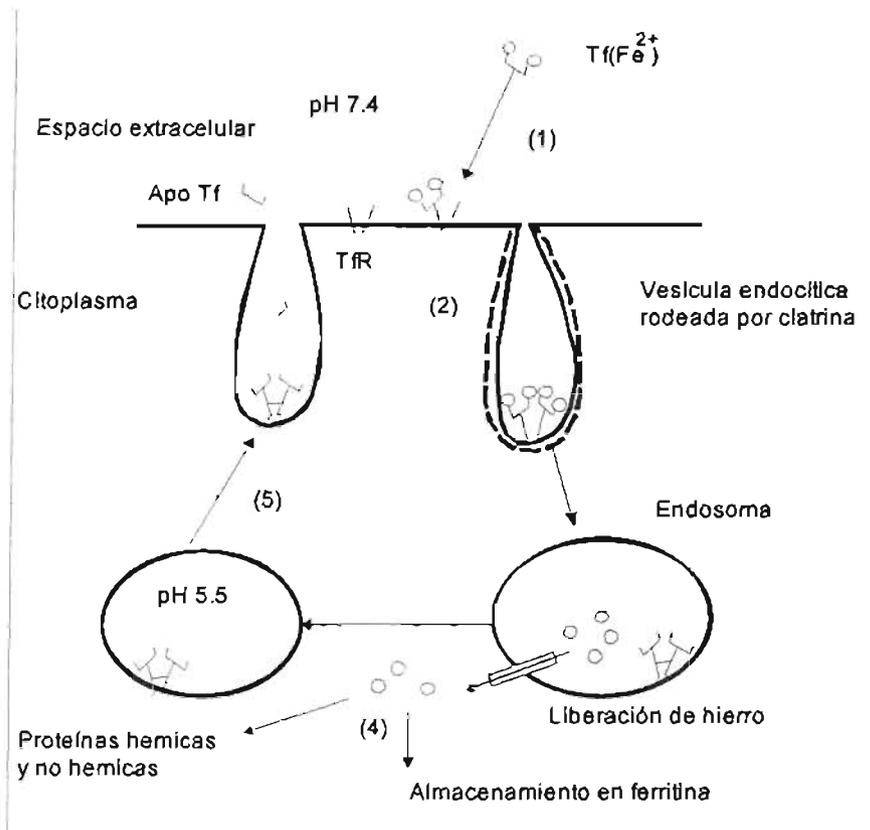


Figura 14 En los tejidos el complejo hierro-transferrina se une a su receptor sobre la superficie externa de la célula, este complejo se internaliza dentro del endosoma, en donde el pH baja a 5.5. El hierro se separa de la molécula de transferrina, y es retirado al citoplasma mediante un transportador. Nramp2 (proteína 2 de macrófago asociada a resistencia natural) o también conocida como transportador de cationes divalentes 1 (DCT1) o el transportador de metales divalentes 1 (DMT1). Aquí puede seguir diferentes rutas, incluyendo la mitocondria y la ferritina. La ferritina acumula el exceso de hierro. El endosoma puede ser conducido a la membrana de la célula en donde se libera la Tf y se recicla el TfR pudiendo generar de nuevo este procedimiento para el ingreso de hierro (modificado de Ponka et al., 2001; Aisen et al., 2001)

En los proeritroblastos el metabolismo del hierro es especial (Ponka et al., 2001), evidencias muestran que el endosoma se une a la mitocondria y como el ion ferroso tiene fuerte afinidad por la ferroquelatasa, esto podría intervenir en su liberación en la mitocondria para la posterior elaboración del grupo hemo (Figura 15).

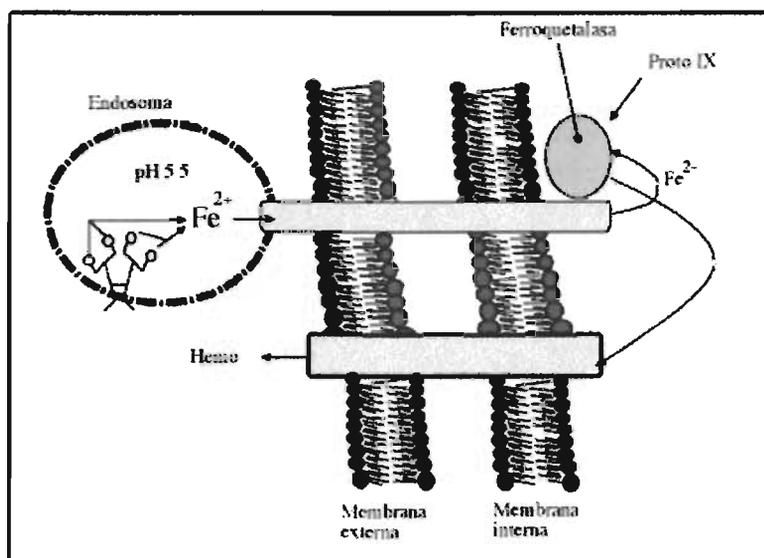


Figura 15 El hierro en su forma ferrosa ingresa a la mitocondria en donde la ferroquelatasa interviene en la formación de los grupos hemo a partir de la protoporfirina IX. Una vez formado el grupo hemo, este es liberado de la mitocondria. (Modificado de Ponka et al., 2001)

2.0

JUSTIFICACIÓN

El deterioro causado por la lesión traumática de la médula espinal (LTME) tiene efectos devastadores. En el proceso patofisiológico de la lesión medular desempeñan un papel importante los radicales libres (RL), particularmente los RL dependientes de hierro quelable o también conocido como libre ya que se sabe que la reducción de la actividad catalítica del hierro en la zona de lesión medular se ve reflejada en la disminución del daño al parénquima medular por los efectos citotóxicos de los radicales libres dependientes de hierro.

3.0

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Poco sabemos sobre la modificación del hierro en la zona de lesión medular en fase aguda, de forma similar son escasos los estudios acerca de los efectos del quelante de hierro desferroxamina en la lesión de la médula espinal por lo que en este trabajo se examinan los niveles de hierro después de una lesión traumática de la médula espinal y el efecto de dos concentraciones de DFRM sobre el nivel de hierro en la fase aguda de la lesión traumática de la médula espinal en la rata.

4.0

HIPÓTESIS

En la fase aguda la lesión traumática de la médula espinal (LTME) se produce un incremento significativo en los niveles de hierro total (hierro no quelable y hierro libre o quelable) en el sitio de lesión medular, y no tendrá o tendrá cambios menores en un tejido sin daño traumático (hígado).

La administración de desferroxamina disminuye, de manera dosis dependiente, la cantidad de hierro total, al eliminar el hierro quelable.

5.0 OBJETIVOS

5.1 *Objetivo general*

Determinar en el sitio de lesión medular la cantidad de hierro basal y quelable y la influencia de la desferroxamina en los niveles de este metal en la fase aguda de una lesión traumática de la médula espinal en la rata

5.1.1 Objetivos particulares.

Determinar el cambio en la cantidad de hierro total entre ratas sanas y ratas con LTME de 24 h de evolución, en la zona de lesión medular y en hígado (como testigo).

Determinar la cantidad de hierro quelable en los tejidos y condiciones señaladas, usando dosis progresivas de DFRM.

6.0 MÉTODOS Y MATERIALES

6.1 *Método*

6.1.1 Animales

Se utilizaron ratas macho Long Evans de 250 g a 350 g de peso con agua y alimento libremente proporcionados, y un ciclo de luz- oscuridad de 12 horas cada uno.

6.1.2 *Diseño experimental*

Los animales se integraron en dos apartados, el primero se estableció para estimar el hierro total y el hierro quelable y evaluar el efecto de 122 mg de DFRM a 24 horas después de una lesión traumática de la médula espinal en la rata (diagrama 1). El segundo apartado se estableció para determinar el efecto de 244mg de DFRM sobre el nivel de hierro a 24 horas después de una LTME (diagrama 2).

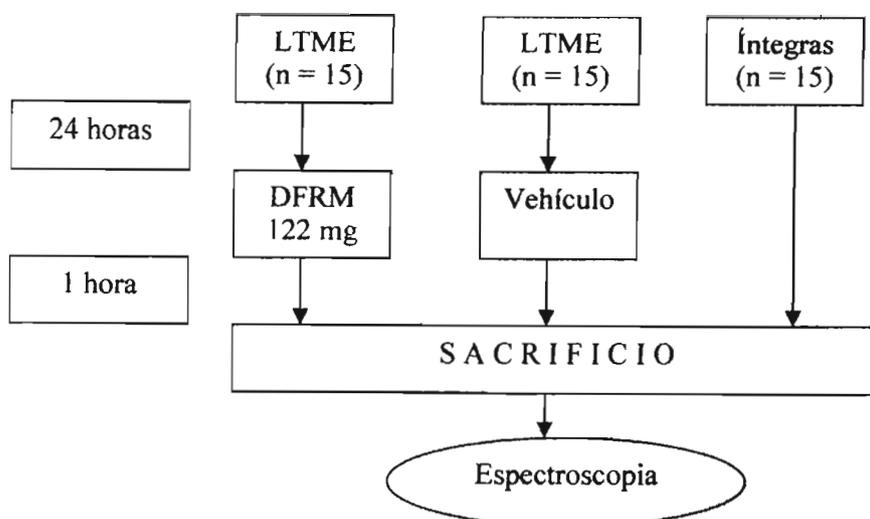


Diagrama 1. Se formaron tres grupos de ratas. Las ratas con lesión traumática de médula espinal (LTME) a 24 horas se trataron con 122 mg de desferroxamia (DFRM) o con vehículo, como control se usó un grupo sin ningún tratamiento (Íntegras). Una hora después se sacrificaron y se extrajo 1.5 cm. de médula espinal con el foco de lesión y una porción de hígado. Las muestras se examinaron por espectroscopia de absorción atómica. Entre paréntesis el número de ratas por grupo.

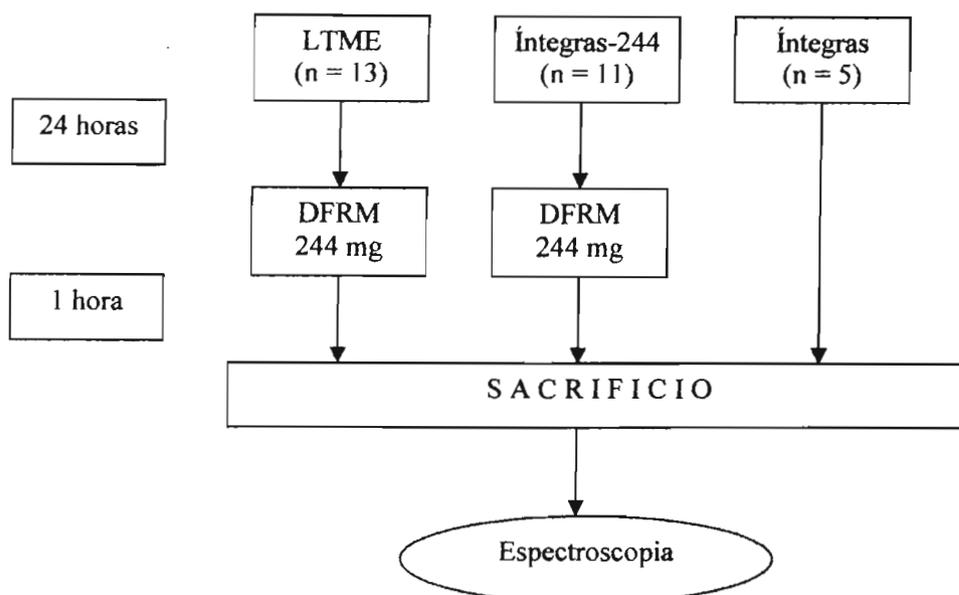


Diagrama 2. Se formaron tres grupos de ratas: Uno de ratas con lesión traumática de médula espinal (LTME) y otro grupo de ratas sin ningún tratamiento (Íntegras-244), después de 24 horas a ambos grupos se les administró 244 mg de desferroxamina, como control se usó un grupo sin ningún tratamiento (Íntegras). Una hora después se sacrificaron y se extrajo 1.5 cm. de médula espinal con el foco de lesión y una porción de hígado. Las muestras se examinaron por espectroscopia de absorción atómica. Entre paréntesis el número de ratas por grupo.

6.1.3 *Procedimiento para la realización de la LTME.*

Para realizar la LTME se anestesia a cada rata con una mezcla de xilazina (12 mg/kg) y ketamina (75 mg/kg), inyectados por vía intramuscular.

El procedimiento quirúrgico se realizó utilizando el microscopio estereoscópico.

La rata bajo anestesia, fue rasurada dorsalmente a lo largo de la columna vertebral, posteriormente se localizó manualmente las vértebras de T7 a T9 y se realizó la asepsia de la zona con jabón quirúrgico, después se realizó una incisión a lo largo de las vértebras T7 a T9 y se procedió a separar los músculos de las vértebras hasta quedar descubierta la parte dorsal de T8 y T9, luego de retirar el proceso espinoso de T8, con pinzas finas de disección se levantó la lamina y se descubrió la medula espinal.

Posteriormente se colocó a la rata en un equipo estereotáxico que forma parte del dispositivo de lesión, el cual consta de un tubo guía cuyo movimiento está controlado manualmente por unos tornillos milimétricos colocados en la base, de tal manera que se coloca exactamente dicho tubo guía sobre la porción de la medula espinal a lesionar. Sin retirar las meninges se lesionó la médula dejando caer un cilindro de acero inoxidable de 10g de peso de 5 cm de altura, a través del tubo guía, sobre la porción de la ME expuesta a nivel T8 (Fotos 4, 5).



Figura 4 Equipo del quirófano, microscopio estereoscópico y aparato para producir la lesión traumática de la médula espinal (Instalaciones del Proyecto CAMINA)



Figura 5 Detalle del equipo para producir la LTME con la rata colocada para realizar el procedimiento de lesión (Instalaciones del Proyecto CAMINA).

6.1.4 *Atención de los animales.*

Todas las ratas se colocaron individualmente en una jaula con aserrín estéril. Particularmente en las ratas lesionadas se adaptó a su alcance el bebedero y el alimento. Al día siguiente y por la mañana se procedió a cambiar la cama por aserrín limpio, agua y alimento, en los animales lesionados se procedió a inducir manualmente la evacuación de la vejiga y a realizar limpieza de la rata con agua y jabón quirúrgico.

6.1.5 *Medición del hierro en la muestra de médula espinal e hígado de la rata mediante espectroscopía de absorción atómica a la flama*

Posterior a una dosis letal de Pentobarbital sódico (9 ml/Kg de peso) se realizó la perfusión intracardíaca de los animales con 250 ml de solución salina preparada previamente con 1000 unidades de heparina. Se extrajeron 1.5 cm de médula espinal con el foco de la lesión, y una pequeña porción de hígado del extremo del lóbulo izquierdo, ambos tejidos se pesaron e inmediatamente se colocaron por separado en tubos de vidrio libres de hierro y se almacenaron en congelación. Posteriormente se deshidrataron todas las muestras en un horno a 70° C durante 1:30 hrs y se guardaron sellados a 4° C, hasta su procesamiento por espectroscopía de absorción atómica a la flama para cuantificar el hierro de cada muestra.

6.1.6 *Tratamiento de las muestras de médula espinal e hígado para su análisis por espectroscopía de absorción atómica.*

Las muestras se colocaron en tubos de ensaye y se les agregó 1ml ácido nítrico (Grado Analítico). Luego se sometieron a calentamiento a la flama para lograr la destrucción de materia orgánica y eliminación de vapores nitrosos, y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Se agregaron 0.2 ml de peróxido de hidrógeno. Se llevó a 2.0 ml con agua desionizada, y se pasó a un tubo de vidrio más largo, para su lectura.
Se preparó un blanco de reactivos y una curva de calibración (0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg / L), con un estándar de hierro.

6.1.7 *Procedimiento de lectura de las muestras.*

- 1) Encender el equipo
- 2) Colocar la lámpara
- 3) Ajustar la corriente al 50 % de la máxima
- 4) Ajustar la longitud de onda a 248.3 nm
- 5) Encender la ganancia del detector de sensibilidad, automático
- 6) Ajustar la presión y flujo de gases
- 7) Encender la llama
- 8) Ajustar la adsorción en agua desionizada
- 9) Leer la lectura de calibración
- 10) Leer el blanco de las muestras (agua desionizada, ácido nítrico y peróxido de hidrógeno)

Calcular la cantidad de hierro de acuerdo al peso de las muestras.

6.2 *Materiales*

6.2.1 *Reactivos*

Empleamos desferroxamina B marca SIGMA mantenida en congelación a (-4 C). Debido a sus propiedades fisicoquímicas, en una sola sesión se pesaron 122 mg y 244 mg de DFRM necesaria según el número de animales a los que se administra el fármaco y se guardó cada dosis en tubitos Eppendorf y se mantuvieron en congelación a (-4 C). En el momento de la administración de DFRM, se disolvió cada dosis con 1 ml de agua desionizada.

Se empleó Pentobarbital sódico marca Smith Kline para sacrificar a los animales administrando una sobre dosis por vía intraperitoneal.

La anestesia fue preparada con Xilazina y Ketamina marca Bayer.

Para la perfusión se preparó solución salina fisiológica al 0.9% con agua desionizada y cloruro de sodio marca Baker de grado analítico y 1000 ui de heparina marca Bayer por cada 250 ml de solución salina.

Se empleó un estándar de hierro de la marca Sigma.

6.2.2 *Preparación del material.*

En la limpieza del material y la remoción del hierro contaminante se utilizó ácido nítrico marca Baker de grado analítico al 5% y agua desionizada.

6.2.3 *Equipo de espectroscopía de adsorción atómica a la flama.*

El análisis espectroscópico se realizó con una unidad de espectrofotometría de absorción atómica marca Varian modelo AA-1475, con sistema nebulizador y quemador de flujo

laminar, llama de aire acetileno, lámpara marca Hamamatsu Photonics KK de cátodo hueco para hierro de 10 mA, longitud de onda de 248.3nm, y flujo de inyección de la muestra de 5ml/min (foto 6-A y 6-B).



Foto 6-A. Detalle de la unidad de espectrofotometría con la llama de flujo laminar, nebulizador de la muestra y la lente móvil para la lectura de la absorción.



Foto 6-B. Medición del contenido de hierro tisular (Laboratorio de Espectroscopia de la FES Zaragoza)

7.0 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se trataron mediante un análisis de varianza y se sometieron a un examen mediante la prueba de Tukey para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos.

8.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Resultados

8.1.1 Efecto de dosis bajas de desferroxamina sobre el contenido de hierro tisular en médula espinal e hígado.

Médula espinal

Después de 24 horas de una lesión traumática de médula espinal (LTME) en la rata se administraron 122 mg de desferroxamina (DFRM) o vehículo y se cuantificó mediante espectroscopía de absorción atómica la cantidad de hierro en el parénquima medular y como testigo se usó una porción de hígado.

En la tabla 4 se detallan los niveles de hierro encontrados en la médula espinal de los siguientes grupos: Íntegras, son ratas sin lesión y sin ningún tratamiento; grupo LTME-Veh, son ratas con lesión medular y con administración de vehículo, y el grupo LTME-122, son ratas con lesión medular y con dosis de 122 mg de DFRM.

| | Íntegras (15)* ($\mu\text{g/g}$ de médula espinal) | LTME-Veh (15)* ($\mu\text{g/g}$ de médula espinal) | LTME-122 (15)* ($\mu\text{g/g}$ de médula espinal) |
|----------------------------------|--|--|--|
| | 4.52 | 12.06 | 7.74 |
| | 1.68 | 10.25 | 8.13 |
| | 2.35 | 13.33 | 10.04 |
| | 3.92 | 16.28 | 8.62 |
| | 2.89 | 14.14 | 8.99 |
| | 1.61 | 15.68 | 8.24 |
| | 1.53 | 12.5 | 10.94 |
| | 0.90 | 13.48 | 8.62 |
| | 0.95 | 14.11 | 9.80 |
| | 1.96 | 14.52 | 8.57 |
| | 2.35 | 16.19 | 10.96 |
| | 0.78 | 13.93 | 10.92 |
| | 1.73 | 13.97 | 8.86 |
| | 3.13 | 11.76 | 9.41 |
| | 1.56 | 13.33 | 9.28 |
| Promedio \pm error estándar | 2.12 ± 0.29 | 13.70 ± 0.42 | 9.28 ± 0.27 |

*: Número de ratas por grupo.

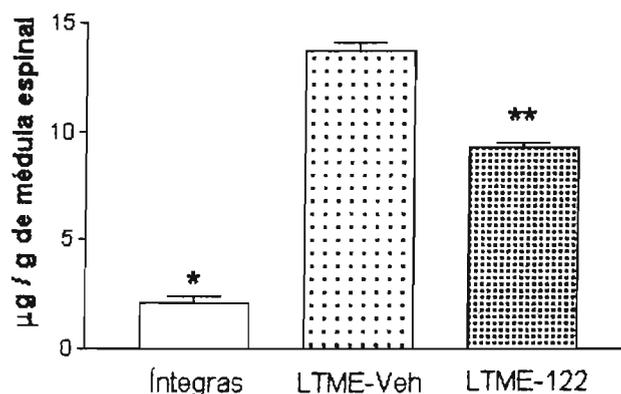
Como puede observarse en la tabla 5 el valor promedio de 13.70 ± 0.42 ($\mu\text{g/g}$ de médula espinal) representa el nivel de hierro total que se eleva después de una LTME con respecto al grupo sin lesión (Íntegras) cuyo nivel de hierro promedio de 2.12 ± 0.29 ($\mu\text{g/g}$ de médula espinal) el cual constituye el nivel de hierro basal.

La dosis de 122 mg de DFRM disminuyó el nivel de hierro en el grupo (LTME-122) con respecto al grupo (LTME-Veh) a un valor promedio de 9.28 ± 0.27 ($\mu\text{g/g}$ de médula espinal)

El hierro quelable se calculo mediante la diferencia entre el grupo (LTME-Veh) y (LTME-122) y fue de 4.42 ($\mu\text{g/g}$ de médula espinal).

Análisis estadístico.

Se muestra en la grafica 1 el resultado del análisis estadístico del contenido de hierro tisular en el sitio de lesión de la médula espinal.



Grafica 1. Contenido de hierro tisular en el sitio de lesión medular

Se encontró diferencia significativa entre los grupos Íntegras contra LTME-Veh y LTME-122 (*, $p < 0.001$); también hubo diferencia significativa entre los grupos LTME-Veh contra LTME-122 (**, $p < 0.001$). Las barras representan la media \pm error estándar. Grupo Íntegras ($n=15$): ratas sin lesión y sin tratamiento alguno; grupo LTME-Veh ($n=15$): ratas con lesión medular y administración de vehículo; grupo LTME-122 ($n=14$): ratas con lesión medular y dosis de 122 mg de desferroxamina.

Hígado

En la tabla 5 se detallan los niveles de hierro encontrados en el hígado de los siguientes grupos: Íntegras, son ratas sin lesión y con administración de vehículo; grupo LTME-Veh, son ratas con lesión medular y con administración de vehículo, y el grupo LTME-122, son ratas con lesión medular y con dosis de 122 mg de DFRM.

Tabla 5

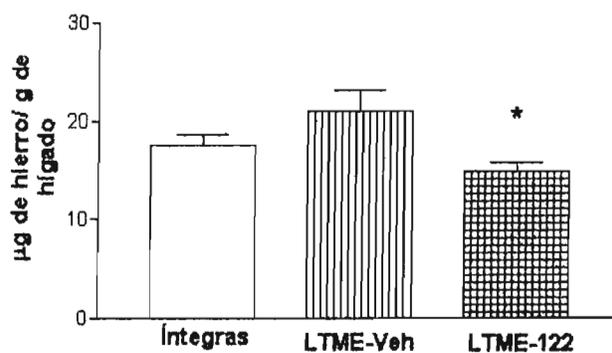
| | Íntegras (15)* ($\mu\text{g/g}$ de hígado) | LTME-Veh (15)* ($\mu\text{g/g}$ de hígado) | LTME-122 (15)* ($\mu\text{g/g}$ de hígado) |
|----------------------------------|---|---|---|
| | 22.66 | 16.96 | 10.85 |
| | 15.78 | 22.03 | 20.34 |
| | 23.41 | 12.88 | 15.60 |
| | 12.54 | 18.73 | 18.86 |
| | 20.6 | 20.21 | 13.65 |
| | 22.94 | 30.88 | 14.76 |
| | 14.51 | 27.04 | 19.81 |
| | 16.5 | 42.38 | 17.95 |
| | 22.57 | 13.38 | 11.91 |
| | 13.0 | 16.41 | 12.40 |
| | 20.18 | 19.82 | 14.25 |
| | 16.10 | 11.6 | 12.65 |
| | 15.67 | 21.16 | 9.37 |
| | 12.76 | 21.62 | 14.15 |
| | 14.6 | 20.83 | - |
| Promedio \pm error estándar | 17.59 \pm 1.04 | 21.06 \pm 2.01 | 14.75 \pm 0.84 |

*: Número de ratas por grupo.

Se observa el mayor nivel de hierro en el grupo de ratas con LTME y administración de vehículo.

Análisis estadístico.

Se muestra en la grafica 2 los resultados del análisis estadístico del contenido de hierro tisular en hígado.



Grafica 2. Contenido tisular de hierro en hígado.

Se encontró diferencia significativa entre los grupos LTME-Veh contra LTME-122 (* $p < 0.01$). El nivel de hierro entre Íntegras y cualquiera de los grupos de ratas lesionadas no tuvieron diferencias significativas. Las barras representan la media \pm error estándar. Grupo Íntegras (n=15): ratas sin lesión y sin tratamiento alguno; grupo LTME-Veh (n=15): ratas con lesión medular y con administración de vehículo; grupo LTME-122 (n=14): ratas con lesión medular y dosis de 122 mg de desferroxamina.

8.1.2 Efecto de dosis altas de desferroxamina en el contenido tisular en médula espinal lesionada e hígado.

Médula espinal.

Se examinó el efecto de 244 mg de desferroxamina sobre los niveles de hierro en un grupo de ratas con una LTME y otro sin ella, y de otro grupo de ratas sin ningún tratamiento ni lesión. Como testigo se usó una porción de hígado.

En la tabla 6 se detallan los niveles de hierro en la zona de lesión medular de los grupos mencionados.

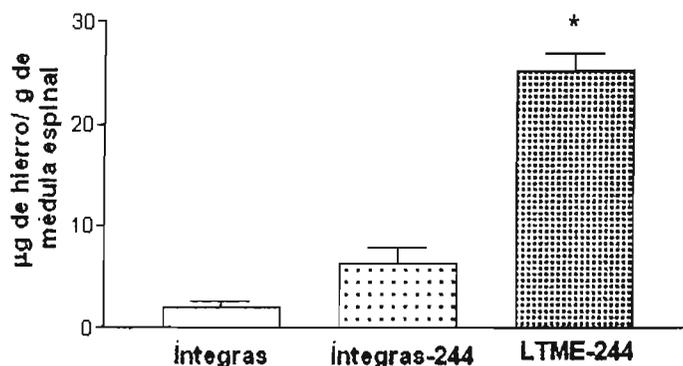
| Tabla 6 | Integras (5)* (µg/g de médula espinal) | Íntegras-244 (11)* (µg/g de médula espinal) | LTME-244 (13)* (µg/g de médula espinal) |
|------------------------------|---|--|--|
| | 2.78 | 13.7 | 19.3 |
| | 0.57 | 6.12 | 14.72 |
| | 0.29 | 17.3 | 12.52 |
| | 2.65 | 2.82 | 29.18 |
| | 2.55 | 5.59 | 30.45 |
| | | 1.29 | 31.18 |
| | | 7.57 | 30.75 |
| | | 7.18 | 20.88 |
| | | 3.34 | 25.96 |
| | | 3.15 | 22.5 |
| | | 3.48 | 23.5 |
| | | | 32.5 |
| Promedio ± error estándar | 1.77 ± 0.45 | 6.46 ± 1.46 | 24.98 ± 1.85 |

Íntegras: ratas sin ningún tratamiento y sin lesión medular; Íntegras-244: ratas sin lesión medular y dosis de 244 mg de desferroxamina; LTME-244: ratas con lesión medular y dosis de 244 mg de desferroxamina. *: Número de ratas por grupo.

Se aprecia que los valores más altos se encuentran en los grupos de ratas que recibieron desferroxamina, particularmente en el grupo con lesión medular.

Análisis estadístico.

Se observa en la gráfica 3 el resultado del análisis estadístico del contenido de hierro tisular en el sitio de lesión de la médula espinal



Grafica 3. Contenido de hierro tisular en médula espinal. Se encontró diferencia significativa entre los grupos LTME-244 contra Íntegras e Íntegras-244 (*, $p < 0.001$) No hay diferencias significativas entre ambas Íntegras. Las barras representan la media \pm error estándar. Íntegras (n= 5): ratas sin desferroxamina (DFRM) o vehículo ni lesión traumática (LTME); Íntegras-244 (n= 11): ratas sin la LTME y dosis de 244 mg de DFRM; LTME-244 (n= 13): ratas con una LTME y dosis de 244 mg de DFRM.

Hígado

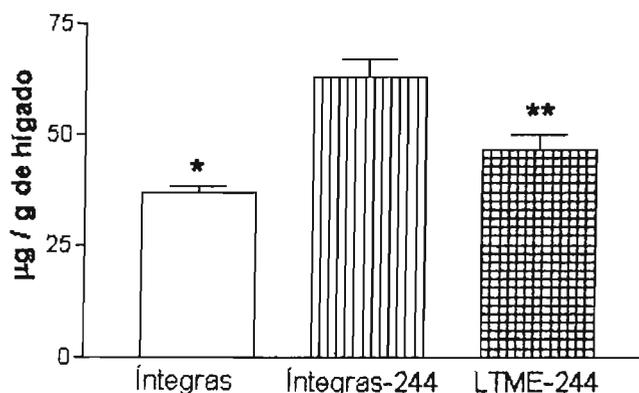
En la columna del grupo (Integras) de la tabla 7 se obtiene el valor promedio del hierro basal el cual alcanzo el nivel mas bajo con respecto a los otros grupos. En la columna del grupo (Íntegras-244) el valor promedio fue mayor al de los otros grupos. En la columna de valores del grupo (LTME-244) se obtuvo el valor promedio más alto con respecto al grupo basal pero menor al grupo (Íntegras-244). Este resultado muestra un patrón diferente con respecto al nivel de hierro encontrado en la médula espinal.

| | Integras (5)* (µg/g de hígado) | Íntegras-244 (11)* (µg/g de hígado) | LTME-244 (13)* (µg/g de hígado) |
|----------------------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------------|
| | 41.8378 | 61.4285 | 43.8992 |
| | 34.2888 | 59.3846 | 36.0733 |
| | 36.9973 | 75.2139 | 34.2984 |
| | 33.253 | 99.1802 | 62.579 |
| | 36.8135 | 50.9989 | 63.5872 |
| | | 52.0431 | 55.6372 |
| | | 71.5517 | 41.7669 |
| | | 54.5189 | 34.4587 |
| | | 48.4795 | 43.2801 |
| | | 53.4233 | 50.2136 |
| | | 66.4772 | 36.7679 |
| | | | 64.2673 |
| | | | 39.1566 |
| Promedio \pm error estándar | 36.63 \pm 1.48 | 62.97 \pm 4.47 | 46.61 \pm 3.15 |

*: Número de ratas por grupo.

Análisis estadístico.

Se muestra en la grafica 4 los resultados del análisis estadístico del contenido de hierro tisular en hígado.



Grafica 4. Contenido de hierro tisular en hígado. Se encontró diferencia significativa entre los grupos Íntegras contra Íntegras-244 (*, $p < 0.01$) también hubo diferencia significativa entre los grupos LTME-244 contra Íntegras-244 (**, $p < 0.01$).

Las barras representan la media \pm error estándar. Íntegras (n= 5): ratas sin desferroxamina (DFRM) o vehículo ni lesión traumática (LTME); Íntegras-244 (n= 11): ratas sin la LTME y dosis de 244 mg de DFRM; LTME-244 (n= 13): ratas con una LTME y dosis de 244 mg de DFRM.

8.2 *Discusión*

8.2.1 *Efecto de la lesión medular sobre el contenido de hierro total tisular*

Con la lesión traumática de la médula espinal (LTME) se inicia una cascada de mecanismos fisiopatológicos que conducen a la muerte celular en el sitio de lesión medular. Entre estos mecanismos ejercen un papel preponderante los radicales libres, por lo que la fuente de estas moléculas es de particular interés. Uno de los mecanismos de generación de radicales libres en la lesión medular esta en relación al papel catalítico del hierro quelable por ello es importante conocer detalladamente este proceso. El daño provocado inicialmente por la LTME al parénquima medular genera entre otros fenómenos, edema e isquemia, con ello la formación de radicales libres lo cual causa la unión cruzada entre las subunidades de ferritina para formar dímeros intramoleculares, resultando en la liberación de hierro, aunado a esto cuando el pH es menor a 6 la liberación de hierro de la hemoglobina se convierte en la fuente principal del incremento del nivel de hierro quelable en la zona de lesión medular (Tator, 1995; Mautés et al., 2000; Liu⁽¹⁾ et al., 2004; Liu et al., 2003; Liu et al., 2004) contribuyendo con ello a la destrucción del parénquima medular.

En nuestro trabajo encontramos que a 24 h después de la lesión medular se detectó un aumento significativo del hierro total de aproximadamente 6.5 veces con respecto al grupo control. Incluyendo en esta cantidad de hierro la contribución del hierro quelable, que fue 2 veces más con respecto al nivel de hierro total del grupo control lo cual puede indicar un aumento del hierro quelable en relación a la LTME.

Para nosotros es importante el haber logrado reproducir un modelo para cuantificar los niveles de hierro en la zona de lesión medular dado que en fechas recientes, por otros grupos se ha podido demostrar una elevación del nivel de hierro en la zona de lesión medular (Liu et al., 2003; Liu⁽¹⁾ et al., 2004). En estos trabajos se muestra un incremento significativo en el nivel de hierro total y quelable a partir de media hora después de la LTME y que alcanza un pico máximo a las 3 horas, disminuyendo este incremento significativo a las 6 horas hasta lograr un nivel de hierro semejante a los controles a partir de las 12 horas. La diferencia de nuestros resultados con otros autores podría deberse a que en nuestro trabajo se determinó el nivel de hierro total a partir del segmento de tejido medular sin tomar en cuenta la aportación del hierro de los eritrocitos del lecho vascular debido a que antes de tomar la muestra se retiró la sangre del lecho vascular mediante una perfusión con solución salina fisiológica preparada con agua desionizada. En cambio, en los trabajos mencionados de Liu y colaboradores en relación al hierro total, estos investigadores midieron el nivel de hierro del espacio extracelular desde las primeras horas, hasta su disminución en que el hierro liberado fue transportado al interior celular en la zona de lesión ya que si bien es cierto que el hierro es transportado por la sangre, esta vía está alterada debido al daño físico del traumatismo por lo que posiblemente el hierro se acumule en el parénquima celular, ya que cuando el hierro intracelular aumenta también se incrementa la síntesis de ferritina y de este modo se asegura con el almacenamiento de hierro la inactivación de los efectos deletéreos que el exceso de hierro puede ocasionar (Kozyca et al., 2002).

Como se mencionó anteriormente nosotros encontramos que el nivel de hierro quelable fue 2 veces más con respecto al nivel de hierro total del grupo control (4.42 µg/g de tejido de médula espinal). Liu⁽¹⁾ y colaboradores encontraron que a 24 horas el nivel de hierro quelable era similar al del grupo control, estos autores midieron los niveles de hierro mediante el examen con Bleomicina (fármaco anticancerígeno), esta droga solo puede unirse al hierro quelable para luego degradar al ADN del medio y cuantificar los productos de esta reacción con lo cual se consigue medir indirectamente el nivel de hierro quelable. En nuestro trabajo la DFRM atrapó al hierro quelable extracelular para luego entrar a la célula por un mecanismo poco conocido (Richardson et al., 1994; Yu et al., 2003; Doulias et al., 2003), del mismo modo la DFRM sin hierro ingresa a la célula quelando al hierro intracelular, de hecho la DFRM ha sido localizada predominantemente en los lisosomas, para luego ser eliminada de forma relativamente rápida del cuerpo. En el hombre la vida media de la DFRM es de 10 a 15 minutos cuando se administra como un bolo i. v. (Bridges et al., 1990) al alcanzar el lecho sanguíneo la filtración renal es muy rápida (Bridges et al., 1990). En nuestro caso determinamos el nivel de hierro quelable directamente del tejido medular mediante la diferencia del nivel de hierro de un grupo de ratas con LTME y el nivel de hierro de ratas también con LTME pero tratadas con una dosis de 122 mg de DFRM por v. i. p. Nos aseguramos de la eliminación de la DFRM y el hierro unido a esta por que se sacrificaron a las ratas 1 hora después de la administración de DFRM y así evaluar los niveles de hierro del tejido y sin la contribución del hierro del lecho vascular. En síntesis nosotros evaluamos el nivel de hierro en el tejido medular lesionado sin la contribución vascular y calculamos la cantidad de hierro que 122 mg de DFRM retiro, y encontramos que tanto el hierro total como el quelable aumentan significativamente en el parénquima celular medular con respecto a los controles a 24 h de una LTME.

8.2.2 *Efecto de dosis bajas de desferroxamina (122 mg) sobre el contenido de hierro total tisular*

La administración de 122mg de desferroxamina (DFRM) por vía i. p. 24 horas después de una lesión traumática de la médula espinal (LTME) dio origen a una disminución significativa del nivel de hierro del 32.3% con respecto a los animales con una LTME y sin DFRM, lo cual corresponde a lo esperado. Esto se debe a la naturaleza de la DFRM y la vida media de este quelante que es de 10 a 15 minutos en el hombre por lo que en nuestro trabajo nos aseguramos de la evacuación de la DFRM y el hierro atrapado al sacrificar a las ratas 1 hora después de la administración de la droga.

Según los pocos reportes con los que se cuenta en relación al hierro después de una LTME (Liu ⁽¹⁾ et al., 2004; Liu et al., 2003) se menciona que el pico máximo de la elevación de hierro quelable es alrededor de las 3 horas, pero no se examina la cantidad de hierro total no solo en el espacio extracelular sino también los niveles de hierro intracelular. En nuestro trabajo evaluamos los niveles de hierro en el tejido con lesión medular después de una perfusión con solución fisiológica y encontramos que 122 mg de DFRM pueden retirar una cantidad de hierro potencialmente deletérea del parénquima medular.

En cuanto a los niveles de hierro en hígado en el grupo de animales con LTME y tratados con 122 mg de DFRM, se encontró la menor cantidad de hierro, de hecho fue 1.192 veces menor con respecto al grupo control, sin embargo no fue una diferencia significativa. El grupo con lesión y sin DFRM presentó el nivel más alto de hierro con 1.197 veces mayor con respecto al grupo control pero tampoco representa una diferencia significativa, lo cual indica que la LTME y la DFRM no alteraron significativamente el nivel de hierro en hígado. Solo hubo diferencia significativa entre el grupo de ratas con LTME y dosis de 122 mg de DFRM y el grupo con lesión medular pero sin DFRM, esto posiblemente refleje la eliminación de la DFRM y el hierro unido a ésta por el metabolismo.

8.2.3 *Efecto de dosis altas de DFRM sobre el contenido de hierro total tisular*

Contrario a lo esperado encontramos que el grupo de ratas con lesión medular y DFRM mostró un aumento de 14 veces el nivel de hierro con respecto al grupo control.

Fue sorprendente encontrar que en el grupo de ratas sin lesión pero con una dosis de 244 mg de DFRM encontramos un aumento de casi 4 veces el nivel de hierro con respecto al grupo control.

Subyacente a estos resultados nosotros sugerimos que podrían ser derivados de la propiedad bifásica de la DFRM. En este sentido un incremento en la dosis de DFRM en presencia de agentes reductores, induce en el parénquima celular un aumento en el estado de estrés oxidativo, conduciendo a la liberación de hierro de los eritrocitos (Berg, 1986; Ferrali et al, 1992; Niihara et al, 2002; Ciccoli et al, 2003) y quizás de otros tipos celulares del parénquima medular. Otro mecanismo que pudiera contribuir al incremento de hierro es su liberación de la hemoglobina a partir de un pH de 6 en el parénquima medular lesionado (Liu ⁽¹⁾ et al., 2004).

Otro mecanismo implicado en la elevación de hierro es sugerido por Atamma et al 1995, mostrando que en condiciones oxidativas la hemoglobina forma hemicromos en la membrana y que el grupo hemo liberado se une a las membranas lo cual conlleva al proceso de lipoperoxidación y lisis celular, favoreciendo que en estas condiciones los

niveles de hierro no hémico se incrementen.

Nosotros sugerimos que la dosis de 244 mg de DFRM puede promover el proceso oxidativo con la subsecuente la liberación de hierro principalmente de los eritrocitos (Ciccoli 2003; Ferrali 1992; Niihara et al, 2002) que se encuentren en la zona de lesión y a la captura celular del hierro no hémico y del hierro unido a la DFRM pues se ha demostrado que este fármaco penetra al parénquima celular mediante el proceso de endocitosis (Doulias, 2003, Ricardson, 1994) también se ha observado que la DFRM preferentemente se encuentra en los lisosomas junto con el hierro reactivo redox, producto de la digestión de metalo proteínas (Yu et al., 2003).

En nuestro trabajo sugerimos que otra fuente del hierro almacenado en la zona de lesión proviene del hierro extracelular que no haya sido removido por la perfusión con solución fisiológica por encontrarse en compartimientos con obstrucción del flujo sanguíneo debido a la acción mecánica del impacto sobre la médula espinal.

En las muestras de hígado encontramos que en el grupo sin lesión pero con 244 mg de DFRM el hierro se incrementó significativamente 1.718 veces con respecto al grupo control, a este respecto nosotros sugerimos que en las ratas lesionadas y con dosis de DFRM, el fármaco pudo permanecer en la zona de lesión medular, en cambio en el caso de las ratas sin lesión (ratas control) la dosis de DFRM y el hierro unido a este fármaco, podrían ocasionar alguna alteración metabólica en hígado, facilitando su almacenamiento en este órgano.

9.0 CONCLUSIONES

La producción de una lesión traumática de la médula espinal (LTME) en la rata indujo la elevación del hierro total y del hierro quelable en el sitio de lesión.

La administración de 122 mg de desferroxamina (DFRM) durante el periodo agudo de la lesión traumática tuvo efecto en la disminución de hierro en el sitio de lesión de la médula espinal y en el tejido hepático no altera el nivel de hierro. Debido a esto puede considerarse como una dosis que pudiera disminuir la participación del hierro en la generación de radicales libres durante el periodo agudo de la lesión medular en la rata.

Este trabajo evidencia que el tratamiento de una LTME con dosis bajas de DFRM requiere mayor investigación sobre sus implicaciones funcionales, dado que con 244 mg de fármaco observamos un incremento de hierro que pudiera resultar deletéreo tanto en un grupo de animales con LTME como en otro grupo de ratas sanas.

Queda abierta la posibilidad para investigar otras moléculas quelantes del hierro como la quercitina para abatir la elevación del hierro en la lesión medular sin la generación de alguna reacción secundaria adversa.

10.0 BIBLIOGRAFÍA

- Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int. J Biochem Cell Biol*, 33 (2001) pp. 940–959
- Atamna H, Hagai G. Heme Degradation in the Presence of Glutathione. *J Biol Chem*; 270 (1995) pp. 24876–24883
- Azbill R, Mu X, Bruce-Kellr A, Mattson M. Springer J. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res*, 765 (1997) pp. 283-290
- Bao F, Liu D. Hydroxyl radicals generated in the rat spinal cord at the level produced by impact injury induces cell death by necrosis and apoptosis: protection by a metalloporphyrin. *Neurosci*, 126 (2004) pp. 285-295
- Bonkovsky L. Iron and the liver. *Am J Med Sci*, 301 (1991) pp. 32-43.
- Borg C, Schaich M. Prooxidant action of desferrioxamine: Fenton-like production of hydroxyl radicals by reduced ferrioxamine, *J Free Radic Biol Med*. 2 (1986) pp. 237-243
- Bridges K. modulation of the availability of intracellular iron Chap. 18. En: *Iron and Storage* Editores Ponka P., Schulman H.M. y Woodworth R. C, (1990), pp. 297-330 USA
- Buchanan E, Nawoczenski D. An Overview En *Spinal Cord Injury: Concepts and Mangement* App roaches. Editores Buchanan L E y Nawoczenski D. (1997) pp. 1-19 Ed. Williams and Wilkins USA
- Buja M, Roberts C. Iron and the heart. *Am J Med*, 51 (1971) pp. 209-221
- Callender T, Weatherall J. Iron chelation with oral desferrioxamine. *Lancet* II (1980) pp. 689-691.
- Chiodo A, Alberti P, Sher G, Francombe H, Tyler B. Desferrioxamine ototoxicity in an adult transfusion-dependent population, *J Otolaryngol*, 26 (1997) pp. 116-122
- Ciccoli L, Rossi V, Leoncini S, Signorini C, Paffetti P, Bracci R, Buonocore G, Comporti M. Iron release in erythrocytes and plasma non protein-bound iron in hypoxic and non hypoxic newborns. *Free Radic Res*, 37 (2003) pp. 51-58
- 1
- Clark R, Mohandas N, Shohet B. Deformability of oxygenated irreversibly sickled cells. *J Clin Invest*, 65 (1980) pp. 189-196.
- Cohen A, Mizanin J, Schwartz E. Rapid removal of excessive iron with daily, high-dose intravenous chelation therapy. *J Pediatr*, 115 (1989) pp. 151-155.
- Corbett D, Golan E. Band 3 and glycophorin are progressively aggregated in density-fractionated sickle and normal red blood cells. Evidence from rotational and lateral

mobility studies. *J Clin Invest*, 91 (1993) pp. 208-217

Chua-anusorn W, Webb J, Macey J, Pootrakul P, St.Pierre G. The effect of histological processing on the forma in iron in iron-loaded human tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1360 (1997) pp. 255-261

De Castro R., Alcock N., Mc Adoo. Sampling of low molecular weight iron by microdialysis following spinal cord injury. *J Neurosci Res*, 57 (1999) pp. 735-739

Doulias T, Christoforidis S, Brunk T, Galaris D. Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest *Free Radic Biol Med*, 35 (2002) pp. 719-728

Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Reviews*, 82 (2002) pp. 47-95

Edwards S. Regulation of neutrophil oxidant production. En: *Calcium, oxygen radicals and cellular damage*. (1991) pp. 35-49 Cambridge

Evans J, Halliwell B. Measurement of iron and copper in biological systems: Bleomycin and copper-phenanthroline assays. *Methods Enzymol*, 233 (1994) pp. 82-92

Faden I, Demediuk P, Panter S, Vink R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science*, 244 (1989) pp. 798-800

Faden I. Recent pharmacological advances in experimental spinal injury. *Trends Neurosci*, sep. (1983) pp. 375-377

Ferrali M, Signorini C, Ciccoli L, Comporti M. Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and siouramil. *Biochem J*, 285 (1992) pp. 295-301

Forrellat B, Gautier H, Fernández N. Metabolismo del hierro. *Revista Cubana Hematol, Inmunol Hemoterapia*, 16 (2000) pp. 149-160

Gómez-Pinilla, Tram H, Cotman C, Nieto-Sampedro M. Neueroprotective effect of MK-801 and U-50488H alter contusive spinal cord injury. *Exp Neurol*, 104 (1989) pp. 118-124

Gutteridge J, Quinla G, Swain J, Cox J. Ferrous iron formation by ferrioxamine prepared from asged desferrioxamine: A potential prooxidant property. *Free Rad Biol Med*, 16 (1994) pp. 733-739

Gutteridge J Halliwell B. Iron and Oxygen: Dangerous mixture. Cap. 4 En: *Iron and Storage* Edit. Ponka P. (1990) pp. 336 Schulman H. M. y Woodworth R. C, USA

Hall E. Free radicals in central nervous system injury . In Rice-Evans C., Bordon R. Editors. *Free radical damage and its control*. (1999) pp. 217-238 Elsevier Science NY

- Halliwell B, Gutteridge J. Free radic biol med, (2001) pp. 36-101, Oxford University Press USA
- Hardingham G, Bading H; The yin and yang of NMDA receptor signalling. Trends Neurosci, 26 (2003) pp. 81-89
- Hardman G, Limbird E, Editors. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th; 1324 (1995) pp. 1668-1669 Ed. McGraw-Hill NY
- Hensley K, Pye Q, Tabatabaie T, Stewart A, Floyd A. Reactive oxygen involvement in neurodegenerative pathways. En: Neuroinflammation: Mechanisms and management. Editor P. Wood. (1996) pp. 265-275 Humana Press Inc. NJ
- Ibarra L, Barbosa-Vivanco M. Rehabilitación en lesiones por accidente. (1998) pp. 349 Ed Interamericana México
- Ikonomidou Ch. Excitotoxicity and neurodegenerative disease. Curr Opin Neurol, 8 (1995) pp. 478-497
- Jackson M. Free radicals in the pathogenesis of tissue damage. En: Calcium, oxygen radicals and cellular damage. (1991) pp. 11-15 Cambridge
- Jacobson D. Reactive oxygen species and programmed cell death. Trends Biochem Sci, 21 (1996) pp. 83-86
- Kanner J, Harel S, Méname S. The generation of ferryl or hydroxyl radicals during interaction of heme proteins with hydrogen peroxide. En: Oxygen radicals in biology and medicine. Editor Simic M. (1987) Elsevier NY USA
- Keberle, H. The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism. Ann NY Acad Sci, 119 (1964) pp. 758-775
- Klein-Schwartz W, Oderda G, Gorman L. Assessment of management guidelines. Acute iron ingestion. Clin Pediatr (Phila) 29 (1990) pp. 316-21
- Koszyca B, Manavis J, Cornish J, Blumbergs P, Patterns of immunocytochemical staining for ferritin and transferrin in the human spinal cord following traumatic injury J Clin Neurosci, 9 (2002) pp. 298-301
- Le Vine S. Iron deposits in multiple sclerosis and Alzheimer's disease brains. Brain Res, 760 (1997) pp. 298-303
- Levy Y, Streifler Y, Panet H, Melamed E, Offen D. Hemin-induced apoptosis in PC12 and neuroblastoma cells: implications for local neuronal death associated with intracerebral hemorrhage Neurotox Res, 4(2002) pp. 609-616.
- Liu ⁽¹⁾J, Tang T, Xiao D. Changes of free iron contents and its correlation with lipid peroxidation after experimental spinal cord injury. Chin J Traumat, 7(2004) pp. 229-32.

Liu D, Sun D, Alcock N, Wen L. Spinal cord injury increase iron levels: catalytic production of hydroxyl radicals. *Free Rad Biol Med*, 34 (2003) pp. 64-71

Liu D, Liu J, Sun D, Wen J. The time course of hydroxyl radical formation following spinal cord injury: the possible role of the iron-catalyzed Haber-Weiss reaction. *J Neurotrauma*, 21 (2004) pp. 805-816.

Liu D. Generation and detection of hydroxyl radical *in vivo* in rat spinal cord by microdialysis administration of Fenton's reagents and microdialysis sampling. *J Biochem Biophys Methods*, 27 (1993) pp. 281-291

Liu D, Liu J, Wen J. Elevation of hydrogen peroxide after spinal cord injury detected by using the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med*, 27 (1999) pp. 478-482

Markesbery W. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimers Disease
Free Radic Biol Med, 23 (1997) pp. 134-147

Mordente A, Meucci E, Miggiano , Martorana G. Prooxidant action of desferrioxamine: Enhancement of alkaline phosphatase inactivation by interaction with ascorbate system. *Arch Biochem Biophys*, 277 (1990) pp. 234-240

Nicotera P, Kass N, Duddy K, Orrenius S. Calcium and signal transduction oxidative cell damage. En: *Calcium, oxygen radicals and cellular damage*, (1991) pp. 17-33 Ed Elsevier Cambridge

Niihara Y, Gel J, Shalev O, Wu H, Tu A, Tanaka R. Desferrioxamine decreases NAD redox potential of intact red blood cells: evidence for desferrioxamine as an inducer of oxidant stress in red blood cells. *BMC Clinical Pharmacol*, 2 (2002)
<http://www.biomedcentral.com/1472-6904/2/8>

Noble J: Wrathall R. Spinal cord contusion in the rat: Morphometric analyses of alterations in the spinal cord. *Experimental Neurol*, 88 (1985) pp. 135-149

Otterbein E, Soares P, Yamashita K, Bach F. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol*, 24 (2003) pp. 449-455

Panahian N, Maines D. Site of injury-directed induction of heme oxygenase-1 and -2 in experimental spinal cord injury: differential functions in neuronal defense mechanisms? *J Neurochem*, 76 (2001) pp. 539-554

Pockett S, Fugurov A. Long-term potentiation and depression in the ventral horn of rat spinal cord *in vitro*. *Neuro Report*, 4 (1993) pp. 97-99

Ponka P, Sheftel A, Zhang A. Iron targeting to mitochondria in erythroid cells
Biochem Soc Trans, 30 (2001) pp. 735-738

Prives M, Lisenko N, Bushkovich V. *Anatomia Humana*. Tomo II, (1975), pp. 426, Ed MIR, Moscu

Propper D, Cooper B, Rufo R, Nienhuis W, Anderson W, Bunn F, Rosenthal A, Nathan G. Continuous subcutaneous administration of deferoxamine in patients with iron overload. *N Engl J Med*, 297 (1977) pp. 418-423.

Qayumi K, Janusz T, Dorovini-Zis K, Lyster M, Jamieson R, Poostizadeh A, Feeley J, Nikbakht-Sangari M. Additive effect of allopurinol and deferoxamine in the prevention of spinal cord injury caused by aortic cross clamping. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 107 (1994) pp. 1203-1209.

Rank H, Carlsson J, Hebbel P. Abnormal redox status of membrane-protein thiols in sicklet erythrocytes. *J Clin Invest*, 75 (1985) pp. 1531-1537.

Richardson D, Ponka P, Baker E. The effect of the iron(III) chelator, desferrioxamine, on iron and transferrin uptake by the human malignant melanoma cell. *Cancer Res*, 54 (1994) pp. 685-689

Ríos de Molina M. El estrés oxidativo y el destino celular
www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/estres%20oxidativo.htm

Rossignol R, Bouyer L, Barthémy C, Langlet C, Leblond H; Recovery of locomotion in the cat following spinal cord lesion. *Brain Res Rev*, 40 (2002) pp. 257-266

Rouault T. A Iron on the brain. *Nature genetics*, 28 (2001) pp. 299-300

Sadrzaden M, Anderson K, Porter S, Hallaway E, Eaton W. Hemoglobin potentia central nervous system damage. *J Clin Invest*, 79 (1987) pp. 662-664

Schipper H. Heme oxygenase expression in human central nervous system disorders. *Free Radic Biol Med* 37 (2004) pp. 1995-2000

Schwartz G, Fehlings M. Secondary injury mechanisms of spinal cord trauma: a novel therapeutic approach for the management of secondary pathophysiology with the sodium channel blocker riluzole. *Progres Brain Res*, 137 (2002) pp. 470

Simic M, Taylor A. *Oxygen radicals in biology and medicine*, (1987) pp. 1-20. Plenum press NY.

Simovich M, Hainsworth N, Fields A, Umbreit J, Conrad M. Localization of the iron transport proteins mobilferrin and DMT-1 in the duodenum: The surprising role of mucin. *American J Hematol*, 14 (2003) pp. 32-45

Smith A, Harris R, Sayre M, Perry G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci*, 94 (1997) pp. 9866-9868

Tator H. Update on the patophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol* 5 (1995) pp. 407-413

Thomas B. Role of intestine in postsurgical complications: involvement of free radicals

Free Radic Biol Med, 36 (2004) pp. 745-756

Vangelder W, Siersema P, Voogd A, Jeu-Jaspars N, Van Eijk, Koster J, De Rooy F, Wilson P. The effect of deferoxamine on iron metabolism and lipid peroxidation in hepatocytes of C57BL/10 mice in experimental uroporphyrin. Biochem Pharmacol, 46 (1993) pp. 221-228

White B, Sullivan J, De Gracia D, O'Neil B, Neumar R, Grossman L, Rafols A, Krause G. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. J Neurological Sciences, 179 (2000) pp. 1-33

Wise Y. Spinal cord contusion models. Prog Brain Res, 137 (2002) pp. 231-335

Wrathall⁽¹⁾ J, Bouzoukis J, Choiniere D. Effect of kynurenate on functional deficits resulting from traumatic spinal cord injury. Eur J Pharmacol, 218 (1992) pp. 273-281

Wrathall⁽²⁾ J, Yang D, Choiniere D, Mundt J. Evidence that local non-NMDA receptors contribute to functional deficits in contusive spinal cord injury. Brain Res, 585 (1992) pp. 140-143

Wu J, Hua Y, Keep F, Nkamura T, Hoff T, Guohua X. Iron and Iron-Handling Proteins in the Brain After Intracerebral Hemorrhage. Stroke, 34 (2003) pp. 2964-2969

Yu Z, Persson L, Eaton W, Brunk T. Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death. Free Radic Biol Med, 34 (2003) pp. 1243-1252

Zentella M, Saldaña B. Papel fisiológico de los radicales libres. Boletín del mensaje bioquímico, 15 (1990) pp. 152-161

Zhang J, Scherch H, Hell E. Direct measurement of lipid hydroperoxides in iron dependent spinal neuronal injury. J Neurochem, 66 (1996) pp. 355-361

Zurita M, Vaquero J, Oya S. Significado de la apoptosis tras una lesión traumática de la médula espinal. MAPFRE MEDICINA, 13 (2002) pp. 3-10

Yang Y, Bao P, Ying J. Effects of resveratrol on secondary damages after acute spinal cord injury in rats. Acta Pharmacol Sin, 24 (2003) pp. 703-710

www.discapnet.es

www.montanabrain.com/pages/spinal.htm

<http://www.webschoolsolutions.com/systems/nervous.htm>

http://www.neurocirugia.cl/revista/revista_neurocirugia_may2004/Trabajos%20originales/F_stulas%20durales-TrabajoDr.Corval_n.pdf

http://www.neurocirugia.cl/revista/revista_neurocirugia_may2004/

http://www.itqb.unl.pt/.../news/DN_Bfr.html

<http://www.medvet.umontreal.ca/clinpath/banq-im/cytology/erythophagieE.htm>

http://pearl1.lanl.gov/external/Research/neu/actinide_research.htm

(<http://www.aans.org/education/journal/neurosurgical/october98/5-4-p1.asp>)