



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**EFFECTO DE LA TALIDOMIDA EN LA EVOLUCIÓN DE LA
LESIÓN TRAUMÁTICA EXPERIMENTAL DE MÉDULA ESPINAL**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

HORACIO JOSÉ REYES ALVA

TUTOR:
DR. GABRIEL GUÍZAR SAHAGÚN

COMITÉ TUTORAL:
DRA. REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND
M. en C. EDUARDO CARLOS SANTOSCOY MEJÍA

MÉXICO, DF

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi Dios, porque me ha dado la vida y la oportunidad de vivirla intensamente, y porque siempre ha llenado de bendiciones a mi Familia y a mi persona.

A mi Esposa Ivonne, porque siempre de manera incondicional me brindas tu apoyo y amor en cada meta que me propongo. Gracias por ser una maravillosa persona y gracias por los hermosos momentos que llenan de magia y alegría mi vida contigo. Te amo

A mis hijos Fery y Mane, que son mi inspiración, mi orgullo, mi todo. Gracias por darme siempre muestras de apoyo y amor para cumplir esta meta. Los alolo

A mis padres, gracias por darme con amor, disciplina y ejemplo, la fortaleza, el empeño y coraje para lograr este tan deseado sueño. Los amo.

A mis hermanos: Lupita, Germán, Víctor, y Juanito; a mis cuñados (as): Paco, Ivonne, Jessica, y Miriam. Gracias por su apoyo y sus palabras de aliento.

A mi Tutor Dr. Gabriel Guízar, Le agradezco infinitamente su dedicación y sus enseñanzas, gracias por compartir sus experiencias y su conocimiento. Gracias por su paciencia en momentos difíciles, y sobre todo gracias por hacerme sentir como de la Familia en Proyecto Camina A.C. Ha sido una gran experiencia tenerlo como tutor y como amigo.

A mi Comité Tutorial: a la Dra. Rebecca Franco, gracias por todas las cosas que me enseñó, por inculcarme con mano recia, que solo llegan a la meta los que se esfuerzan verdaderamente. Gracias por su amistad. Al M. en C. Carlos Santoscoy, siempre te agradeceré que me recomendaras a Proyecto Camina, gracias porque siempre me has brindado tus conocimientos, tus experiencias pero sobre todo tu amistad.

A la Dra. Sara Caballero por contribuir en forma importante en mi formación profesional (Especialidad y Maestría), y por tu amistad.

A Angy y a Paco, quienes de manera siempre desinteresada y amable, me brindaron su conocimiento y ayuda invaluable para la realización de este trabajo de investigación. Gracias por su amistad.

A mis amigos de Proyecto Camina A.C. Laura, Don Memo, Luis, Braulio, Don Fidel, Abdiel, Elisa, Susy, Nayeli y Marco y a todos los que me hicieron sentir siempre en casa.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Ignacio Domínguez Vara y al MVZ. ESP. Marco Antonio Barbosa Mireles por todas sus atenciones y apoyo incondicional, que hicieron posible la culminación de esta meta.

Gracias a todas los animales de experimentación que brindaron su vida para la realización de esta investigación.

RESUMEN

La talidomida es un fármaco derivado del ácido glutámico; por sus propiedades como antiinflamatorio, inmunomodulador y antiangiogénico se utiliza actualmente para el tratamiento de diversas condiciones patológicas. No existen estudios que hayan evaluado el efecto de la talidomida en el curso de una lesión traumática de médula espinal (LTME). Su capacidad para inhibir la producción del factor de necrosis tumoral- α , disminuir la respuesta inflamatoria aguda, controlar la permeabilidad vascular (al disminuir la producción del factor de crecimiento vascular endotelial) y cambiar el fenotipo de células Th1 a Th2, nos sugiere que la talidomida podría contribuir de manera importante a la disminución del daño secundario que se presenta después de una LTME y en consecuencia podría funcionar como un neuroprotector efectivo. El presente trabajo determinó el efecto de la administración de talidomida (25 mg I.P.) en el curso de una LTME en ratas adultas. Se evaluó su influencia sobre el edema, proceso inflamatorio agudo, y cantidad de tejido medular preservado en el sitio de lesión y áreas vecinas, también se realizó una evaluación de la evolución funcional. La talidomida fue administrada de forma temprana (10 minutos postlesión) y tardía (4 horas postlesión). Los resultados del experimento mostraron que la talidomida administrada temprana o tardíamente disminuye significativamente el edema medular medido a 24 horas postlesión; sin embargo solo la administración tardía disminuyó el infiltrado inflamatorio en áreas vecinas (5 mm craneal y caudal a la lesión) pero no tuvo efecto en el sitio de lesión. En la evaluación funcional se observó que la administración 10 minutos postlesión con dosis única deteriora significativamente el comportamiento motor. Los otros grupos de tratamiento con aplicación de talidomida 4 horas, y 24 horas (con dosis únicas y con dosis repetidas) postlesión no mostraron efectos en la evolución funcional de la LTME durante las 7 semanas que siguen a la lesión. La cantidad de tejido medular preservado en la zona de lesión fue similar en todos los grupos de tratamiento. La administración tardía mostró tener un efecto no favorable para la preservación de tejido en las zonas craneal y caudal a la lesión, ya que promovió una mayor cantidad de tejido necrótico-hemorrágico en la llamada "zona de penumbra". Concluimos que la administración de talidomida bajo las condiciones utilizadas en este experimento, no promueve efectos favorables para la recuperación funcional de la LTME.

ABSTRACT

Thalidomide is a glutamic acid derivative; because their pharmacological properties including anti-inflammatory, immunomodulatory, and antiangiogenic activities, it is used as treatment for a diversity of pathological conditions. No studies have been conducted to evaluate the effect of thalidomide in treatment of spinal cord injury (SCI). The abilities of thalidomide to inhibit the production of TNF-alpha, to diminish acute inflammatory response, to control the vascular permeability (diminishing the production of vascular endothelial growth factor) and to change the phenotype from cells Th1 to Th2, suggest that thalidomide could contribute to reduces the secondary damage that develops early after SCI, and in consequence works as a novel neuroprotector. The present investigation evaluated the effect of administering thalidomide (single or repeated doses of 25 mg I.P.) to adult rats subjected to a clinically relevant model of acute SCI. It was evaluated the effects on edema, acute inflammatory processes, amount and quality of spared spinal cord tissue at the site of the injury and neighboring areas, as well as on functional outcome. Administration of thalidomide was started early (10 minutes) or late (4 hours) after injury. Comparing with injured rats treated only with vehicle (control group), rats treated with thalidomide started both early or late after injury showed significantly less spinal cord edema 24 hours post lesion; however only the later administration showed to diminished the inflammatory infiltrate in the surrounding tissue (5mm cranial and caudal to site of lesion) but not in the site of lesion. The functional evaluation showed that the early administration of thalidomide as a single dose was detrimental. Groups treated at 4 hours and 24 hours post-injury as single or repeated doses didn't show any effect on the functional outcome assessed during 7 weeks post-injury. The amount of spinal cord tissue preserved in the area of lesion was similar among all groups. Later administration showed a detrimental effect on tissues around the lesion due to a greater amount of necrotic-hemorrhagic tissue. We conclude that the administration of thalidomide as used here does not promote beneficial effects in the recovery of functionality after SCI.

COMITÉ TUTORAL

DR. GABRIEL GUÍZAR SAHAGÚN

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas. Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional siglo XXI, IMSS, Proyecto Camina A.C. Ciudad de México, D.F.

DRA. REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND

Centro Nacional de Rehabilitación, Departamento de Bioquímica, Ciudad de México, D.F.

M. en C. EDUARDO CARLOS SANTOSCOY MEJÍA

Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

JURADO

DR. HECTOR SUMANO LÓPEZ

PRESIDENTE

Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

DRA. REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND

VOCAL

Centro Nacional de Rehabilitación, Departamento de Bioquímica, Ciudad de México, D.F.

M. en C. EDUARDO CARLOS SANTOSCOY MEJÍA

SECRETARIO

Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

DRA. SARA CABALLERO CHACÓN

SUPLENTE

Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

DR. GABRIEL GUÍZAR SAHAGÚN.

SUPLENTE

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas. Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional siglo XXI, IMSS, Proyecto Camina A.C. Ciudad de México, D.F.

ÍNDICE GENERAL

Introducción	1
Anatomía de la médula espinal	1
Lesión traumática de la médula espinal	4
a. Antecedentes	4
b. Fisiopatología	5
c. Tratamiento	10
Talidomida	10
a. Antecedentes	10
b. Estructura química	11
c. Efectos	12
d. Efectos secundarios adversos	13
e. Indicaciones	14
f. Presentación comercial	15
g. Posología y farmacocinética	16
Justificación	18
Objetivo General	18
Objetivos Particulares	18
Hipótesis 18	
Material y Métodos	18
a. Material biológico	19
b. Procedimiento quirúrgico y lesión de médula espinal	19
c. Alojamiento y manejo médico	20
d. Eutanasia	20
e. Diseño experimental	22
f. Contenido de agua	22
g. Inflamación aguda	22
h. Evaluación funcional	27
i. Evaluación de tejido medular preservado	28
Resultados	31
a. Contenido de agua	31
b. Inflamación aguda	32
b.1. Determinación de la actividad enzimática de la MPO	32
b.2. Infiltrado de polimorfonucleares	33
c. Evaluación funcional	35
d. Evaluación de tejido medular preservado	38
Discusión	46
Conclusiones	52
Referencias Bibliográficas	53
Anexos	63

INTRODUCCIÓN.

Anatomía de la médula espinal.

El sistema nervioso central está dividido en 6 partes: los hemisferios cerebrales, el diencefalo, el mesencefalo, la protuberancia, el bulbo raquídeo y la médula espinal.

La médula espinal es una estructura cilíndrica elongada, en el humano mide aproximadamente 45 cm. de longitud, y se extiende desde la médula oblonga del cerebro posterior hasta la primera y segunda lumbar. Se ubica en el conducto raquídeo o canal vertebral, está dividida en segmentos medulares: 8 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacros, 1 coccígeo, y la parte terminal de la médula espinal denominada cauda equina. (Guyton, 1994; Climent y cols. 1998; Purves et al. 2001; Peterson, 2000; Sharp et al. 2006)

Los nervios espinales surgen de la médula espinal como 31 pares de nervios espinales (8 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacros, y 1 coccígeo). La información sensoria es transmitida por los axones aferentes del nervio espinal que ingresa a la médula espinal a través de las raíces dorsales; la información motora es transmitida por los axones eferentes que abandonan la médula espinal a través de las raíces ventrales. La unión de los axones motores y sensorios da origen a los nervios periféricos segmentarios.

Los nervios espinales cervicales y torácicos emergen por el foramen intervertebral, las raíces espinales lumbares, sacros y coccígeo recorren descendiendo por el espacio subaracnoideo antes de alcanzar los forámenes correspondientes, formando un grupo de raíces la llamada cauda equina.

Hay regiones ensanchadas en la médula espinal, llamados plexos, y contienen mayor cantidad de células nerviosas y sus conexiones. El ensanchamiento cervical es llamado plexo braquial (C5 a T1), procesa información de los miembros superiores, el ensanchamiento o plexo lumbosacro (L1 a S2), procesa información de los miembros inferiores.

La médula espinal está compuesta de una sustancia gris y una blanca, los cuerpos de las células nerviosas se encuentran en la sustancia gris, con muchas fibras nerviosas cortas, y en la sustancia blanca se ubican tractos de fibras nerviosas y glía, la disposición es simple: al interior la sustancia gris y esta se encuentra rodeada por la sustancia blanca.

Las vías de la sustancia blanca están divididas en los cordones posteriores, laterales y anteriores cada uno contiene haces de axones con funciones específicas. Los cordones laterales llevan axones que

viajan desde la corteza cerebral para hacer contacto con las neuronas motoras espinales, formando así la mayor extensión caudal de las pirámides bulbares. Los cordones posteriores transmiten información sensoria ascendente desde los mecano-receptores somáticos. Los cordones antero laterales transmiten información termoalgésica ascendente y motora descendente. (Guyton, 1994; Climent y cols. 1998; Purves et al. 2001; Peterson, 2000; Sharp et al. 2006)

La sustancia gris de la médula espinal esta dividida en astas o cuernos posteriores, y astas o cuernos anteriores, la información sensoria llega a las astas posteriores y la motora sale de las astas anteriores y llegan hasta los músculos estriados. Por lo tanto las neuronas que procesan información sensorial se localizan posteriormente, mientras que las que procesan información motora se localizan anteriormente. Las neuronas preganglionares del SNA se encuentran intermedias.

La sustancia gris de la médula espinal desempeña dos funciones:

1). Sus sinapsis transmiten señales entre la periferia y el encéfalo en ambas direcciones.

Principalmente en las astas posteriores se lleva a cabo el relevo de las señales provenientes de las raíces sensitivas de los nervios espinales, después se dirigen hacia arriba, por la sustancia blanca medular a las distintas áreas sensitivas del encéfalo.

En las astas anteriores y columnas laterales se realiza el relevo de las señales motoras provenientes de los tractos nerviosos que descienden del encéfalo, hacia las raíces nerviosas motoras espinales que hacen sinapsis con el músculo estriado.

2). Integra algunas actividades motoras que conforman a los reflejos espinales.

La sustancia blanca se divide en columnas:

- 2 columnas posteriores
- 2 columnas laterales
- 2 columnas anteriores

Estas columnas contienen tractos que discurren a lo largo de toda la médula espinal, algunos de ellos están adyacentes a la sustancia gris, como los tractos propioespinales, quienes viajan solo algunos segmentos medulares para conectarse entre si algunos de ellos, se encargan de asistir los reflejos medulares. El resto de la sustancia blanca contiene tractos de fibras largas que llevan información

sensitiva hacia el encéfalo, o bien señales motoras desde el encéfalo hasta la médula espinal. (Guyton, 1994; Peterson, 2000)

Tractos motores:

- a) Tracto corticoespinal lateral (desde la corteza motora del encéfalo a la médula espinal)
- b) Tracto corticoespinal ventral (desde la corteza motora del encéfalo a la médula espinal)
- c) Tractos rubroespinales (desde el núcleo rojo del mesencéfalo a la médula espinal)
- d) Tractos retículo espinales (desde la sustancia reticular del encéfalo, protuberancia y bulbo a la médula espinal)
- e) Tracto olivoespinal (desde la oliva inferior del bulbo a la médula espinal)
- f) Tracto vestibuloespinal (desde los núcleos vestibulares del bulbo y la protuberancia hasta la médula espinal)
- g) Tracto tectoespinal (desde el techo del mesencéfalo hasta la médula espinal)

Tractos sensitivos:

- a) Fascículo grácil y fascículo cuneiforme (constituyen la mayor parte de las columnas dorsales, llevan información de la periferia hasta los núcleos grácil y cuneiforme en el extremo inferior del bulbo) conducen estímulos del tacto fino y discrimina entre estímulos sensitivos en piel y posiciones de partes del cuerpo.
- b) Tractos espinotalámicos anterior y lateral (llevan señales periféricas que hacen relevo en las astas posteriores, atraviesan la comisura blanca anterior y ascienden desde el lado opuesto de la médula hasta el tallo encefálico y el tálamo) conducen estímulos del tacto grueso, dolor y temperatura.
- c) Tractos espinocerebelosos anterior y lateral (llevan señales periféricas que hacen relevo en las astas posteriores, ascendiendo hasta el cerebelo)
- d) Tracto espinoolivario (desde las astas posteriores de la médula hasta la oliva inferior del bulbo) estos dos últimos son responsables de percibir señales de los músculos y articulaciones, que informan constantemente al cerebelo de los movimientos y posición de partes del cuerpo, todo ello para permitir la coordinación de los movimientos corporales. (Guyton, 1994)

Los conjuntos neuronales responsables de la locomoción son 3 subsistemas motores:

1. Circuito en el interior de la sustancia gris de la médula espinal. Incluye neuronas motoras primarias o alfa (también llamadas neuronas inferiores) las cuales envían sus axones fuera de la médula espinal hasta llegar a los músculos estriados (llevando información motora voluntaria o refleja), y a las interneuronas medulares que constituyen una fuente importante de las aferencias sinápticas a las neuronas motoras. (que participan en la coordinación refleja entre los grupos musculares)
2. Neuronas en el tronco encefálico y corteza cerebral. Sus axones de estas neuronas motoras superiores descienden para hacer sinapsis con interneuronas, o con motoras primarias o con ambas en la sustancia gris de la médula espinal.

Las vías descendentes son esenciales para el control de los movimientos voluntarios y constituye un nexo entre los pensamientos y las acciones, estas son responsables de integrar la información sensitiva vestibular, somatosensitiva y visual, para ajustar la actividad refleja de la médula espinal, fundamentalmente para movimientos básicos de dirección del cuerpo y control de la postura.

La planificación, iniciación y dirección de los movimientos se llevan a cabo por la corteza motora primaria, corteza promotora y motora suplementaria, la información cortical es enviada a través de la vía corticoespinal hacia la médula espinal.

3. El cerebelo y los ganglios basales son estructuras que no tienen acceso directo a las neuronas primarias alfa o a las interneuronas medulares sin embargo regulan la actividad de las neuronas motoras superiores que dan origen a las vías descendentes.
El cerebelo corrige los errores al comparar la información de movimiento producida en la corteza y el tronco encefálico con la retroalimentación sensitiva acerca de los movimientos que realmente se han producido, por lo tanto coordina los movimientos complejos. Los ganglios basales son importantes en la iniciación del movimiento. (Purves et al. 2001)

Cada extremidad parece ser controlada por un generador central de patrones, un circuito oscilatorio básico de la médula espinal responsable de la flexión y extensión alternantes de la extremidad durante la locomoción, que logra secuencias de movimientos que se desarrollan a diferentes velocidades de locomoción, estos centros no

son dependientes de las vías descendientes en su totalidad en los cuadrúpedos, en cambio en el humano si.

La médula espinal se encuentra rodeada por las meninges: de afuera hacia dentro son: dura madre (gruesa y resistente), aracnoides (con prolongaciones aracniformes) y la piamadre (delicada y delgada). Entre la aracnoides y la piamadre está el espacio subaracnoideo lleno de líquido cefaloraquídeo. (Guyton, 1994; Purves et al. 2001; Peterson, 2000)

La irrigación de la médula espinal está dada por una arteria espinal anterior y dos arterias espinales dorsales, que brindan irrigación de afuera hacia dentro con las arterias vasocoronarias, y de adentro hacia fuera con la arteria del surco, las cuales provienen de 2 arterias vertebrales y aproximadamente 10 arterias medulares que nacen de ramas segmentarias de la aorta. (Guyton, 1994; Purves et al. 2001; Peterson, 2000)

LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MEDULA ESPINAL

Antecedentes.

Es un problema de salud pública que pone en riesgo la vida del paciente en fase aguda y que en los pacientes que sobreviven puede producir incapacidad a largo plazo con pérdida permanente del control voluntario en la locomoción y en el soporte corporal de las extremidades, además de generar una gran variedad de disfunciones sensitivas y autonómicas con devastadoras repercusiones personales, económicas y sociales. (Das et al, 1989; Berkowitz, y cols. 1992; Hulsebosch, 2002; UAB, 2006)

Estadísticas muestran que en el período de tiempo correspondiente a la 2ª guerra mundial, las personas que padecían Lesión Traumática de la Médula Espinal (LTME) tenían una esperanza de vida de apenas 3 meses. En 1966 esta esperanza de vida se incremento a 20 años. Y hoy en día los avances médicos y científicos han permitido han permitido aumentarla de 25 a 30 años después del evento traumático. (Lali and Sekhon, 2001; Hulsebosch, 2002; UAB, 2006)

En algunos países representa una de las primeras causas de muerte durante el período productivo de las personas menores de 40 años, sin embargo la LTME, es un padecimiento con baja incidencia en la población a comparación de otras patologías y padecimientos. (Lali and Sekhon, 2001; Hulsebosch, 2002; UAB, 2006)

En el Distrito Federal, México, se ha reportado una incidencia anual de 18.1 casos de LTME por cada millón de habitantes por año, en Estados Unidos de América la incidencia es de 20 a 27.1 casos de LTME por millón de habitantes al año. La incidencia mundial es de

12 a 40 casos por millón de habitantes al año; el 82 % de los casos suelen ser hombres, y el 75 % de los casos están entre los 15 y 35 años de edad. Los agentes traumáticos más comunes son accidentes en vehículos motorizados (40 a 50 %), accidentes en la práctica deportiva (10 a 25 %), accidentes de trabajo (10 a 25 %), lesiones con objetos punzocortantes (10 a 25 %) y caídas (20 %). La mortalidad de individuos con LTME es de 6 a 17%. (Buchanan et. al., 1987, Segal, 1989; Ibarra et. al., 1998, Pardini, 1998; Zeiling y cols. 2000; Fehlings 2001; Lali and Sekhon, 2001; Vértiz, 2003, Díaz, 2003; UAB, 2006)

De acuerdo con la intensidad del LTME existen alteraciones estructurales y funcionales variables, que oscilan desde un bloqueo transitorio de la conducción de impulsos nerviosos, hasta la pérdida total de las funciones motora y sensitiva por debajo del sitio dañado, traduciéndose en paraplejia si afecta miembros inferiores o tetraplejia si afecta miembros superiores e inferiores. También sufriendo disfunción vesical, sexual, y en algunos casos dolor crónico. (Tarlow et al. 1953; Kao, 1977; Frankel 1987, Das et al. 1989; Barry et al. 1993; Taoka, 1998)

Fisiopatología de la LTME.

Involucra 2 fases:

1). El daño mecánico primario resulta de la fuerza mecánica y distorsión provocada por el impacto, aplastamiento, estiramiento, desgarre y/o laceración tisular, que provocan una pérdida de las características estructurales y funcionales del parénquima medular. Estos efectos inmediatos y son irreversibles.

2). Los mecanismos secundarios de lesión ocurren por procesos como la hemorragia (principalmente en la sustancia gris), edema, y muerte celular excitotóxica. La médula espinal sufre cambios patológicos secuenciales que incluyen a la necrosis axonal y neuronal, desmielinización, formación de quiste e infarto.

Días después del evento traumático los cambios progresivos de cavitación y necrosis coagulante en el sitio de la lesión y sus márgenes, se presentan como resultado de la inflamación, necrosis, apoptosis y formación de cicatriz glial. (Lemke y cols. 1987; Faden, 1988; Hall et al. 1989; Toaka, 1998; Schwartz et al. 2002; Hulsebosch, 2002; Jiménez, 2004; Bao et al. 2004)

Algunos autores dividen a los mecanismos secundarios en tres fases:

Fase aguda:

Inicia inmediatamente después del traumatismo y se prolonga por unos días después. En esta fase existe un daño neural inmediato, por

la hemorragia, el flujo sanguíneo disminuido y la necrosis (reversible durante las primeras 8 horas postlesión).

El tejido infartado propaga la necrosis hasta las zonas vecinas superiores e inferiores a la lesión (epicentro), debido al daño sobre arteriolas, capilar y vénulas, limitando el flujo sanguíneo hasta el tejido medular. El infarto generalmente se intensifica por procesos tales como el vasoespasmio local, trombosis y choque neurogénico.

La isquemia es uno de los mecanismos secundarios de lesión más importantes, ya que aunada al edema, la inflamación y la hemorragia, dificulta o impide la perfusión de la médula espinal sobre todo en las primeras 2 horas posteriores al LTME, período en el que la sustancia gris es más vulnerable, debido a que presenta una mayor demanda metabólica provocando que la necrosis traumática sea más severa. (Young, 2002; Hulsebosch, 2002; Santoscoy, 2003)

En la sustancia blanca la disminución del flujo sanguíneo tiene una duración de 1 hora aproximadamente, recuperándose en las siguientes horas. (Santoscoy, 2003)

Las alteraciones del flujo sanguíneo no solo ocurren en el sitio de lesión, también en varios segmentos medulares vecinos a la lesión, incluso la irrigación sanguínea de los segmentos medulares superiores al foco de lesión se ven más afectados que los segmentos inferiores a la lesión.

Las alteraciones de la irrigación del parénquima medular provocan bajos niveles energéticos celulares (por pérdida de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa), ocasionando una menor disposición de ATP, un bloqueo de la bomba de sodio y potasio, y otros canales, y una acumulación citosólica de calcio e hidrogeniones, desencadenando una serie de procesos necróticos como la despolarización de la membrana celular, una descarga del contenido de los lisosomas y una activación de enzimas calcio-dependientes autodestructivas (lipasas, proteasas, ATPasas, y endonucleasas) hacia el espacio intracelular, afectando a la membrana citoplasmática, al citoesqueleto y a componentes del núcleo celular, resultando en la muerte celular, y desde luego la extensión de la lesión en comparación con la lesión original (hasta 2 segmentos medulares superiores e inferiores al foco de la lesión). (Kawata, 1993; Cotran, 1999; Guth, 1999; Ropper, 2001; Hulsebosch, 2002; Martiñon, 2006)

La isquemia produce alteraciones de la vía glucolítica aeróbica que obligan a recurrir a las células a un mecanismo homeostático compensatorio de respiración anaerobia que solo le proporciona 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, permitiéndoles sobrevivir precariamente, sin embargo la célula en anaerobiosis agota el ATP intracelular en poco tiempo, la membrana se despolariza y se bloquean tanto la bomba de sodio y potasio (ATPasa), como la entrada de nuevas moléculas de glucosa, por lo que la célula no puede por sí misma volver a su metabolismo

aeróbico que le proporcione 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa.

En condiciones anaeróbicas, el ácido pirúvico procedente de la glucólisis, se reduce a ácido láctico ocasionando incremento de los niveles de lactato, obtención insuficiente de energía, acidez intracelular y reducción en los sistemas amortiguadores a nivel perivascular y en la sangre. La acidosis resultante interfiere con la función enzimática normal, proporciona un ambiente favorable para la formación de especies de oxígeno reactivas ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}) y la subsecuente lipoperoxidación, que se ve incrementada por la presencia de hierro, además de constituir un mecanismo importante en la formación del edema intracelular en las células del sistema nervioso. La acidosis y la disfunción tisular coexisten simultáneamente y si no se corrigen en el corto plazo producen despolarización de la membrana, muerte celular y lesiones orgánicas irreversibles.

El proceso isquémico suele estar seguido de una fase de reperfusión tisular que puede incrementar el daño en la médula espinal, al promover el flujo de especies de oxígeno reactivas y otros productos tóxicos que generan procesos autodestructivos y producen déficit funcional permanente. (Kawata, 1993; Cotran, 1999; Guth, 1999; Ropper, 2001; Santoscoy, 2003; Martiñon, 2006) 4, 5,

Fase de pérdida secundaria de tejido:

Minutos u horas después de la lesión, ocurren alteraciones bioquímicas como la lipoperoxidación y la acumulación de neurotransmisores en la lesión y en las zonas vecinas.

La lipoperoxidación es una reacción en cadena que proporciona un suministro continuo de radicales libres, con efectos potencialmente devastadores para las células del tejido medular, provocando la fragmentación y/o modificación de proteínas, por la oxidación de las cadenas de aminoácidos o formando uniones cruzadas entre proteínas.

La liberación de grandes cantidades de neurotransmisores (glutamato y aspartato) propiciada por la lisis celular en un ambiente hipóxico, conduce a una aguda sobreestimulación de las neuronas viables, propiciando una muerte celular por excitotoxicidad. (Faden y cols. 1988; Koyanagi, 1993; Choi, 1996; Toaka, 1998; Doble, 1999; Schnell, 1999; Murray, 2001; Ropper, 2001; Young, 2002)

Días después del traumatismo existe una baja capacidad de regeneración espontánea de las fibras nerviosas, debido a que inhibidores de la regeneración son secretados y al desbalance en la producción de diversos factores tróficos.

Procesos como la pérdida de la regulación iónica y osmótica en células de la sustancia gris y axones de la sustancia blanca, provocan

una pérdida de la transmisión del impulso nervioso, y favorecen la aparición del edema. (Lei, 1999)5

El incremento del calcio libre a nivel intracelular activa ciertas proteasas y fosfolipasas, que afectan a la mielina entre otros elementos celulares, favoreciendo la desmielinización.

El incremento acelerado del calcio intracelular, inicia una cascada de activación de las proteínas cinasas, alteraciones en el metabolismo y la producción de radicales libres, por ejemplo:

- Activan las proteasas de cisteína (Calpaína) dañando al citoesqueleto.
- Activan cinasas dependientes de calcio/calmodulina, y modifican a los canales iónicos, y a receptores como los NMDA, los AMPA/kainato y los canales de calcio sensibles al voltaje, quienes pueden mediar la excitotoxicidad, y contribuyen, incrementando los procesos neurodegenerativos.
- Activan endonucleasas, provocando la ruptura del DNA.
- Provocan daño a la función mitocondrial.

Estos procesos inician tempranamente la muerte celular. El mecanismo de muerte neuronal iniciado por las altas concentraciones del glutamato es típicamente necrótico. (Hagan, 1986; Faden y cols 1988; Volker, 1990; Reynolds, 1995; Choi, 1996; Cuzzocrea, 2006) 6, 7

La pérdida de regulación iónica afecta al Magnesio, que es importante para la síntesis de DNA, proteínas y una gran cantidad de metabolitos de alta energía. Existe una alteración en la distribución de éste ión a nivel de la lesión y zonas vecinas, y esto conlleva a un incremento de los aminoácidos excitatorios, dañando a las neuronas con receptores NMDA por un mecanismo de excitotoxicidad

Existe una sobreproducción de citocinas, particularmente del factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α), quien propicia la inflamación, el edema y la ausencia de una respuesta inmunológica reparadora después de la LTME. Considerado uno de los factores clave en el proceso autodestructivo que se presenta después del traumatismo inicial, proceso que puede convertir lesiones incompletas en lesiones completas. (Hayashi et al., 2000; Kim et al., 2000; Lee et al., 2000).

Al FNT- α se le ha atribuido un papel importante en la neurodegeneración secundaria a LTME, estudios previos sugieren que es deletéreo para la recuperación funcional. Se han considerado como elementos negativos su efecto proinflamatorio, su papel activo en la promoción de apoptosis de neuronas y oligodendrocitos en la zona de lesión y áreas adyacentes y su capacidad para potenciar el daño excitotóxico. (Kronke et al. 1990; Klusman and Schwab, 1997;

Streit, 1998; Bethea et al. 1999; Lee et al. 2000; Hayashi et al. 2000; Kim et al. 2000; Lee et al. 2000; Lee et al. 2000; Hermann et al. 2001; Yune et al. 2003; Cuzzocrea, 2006)

El incremento en el RNAm y las concentraciones del FNT- α se detecta desde los primeros 30 minutos después de una LTME. El pico máximo se observa a la hora después de la lesión, e induce una liberación inmediata de citocinas, las cuales contribuyen a la succión de RNAm para citocinas adicionales; la proteína se encuentra elevada hasta 4.5 veces más que su nivel basal a 24 horas postlesión. (Streit, 1998)

La expresión incrementada del FNT- α se ha identificado en neuronas, células gliales y endoteliales adyacentes al sitio de lesión. Los receptores p55 y p75 que median el transporte y actividad del FNT- α , también se sobreproducen desde la primera hora postlesión, alcanzando su pico máximo 8 y 4 horas respectivamente; se expresan en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Otras citocinas proinflamatorias que se expresan más tarde son la IL-6 (pico máximo a las 3 horas postlesión) y la IL-1 (Pico máximo a las 6 horas postlesión).

(Yakovlev y Faden 1994; Wang et al., 1996; Bartholdi et al. 1997; Streit et al. 1998; Xu et al. 1998; Hayashi et al. 2000; Lee et al. 2000; Yan et al. 2001; Pan et al. 2002; Yune et al. 2003; Yan et al. 2003; Pan et al. 2003)

Después de una LTME la permeabilidad vascular se incrementa en la zona de lesión por lo que se produce edema y se favorece inflamación, eventos que se asocian de manera importante al fenómeno autodestructivo que sigue al daño mecánico inicial (Orlicek et al. 1999; Earnhardt et al. 2002).

Se sugiere que en animales de experimentación la reducción de la expresión del FNT- α y la concomitante reducción del infiltrado de neutrófilos por la administración de IL-10, proteína C activada y PGE₁, mejora el resultado funcional de individuos sometidos a LTME. Existen también reportes de un papel potencialmente benéfico del FNT- α en la regeneración tisular que ocurre después de LTME, aún cuando esta regeneración es insuficiente para una recuperación funcional efectiva. (Schwartz et al. 1991; Lotan et al. 1994; Klusman and Schwab, 1997; Taoka et al. 1998; Bethea et al. 1999; Scherbel et al. 1999; Kim et al. 2001; Naruo et al. 2003)

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) esta involucrado en el agravamiento del daño secundario después de LTME, funciona como mitógeno endotelial en angiogenesis y es un potente mediador de permeabilidad vascular. Existen reportes de que el VEGF está involucrado también en la formación de edema cerebral asociado con infarto cerebral y neurotrauma. (Senger et al., 1983; Papavassiliou et

al. 1997; Cobbs et al. 1998; Lennmyr et al. 1998; Sköld et al. 2000; Akiyama et al. 2004)

La revascularización de la zona de lesión es un proceso muy eficiente y rápido. Inicialmente en el epicentro de la lesión se pierden casi por completo los vasos sanguíneos ya sea por ruptura o por trombosis, luego por acción de la VEGF se va neoformando la vascularización, logrando a los 7 días después del evento traumático una revascularización máxima, su número es igual al testigo normal, pero los vasos sanguíneos presentes son de mayor diámetro, éstos involucionan a 14 días postlesión, y el tamaño de los vasos sanguínea desciende nuevamente. (Casella et al., 2002).

Fase crónica:

Se presenta unas semanas después del traumatismo, y se manifiesta como fragmentación axonal, desmielinización, degeneración Waleriana (en humanos dura años), apoptosis de oligodendrocitos y la formación de una cicatriz glial. (Faden y cols. 1988; Koyanagi, 1993; Choi, 1996; Toaka, 1998; Doble, 1999; Schnell, 1999; Murray, 2001; Ropper, 2001; Young, 2002; Díaz, 2003)

Morfológicamente se reconocen 2 tipos de tejido lesionado:

A). El tejido del epicentro o foco de la lesión, en donde se observa muerte celular, debido a la necrosis y apoptosis.

B). Zona de penumbra (zonas vecinas a la lesión) en donde la destrucción del parénquima medular, depende de la apoptosis y atrofia de algunas neuronas distantes al área de la lesión.

El período de latencia es relativamente largo, entre el momento de la lesión y la aparición secuencial de eventos antes mencionados, esto permite diferenciar el daño mecánico primario del daño propiciado por los mecanismos secundarios. Lo más relevante es que la mayor parte de la destrucción del substrato anatómico necesario para la recuperación neurológica y el déficit funcional total, es resultado de los mecanismos secundarios de lesión. (Lemke y cols. 1987; Faden, 1988; Hall et al. 1989; Toaka, 1998; Schwartz et al. 2002; Bao et al. 2004) 1, 2,3

Un aspecto a resaltar, es que en la LTME, sin importar la gravedad de la lesión, siempre queda un remanente viable de tejido y de axones. (Kakulas, 1984, Hall, et al 1989)

Tratamiento de la LTME.

Actualmente no se cuenta con un tratamiento neuroprotector adecuado. El único tratamiento aceptado a nivel mundial para LTME es la aplicación de una megadosis de Metilprednisolona (30 mg/kg), ya que aplicada tempranamente permite una recuperación motora y sensoria en forma parcial, mejora y mantiene el metabolismo

energético aeróbico, previene la isquemia postraumática manteniendo el flujo tisular, disminuye la formación del ácido láctico y de los niveles de arginina (substrato necesario para formación de ácido nítrico), y disminuye las concentraciones extracelulares de glutamato.

Sin embargo estudios recientes, demuestran que posee poca efectividad, que implica riesgos de complicaciones potencialmente graves y bloqueo de mecanismos intrínsecos de reparación.

Por ello se requiere un tratamiento más eficiente y seguro, que evite o disminuya el proceso de lesión neurológica secundaria, y que manifieste entre otros parámetros, una mejor evolución clínica y menor destrucción del parénquima medular después de una LTME. (Pointillart et al. 2000; Hurlbert, 2001; Guízar-Sahagún et al. 2004)

TALIDOMIDA

Antecedentes

En 1957 la talidomida fármaco derivado del ácido glutámico, fue introducida al mercado por una compañía farmacéutica alemana Chemie Grunenthal con el nombre de *Kevadón*,. En 1958 entró al mercado mundial y se expandió su uso para tratar náuseas asociadas al embarazo.

En los Estados Unidos de América, el médico francés Kelsey de la FDA impidió la entrada del medicamento porque observó efectos como el adormecimiento de los miembros y neuritis periférica. (Baylor College of Medicine, 2004)

Pronto en el resto del mundo se detectaron graves efectos teratogénicos, propiciados por la talidomida, por lo que en 1961 fue retirada del mercado. La talidomida fue recetada bajo estos nombres: *Imidan, Varian, Contergan, Gluto Naftil, Softenon, Noctosediv, Enterosediv, Entero-Sediv-Suspensio*

En 1965, el Dr. Sheskin en forma casual y durante la atención de un paciente con eritema nudoso leproso, que padecía de los característicos nódulos dolorosos en la piel y quien no podía conciliar el sueño por esta razón, decidió administrarle talidomida como sedante. El resultado fue sorprendente, luego de algunos días de administración el paciente descansó bien y los nódulos que tenía el enfermo desaparecieron, así como la hipertermia y mientras se le administró la talidomida los nódulos no reaparecieron. Esta observación casual hizo que la indicación se generalizara y miles de pacientes leprosos fueron medicados con esta droga. El efecto de la talidomida en el eritema nudoso de la lepra fue efectiva en el 90 % de los casos, hecho que fue confirmado en 1976 por la WHO.

Esta observación llevo a los investigadores a identificar otras propiedades de la talidomida, por las que fue reintroducido éste fármaco en la terapéutica mundial. (Baylor College of Medicine, 2004)

En 1965, investigadores llamaron la atención sobre los efectos de la talidomida en el cáncer avanzado, con relativo éxito en un paciente. Otros investigadores determinaron la eficacia de la talidomida en el tratamiento de úlceras múltiples en la boca, esófago, genitales y ano que forman parte del complejo de la enfermedad de Behcet y en las infecciones por HIV9/10 con cultivos negativos para el virus del herpes y los hongos.

También la talidomida demostró tener algunos efectos beneficiosos en la enfermedad crónica del injerto *versus* huésped, aunque sin ningún efecto sobre el rechazo del injerto; además se comunicaron efectos positivos en afecciones dermatológicas como el prurigo nodularis, el prurigo actínico, el eritema multiforme, el pioderma gangrenoso y otras afecciones generales como el lupus discoide eritematoso, la artritis reumatoide. En la enfermedad de Still, el sarcoma de Kaposi, la colitis ulcerosa y la neuralgia postherpética hubo resultados benéficos derivados de la respuesta a la talidomida.

En 1999 un estudio efectuado sobre 84 pacientes con mieloma múltiple refractarios al tratamiento quimioterapéutico mostró remisiones completas en dos casos, 10 % de remisión casi completa y en el 32 % una respuesta con disminución del 25 por ciento del nivel de paraproteína en el suero y de la cantidad de proteína de Bence Jones en orina. Estas respuestas fueron asociadas a una disminución del porcentaje de células plasmáticas en médula ósea que indicaron una reducción de la masa tumoral. Solamente un 55 % de los pacientes pudieron recibir la dosis máxima (800 mg diarios) estimada para el estudio, debido a la toxicidad evidenciada durante su administración. (Grosshans y Illy, 1984; [Stirling, 1988](#); [Ordi-Ros et al. 1988](#); [Tseng et al. 1996](#))

Es importante señalar que se necesitan en todas las situaciones estudios más prolongados y profundos, porque se han observado efectos colaterales, especialmente la aparición de una neuropatía axonal.

Estructura química.

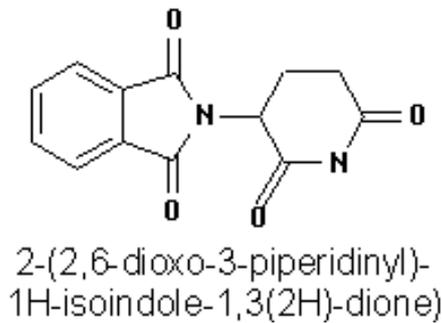


Figura 1. La molécula de talidomida consiste en 2 anillos amino uno es Phtalimida y el otro es glutarimida. La configuración de la talidomida consiste de 2 isómeros ópticos: isómero -R e isómero-S, estos al combinarse tienen una apariencia molecular como imagen de espejo con idénticas propiedades químicas. El isómero-S es responsable de la teratogenicidad de la talidomida.

Fórmula: $C_{13}H_{10}N_2O_4$; peso molecular: 258.23; Identificador químico internacional de IUPAC: InChI=1/C13H10N2O4/c16-10-6-5-9(11(17)14-10)15-12(18)7-3-1-2-4-8(7)13(15)19/h1-4,9H,5-6H2,(H,14,16,17).

Propiedades físicas: blanca, inodora, y de compuesto cristalino. (Thomas and Ducros, 1993; Mujagic, and Chabner, 2002)

Efectos de la talidomida

Aunque se desconoce su mecanismo exacto de acción, se ha determinado en varias investigaciones lo siguiente:

A). Propiedad antiinflamatoria.

- Promueve la inhibición de quimiotaxis, y la inhibición de la capacidad fagocítica de neutrófilos y macrófagos.
- Actúa sobre las células fagocíticas y endoteliales pero no sobre los linfocitos T.
- Promueve la disminución de la formación de edema en la escisión experimental de nervio isquiático en ratas (Schröder and Sellhaus, et al. 1995)
- Inhibe la síntesis de citocinas por los monocitos, especialmente el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), interferón gamma, la IL-6 y la IL-1 β . (Moreira and Sampaio, 1993; [Tseng et al., 1996](#); Corral et al. 1999; Verbon and Jufferman, 2000; Radomsky y Levine, 2001; [Calabrese y Fleischer, 2000](#); [Federman y Federman, 2000](#); Marriott et al. 2002; Majumdar et al. 2002; Kim and Kim, 2003; Greig

and Giordano, 2004; Kiaei and Petri, 2006; Bosch and Sánchez, 2008).

- Su efecto en FNT- α es mediado por la degradación de su RNAm, el cual no es completamente eliminado, pero su vida media es reducida de 30 a 17 minutos. (Corral et al. 1999; [Calabrese y Fleischer, 2000](#); Federman y Federman, 2000; [Radomsky y Levine, 2001](#))
- Favorece la producción de citocinas Th2 incluyendo IL-4, IL-5 e IL-10. No altera la producción de IL-1 e IL-6. (McHugh et al., 1995; [Tseng et al., 1996](#); George et al., 2000; Calabrese y Fleischer, 2000; George et al., 2000; Radomsky y Levine, 2001; Mujagic, and Chabner, 2002).
- Estudios llevaron al descubrimiento de dos sustancias análogas de la talidomida, que son los inhibidores de la fosfodiesterasa-4 que inhibe la producción del FNT α pero con pequeño efecto sobre la activación de las células T, y otra que no inhibe la fosfodiesterasa pero estimula fuertemente a las células T y la secreción de interferon- γ y la interleuquina-2. (Du et al., 2004; Zhang et al., 2005).

B). Propiedad inmunomoduladora, no inmunosupresora.

- Altera la expresión fenotípica de los leucocitos (*in vivo*)
- Tiene capacidad para modificar el fenotipo de las células T ayudadoras de Th1 (patrón proinflamatorio) a Th2 (patrón antiinflamatorio) en base al tipo de citocinas que producen. (Oliver et al., 2000).
- Funciona como coestimulador de células T, incluyendo capacidad para estimular la respuesta antiviral y citotoxicidad de células T CD8. (Corral et al. 1999; Dredge et al., 2002; Mujagic, and Chabner, 2002; Haslett et al. 2003; ; Kim and Kim, 2003; Schafer and Gandhi, 2003; Kiaei and Petri, 2006, Aragon-Ching et al. 2007; Bosch and Sánchez, 2008).

C). Propiedad antiangiogénica.

- Tiene capacidad para inhibir la producción del factor de crecimiento endotelio vascular (FCEV) y la inhibición del factor de crecimiento de los fibroblastos (FCF) que normalmente estimulan la angiogénesis. (Yabu, and Tomimoto, 2005; Aragon-Ching et al. 2007)
- Induce la adhesividad en las vénulas postcapilares por los lipopolisacáridos (Mujagic, and Chabner, 2002)

D). Reduce la fase de isquemia y los daños derivados del síndrome de reperfusión, mediante la inhibición de la síntesis FNT α en la Lesión traumática de médula espinal en conejos (Lee et al. 2007)

E). Propiedad antitumoral:

- En ratones por la propiedad de inhibir la angiogénesis (Ruddy and Majumdar, 2002; Yabu, and Tomimoto, 2005)
- Análogos de la talidomida inducen la apoptosis de las células tumorales (Aragon-Ching et al. 2007)
- En tumores prostáticos, rectales y pancreáticos de humanos (Marriott et al. 2003; Aragon-Ching et al. 2007)

F). Efectos antifibróticos:

- Observados en la fibrosis hepática experimental en ratas, por la propiedad de inhibir a el FNT y de HSC-T6 (Chong and Hsu, 2006).

Efectos secundarios adversos.

Es teratógena, una sola dosis en una mujer embarazada entre los 20 y 40 días de gestación, producen graves malformaciones al feto. La malformación más conocida es la ausencia de la mayor parte del brazo o de la pierna y la presencia de manitas en forma de aleta (focomelia).

Las deformidades en bebés afectados en el pasado, ocurrían con mayor frecuencia en ambos lados y a menudo tenían deformidades tanto en los brazos como en las piernas. En los casos más graves, los bebés carecieron por completo de miembros. Además se manifestaron deformidades en ojos, orejas, corazón, genitales, riñones y tracto digestivo (labios y la boca).

La talidomida puede provocar daños nervioso grave (neuropatía periférica) que puede resultar irreversible, después de que el paciente deje de tomar talidomida. Los síntomas incluyen sensación de quemazón, adormecimiento u hormigueo de los brazos, manos, piernas o pies. Otros efectos adversos pueden ser somnolencia y disminución de la capacidad para pensar con claridad. La talidomida puede interferir con la capacidad de conducción o el manejo de máquinas. También se detectó con menor frecuencia incremento de la sensibilidad de la piel a la luz solar, mareos, incoordinación, depresión respiratoria, disminución de la presión arterial y disminución de la frecuencia cardíaca, erupciones cutáneas, constipación, fiebre y tromboembolias. ([Stirling, 1988](#); [Tseng et al., 1996](#); [Radomsky y Levine, 2001](#); Matthews et al., 2003)

Indicaciones

- enfermedad de *Behcet* (tipo *vasculitis sistémica*) (Rustin, 1990; Thomas and Ducros, 1993, Perri III, 2004)
- eritema nodoso leproso (Tseng, 1996; Teo, 1999; Perri III, 2004; Yasui and Kobayashi, 2005)
- estomatitis aftosa (Tseng, 1996 ; Calabrese y Fleischer, 2000)
- Liquen plano (Dereure, 1996; Perri III, 2004;)
- sarcoma de *kaposi* (Gagnon, 1998)
- mieloma múltiple (Calabrese, 2000; Teo 2001; Yabu, and Tomimoto, 2005; Aragon-Ching et al. 2007; Kastritis and Dimopoulos, 2007). En combinación con dexametazona (Yuan and Hou, 2007) Con análogos: Lenalidomida y CC-4047 (Thomas and Richards, 2007; Kumar and Rajkumar, 2007; Bosch and Sánchez, 2008)
- cáncer de riñón, hígado y tiroides (Calabrese, 2000)
- tratamiento de úlceras aftosas (Tseng, 1996; Gagnon, 1998; Calabrese 2000; Perri III, 2004)
- lupus eritematoso sistémico (Walchhner, 2000)
- Hipoderma gangrenoso (Federman y Federman, 2000)
- enfermedad de injerto contra huésped crónica (Van de Poel, 2001)
- histiocitosis de células de *Langer hands* adultas (Mortazavi, 2002)
- Sarcoidosis (Perri, 2003)
- algunas enfermedades neurodegenerativas crónicas (Greig and Giordano, 2004)
- algunas manifestaciones de SIDA como caquexia, úlceras aftosas y sarcoma de Kaposi (Gagnon y Bruera, 1998; Guckian, 2000; Verbon, 2000; Krown, 2001; Aweeka and Trapnell, 2001; Bosch and Sánchez, 2008)
- tratamiento de úlceras en boca y faringe, y ganancia de peso en el SIDA (Perri, 2003; Franks, 2004)
- Cáncer de la médula ósea (Perri, 2003; Franks, 2004)
- neoplasias cerebrales primarias (Perri, 2003; Franks, 2004)
- artritis reumatoide
- infiltración linfocítica de la piel de *Jessner*
- enfermedad inflamatoria intestinal (enf. de *Crohn*)
- síndrome de *Sjogren*
- cáncer de hígado y tiroides ([Calabrese y Fleischer, 2000](#); Joglekar y Levin 2004).
- enfermedades neurodegenerativas crónicas (Greig et al., 2004).
- Melanoma con análogos de la talidomida: *Lenalidomide* (Aragon-Ching et al. 2007)

- tumores prostáticos, rectales y pancreáticos de humanos (Marriott et al. 2003; Aragon-Ching et al. 2007; Raia and Bertolini, 2007)
- Prurigo actínico (Thomas and Ducros, 1993)
- Hydroa vacciniforme
- Sarco idosis
- Enf. de las crioaglutininas
- Eritema multiforme
- Enf. de Jessner-Karof
- Leishmaniasis cutánea
- Pioderma gangrenoso
- Enf. de Weber-Christian
- Neuralgia postherpética (Thomas and Ducros, 1993)
- Mielodisplasia (Aragon-Ching et al. 2007)

Experimentalmente se ha usado en ratas para:

- inhibición de varios eventos de degeneración Valeriana (Schroder, 1995)
- prevención de retinopatía diabética (Bosco, 2003)
- prevención de daño hepático por lipopolisacáridos (Enomoto, 2003)
- prevención de cirrosis por tetracloruro de carbono (Muriel, 2003)
- disminución de hiperplasia en lesión arterial (Park, 2004)
- inhibición de pérdida ósea en periodontitis (Lima, 2004)
- Farmacodinamia (Huang, 2005)

Presentación comercial.

Es actualmente vendida como *Thalomid* por Celgene Corp. of Warren, N.Y. Envasada en capsulas de 50, 100 y 200 mg para vía oral. Se almacena a temperatura ambiente, lejos de humedad y calor excesivos. Autorizada por la FDA (Foods and Droug Administration) en 1998. El Dr. Frances Kelsey fue pieza clave para ello.



Figura 2. Presentaciones de talidomida en E.U.A. y México (respectivamente).

Otra presentación es *Talizer* tabletas de 100 mg. Laboratorios Serral. Para vía oral y de venta en México. (Mujagic, and Chabner, 2002)

En poco tiempo se contará con analogos de la droga que disminuyan al mínimo los temidos efectos teratógenos: EM8, CC-4047, CPS49, CG3033 y Lenalidomida (CC-5013).

La FDA a través de su programa regulatorio limita la prescripción, distribución y uso de la droga, el programa por medio del Sistema para la Educación, Prescripción y Seguridad de la talidomida requiere del registro del profesional médico y del paciente para la obligatoriedad del cumplimiento de las estrictas medidas anticonceptivas para hombres y mujeres en tratamiento con la talidomida.

Posología y Farmacocinética.

La **N-phthaloylglutamimide** fue sintetizada en 1954 por el Dr. Wilhem Kunz en los laboratorios Chemie Grunenthal de Alemania durante un programa de desarrollo de drogas antihistamínicas para el tratamiento de las alergias pero fue encontrada de poca actividad en ese campo, pero en cambio se determinó su efecto hipnótico. Cuatro años más tarde fue autorizada su venta en Alemania, Canadá e Inglaterra para aplicarla como sedante, con el "reconocimiento" de que dosis de 10.000 mg por kg., era inocua para la vida de las ratas en el laboratorio¹, de hecho nunca fue determinada su dosis letal. (Teo et al. 1999)

En humanos se administran dosis desde 50 mg/ kg. Hasta 800 mg./kg. En adultos no existe toxicidad aguda, una sobredosis fatal es virtualmente imposible (Teo, 2001; Radomsky y Levine, 2001; Mujagic, and Chabner, 2002)

La absorción de la talidomida en el tracto gastrointestinal es lenta (se absorbe el 90%), se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas después de 2.9 a 5.7 horas después de su administración oral. Los alimentos no afectan su absorción. Se distribuye ampliamente a través de líquidos y tejidos corporales y cruza fácilmente la barrera hematoencefálica. ([Stirling, 1988](#); [Radomsky y Levine, 2001](#); Majumdar et al. 2002; Bosch and Sánchez, 2008)

La mayor parte de la droga se metaboliza por vías no enzimáticas, por hidrólisis espontánea en tejidos y sangre. Una mínima cantidad se metaboliza en hígado por el sistema del citocromo P450 ([Tseng et al. 1996](#); [Stirling, 1988](#); [Radomsky y Levine, 2001](#); Teo et al. 2004).

El tiempo medio de eliminación es de 5 a 7 horas y no lo hace por vía renal; en orina se encuentra menos del 1 % de la droga. Los enantiómeros R- y S- de talidomida se interconvierten en plasma y se unen a proteínas 55% y 65%, respectivamente. (Tseng et al. 1996).

Su aplicación intravenosa en humanos es bien tolerada, la dilución en glucosa al 5 % resulta estable para los enantiómeros R- y S- por al menos 2 semanas a temperatura ambiente (Eriksson et al. 2000).

Se ha aplicado por vía intravenosa en ratones, conejos y ratas. Se detectaron diferencias farmacocinéticas interespecie relacionadas a diferencias en el metabolismo.

Un estudio de biodisponibilidad de talidomida administrada IV en ratas, sugiere que existe un equilibrio e intercambio rápido del compuesto entre sangre y cerebro, además que se excreta por vía hepatobiliar. (Chung et al. 2004; Huang et al., 2005)

Frecuencia	Vía	Dosis	Aplicación	Referencia
Dosis única, 24 y 48 hrs	IP	20 mg/kg	Reducción de la lesión por isquemia/reperfusión en la LTME	Lee et al, 2007
Dosis única	i.v.	5 mg/kg	Farmacodinamia	Huang et al., 2005
3 días antes y 2 después	oral	100 mg/kg/d	Inhibición hiperplasia en lesión arterial	Park et al., 2004
11 días	oral	5, 15, 45 o 90 mg/kg/d	Inhibición de pérdida ósea en periodontitis	Lima et al., 2004
3 meses	oral	200 mg/kg/d	Prevención de retinopatía diabética	Bosco et al., 2003
Dosis única	oral	5 mg/kg	Prevención de daño hepático por lipopolisacáridos	Enomoto et al., 2003
8 semanas	oral	200 mg/kg/12h	Prevención de cirrosis por tetracloruro de carbono	Muriel et al., 2003
10 - 15 días	oral	250 mg/kg/12h	Inhibición varios eventos en degeneración	Schroder et al., 1995

		Walleriana	
--	--	------------	--

Tabla 1. Dosis de talidomida. En ratas y conejos se han probado diferentes dosis y vías en diferentes modelos experimentales.

JUSTIFICACIÓN

No existen estudios que hayan evaluado el efecto de la talidomida en el curso de una Lesión Traumática de Médula Espinal.

Su capacidad para inhibir la producción de FNT- α , disminuir la respuesta inflamatoria aguda, controlar la permeabilidad vascular (al disminuir la producción de VEGF) y cambiar el fenotipo de células Th1 a Th2, nos sugiere que la talidomida puede contribuir de manera importante a la disminución del daño secundario que se presenta después de una LTME y en consecuencia funcionar como un neuroprotector efectivo.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la administración de la talidomida en la evolución de la Lesión Traumática de la Médula Espinal en ratas Long-Evans.

Objetivos Particulares

Determinar en médula espinal lesionada el efecto de la talidomida a dosis única temprana, dosis tardía y dosis repetidas sobre:

Contenido de agua

Inflamación aguda

Evaluación funcional

Evaluación de tejido medular preservado

HIPÓTESIS

La administración intraperitoneal de talidomida a ratas sometidas a Lesión Traumática de la Médula Espinal disminuirá el edema e infiltrado inflamatorio agudo en la zona de lesión, disminuirá la presencia de mieloperoxidasa y favorecerá la preservación de tejido medular, manifestándose en mejor evolución funcional.

Los resultados con dosis repetidas serán superiores a dosis únicas y de éstas será superior la temprana al compararla con la tardía.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Material biológico.

Se utilizaron ratas de la cepa Long-Evans adultas, de 14 a 15 semanas de edad, de 240 a 260 g de peso corporal, hembras, sanas y sin haber sido sometidas a ningún experimento previo.

La asignación de animales a los grupos de tratamiento en cada fase del experimento, se realizó en forma aleatoria.



Figura 3. Ratas de la cepa Long-Evans. Se utilizaron el menor número posible de animales y se evitó el sufrimiento innecesario.

Para la realización de esta investigación se tomaron en cuenta los lineamientos éticos y legales establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud, en materia de Investigaciones para la Salud (Título Séptimo: de la investigación que incluya la utilización de animales en experimentación).

Procedimiento quirúrgico y lesión de médula espinal.

La rata fue anestesiada con una mezcla de *Ketamina* 80 mg/Kg y *Xylazina* 8 mg/Kg, la aplicación fue intramuscular (biceps femoral) en el miembro pélvico en todas las fases, excepto en las ratas de la fase de Evaluación Funcional, en las que se aplicó en el músculo tríceps braquial en el miembro torácico, para no afectar la evaluación funcional BBB de los miembros pélvicos.

Anestesiada la rata, mediante técnica estéril se realizó una laminectomía a nivel T-9 que permitió visualizar la porción dorsal de la médula espinal con las meninges intactas.

Después el animal anestesiado se colocó y fijó de las apófisis espinosas cercanas a la laminectomía, en el impactador diseñado por la

Universidad de New York y se produjo una contusión dejando caer el pistón de punta roma, desde una altura de 25 mm sobre la médula expuesta con las meninges íntegras. No se aceptaron errores superiores al 3% en altura y velocidad.

Finalmente, el cierre quirúrgico se realizó suturando la herida quirúrgica por planos con sutura de Nylon de 3-0.

Este procedimiento no fue realizado en las ratas Naive que fungieron como testigos de normalidad.

Alojamiento y manejo médico.

Los animales lesionados se alojaron en jaulas individuales de acrílico, con aserrín estéril (3 cm. de altura), en un ambiente con temperatura y humedad controladas, en el bioterio de Proyecto Camina A.C.

Se les ofreció agua filtrada y alimento a demanda. Se manejaron 2 veces al día el intestino y la vejiga urinaria neurogénicos, con expresión manual, hasta la recuperación del automatismo (aproximadamente 2 semanas después de la lesión), se supervisó la herida quirúrgica y limpieza del pelaje, diariamente. A los 10 días fueron retirados los puntos de sutura.

Aquellos animales lesionados que vivieron 7 semanas postlesión, recibieron enrofloxacin por vía oral, durante 8 días postlesión y paracetamol por vía oral durante 3 días postlesión, a dosis recomendadas, para evitar dolor, autofagia e infecciones. También se les aplicó fisioterapia de movimiento (de bajo impacto), en los miembros pélvicos con riesgos de anquilosis.

La dosis de talidomida para cada rata, se preparó disolviendo 25 mg. de talidomida en polvo en 3 ml de solución salina fisiológica dentro de un Eppendorf y se administró por vía intraperitoneal, previo rasurado y embrocado de la pared abdominal.

Eutanasia.

La rata fue anestesiada mediante la aplicación de pentobarbital sódico inyectable, a una dosis de 60 mg/Kg por vía intraperitoneal (IP). Después de 5 minutos, se administró vía IP 1 ml de heparina inyectable. Se colocó a la rata anestesiada en decúbito dorsal sobre una rejilla, y fue fijada a la misma de las extremidades torácicas y pélvicas con ligas.

Se realizó una incisión por línea media en abdomen craneal, plano cutáneo y muscular, se ingreso a la cavidad abdominal. Se visualizó el apéndice Xifoides, se fijó y traccionó de suave, hasta lograr tensar al músculo diafragma, posteriormente se puncionó hasta llegar a la cavidad torácica, se realizó toracotomía esternal. Se retiró el pericardio

y se realizó el corte del vértice del corazón (2mm.), se introdujo un catéter metálico # 23 por la ventana cardiaca hacia el ventrículo izquierdo, hasta llegar al seno aórtico y al nacimiento de la arteria aorta; se fijó el catéter por pinzamiento, y se conectó el catéter a una bomba peristáltica, que bombeó 100 ml Solución Salina Fisiológica (SSF) a una velocidad de 10ml. /20 seg. (30ml. /min.), finalmente se realizó auriculotomía derecha para permitir el desangrado.



Figuras 4 y 5. Eutanasia y perfusión intracardiaca de la rata. El animal anestesiado fue colocado en una rejilla de acero, los miembros torácicos fueron fijados por medio de ligas.

Se mantuvo anestesiado al animal durante el proceso de desangrado. Una vez terminada esta fase se perfundió con 500 ml. de formol amortiguado, se alineó la cabeza, tronco y cola durante el proceso, para indurar al animal de forma correcta.

Después se realizó una laminectomía torácica y lumbar, y se extrajeron 3.5 cm de la médula espinal con meninges (la lesión al centro), se marcó con tinta china la porción caudal del órgano y se empapeló la médula extraída (para mantener su forma) y se guardó en formol amortiguado, en un frasco etiquetado.



Figura 6. Frascos con tejido medular extraído. La médula se empapeló para mantener su forma dentro de los frascos con formol amortiguado.

En la fase de evaluación del contenido de agua (edema), se requirió la decapitación de la rata, y la aplicación de la técnica de obtención rápida del segmento medular de 3 cm, para evitar modificaciones en el contenido de agua de la médula espinal en estudio, la muestra fue

inmediatamente pesada en la balanza analítica, para después ser llevada dentro de un Ependorf a un horno.

En la fase de inflamación aguda, para las pruebas de determinación de Mieloperoxidasa (MPO) y determinación proteínas totales se requirió únicamente perfundir a las ratas con 200 μ l. SS helada (Taoka et al., 1998), y la aplicación de la técnica de obtención rápida del segmento medular de 2.5 cm. La muestra se llevó inmediatamente a una charola de aluminio colocada sobre hielo seco (a una temperatura de -40° C), dentro de la cámara de congelación del criostato.

Diseño experimental.

Las evaluaciones que se realizaron fueron:

- Contenido de agua
- Inflamación aguda
- Evaluación funcional
- Evaluación de tejido medular preservado

Contenido de agua:

GRUPO	TRATAMIENTO	RANGO DE APLICACIÓN
1	talidomida dosis única temprana	100 mg/kg 10 min. postlesión IP
2	talidomida dosis única tardía	100 mg/kg 4 hrs. Postlesión IP
3	vehículo	3 ml. SS, 10 minutos postlesión IP
4	Naive	Sin tratamiento

Se evaluó a las 24 horas postlesión la magnitud del edema en la médula espinal en ratas de todos los grupos (n = 4).

Para determinar el contenido de agua se sacrificó a las ratas por decapitación e inmediatamente se obtuvo el segmento torácico de médula espinal de 3 cm. (La lesión al centro: segmento T9). En las ratas intactas se obtuvo el segmento con dimensiones idénticas con el segmento T9 al centro.

Se pesó el tejido medular inmediatamente después de ser extraído (peso húmedo), se colocó dentro de un Ependorf y después de

secarse en un horno a 57 ° C durante 6 horas, se pesó nuevamente (peso seco).

El cálculo del contenido de agua, se determinó de la siguiente forma:

$$\text{Contenido de agua} = \text{peso húmedo} - \text{peso seco}$$

Los valores obtenidos se analizaron utilizando una prueba de ANOVA de una vía seguida por la prueba de Tukey para identificar los grupos que pudieran estar dando diferencias, se consideró significativa una $P < 0.05$.

Inflamación aguda:

GRUPO	TRATAMIENTO	RANGO DE APLICACIÓN
1	talidomida dosis única temprana	100 mg/kg 10 min. postlesión IP
2	talidomida dosis única tardía	100 mg/kg 4 hrs. Postlesión IP
3	Vehículo	3 ml. SS, 10 minutos postlesión IP
4	Naive	Sin tratamiento

Se evaluaron 24 horas postlesión en ratas de todos los grupos ($n = 4$), midiendo:

A). La actividad de MPO en el tejido medular, como un indicador de la acumulación de neutrófilos en la zona lesionada y en las zonas craneal y caudal vecinas a la lesión.

Para ello, se perfundió a las ratas anestesiadas con 200 ml. SS helada (Taoka et al., 1998) hasta completar el desangrado, después se aplicó la técnica de obtención rápida del segmento medular de 2.5 cm., y la muestra se llevó inmediatamente dentro de la cámara de congelación del criostato, sobre una charola de aluminio colocada sobre hielo seco (a una temperatura de -40 ° C).

Posteriormente se procedió a la medición y corte de los segmentos medulares:

- Craneal a la lesión
- Lesión o epicentro
- Caudal a la lesión

(Cada segmento midió 0.5 cm. de longitud).

Cada segmento fue pesado en la balanza analítica, y se calculó 5 veces su volumen; la muestra fue almacenada dentro de un

Eppendorf etiquetado y se agregaron 5 volúmenes de amortiguador de fosfato de potasio, y 0.5% de detergente de cloruro de hexadecil trimetil amonio (Koji et al., 2000).

Después los segmentos fueron homogeneizados y almacenados dentro de la cámara de congelación del criostato a -20°C .

Los segmentos homogeneizados, fueron centrifugados después a $8,944 \times g$ ($10 \sim 700,000$) a 0°C .

Se tomaron alícuotas de $50 \mu\text{L}$ del sobrenadante de cada Eppendorf y fueron transportadas en un termo con hielo seco a -30°C , hasta el Instituto Nacional de Rehabilitación, en donde las muestras fueron congeladas a -70°C .

Se cumplieron 3 ciclos de congelación-descongelación durante el proceso.

Se realizó en el espectrofotómetro una curva de calibración de la enzima peroxidasa (curva de referencia) y se leyó a una longitud de onda de 460 nm ., en intervalos de 1 minuto, durante 25 minutos. En cubetas de 1 cm . de grosor (paso de luz) a temperatura ambiente

Se prepararon:

Reactivo 1.

Solución de reacción: 2.9 mL contienen: 50 mM de fosfato de sodio, 0.53 mM de dihidrocloruro de o- dianisidina y 0.15 mM de peróxido de hidrógeno (se mantuvo refrigerado a 3°C)

Reactivo 2.

Enzima de la peroxidasa de $5\text{U}/100 \text{ mL}$ de amortiguador de fosfato de potasio y amonio 0.5% de detergente de cloruro de hexadecil trimetil. (Alícuotas de $5 \mu\text{L}$ y congelado a -20°C)

Reactivo 3.

Amortiguador de fosfato de potasio, y 0.5% de detergente (cloruro de hexadecil trimetil amonio)

La curva de calibración se realizó, empleando el reactivo 2, para dilución seriada de 5 puntos con concentraciones de $5, 2.5, 1.25, 0.625$ y 0.312 U de la enzima peroxidasa/ 5 microlitros . (las concentraciones fueron puntos de la curva seriada)

Colocando en una gradilla 5 Eppendorf numerados del 1 al 5; en el Eppendorf 1 se colocaron 10 microlitros del reactivo 2 y en los 5 Eppendorf se colocaron 5 microlitros del reactivo 3. Luego se

pasaron del tubo 1 al tubo 2, 5 microlitros mezclando bien, del 2 al 3 otros 5 microlitros, y así sucesivamente hasta terminar los tubos.

Después en 5 celdillas a temperatura ambiente (cubetas) se colocaron 500 microlitros del reactivo 1 en cada una de ellas, y se agregan 5 microlitros de cada una de las diluciones, se mezclaron bien y leyeron inmediatamente en el espectrofotómetro.

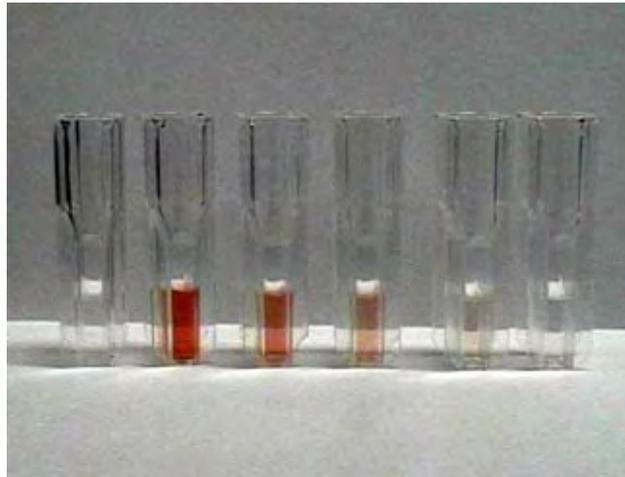


Figura 7. Colorimetría. La reacción inicia cuando la enzima se oxida con el peróxido de hidrogeno, después el sustrato se une a la MPO oxidada y conforma una estructura estable. Entonces la solución va intensificando de color, y la reacción colorimétrica es proporcional en cada celdilla, siendo determinada por la absorbencia.

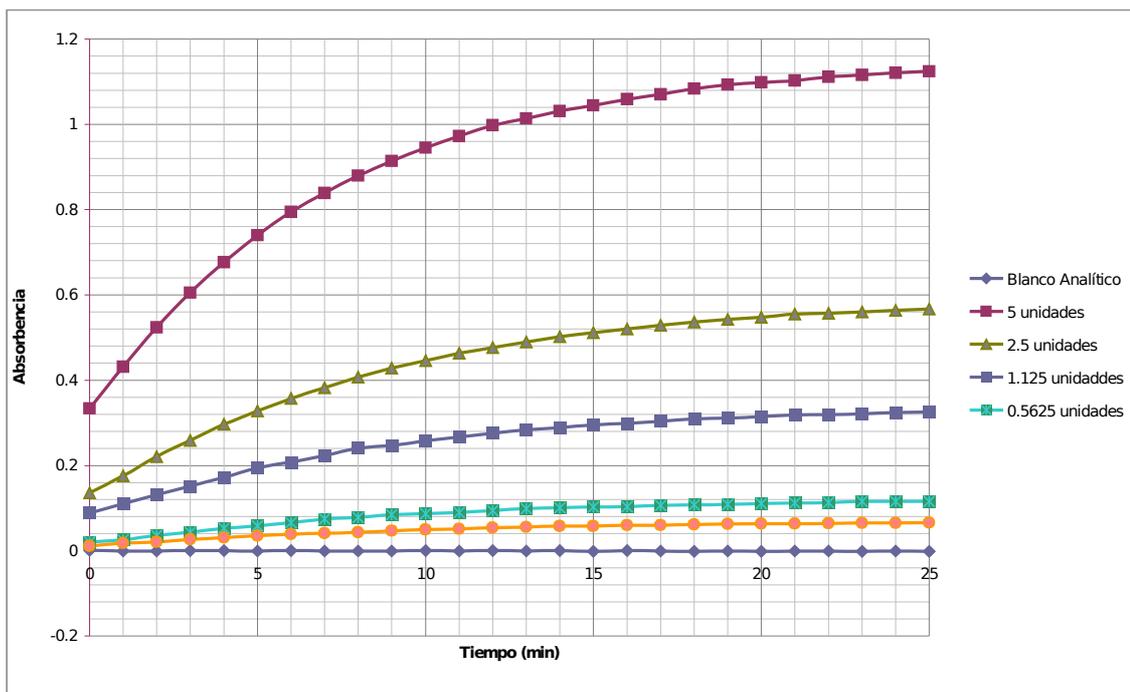


Figura 8. Curva de calibración de la actividad de MPO

Para las alícuotas obtenidas de los animales, se aplicó en cada celdilla 500 microlitros del reactivo 1 y 5 microlitros de la muestra problema, se mezclaron muy bien se leyeron a una longitud de onda de 460 nm., en intervalos de 1 minuto, durante 25 minutos, a temperatura ambiente.

Las absorbencias de las muestras problema se extrapolaron a la curva de calibración para determinar las U/microlitro.

Los resultados se expresaron en unidades por gramo de tejido medular. La actividad se calcula en base a una curva estándar preparada con mieloperoxidasa purificada (Taoka et al., 1998).

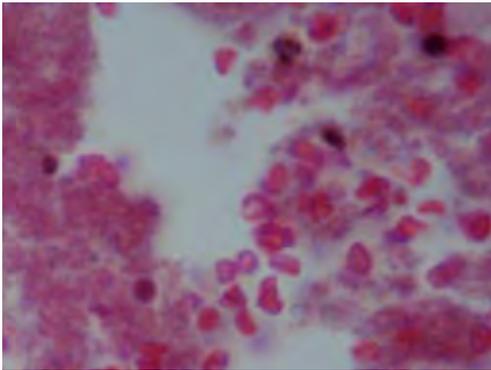
- B). Se determinó la cantidad de proteínas totales en el tejido medular en la zona lesionada y en las zonas craneal y caudal más próximas a la lesión. Empleando las mismas alícuotas obtenidas para la determinación de MPO, se realizó una curva de calibración (de referencia) en el espectrofotómetro con albúmina bovina (100 mg./mL., el método empleado fue de Lowry de alta sensibilidad.

# tubo	μL de PBS (amortiguador)	μL del estándar de albúmina bovina
0	50	0
2	48	2
3	46	4
4	44	6
5	42	8
6	40	10

En todas estas celdillas se colocó 50 μL y se conformó la solución A y a cada tubo se le agregó 400 μL de una solución de reacción colorimétrica. Y se mezclaron muy bien, se reposaron 15 minutos y se leyeron a una longitud de onda de 750 nm., y se determinaron en ng. de proteína/ mL

Se realizó el mismo procedimiento con las alícuotas de las muestras problema, obteniendo 7 μL de la alícuota, agregando 43 μL del PBS y finalmente agregando 400 μL de la solución de reacción, se reposaron 15 minutos y se leyeron a una longitud de onda de 750 nm., y se determinaron en ng. de proteína/ mL

- C). Se cuantificó la cantidad de polimorfonucleares en el tejido medular, en regiones del epicentro, craneal y caudal. Las evaluaciones se realizaron en cortes histológicos transversales de médula espinal de 8 micras, y teñidos con la técnica de hematoxilina de Harris.



Figuras 9 y 10. Fotografía digital de corte histológico de medula espinal lesionada tratada con talidomida 4 horas (4x). Epicentro (X) y 100 X (X). Una cámara digital fue colocada en el orificio triocular del microscopio y se conectó a una computadora personal, y se fotografió el material en 4 X para definir áreas necrótico-hemorrágicas y 100 X (0.02 mm²) para conteo de polimorfonucleares.

Se promedió la cantidad de neutrófilos en 10 campos 100 X consecutivos de las zonas necrótico-hemorrágicas de la región craneal del epicentro y caudal del epicentro (designados de forma aleatoria), y después se determinó la cantidad de éstas células inflamatorias a una distancia de 5 mm. en las regiones craneal y caudal al epicentro, debido a que en estas últimas regiones existía poco o nulo tejido necrótico, se evaluó todo el tejido medular y en el espacio subaracnoideo.

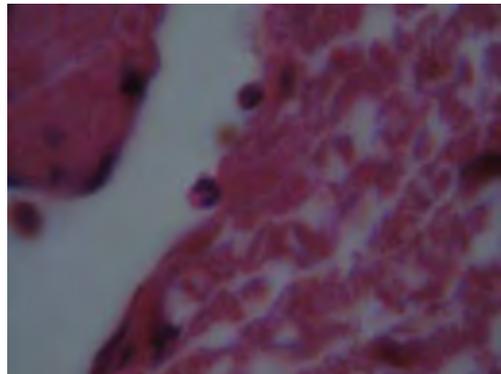


Figura 11. Fotografía digital de corte histológico de medula espinal lesionada tratada con Solución Salina 10 minutos postlesión 5 mm craneal al epicentro en donde se aprecia un polimorfonuclear en el espacio subaracnoideo

Los resultados de la determinación de MPO se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas, también seguida por la prueba de Tukey. Se considera significativa una $p < 0.05$.

Los valores obtenidos en las pruebas de cuantificación de polimorfonucleares y determinación de proteínas totales, se analizaron utilizando una prueba de ANOVA de una vía seguida por la prueba de Tukey para identificar los grupos que pudieran estar dando diferencias, se consideró significativa una $P < 0.05$.

Evaluación Funcional:

GRUPO	TRATAMIENTO	RANGO Y FRECUENCIA DE APLICACIÓN
1	talidomida dosis única temprana	(100 mg/kg 10 min. postlesión) IP
2	talidomida dosis única tardía	(100 mg/kg 4 hrs. postlesión) IP
3	talidomida dosis única tardía	(100 mg/kg 24 hrs. Postlesión) IP
4	talidomida repetidas dosis	(100 mg/kg/día por 5 días, iniciando 10 min. postlesión) IP
5	talidomida repetidas dosis	(100 mg/kg/día por 5 días, iniciando 4 hrs. postlesión) IP
6	talidomida repetidas dosis	(100 mg/kg/día por 5 días, iniciando 24 hrs. postlesión) IP
7	vehículo (SS-1)	(3 ml. SSF, 10 minutos postlesión) IP
8	vehículo (SS-2)	(3 ml. SSF, 10 minutos postlesión) IP

Se evaluaron 7 semanas postlesión en ratas de todos los grupos (n = 8)

Para la evaluación de la función motora se utilizó la prueba de habilidad locomotora a campo abierto (escala BBB) que evalúa el desempeño motor de las extremidades posteriores desde grado 0 (parálisis flácida total) hasta grado 21 (marcha normal). (Basso, Beattie y Bresnahan, 1996).

La evaluación BBB se realizó cada 7 días desde el segundo día postlesión hasta los 49 días, para determinar amplitud de movimiento de tobillo, rodilla y cadera, colocación plantar y soporte de peso de la pelvis, frecuencia de pasos y coordinación entre patas traseras y delanteras, alineación de la pata al dar el paso, separación de los dedos y posición de la cola.



Figuras 12 y 13. Evaluación BBB. Para la evaluación funcional de las ratas se colocaron a las ratas lesionadas sobre un cajón de madera, con superficie lisa, de 1.2 m² con bordes laterales de 20 cm. de altura. Se observó a la rata durante un período aproximado de 5 minutos.

El experimento se realizó en dos fases:

1ª: grupos 1, 2, 3 y 7

2ª grupos 4, 5, 6 y 8

Cada fase contó con un grupo testigo.

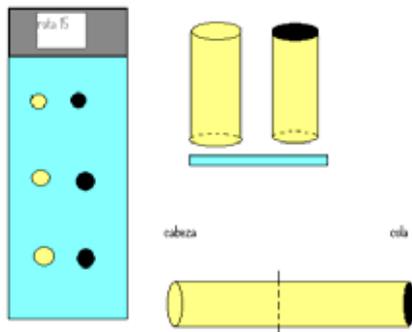
Los resultados semanales fueron obtenidos del promedio de ambos miembros pélvicos del animal lesionado. Posteriormente cada dato fue promediado con datos del mismo grupo de tratamiento.

Los valores obtenidos en esta fase se analizaron utilizando una prueba de ANOVA de medidas repetidas, seguida de una prueba de Tukey. Se consideró significativa una $P < 0.05$.

Evaluación de tejido medular preservado

GRUPO	TRATAMIENTO	RANGO DE APLICACIÓN
1	talidomida dosis única temprana	100 mg/kg 10 min. postlesión IP
2	talidomida dosis única tardía	100 mg/kg 4 hrs. Postlesión IP
3	vehículo	3 ml. SSF, 10 minutos postlesión IP
4	Naive (testigo)	Sin tratamiento

Se evaluaron 24 horas postlesión en ratas de todos los grupos (n = 4).



Figuras 14 y 15. Las evaluaciones se realizaron en cortes histológicos transversales de médula espinal de 8 micras, y teñidos con la técnica de hematoxilina de Harris. De cada médula espinal se obtuvieron 10 niveles, cada nivel tiene 4 cortes histológicos, se obtenía un nivel, y se tiraban 900 micras, y se tomaba nuevamente un nivel (4 cortes por cada mm.)



Figuras 16 y 17. Una cámara digital fue colocada en el orificio triocular del microscopio y se conectó a una computadora personal, y se fotografiaron 10 niveles 4 X por rata, para definir áreas de apariencia normal, áreas de apariencia normal con microquistes y áreas necrótico-hemorrágicas.

Para el estudio morfométrico se eligió un corte del centro de la médula espinal (el que tenga mayor cantidad de epéndimo). Se delimitaron las zonas de tejido preservado, moderadamente preservado y de tejido destruido.

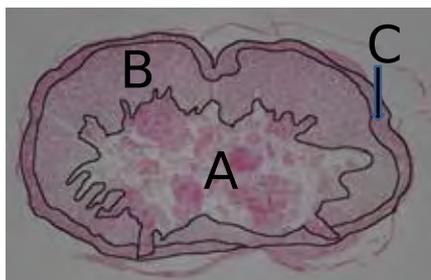


Figura 18. Fotografía digital del corte histológico (4x) de médula espinal de ratona lesionada tratada con talidomida 4 horas postlesión,

correspondiente al segmento medular T9; epicentro de la lesión. Se identificaron en el epicentro tres tipos de tejido diferentes: tejido necrótico hemorrágico, localizado principalmente en la sustancia gris y caracterizado por desintegración tisular, presencia de eritrocitos y células inflamatorias (zona A); tejido preservado con abundantes microquistes, localizado predominantemente en sustancia blanca entorno al tejido necrótico hemorrágico (zona B) y tejido preservado de aspecto normal, localizado predominantemente en la periferia de la médula (zona C).



Figura 19. Fotografía digital del corte histológico (4x) de médula espinal de rata lesionada tratada con talidomida 10 minutos postlesión, correspondiente al segmento medular T9; 6 mm caudal al epicentro de la lesión. Se identificaron en el epicentro dos tipos de tejido diferentes: una pequeña área de tejido necrótico hemorrágico (centro), localizado principalmente en la sustancia blanca y cerca de la sustancia gris. Caracterizado por desintegración tisular, presencia de eritrocitos; y tejido preservado de aspecto normal que ocupaba la mayor parte de la superficie del corte histológico.

Para hacer las mediciones se usan laminillas con impregnación argéntica en un sistema computarizado de morfometría compuesto de: un microscopio de campo claro con objetivo 4 X, una cámara digital colocada en el orificio triocular del microscopio, conectada a una computadora personal y el programa para análisis de imágenes Image-Pro-Plus de Media Cybernetics 4.1. (Figura X)

Los valores obtenidos en las pruebas de cuantificación de polimorfonucleares y determinación de proteínas totales, se analizaron utilizando una prueba de ANOVA de una vía seguida por la prueba de Tukey para identificar los grupos que pudieran estar dando diferencias, se consideró significativa una $P < 0.05$.

RESULTADOS

Contenido de agua.

Los segmentos medulares con mayor contenido de agua, fueron las de ratas lesionadas tratadas con Solución Salina (SS), la diferencia fue significativa $P < 0.05$ respecto al segmento medular de ratas intactas.

Mientras que la cantidad de agua en los segmentos medulares de ratas tratadas con talidomida 4 horas y talidomida 10 minutos, es solo ligeramente superior a la de los segmentos medulares de ratas intactas. (Figura 20)

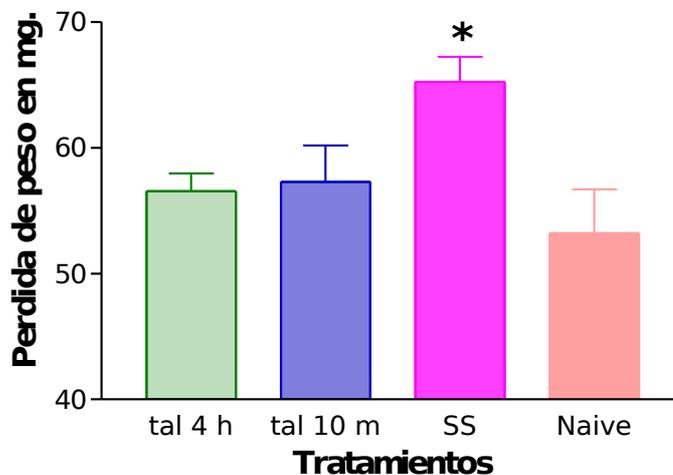


Figura 20. Representación gráfica del contenido de agua (diferencia de peso entre tejido húmedo y seco) en los segmentos medulares de ratas. Media \pm Error Estándar (ES). N=4. *, $P < 0.05$ entre SS y Naive. Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); médulas intactas (Naive).

El peso húmedo y el peso seco de los tejidos medulares, esta detallado en forma gráfica en las figuras 45 y 46 contenidas en la sección de anexos.

Inflamación Aguda.

A). Determinación de la actividad enzimática de la MPO.

Las médulas lesionadas de ratas tratadas con talidomida 4 horas mostraron mayor actividad no significativa de MPO en relación a la cantidad de proteínas por gramo de tejido, en los segmentos del epicentro, y craneal y caudal al epicentro con respecto a los mismos segmentos de las médulas lesionadas del grupo tratado con SS.

Las médulas lesionadas de ratas tratadas con talidomida 10 minutos mostraron menor actividad de MPO en relación a la cantidad de proteínas por gramo de tejido, en el segmento craneal al epicentro, en relación al mismo segmento en el grupo tratado con SS. No hubo diferencias con el grupo testigo en los segmentos del epicentro y caudal al epicentro.

Las médulas lesionadas de ratas tratadas con SS mostraron mayor actividad de MPO en relación a la cantidad de proteínas por gramo de tejido, la diferencia fue significativa $P < 0.001$ en los segmentos del epicentro y craneal al epicentro; y una tendencia mayor no significativa en el segmento caudal al epicentro con respecto a las médulas de ratas intactas. (Figura 21)

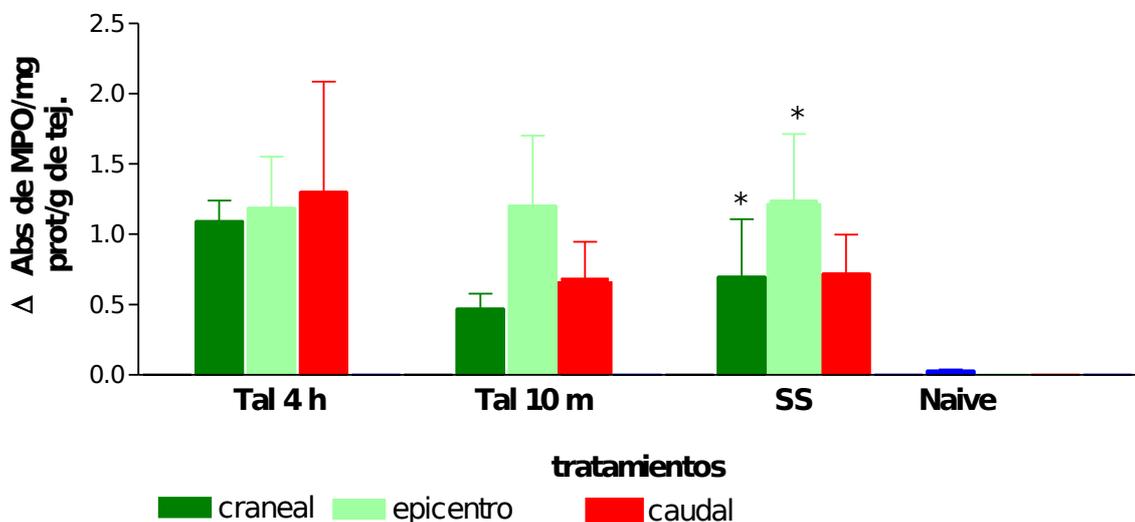


Figura 21. Representación gráfica de la actividad de MPO en relación a la cantidad de proteínas totales por gramo de tejido medular. Delta representa la diferencia en Absorbencia entre el principio y el final de la reacción enzimática para cada uno de los segmentos (epicentro, craneal y caudal al epicentro) en los diferentes grupos de tratamiento.* $P < 0.001$ vs naive. $N=4$. Media \pm Error Estándar(ES). Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión medular +

Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); médulas intactas (Naive).

El delta de MPO, la determinación de mg de proteínas/ gramo de tejido medular y la absorbencia de MPO, están detallados en forma gráfica en las figuras 47, 48, 49 y 50 contenidas en la sección de anexos.

B) infiltrado de polimorfonucleares:

En la zona necrótica hemorrágica del epicentro se contaron en promedio un polimorfonuclear por campo de 0.02 mm² en las ratas tratadas con SS y dosis única de talidomida 10 minutos después de la lesión, mientras que en las ratas tratadas con talidomida a 4 horas de la lesión el promedio de polimorfonucleares encontrados fue de aproximadamente la mitad. En el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas

(Figura 22)

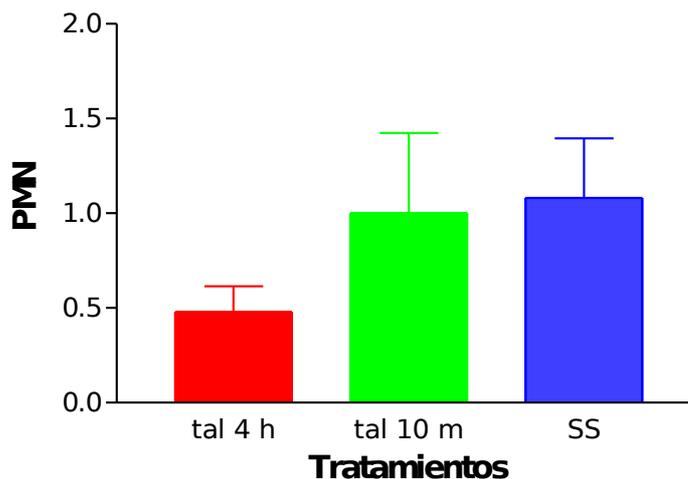


Figura 22. Representación gráfica del promedio de polimorfonucleares por campo 100 X (0.02 mm²) en la zona necrótica del epicentro medular de ratas. N=4. Media \pm Error Estándar (ES). Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); médulas intactas (Naive).

Al evaluar la superficie medular a 5 mm. en sentido craneal y caudal al epicentro, no se encontraron polimorfonucleares en la médula espinal de ratas lesionadas, sin importar el tratamiento. Sin embargo, si se encontraron polimorfonucleares en el espacio subaracnoideo.

Las médulas con mayor cantidad de polimorfonucleares en el espacio subaracnoideo fueron las de ratas lesionadas tratadas con Solución Salina. Las que mostraron menor cantidad de éstas células fueron las ratas tratadas con talidomida dosis única 4 horas después de la lesión. Las ratas tratadas con talidomida 10 minutos postlesión quedaron en una posición intermedia. Este patrón se observó tanto en los cortes obtenidos a 5 mm. craneal, como a 5 mm caudal al epicentro. Las diferencias no fueron significativas en el estudio estadístico (Figura 23)

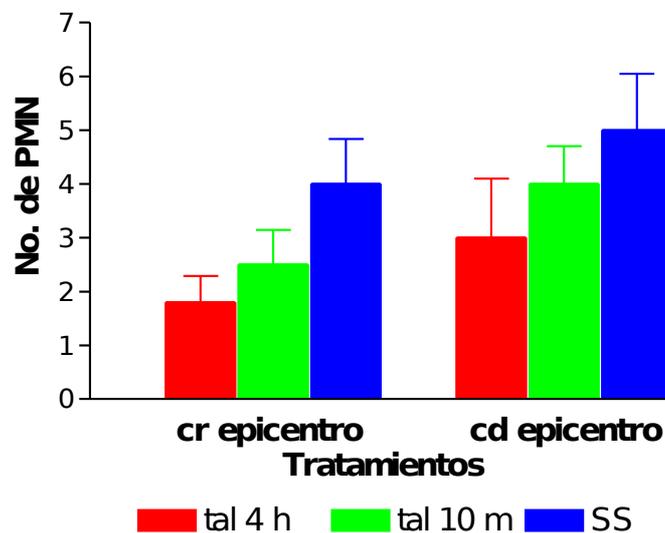


Figura 23. Representación gráfica del promedio de polimorfonucleares en el espacio subaracnoideo 5 mm. craneal y 5 mm. caudal al epicentro en médulas de ratas. N=4. Media \pm Error Estándar (ES). Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS).

Evaluación Funcional.

Las ratas lesionadas tratadas con talidomida 10 minutos dosis única, obtuvieron resultados funcionales significativamente más bajos ($P < 0.01$) respecto a las ratas tratadas con Solución Salina-1.

Las ratas lesionadas tratadas con talidomida 4 horas dosis única mostraron una evolución significativamente mayor ($P < 0.05$) que las ratas lesionadas tratadas con talidomida 10 minutos dosis única.

Las ratas lesionadas tratadas con talidomida 4 horas dosis única y talidomida 24 horas dosis única postlesión no mostraron diferencias significativas con respecto a los grupos testigo. (Figura 24)

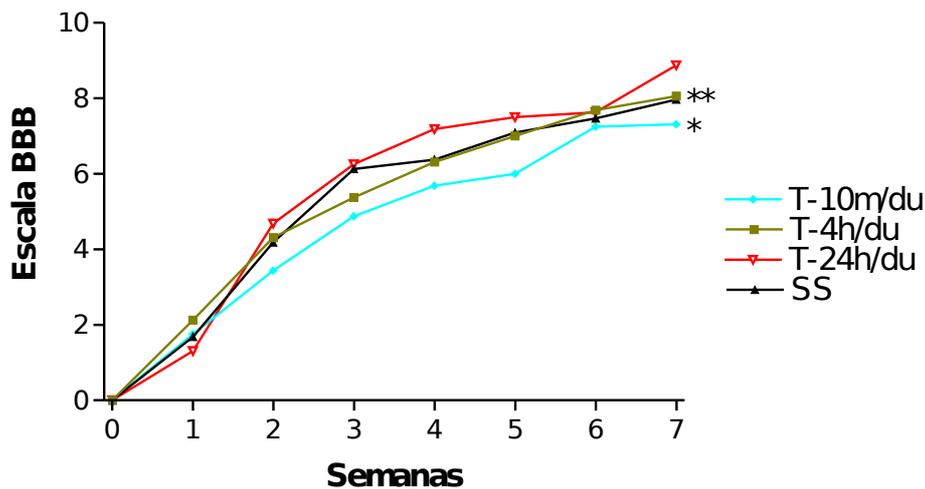


Figura 24. Representación gráfica de la evolución funcional (escala BBB) durante un período de 7 semanas de ratas lesionadas tratadas con talidomida con dosis única. *, $P < 0.01$ entre SS y T-10m/du; **, $P < 0.05$ entre T-4 h/du y T-10m/du. N=8, Lesión medular + talidomida IP 10 minutos/dosis única postlesión (T-10m/du); Lesión medular + talidomida IP 4 horas/ dosis única postlesión, (T-4 h/du); Lesión medular + talidomida IP 24 horas/dosis única postlesión (T-24h/du); .Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS).

Las ratas lesionadas tratadas con talidomida 10 minutos 5 días continuos, mostraron una evolución significativamente mayor ($P < 0.01$) que las ratas lesionadas tratadas con talidomida 24 horas 5 días continuos.

Las ratas lesionadas tratadas con talidomida a dosis 10 minutos, 5 días continuos y talidomida 4 horas, 5 días continuos postlesión no mostraron diferencias significativas con respecto a los grupos testigo. (Figura 25)

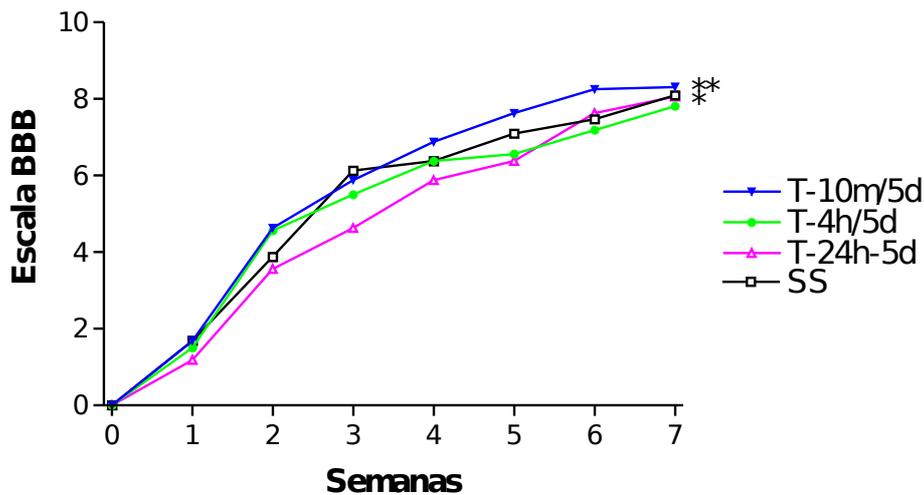


Figura 25. Representación gráfica de la evolución funcional (escala BBB) de ratas lesionadas tratadas con dosis repetidas durante 5 días continuos durante un período de 7 semanas. *, $P < 0.05$ entre SS-1 y T-24h/5d; **, $P < 0.01$ entre T-10m/5d y T-24h/5d. $N=8$, Lesión medular + talidomida IP 10 minutos/dosis repetida 5 días continuos postlesión (T-10m/5d); Lesión medular + talidomida IP 4 horas/ dosis repetida 5 días continuos postlesión, (T-10m/5d); Lesión medular + talidomida IP 24 horas/dosis repetida 5 días continuos postlesión (T-24h/5d); .Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS-1 y SS-2).

Se realizó una comparación entre tratamientos con dosis única y tratamientos con dosis repetidas en 5 días continuos, lográndose observar que las ratas lesionadas tratadas con talidomida 10 minutos, 5 días continuos, obtuvieron una mayor evolución significativa ($P < 0.001$) que las ratas lesionadas con talidomida 10 minutos dosis única.

Las ratas lesionadas tratadas con talidomida 24 horas dosis única postlesión, resultaron tener una evolución significativamente mayor ($P < 0.001$) que las ratas lesionadas tratadas con talidomida 24 horas 5 días continuos postlesión dosis única. (Figura 26)

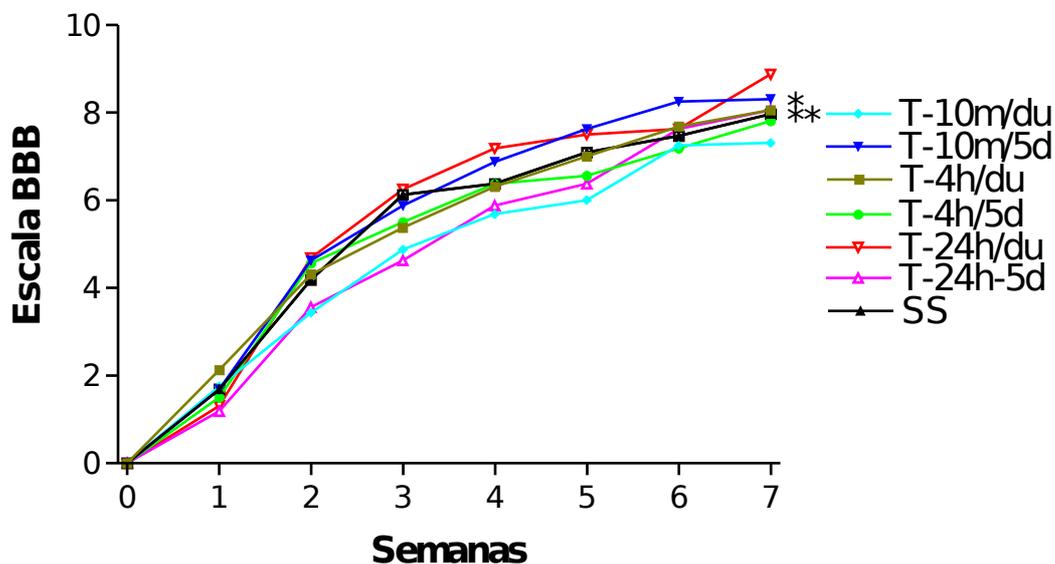


Figura 26. Representación gráfica de la evolución funcional (escala BBB) de ratas lesionadas tratadas con talidomida con dosis únicas y dosis repetidas (5 días consecutivos) durante un período de 7 semanas. *, $P < 0.001$ entre T-10m/5d y T-10m/du; **, $P < 0.001$ entre T-24h/5d y T-24h/du. N=8, Lesión medular + talidomida IP 10 minutos/dosis única postlesión (T-10m/du); Lesión medular + talidomida IP 4 horas/ dosis única postlesión, (T-10m/du); Lesión medular + talidomida IP 24 horas/dosis única postlesión (T-24h/du); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos/dosis repetida 5 días continuos postlesión (T-10m/5d); Lesión medular + talidomida IP 4 horas/ dosis repetida 5 días continuos postlesión, (T-10m/5d); Lesión medular + talidomida IP 24 horas/dosis repetida 5 días continuos postlesión (T-24h/5d); .Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS-1 y SS-2).

Tejido Preservado

Epicentro.

El área de tejido necrótico hemorrágico y el área de tejido preservado con microquistes son muy parecidas entre sí, sin importar el grupo de tratamiento. Mientras que el área de tejido preservado con apariencia normal es de aproximadamente la mitad de las áreas antes señaladas. Notablemente el área total de corte del epicentro de las ratas tratadas con talidomida muestra una tendencia a ser mayor que el área de corte de las ratas naive al mismo nivel, y alcanza significancia estadística ($P < 0.05$) en las ratas tratadas con talidomida 4 horas.

Al comparar las áreas de tejido de aspecto normal, preservado con microquistes, y necrótico hemorrágico entre los diferentes grupos de tratamiento, no se encontraron diferencias estadísticas. (Figura 27)

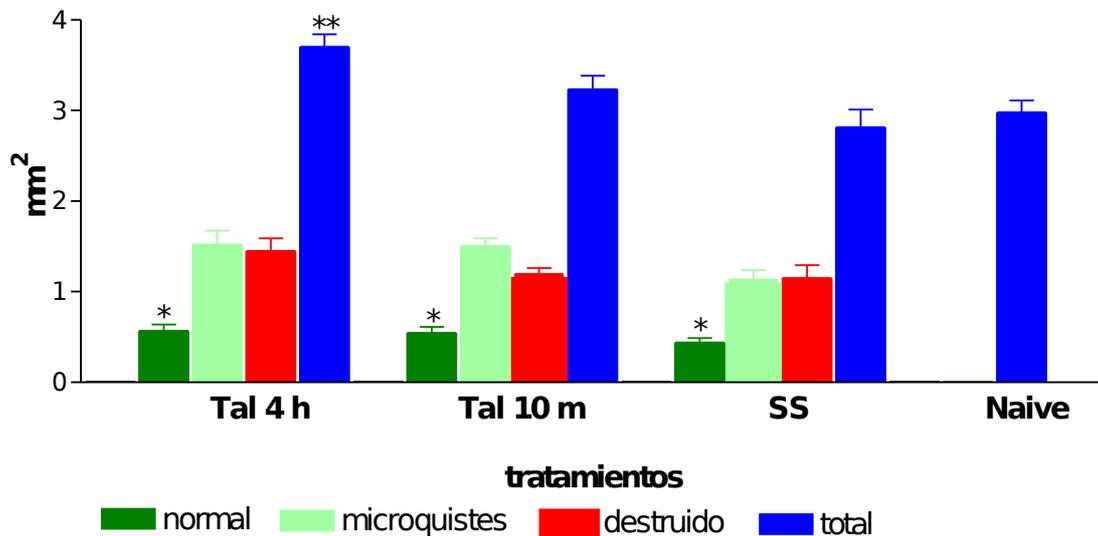


Figura 27. Representación gráfica de morfometría de acuerdo a características del tejido medular en el epicentro (mm^2). *, $P < 0.05$ tal 4 h vs Naive \pm Error Estándar (ES). N=4. Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); intactas (Naive).



Figura 28. Fotografía digital del corte histológico (4x) de médula espinal de rata lesionada tratada con talidomida 4 horas postlesión, correspondiente al segmento medular T9; epicentro de la lesión.

El área de tejido necrótico hemorrágico y el área de tejido preservado con apariencia normal son muy parecidas entre sí, en los grupos de tratamiento de Talidomida 10 minutos y SS. Mientras que el área de tejido necrótico hemorrágico y el área de tejido preservado con microquistes son muy similares entre sí en el grupo de tratamiento de talidomida 4 horas. El área total de corte de 2 mm craneal al epicentro de las ratas tratadas con talidomida muestran una tendencia no significativa a ser mayores que el área de corte de las ratas naive al mismo nivel.

Al comparar las áreas de tejido de aspecto normal, preservado con microquistes, y necrótico hemorrágico entre los diferentes grupos de tratamiento, no se encontraron diferencias estadísticas. (Figura 28)

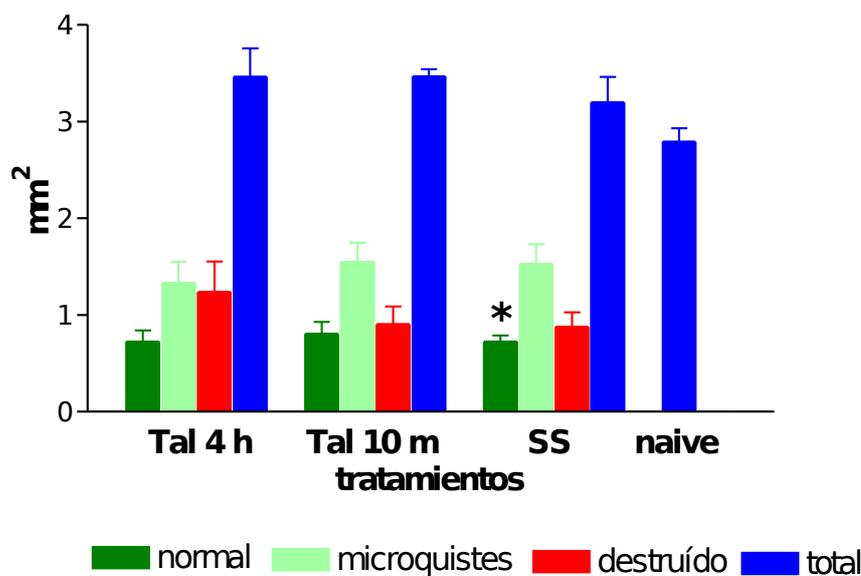


Figura 29. Representación gráfica de morfometría de acuerdo a características del tejido medular 2 mm. craneal al epicentro (mm^2). \pm Error Estándar (ES). N=4. Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); intactas (Naive).



Figura 30. Fotografía digital del corte histológico (4x) de médula espinal de rata lesionada tratada con talidomida 4 horas postlesión, correspondiente al segmento medular T9; 2 mm craneal del epicentro de la lesión

El área de tejido necrótico hemorrágico y el área de tejido preservado con apariencia normal son muy parecidas entre sí, en los grupos de tratamiento de Talidomida 10 minutos y SS. Mientras que el área de tejido necrótico hemorrágico y el área de tejido preservado con microquistes son muy similares entre sí en el grupo de tratamiento de talidomida 4 horas. El área total de corte de 2 mm caudal al epicentro de las ratas tratadas con talidomida 4 horas muestran una tendencia significativa mayor ($P < 0.001$) que el área de corte de las ratas naive al mismo nivel.

Al comparar las áreas de tejido de aspecto normal, preservado con microquistes, y necrótico hemorrágico entre los diferentes grupos de tratamiento, no se encontraron diferencias estadísticas. (Figura 29)

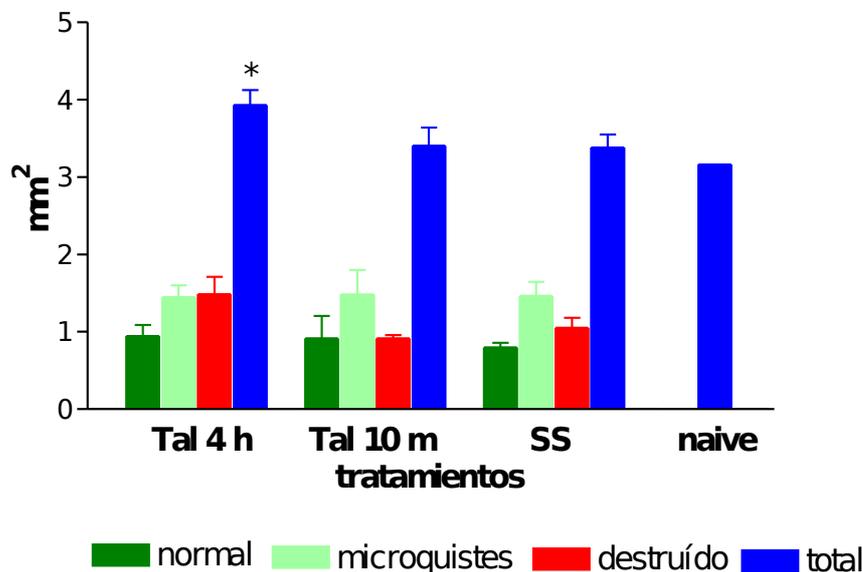


Figura 31. Representación gráfica de morfometría de acuerdo a características del tejido medular 2 mm. caudal al epicentro (mm^2). *, $P < 0.001$ tal 4 h respecto Naive \pm Error Estándar (ES). N=4. Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión

medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); intactas (Naive).



Figura 32. Fotografía digital del corte histológico (4x) de médula espinal de rata lesionada tratada con talidomida 10 minutos postlesión, correspondiente al segmento medular T9; 2 mm caudal del epicentro de la lesión

Se observó que el área de tejido preservado de apariencia normal en los grupos es muy similar sin importar el tratamiento, a 4 mm. craneal al epicentro.

El área de tejido necrótico hemorrágico en todos los grupos de tratamiento es aproximadamente la sexta parte del tejido preservado de apariencia normal a 4 mm craneal al epicentro. Siendo el grupo de talidomida 4 horas el que obtuvo una ligera tendencia mayor no significativa de tejido necrótico hemorrágico con respecto a los otros grupos de tratamiento.

Al comparar las áreas totales de tejido medular no se encontraron diferencias estadísticas. El grupo talidomida 4 horas presentó una tendencia mayor de tejido medular total con respecto a los otros grupos de tratamiento, a 4mm. craneal al epicentro. (Figura 30)

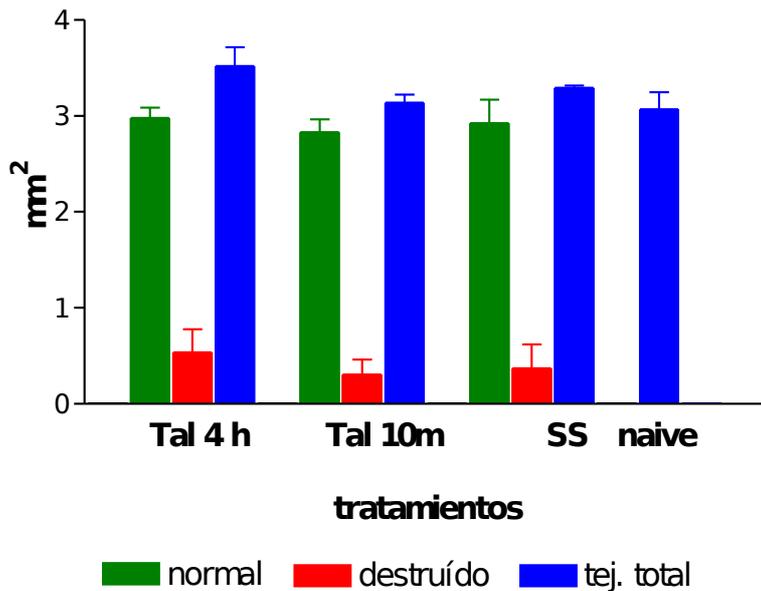


Figura 33. Representación gráfica de morfometría de acuerdo a características del tejido medular 4 mm. craneal al epicentro (mm^2). \pm Error Estándar (ES). N=4. Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); intactas (Naive).



Figura 34. Fotografía digital del corte histológico (4x) de médula espinal de rata lesionada tratada con talidomida 10 minutos postlesión, correspondiente al segmento medular T9; 4 mm craneal del epicentro de la lesión
Se observó que el área de tejido preservado de apariencia normal en los grupos es muy similar sin importar el tratamiento, a 4 mm. caudal al epicentro.

El área de tejido necrótico hemorrágico en todos los grupos de tratamiento es aproximadamente la sexta parte del tejido preservado de apariencia normal a 4 mm caudal al epicentro. Siendo el grupo de talidomida 4 horas el que obtuvo una ligera tendencia mayor no significativa de tejido necrótico hemorrágico con respecto a los otros grupos de tratamiento.

Al comparar las áreas totales de tejido medular no se encontraron diferencias estadísticas. El grupo talidomida 4 horas y SS presentaron una tendencia mayor de tejido medular total con respecto a los otros grupos de tratamiento, a 4mm. caudal al epicentro. (Figura 31)

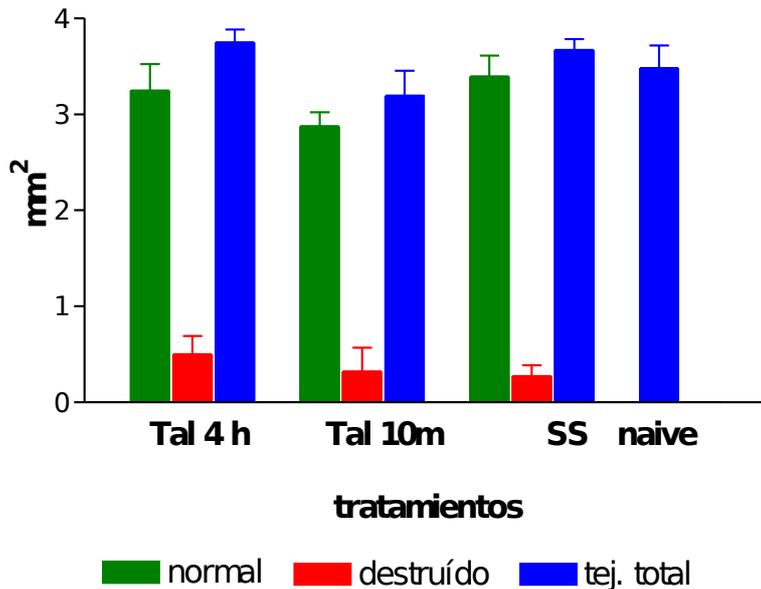


Figura 35. Representación gráfica de morfometría de acuerdo a características del tejido medular 4 mm. caudal al epicentro (mm^2). \pm Error Estándar (ES). N=4. Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); intactas (Naive).



Figura 36. Fotografía digital del corte histológico (4x) de médula espinal de rata lesionada tratada con talidomida 10 minutos postlesión, correspondiente al segmento medular T9; 4 mm caudal del epicentro de la lesión

El área de tejido preservado de apariencia normal en los grupos es muy similar sin importar el tratamiento, a 6 mm. craneal al epicentro.

El área de tejido necrótico hemorrágico en todos los grupos de tratamiento es muy reducida respecto al área de tejido preservado de apariencia normal a 6 mm craneal al epicentro. Siendo el grupo de talidomida 4 horas el que obtuvo una ligera tendencia mayor no significativa de tejido necrótico hemorrágico con respecto a los otros grupos de tratamiento.

Entre las áreas totales de tejido medular no se encontraron diferencias estadísticas. El grupo talidomida 4 horas y SS presentaron una tendencia significativa mayor ($P < 0.05$) de tejido medular total con respecto al grupo Naive, a 6 mm. craneal al epicentro. (Figura 32)

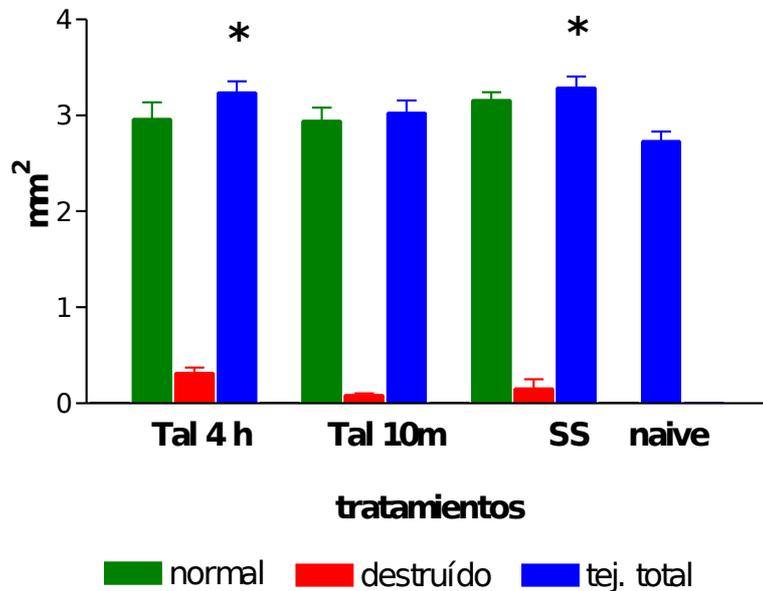


Figura 37. Representación gráfica de morfometría de acuerdo a características del tejido medular 6 mm. craneal al epicentro (mm^2).*, $P < 0.05$ tal 4 h y SS respecto Naive, \pm Error Estándar (ES). $N=4$. Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); intactas (Naive).



Figura 38. Fotografía digital del corte histológico (4x) de médula espinal de rata lesionada tratada con SS 10 minutos postlesión, correspondiente al segmento medular T9; 6 mm craneal del epicentro de la lesión

El área de tejido preservado de apariencia normal en los grupos es muy similar sin importar el tratamiento, a 6 mm. caudal al epicentro.

El área de tejido necrótico hemorrágico en todos los grupos de tratamiento es muy reducida respecto al área de tejido preservado de apariencia normal a 6 mm caudal al epicentro. Siendo el grupo de

talidomida 4 horas el que obtuvo una ligera tendencia mayor no significativa de tejido necrótico hemorrágico con respecto a los otros grupos de tratamiento.

Entre las áreas totales de tejido medular no se encontraron diferencias estadísticas. El grupo talidomida 4 horas presentó una tendencia no significativa mayor de tejido medular total con respecto al grupo Naive, a 6 mm. caudal epicentro. (Figura 33)

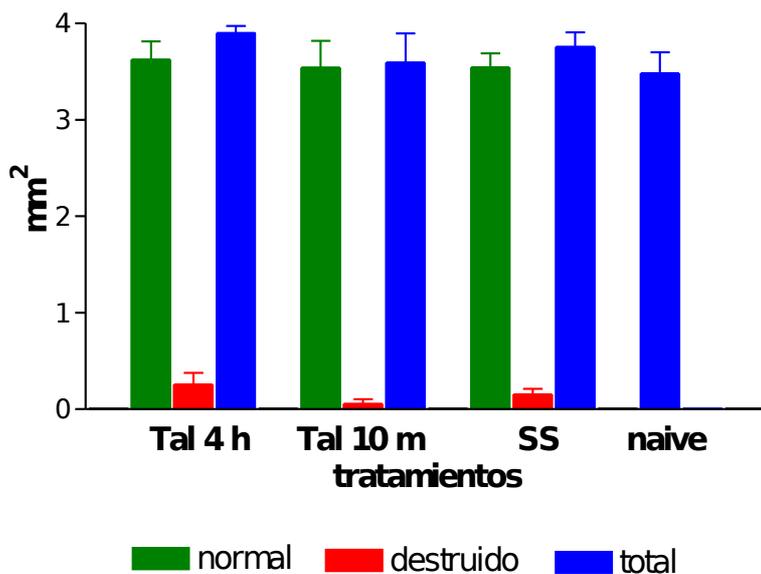


Figura 39. Representación gráfica de morfometría de acuerdo a características del tejido medular 6 mm. caudal al epicentro (mm^2). \pm Error Estándar (ES). N=4. Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); intactas (Naive).



Figura 40. Fotografía digital del corte histológico (4x) de médula espinal de rata lesionada tratada con SS 10 minutos postlesión, correspondiente al segmento medular T9; 4 mm caudal del epicentro de la lesión

El área de tejido preservado de apariencia normal en los grupos es muy similar sin importar el tratamiento, a 8 mm. craneal al epicentro.

El área de tejido necrótico hemorrágico en todos los grupos de tratamiento es mínima respecto al área de tejido preservado de apariencia normal a 8 mm craneal al epicentro. Siendo el grupo SS el que obtuvo una ligera tendencia mayor no significativa de tejido necrótico hemorrágico con respecto a los otros grupos de tratamiento.

Entre las áreas totales de tejido medular no se encontraron diferencias estadísticas. Los grupos tratados con talidomida mostraron una tendencia no significativa mayor de tejido medular total con respecto al grupo SS y Naive, a 8 mm. craneal epicentro.

(Figura 34)

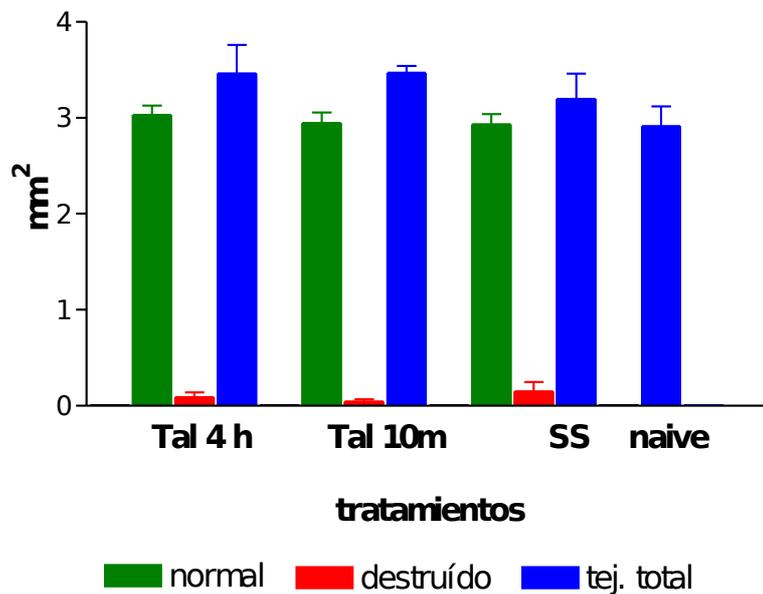


Figura 41. Representación gráfica de morfometría de acuerdo a características del tejido medular 8 mm. craneal al epicentro (mm^2). \pm Error Estándar (ES). N=4. Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); intactas (Naive).



Figura 42. Fotografía digital del corte histológico (4x) de médula espinal de rata lesionada tratada con talidomida 10 minutos postlesión, correspondiente al segmento medular T9; 8 mm craneal del epicentro de la lesión

El área de tejido preservado de apariencia normal en los grupos es muy similar sin importar el tratamiento, a 8 mm. craneal al epicentro.

El área de tejido necrótico hemorrágico en todos los grupos de tratamiento es mínima respecto al área de tejido preservado de apariencia normal a 8 mm craneal al epicentro. Siendo el grupo con talidomida 4 horas el que obtuvo una ligera tendencia mayor no significativa de tejido necrótico hemorrágico con respecto a los otros grupos de tratamiento.

Entre las áreas totales de tejido medular no se encontraron diferencias estadísticas. Los grupos mostraron tendencias similares, sin importar el tratamiento, a 8 mm. craneal epicentro. (Figura 35)

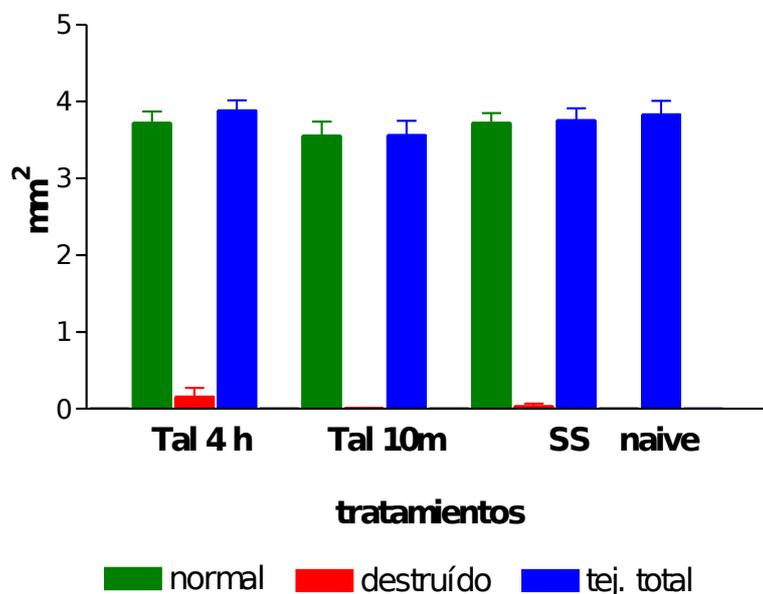


Figura 43. Representación gráfica de morfometría de acuerdo a características del tejido medular 8 mm. caudal al epicentro (mm^2). \pm Error Estándar (ES). N=4. Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); intactas (Naive).



Figura 44. Fotografía digital del corte histológico (4x) de médula espinal de rata lesionada tratada con talidomida 10 minutos

postlesión, correspondiente al segmento medular T9; 8 mm caudal del epicentro de la lesión

DISCUSIÓN

El objetivo general de este experimento fue evaluar el efecto de la administración de la talidomida en la evolución de la LTME en ratas, y se planteó determinar el efecto a dosis única temprana, dosis tardía y dosis repetidas sobre:

a). El contenido de agua:

Nesic y cols. (2002) mostraron que en la fase de los mecanismos secundarios de lesión en la LTME, se induce un incremento en la expresión de citocinas y quimiocinas, quienes a su vez estimulan a células endoteliales para mediar la unión de células inflamatorias (neutrófilos, monocitos y células T) lo que exacerba la pérdida celular.

Diversas células del sistema nervioso pueden liberar diferentes factores de permeabilidad vascular ante diferentes situaciones patológicas. Entre estos factores uno de los más estudiados es el llamado Factor de Permeabilidad Vascular (FPV/FCEV) que se considera idéntico al Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (FCEV) ambos de la familia de proteínas que favorecen la angiogénesis.

En la LTME se desarrollan diversos acontecimientos fisiopatológicos, entre los más importantes destaca la formación del edema vasogénico, el cual ha sido correlacionado con la desmielinización axonal. Vaquero y cols. (2004) sugieren que existe correlación positiva entre los niveles de FPV/FCEV y el edema tisular en cerebro. Más tarde en un modelo experimental de LTME severa, determinó niveles pico de FPV/FCEV a las 8 horas postlesión, manteniéndose estos niveles durante los 7 primeros días postlesión y que después disminuyeron en forma progresiva, coincidiendo con lo acontecido con el edema vasogénico. También sugiere que una de las causas del edema después de una LTME es la reacción astrogliar y la consecuente expresión de FPV/FCEV por los astrocitos reactivos, macrófagos y otras células presentes en el tejido nervioso traumatizado.

En el experimento las ratas del grupo testigo mostraron un incremento del contenido de agua en el tejido medular lesionado (edema), fenómeno que coincide con reportes de este proceso patológico básico desde hace aproximadamente un siglo (Allen 1911).

En contraste, los animales de grupos tratados con talidomida 10 minutos y con talidomida 4 horas postlesión, mostraron un menor contenido de agua en el tejido medular lesionado, en relación con las

ratas del grupo testigo. Incluso su contenido de agua fue ligeramente mayor que el grupo de las ratas intactas.

El efecto de disminución del edema en la LTME, derivado de la administración de talidomida a dosis temprana (10 min. p.l.) y dosis tardía (4 hrs. P.l.), evaluado a 24 horas postlesión en ratas, coincide con estudios previos, en donde se ha reportado la capacidad de la talidomida para disminuir el edema en otros tejidos como: piel, boca, faringe, tiroides, hígado, páncreas, intestino, riñón, próstata, nervios periféricos, entre otros y dentro de otras condiciones patológicas. Debido a la capacidad del fármaco para inhibir la síntesis del FCEV y la inhibición de la síntesis del factor de crecimiento de los fibroblastos (FCF) y probablemente la inhibición de la síntesis del FPV/FCEV (Schröder and Sellhaus, et al. 1995; [Tseng et al., 1996](#); Corral et al. 1999; Verbon and Jufferman, 2000; Radomsky y Levine, 2001; [Calabrese y Fleischer, 2000](#); [Federman y Federman, 2000](#); Marriott et al. 2002; Majumdar et al. 2002; Greig and Giordano, 2004; Yabu, and Tomimoto, 2005; Kiaei and Petri, 2006; Aragon-Ching et al. 2007).

b). El proceso inflamatorio agudo,

Actividad de Mieloperoxidasa (MPO).

La determinación de la actividad de la MPO es una prueba empleada con mucha frecuencia como un indicador de inflamación aguda, inclusive en estudios de LTME (Bradley et al. 1982; Carlson et al. 1998; Shah-Hinan Ahmed et al. 2000; Toru Fujimoto et al. 2000; Fernández y Esteban, 2000; Herbert et al. 2001; Bao et al. 2004; Erman et al. 2004; Genovese et al 2005; Bao et al. 2006).

En estudios previos, en patologías distintas a la lesión medular, se ha demostrado que la talidomida es un potente inhibidor de la inflamación aguda. ([Tseng et al., 1996](#); Corral et al. 1999; Verbon and Jufferman, 2000; Radomsky y Levine, 2001; [Calabrese y Fleischer, 2000](#); [Federman y Federman, 2000](#); Marriott et al. 2002; Majumdar et al. 2002; Greig and Giordano, 2004; Kiaei and Petri, 2006).

Los grupos de Talidomida 4 horas, Talidomida 10 minutos y solución salina postlesión mostraron mayor actividad de MPO con respecto al grupo Naive. Evidenciando una mayor actividad de polimorfonucleares 24 horas después de la lesión traumática de la médula espinal.

El grupo de tratamiento con talidomida a dosis temprana (10 minutos postlesión) no mostró efecto en la actividad de la MPO en los segmentos del epicentro, ni tampoco en los segmentos craneal y caudal al epicentro.

El grupo con talidomida a dosis tardía (4 horas postlesión) no mostró efecto alguno en la actividad de la MPO en la zona del epicentro de

la lesión, comparando esto con el grupo testigo. Sin embargo, en los segmentos craneal y caudal al epicentro si hubieron efectos ya que en ambos se incrementaron los niveles de la MPO, donde probablemente este fármaco incrementó la síntesis de la enzima por parte de los polimorfonucleares y macrófagos.

Si consideramos que la actividad de la MPO únicamente refleja la presencia/actividad de los PMN, nuestros resultados entonces sugieren que el infiltrado inflamatorio en la zona del epicentro no es influenciado por la talidomida a dosis temprana o tardía, mientras que en zonas alejadas al epicentro (consideradas como “zona de penumbra”) si son susceptibles de modificarse por influencia de este fármaco. Es importante tomar en cuenta que existen otras fuentes de MPO, además de los PMN en las zonas de neuroinflamación, como los macrófagos y la microglía (García, 1998).

Estudios previos reportan la capacidad de la talidomida para inhibir la quimiotaxis, y la inhibición de la capacidad fagocítica de neutrófilos y macrófagos en otros tejidos y condiciones patológicas. Sin embargo en LTME no se observó tal capacidad con los esquemas de tratamiento empleados en este experimento (Moreira and Sampaio, 1993; [Tseng et al., 1996](#); Corral et al. 1999; Verbon and Jufferman, 2000; Radomsky y Levine, 2001; [Calabrese y Fleischer, 2000](#); [Federman y Federman, 2000](#); Marriott et al. 2002; Majumdar et al. 2002; Kim and Kim, 2003; Greig and Giordano, 2004; Kiaei and Petri, 2006; Bosch and Sánchez, 2008).

Otras investigaciones determinaron que la talidomida no altera la producción de IL-1 e IL-6, que son citocinas muy proinflamatorias, probablemente en LTME sucedió lo mismo. (Kopf et al. 1995; McHugh et al., 1995; [Tseng et al., 1996](#); George et al., 2000; Calabrese y Fleischer, 2000; George et al., 2000; Radomsky y Levine, 2001; Mujagic, and Chabner, 2002).

Los datos permiten deducir que a pesar de aplicar diferentes esquemas de tratamiento con talidomida durante los primeros minutos u horas después de la LTME, no existió efecto sobre la cantidad de polimorfonucleares en la zona de lesión.

Cantidad de PMN.

En el experimento se observó la ausencia de polimorfonucleares en los segmentos craneal y caudal al epicentro, y por otro lado fueron ubicados en forma abundante en las áreas necrótico-hemorrágicas en el segmento del epicentro de la lesión. Esto coincide con otros estudios realizados en LTME en ratas por Carlson et al. (1998) en donde se reporta que los polimorfonucleares se concentraron preponderantemente en la zona de lesión y que se denotó una ausencia de polimorfonucleares en el “área de penumbra”. Por lo

que se deduce que la ausencia de polimorfonucleares en los segmentos craneal y caudal a la lesión, no es un efecto de la administración temprana o tardía de talidomida.

La administración tardía (4 horas) de talidomida postlesión mostró un efecto de disminución de la cantidad de polimorfonucleares en la zona de lesión, y en las zonas craneal y caudal al epicentro en la médula espinal, resultados que coinciden con los mostrados en estudios realizados por Yasui and Kobayashi, (2005) en eritema nodoso leproso y mieloma múltiple en donde se sugiere que la talidomida inhibe la activación de los polimorfonucleares y la proliferación de éstos ([Tseng et al., 1996](#); Radomsky y Levine, 2001; [Calabrese y Fleischer, 2000](#); [Federman y Federman, 2000](#)).

La administración temprana (10 minutos) de talidomida postlesión no mostró efecto sobre la cantidad de polimorfonucleares en la zona de lesión y en las zonas craneal y caudal al epicentro en la médula espinal, deduciéndose que la talidomida no incide sobre la cantidad de polimorfonucleares cuando es aplicada pocos minutos después de la LTME.

A pesar de que no se identificaron PMN en el parénquima medular de la porción craneal y caudal al epicentro de las médulas lesionadas, la actividad de la MPO en estas mismas regiones se encontró muy elevada respecto a las ratas naive. Parte de esta actividad puede estar relacionada con el infiltrado de polimorfonucleares en el espacio subaracnoideo (tomando en cuenta que para el estudio de la actividad de la enzima se incluyó el saco dural con todo su contenido), pero seguramente también refleja actividad de las otras células como los macrófagos y microglia mencionados anteriormente.

C). Evaluación funcional (BBB):

Dosis única:

La administración temprana a los 10 minutos postlesión de talidomida postlesión produjo un nivel menor de evolución funcional de la LTME en relación con el grupo tratado con SS. Realizando un análisis comparativo de los 7.3 grados en promedio, obtenidos por este grupo de tratamiento en la escala BBB a la séptima semana postlesión de evaluación, con respecto a los más de 8 grados en promedio del grupo testigo (SS), podemos inferir que la administración de talidomida en los primeros minutos postlesión produce un efecto desfavorable para la evolución apropiada de la LTME en ratas.

Nuestros datos sugieren que la inhibición temprana del proceso inflamatorio, no es adecuada para la evolución funcional de la LTME, coincidiendo con lo reportado por Steit y cols. (1997) que demostró que la expresión transitoria de las citocinas proinflamatorias implicadas en los mecanismos secundarios de lesión, como lo son TNF α , IL-1 β , IL-6 pudieran favorecer la recuperación funcional después de una LTME, y ellos concluyen que al inhibirlas no necesariamente se brindarían efectos beneficiosos en la reparación de la herida y la regeneración celular.

La administración tardía de talidomida a las 4 horas y a las 24 horas postlesión, no mostraron efecto en la evolución funcional de la LTME en ratas.

Dosis continuas:

La administración de talidomida temprana (10 minutos) y tardía (4 horas y 24 horas) con dosis repetidas (5 días continuos) postlesión no mostraron efecto en la evolución funcional de la LTME en ratas

Al realizar una comparación entre tratamientos con dosis única y con dosis repetidas, se concluyó que la administración temprana postlesión con dosis repetidas, obtuvo mejores resultados que la administración temprana dosis única postlesión. Infiriéndose que solo en este caso, la administración temprana de talidomida dosis única produce un efecto desfavorable en la evolución de la lesión traumática de la médula espinal, que puede ser revertido si la talidomida es administrada durante 5 días continuos.

La fase inflamatoria aguda ha sido responsabilizada del proceso de lesión neurológica secundaria de la médula espinal después de un traumatismo. (Lazarov-Spiegler, 1998) Este experimento demuestra que el proceso inflamatorio no es del todo malo para la restauración neurológica, el hecho es que la contención temprana de la inflamación en la médula espinal lesionada, obstruye los beneficios posibles que pueda brindar el proceso inflamatorio.

Los resultados de nuestro experimento contrastan con los resultados obtenidos por Lee y Kim, en 2007 con un modelo experimental de

lesión de la médula espinal por isquemia/reperfusión, mediante la compresión (mediante clip vascular) de la aorta caudal durante 15 minutos en conejos, ellos administraron talidomida IP a dosis única (temprana postlesión) y dosis repetida (24 horas y 48 horas postlesión), en ambos grupos se obtuvieron resultados en la evaluación funcional significativamente mejores que los testigos, ellos determinaron finalmente que la administración de talidomida brindaba efectos benéficos para la recuperación funcional de la lesión por isquemia y síndrome de reperfusión en la médula espinal en conejos.

Se concluye que la lesión originada por el modelo experimental de isquemia/ reperfusión, genera una lesión de menor intensidad y de menor extensión, ya que solo se restringió el riego sanguíneo durante 15 minutos mediante un clip vascular en la aorta caudal, en cambio en la LTME La isquemia aunada al edema, la inflamación y la hemorragia, dificultan o impiden la perfusión de la médula espinal sobre todo en las primeras 2 horas posteriores al evento traumático, período en el que la sustancia gris es más vulnerable, debido a que presenta una mayor demanda metabólica provocando que la necrosis traumática sea más severa. Además existe un daño mecánico primario resultante de la aplicación de una fuerza mecánica, que provoca distorsión provocada por el impacto, aplastamiento, estiramiento, desgarre y/o laceración tisular, que provocan una pérdida de las características estructurales y funcionales del parénquima medular, que no existió en el modelo experimental realizado en conejos.

D). tejido medular preservado:

La administración temprana a los 10 minutos postlesión y tardía a las 4 horas postlesión de talidomida no mostraron efecto alguno en la preservación de tejido medular en el sitio del epicentro de la lesión.

Sin embargo la administración tardía de talidomida a las 4 horas postlesión, si determinó un efecto desfavorable, ya que promovió una mayor cantidad de tejido necrótico-hemorrágico en los segmentos: 2, 4, y 6 mm craneal al epicentro y 2, 4, 6 y 8 mm caudal al epicentro.

La administración temprana de talidomida a los 10 minutos postlesión no mostró ningún efecto en la preservación de tejido en los 8 mm craneales y caudales a la lesión.

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos con la aplicación temprana de talidomida fueron:

- Efecto de disminución del edema en la médula espinal lesionada
- Efecto de disminución del infiltrado inflamatorio agudo craneal a la lesión
medular, pero sin efecto en las zonas del epicentro y caudal epicentro.
- Efecto desfavorable para la evolución funcional de la LTME
- Sin efecto en la preservación de tejido medular en las zonas del epicentro, craneal y caudal al epicentro

Se concluye que la administración de talidomida a los 10 minutos postlesión no es adecuada para una evolución funcional de la LTME en ratas.

Los datos obtenidos con la aplicación tardía de talidomida fueron:

- Efecto de disminución del edema en la médula espinal lesionada
- Incrementa la síntesis de MPO en macrófagos y microglía
- Efecto de disminución de PMN en el sitio del epicentro y en los segmentos craneal y caudal al epicentro en el espacio subaracnoideo
- Sin efecto para la evolución funcional de la LTME
- Sin efecto en la preservación de tejido medular en la zona del epicentro, y efecto desfavorable que promovió una mayor cantidad de tejido necrótico-hemorrágico en zonas craneal y caudal al epicentro.

Se concluye que la administración de talidomida a las 4 horas postlesión no es adecuada para una evolución funcional de la LTME en ratas.

Después de evaluar de forma integral los resultados se concluye que la administración de talidomida, no promueve efectos favorables para la recuperación de la LTME en ratas.

REFERENCIAS

1. Akiyama C, Yuguchi T, Nishio M, Tomishima T, Fujinaka T, Taniguchi M, Nakajima Y, Kohmura E, Yoshimine T. Src family kinase inhibitor PP1 reduces secondary damage after spinal cord compression in rats. *J Neurotrauma* 2004; 21: 923-931
2. Aragon-Ching J.B., Li H., Gardner E.R., Figg W.D. Thalidomide Analogues as Anticancer Drugs. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* 2007 June ; 2(2): 167-174.
3. Aweeka F., Trapnell C., Chernoff M., Jayewardene A., Spritzler J., Bellibas S. E., MD, Lizak P., Jacobson J., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of thalidomide in HIV patients treated for oral aphthous ulcers: ACTG protocol 251. *J Clin Pharmacol* 2001;41:1091-1097.
4. 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.* 2004. 126: 285-295.
5. Bartholdi D, Schwab ME. Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 1422-1438.
6. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol* 1996; 139: 244-256.
7. Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F, Marcillo AE, Loo K, Green J, Dietrich WD. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor- α production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 1999; 16: 851-863.
8. Bosch ME, Sánchez AJ, Rojas FS, Ojeda CB. Recent advances in analytical determination of thalidomide and its metabolites. *J Pharm Biomed Anal.* 2008 Jan 7;46(1):9-17. Epub 2007 Oct 9.
9. Bosco AA, Lerario AC, Santos RF, Wajchenberg BL. Effect of thalidomide and rosiglitazone on the prevention of diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 2003; 46: 1669-1675.
10. Calabrese L, Fleischer AB. Thalidomide: current and potential clinical applications. *Am J Med* 2000; 108: 487-495.

11. Casella GT, Marcillo A, Bunge MB, Wood PM. New vascular tissue rapidly replaces neural parenchyma and vessels destroyed by a contusion injury to the rat spinal cord. *Exp Neurol* 2002; 173: 63-76.
12. Chong LW, Hsu YC, Chiu YT, Yang KC, Huang YT. Anti-fibrotic effects of thalidomide on hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci*. 2006 May; 13 (3): 403-18.
13. Chung F, Lu J, Palmer BD, Kestell P, Browett P, Baguley BC, Tingle M, Ching LM. Thalidomide pharmacokinetics and metabolite formation in mice, rabbits, and multiple myeloma patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5949-5956.
14. Cobbs CS, Chen J, Greenberg DA, Graham SH. Vascular endothelial growth factor expression in transient focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci Lett* 1998; 249: 79-82.
15. Corral L. G., Haslett P. A. J., Muller G. W., Chen R., Wong L., Ocampo C.J., Patterson R.T., Stirling D.I., Kaplan G. Differential Cytokine Modulation and T Cell Activation by Two Distinct Classes of Thalidomide Analogues That Are Potent Inhibitors of TNF- α . *The Journal of Immunology*, 1999, 163: 380-386.
16. Cuzzocrea S., Genovese T., Mazzon E., Crisafulli C., Min W., Di Paola R., Muià C., Li J., Esposito E., Bramanti P., Xu W., Massuda E., Zhang J., Wang Z. PARG activity mediates post-traumatic inflammatory reaction after experimental spinal cord trauma. *JPET Fast Forward*. 2006 10 1-28
17. Das G.D., Das K.G., Brasko J., Rai P., Rajeswari V. Spinal traumas: some postoperative complications in experimental animals. *Brain Res Bull*. 1989. 22:33-37.
18. Dereure O, Basset-Seguin N, Guilhou JJ. Erosive lichen planus: dramatic response to thalidomide. *Arch Dermatol* 1996; 132: 1392-1393.
19. Díaz R.M.A. Efecto de la ciclosporina-A sobre la expresión y actividad de la sintetasa del óxido nítrico en tejido medular lesionado de rata. Tesis Doctorado. 2003. México.
20. Du W, Hattori Y, Hashiguchi A, Kondoh K, Hozumi N, Ikeda Y, Sakamoto M, Hata J, Yamada T. Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and its alteration by thalidomide treatment. *Pathol Int* 2004; 54: 285-294.

21. Earnhardt JN, Streit WJ, Anderson DK, O'Steen WA, Nick HS. Induction of manganese superoxide dismutase in acute spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2002; 19: 1065-1079.
22. Enomoto N, Takei Y, Hirose M, Kitamura T, Ikejima K, Sato N. Protective effect of thalidomide on endotoxin-induced liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 27: 25-65.
23. Eriksson T, Bjorkman S, Roth B, Hoglund P. Intravenous formulations of the enantiomers of thalidomide: pharmacokinetic and initial pharmacodynamic characterization in man. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52: 807-817.
24. Faden I. Recent pharmacological advances in experimental spinal injury. *Trends Neurosci.*1983.375-377
25. Federman GL, Federman DG. Recalcitrant pyoderma gangrenosum treated with thalidomide. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 842-844.
26. Fernández J., Esteban A. Detección de marcadores de inflamación ¿Es útil en alergia a medicamentos? *Alergol Inmunol Clin* 2000; 15 (Ext. 2):162-169
27. García M.O.H. Roche N.P., Flores S.R.M. Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: mieloperoxidasa. *Rev Cubana Invest Biomed.* 1998; 17 (3): 190-197.
28. Genovese T, Mazzon E, Esposito E, Di Paola R, Caminiti R, Meli R, Bramanti P, Cuzzocrea S. Effect of thalidomide on signal transduction pathways and secondary damage in experimental spinal cord trauma. *Shock.* 2008 Jan 9
29. George A, Marziniak M, Schafers M, Toyka KV, Sommer C. Thalidomide treatment in chronic constrictive neuropathy decreases endoneurial tumor necrosis factor-alpha, increases interleukin-10 and has long-term effects on spinal cord dorsal horn met-enkephalin. *Pain* 2000; 88: 267-275.
30. Greig NH, Giordano T, Zhu X, Yu QS, Perry TA, Holloway HW, Brossi A, Rogers JT, Sambamurti K, Lahiri DK. Thalidomide-based TNF-alpha inhibitors for neurodegenerative diseases. *Acta Neurobiol Exp.* 2004. 64: 1-9.
31. Grosshans E, Illy G. Thalidomide therapy for inflammatory dermatoses. *Int J Dermatol* 1984; 23: 598-602.

32. Guckian M., Dransfield I., Hay P., Dalgleish A. G. Thalidomide analogue CC-3052 reduces HIV1 neutrophil apoptosis in vitro Clin Exp Immunol. 2000. 121:472-479.
33. Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Salgado-Ceballos H, Espitia A, Orozco S, Ibarra A, Martinez A, Franco-Bourland RE, Madrazo I. Spontaneous and induced aberrant sprouting at the site of injury is irrelevant to motor function outcome in rats with spinal cord injury. Brain Res 2004; 1013: 143-151.
34. Hall E, free radicals in central nervous system injury. In rice-evans C. Bordon R. editors. 1999. 217-238
35. Haslett PA, Hanekom WA, Muller G, Kaplan G. Thalidomide and a thalidomide analogue drug costimulate virus-specific CD8+ T cells in vitro. J Infect Dis 2003; 187: 946-955.
36. Hayashi M, Ueyama T, Nemoto K, Tamaki T, Senba E. Sequential mRNA expression for immediate early genes, cytokines, and neurotrophins in spinal cord injury. J Neurotrauma 2000; 17: 203-218.
37. Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC, Beattie MS. Tumor necrosis factor-alpha induces cFOS and strongly potentiates glutamate-mediated cell death in the rat spinal cord. Neurobiol Dis 2001; 8: 590-599.
38. Huang YJ, Liao JF, Tsai TH. Concurrent determination of thalidomide in rat blood, brain and bile using multiple microdialysis coupled to liquid chromatography. Biomed Chromatogr 2005.
39. Hulsebosch C. E. Recent advances in pathophysiology and treatment Of spinal cord injury. Advances in Physiology Education. 2002.26: (4) 238-255
40. Hurlbert RJ. The role of steroids in acute spinal cord injury: an evidence-based analysis. Spine 2001; 26: S39-S46.
41. Joglekar S, Levin M. The promise of thalidomide: evolving indications. Drugs Today (Barc) 2004; 40: 197-204.
42. Kastritis E, Dimopoulos MA. Thalidomide in the treatment of multiple myeloma. Best Pract Res Clin Haematol. 2007 Dec;20(4):681-99.
43. Kiaei M., Petri S., Kipiani K., Gardian G., Choi D.K., Chen J., Calingasan N. Y., Schafer P., Muller G. W., Stewart C., Hensley K., Beal M.F. Thalidomide and Lenalidomide Extend Survival in

- a Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The Journal of Neuroscience*. 2006. 26(9):2467–2473
44. Kiernan, J.A. *El sistema nervioso humano*. McGraw-hill interamericana. 1998. Séptima edición, México.
45. Kim GM, Xu J, Xu J, Song SK, Yan P, Ku G, Xu XM, Hsu CY. Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 2001; 21: 6617-6625.
46. Kim WK, Kan Y, Ganea D, Hart RP, Gozes I, Jonakait GM. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor-alpha production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway. *J Neurosci* 2000; 20: 3622-3630.
47. Klusman I, Schwab ME. Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res* 1997; 762: 173-184.
48. Kopf, M., Le Gros, G., Coyce, A., *et al.* (1995) Immune responses of IL-4, IL-5, IL-6 deficient mice. *Immunol. Rev.* 148: 45-69.
49. Kronke M, Schutze S, Scheurich P, Meichle A, Hensel G, Thoma B, Kruppa G, Pfizenmaier K. Tumour necrosis factor signal transduction. *Cell Signal* 1990; 2: 1-8.
50. Krown SE. Management of Kaposi sarcoma: the role of interferon and thalidomide. *Curr Opin Oncol* 2001; 13: 374-381.
51. Kumar S, Rajkumar SV. Thalidomide and lenalidomide in the treatment of multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2006 Jul;42(11):1612-22. Epub 2006 Jun 5.
52. Lali H.S. Sekhon, MB, and M. G. Fehlings. Epidemiology, Demographics, and Pathophysiology of Acute Spinal Cord Injury. *SPINE* 2001.26; (24S), S2–S12.
53. Lazarov-Spiegler O., Rapalino O., Agranov., Schwartz M. Restricted inflammatory reaction in the CNS: a key impediment to axonal regeneration?. *Opinion. Molecular medicine today*, August 1998. Elsevier Science. S1357-4310 01298. 337- 342
54. Lee YB, Yune TY, Baik SY, Shin YH, Du S, Rhim H, Lee EB, Kim YC, Shin ML, Markelonis GJ, Oh TH. Role of tumor necrosis

factor-alpha in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2000; 166: 190-195.

55. Lee CJ, Kim KW, Lee HM, Nahm FS, Lim YJ, Park JH, Kim CS. The effect of thalidomide on spinal cord ischemia/reperfusion injury in a rabbit model. *Spinal Cord*. 2007.45:(2)149-57.
56. Lemke M., Demediuk P., McIntosh T.K., Vink R., Faden A.I. Alterations in tissue Mg ++, Na+, and spinal cord edema following impact trauma in rats *Bioch Bioph Res Com*. 1987. ! 47 1170-1175.
57. Lennmyr F, Ata KA, Funa K, Olsson Y, Terent A. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 874-882.
58. Li H, Raia V, Bertolini F, Price DK, Figg WD. Circulating endothelial cells as a therapeutic marker for thalidomide in combined therapy with chemotherapy drugs in a human prostate cancer model. *BJU Int*. 2007 Dec 5
59. Lima V, Vidal FD, Rocha FA, Brito GA, Ribeiro RA. Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *Periodontol* 2004; 75: 162-168.
60. Majumdar S, Lamothe B, Aggarwal BB. Thalidomide suppresses NF-kappa B activation induced by TNF and H2O2, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. *J Immunol* 2002; 168: 2644-2651.
61. Majumdar S., Lamothe B., Aggarwal B.B. Thalidomide Suppresses NF- κ B Activation Induced by TNF and H2O2, But Not That Activated by Ceramide, Lipopolysaccharides, or Phorbol Ester. *The Journal of Immunology*. 2002. 168: 2644-2651.
62. Marriott J. B., Clarke I. A., Dredge K., Muller G., Stirling D., Dalgleish A. G. Thalidomide and its analogues have distinct and opposing effects on TNF- α and TNFR2 during co-stimulation of both CD4+ and CD8+ T cells. *Clin Exp Immunol* 2002.130: 75-84
63. Marriott J. B., Clarke I. A., Czajka A., Dredge K, Childs K., Man H., Schafer P., Govinda S., Muller G. W.; Stirling D., Dalgleish A.G. A novel subclass of thalidomide analogue with anti-solid tumor activity in which caspase-dependent apoptosis is

- associated with altered expression of bcl-2 Family Proteins1. *Cancer Research*. 2003. 63: 593–599
64. Martiñón G.S.S. Doble inmunización y/o administración de glutatión monoetil ester para mejorar el efecto neuroprotector obtenido con el péptido neural modificado A01. Tesis Maestría. UNAM. 2006. México.
65. Matthews SJ, McCoy C. Thalidomide: a review of approved and investigational uses. *Clin Ther* 2003; 25: 342-395.
66. McHugh SM, Rifkin IR, Deighton J, Wilson AB, Lachmann PJ, Lockwood CM, Ewan PW. The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2 (Th2) and concomitantly inhibits Th1 cytokine production in mitogen- and antigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Clin Exp Immunol* 1995; 99: 160-167.
67. Moreira A. I., Sampaio E.P.,*Zmuidzinas S.A., Frindt P., Smith, K.A. Kaplan, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor α by enhancing mRNA degradation. *J. exp. med.*The rockefeller University press. 1993 177: 1675-1680
68. Mujagic H., Chabner B.A., Mujagic Z. Mechanisms of Action and Potential Therapeutic Uses of Thalidomide. *Croatian Medical Journal*. 2002.43(3):274-285,2002
69. Muriel P, Fernandez-Martinez E, Perez-Alvarez V, Lara-Ochoa F, Ponce S, Garcia J, Shibayama M, Tsutsumi V. Thalidomide ameliorates carbon tetrachloride induced cirrhosis in the rat. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 951-957.
70. Naruo S, Okajima K, Taoka Y, Uchiba M, Nakamura T, Okabe H, Takagi K. Prostaglandin E1 reduces compression trauma-induced spinal cord injury in rats mainly by inhibiting neutrophil activation. *J Neurotrauma* 2003; 20: 221-228.
71. Nestic O., Svrakic N.M., Xu K-Y, Westlund D., Hulsebosch K., Galante Z., Soteropoulus A., Toliás P., DNAMicroarray analysis of the contused spinal cord: effect of NMDA receptor inhibition. *J. neurosc. Res*. 68: 406-423
72. Oliver SJ. The Th1/Th2 paradigm in the pathogenesis of scleroderma, and its modulation by thalidomide. *Curr Rheumatol Rep* 2000; 2: 486-491.
73. Orlicek SL, Hanke JH, English BK. The src family-selective tyrosine kinase inhibitor PP1 blocks LPS and IFN-gamma-

mediated TNF and iNOS production in murine macrophages. Shock 1999; 12: 350-354.

74. Paczynski RP, Venkatesan R, Diringer MN, He YY, Hsu CY, Lin W. Effects of fluid management on edema volume and midline shift in a rat model of ischemic stroke. Stroke 2000; 31: 1702-1708.
75. Pan JZ, Ni L, Sodhi A, Aguanno A, Young W, Hart RP. Cytokine activity contributes to induction of inflammatory cytokine mRNAs in spinal cord following contusion. J Neurosci Res 2002; 68: 315-322.
76. Pan W, Csernus B, Kastin AJ. Upregulation of p55 and p75 receptors mediating TNF-alpha transport across the injured blood-spinal cord barrier. J Mol Neurosci 2003; 21: 173-184.
77. Papavassiliou E, Gogate N, Proescholdt M, Heiss JD, Walbridge S, Edwards NA, Oldfield EH, Merrill MJ. Vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) expression in injured rat brain. J Neurosci Res 1997; 49: 451-460.
78. Pardini, C.M. Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal. Tesis Doctorado SSA.1998. México.
79. Park SJ, Kim HS, Yang HM, Park KW, Youn SW, Jeon SI, Kim DH, Koo BK, Chae IH, Choi DJ, Oh BH, Lee MM, Park YB. Thalidomide as a potent inhibitor of neointimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 885-891.
80. Perri III A.J., Hsu S. A review of thalidomide's history and current dermatological applications Dermatology Online Journal 9 (3): 5
81. Pointillart V, Petitjean ME, Wiart L, Vital JM, Lassie P, Thicoipe M, Dabadie P. Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase. Spinal Cord 2000; 38: 71-76.
82. Radomsky CL, Levine N. Thalidomide. Dermatol Clin 2001; 19: 87-103.
83. Ropper A. H, Gorson K.C., Weinberg D:H: treatment Experience in patients with antimyelin associated glycoprotein neuropathy. Muscle nerve 24: (6) 315-335
84. Ruddy J.M. B., Majumdar S. K. Antitumorigenic Evaluation of Thalidomide Alone and in Combination with Cisplatin in DBA2/J Mice. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2002. 2:1 7-13.

85. Santoscoy, M.E.C.; Peroxidación de lípidos utilizando donadores de ácido nítrico y antioxidantes en ratas con lesión medular experimental. Tesis Maestría. UNAM. 2003.
86. Schafer P. H., Gandhi A. K., Loveland M. A., Chen R. S., Man H., Schnetkamp P. P M., Wolbring G., Govinda S., Corral L. G., Payvandi F., Muller G. W., Stirling D. I. Enhancement of cytokine production and ap-1 transcriptional activity in t cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003.305: (3) 1222-1232
88. Scheff SW, Saucier DA, Cain ME. A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score. *J Neurotrauma* 2002; 19: 1251-1260.
89. Scherbel U, Raghupathi R, Nakamura M, Saatman KE, Trojanowski JQ, Neugebauer E, Marino MW, McIntosh TK. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 8721-8726.
90. Schroder JM, Sellhaus B, Wohrmann T, Kogel B, Zwingenberger K. Inhibitory effects of thalidomide on cellular proliferation, endoneurial edema and myelin phagocytosis during early wallerian degeneration. *Acta Neuropathol (Berl)* 1995; 89: 415-419.
91. Schröder J. M., Sellhaus B., Wöhrmann T., Kögel B., Zwingenberger K. Inhibitory effects of thalidomide on cellular proliferation, endoneurial edema and myelin phagocytosis during early Wallerian degeneration. *Neuropathol*. 1995. 89:415-419
92. Schwartz M, Solomon A, Lavie V, Ben-Bassat S, Belkin M, Cohen A. Tumor necrosis factor facilitates regeneration of injured central nervous system axons. *Brain Res* 1991; 545: 334-338.
93. 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*.2002. 137: 470
94. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-985.

95. Skold M, Cullheim S, Hammarberg H, Piehl F, Suneson A, Lake S, Sjogren A, Walum E, Risling M. Induction of VEGF and VEGF receptors in the spinal cord after mechanical spinal injury and prostaglandin administration. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 3675-3686.
96. Streit. W. J., Semple-Rowland S. L., Hurley S. D., Miller R. C., Popovich P. G., Stokes B.T. Cytokine mRNA Profiles in Contused Spinal Cord and Axotomized Facial Nucleus Suggest a Beneficial Role for Inflammation and Gliosis. *Experimental Neurology*. 152, 74–87
97. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Harada N, Johno M, Naruo M. Activated protein C reduces the severity of compression-induced spinal cord injury in rats by inhibiting activation of leukocytes. *J Neurosci* 1998; 18: 1393-1398.
98. Taoka Y., Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Progress in Neurobiology*. 1998 56: 341-358.
99. Teo S. K., Scheffler M. R., Kook K. A., Tracewel W. G. I, Colburn W. A., Stirling D. I., Thomas S. D., Thalidomide Dose Proportionality Assessment following Single Doses to Healthy Subjects. *J Clin Pharmacol* 2001. 41:662-667
100. Teo S. K., Colburn W.A., Thomas S.D. Single-dose oral pharmacokinetics of three formulations of thalidomide in healthy male volunteer. *J Clin Pharmacol*. 1999. 39:1162-1168
101. Thomas L., Ducros B., Secchi T., Balme B., Moulin G. Successful treatment of adult's Langerhans cell histiocytosis with thalidomide. *Archives of Dermatology, Hôpital de l'antiquaille, France*, 1993; 129: 1261-1264.
102. Thomas SK, Richards TA, Weber DM. Lenalidomide in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007 Dec;20(4):717-35.
103. Tseng S, Pak G, Washenik K, Pomeranz MK, Shupack JL. Rediscovering thalidomide: a review of its mechanism of action, side effects, and potential uses. *J Am Acad Dermatol* 1996; 35: 969-979.
104. Tsukagoshi S. The mechanism of action of thalidomide. *Nippon Rinsho*. 2007 Dec;65(12):2291-5.
105. Van de Poel MH, Pasman PC, Schouten HC. The use of thalidomide in chronic refractory graft versus host disease. *Neth J Med* 2001; 59: 45-49.

106. Vaquero J., Zurita M., Aguayo C. Administración precoz de dexametasona tras una lesión traumática de la médula espinal: Efectos sobre la recuperación funcional y la expresión local de factores de permeabilidad vascular. *Mapfre Medicina*, 2004; 15 (4)
107. Verbon A., Juffermans N.P., Speelman P., Van Deventer S. J. H., Ten Berge I. J. M., Guchelaar H., Van Der Poll T.A Single Oral Dose of Thalidomide Enhances the Capacity of Lymphocytes to Secrete Gamma Interferon in Healthy Humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000. 44: (9) 2286–2290
108. Walchner M, Meurer M, Plewig G, Messer G. Clinical and immunologic parameters during thalidomide treatment of lupus erythematosus. *Int J Dermatol* 2000; 39: 383-388.
109. Wang CX, Nuttin B, Heremans H, Dom R, Gybels J. Production of tumor necrosis factor in spinal cord following traumatic injury in rats. *J Neuroimmunol* 1996; 69: 151-156.
110. www.spinalcord.uab.edu. Lesión de la médula espinal datos y Cifras a la Vista. Centro de Estadísticas Nacionales de Lesiones de Médulas, University of Alabama at Birmingham,. Junio 2006.
111. Xu J, Fan G, Chen S, Wu Y, Xu XM, Hsu CY. Methylprednisolone inhibition of TNF-alpha expression and NF-kB activation after spinal cord injury in rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 59: 135-142.
112. Yabu T., Tomimoto H., Taguchi Y., Yamaoka S., Igarashi Y., Okazaki T. Thalidomide-induced antiangiogenic action is mediated by ceramide through depletion of VEGF receptors, and is antagonized by sphingosine-1-phosphate. *Blood*, 2005. 106: (1) 125-134
113. Yakovlev AG, Faden AI. Sequential expression of c-fos protooncogene, TNF-alpha, and dynorphin genes in spinal cord following experimental traumatic injury. *Mol Chem Neuropathol* 1994; 23: 179-190.
114. Yan P, Li Q, Kim GM, Xu J, Hsu CY, Xu XM. Cellular localization of tumor necrosis factor-alpha following acute spinal cord injury in adult rats. *J Neurotrauma* 2001; 18: 563-568.
115. Yan P, Liu N, Kim GM, Xu J, Xu J, Li Q, Hsu CY, Xu XM. Expression of the type 1 and type 2 receptors for tumor

necrosis factor after traumatic spinal cord injury in adult rats. *Exp Neurol* 2003; 183: 286-297.

116. Yasui K, Kobayashi N, Yamazaki T, Agematsu K. Thalidomide as an immunotherapeutic agent: the effects on neutrophil-mediated inflammation. *Curr Pharm Des.* 2005;11(3):395-401.
117. Yuan ZG, Hou J, Wang DX, Fu WJ, Chen YB, Xi H. Efficacy of thalidomide combined dexamethasone on newly diagnosed multiple myeloma. *Ai Zheng* 2007; Dec: 26(12):1369-72.
118. Yune Y, Chang MJ, Kim SJ, Lee YB, Shin SW, Rhim H, Kim YC, Shin ML, Oh YJ, Han CT, Markelonis GJ, Oh TH. Increased production of tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis after traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 2003; 20: 207-219.
119. Zhang ZL, Liu ZS, Sun Q. Effects of thalidomide on angiogenesis and tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma in nude mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 216-220.

ANEXOS

Contenido de agua.

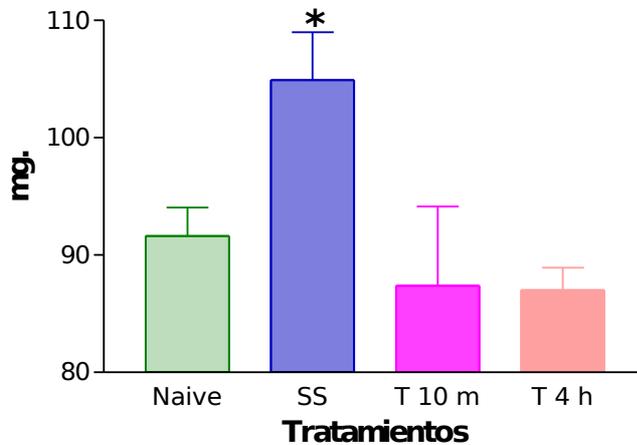


Figura 45. Representación gráfica del peso húmedo en los segmentos medulares de ratas. Media \pm Error Estándar (ES). N=4. *, (P<0.05). Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h)

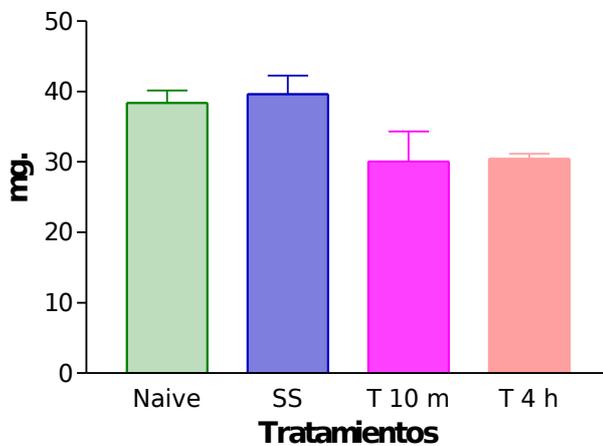


Figura 46. Representación gráfica del peso seco en los segmentos medulares de ratas. Media \pm Error Estándar (ES). N=4. Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h)

Determinación de MPO.

La absorbencia de MPO en los segmentos medulares craneales a la lesión del grupo Naive se comportó como grupo control, ya que no existió correlación ($r^2=0.0002$).

Se observaron niveles de absorbencia significativamente mayores en las muestras de tejido medular craneal a la lesión de los grupos tratados con talidomida IP 4 horas postlesión, SS IP 10 minutos postlesión y talidomida IP 10 minutos postlesión.

La prueba de regresión lineal muestra una correlación positiva baja en los tratamientos de SS IP 10 minutos postlesión ($r^2=0.1164$) y Talidomida 10 minutos postlesión ($r^2=0.3670$) y una correlación positiva altamente significativa en el tratamiento talidomida IP postlesión ($r^2=0.6579$). (Anexo C)

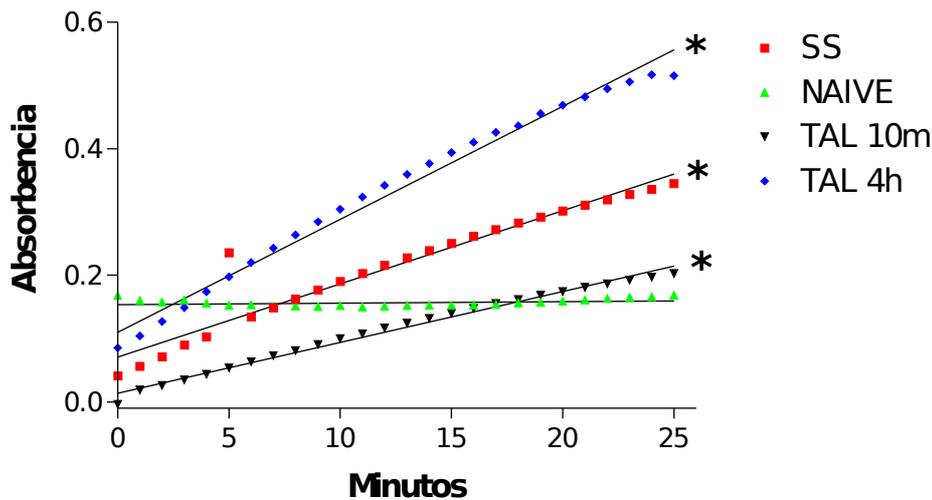


Figura 47. Determinación de MPO en el segmento craneal al epicentro. N=4. *, ($P<0.0001$), tal Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (TAL 10m); Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (TAL 4h)

La prueba de regresión lineal muestra una correlación positiva baja en los tratamientos de SS IP 10 minutos postlesión ($r^2= 0.2751$), talidomida 10 minutos postlesión ($r^2= 0.2035$) y talidomida 4 horas IP postlesión ($r^2= 0.4069$). (Anexo D)

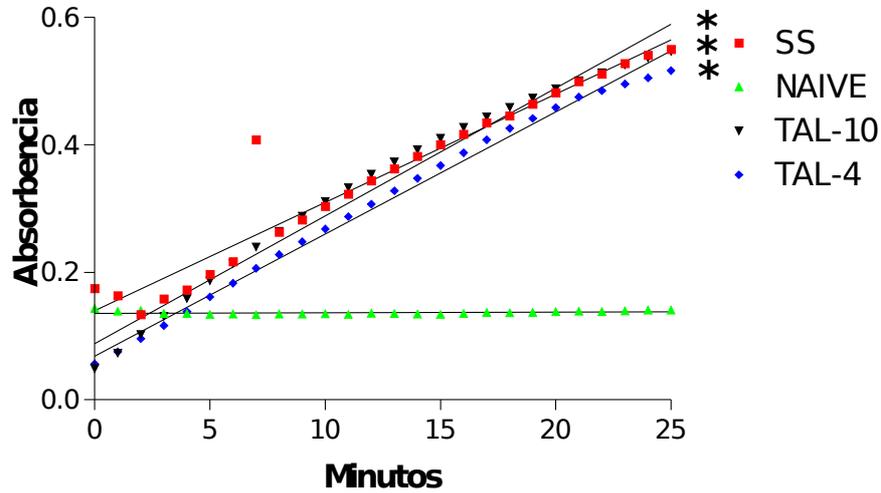


Figura 48. Determinación de MPO en el segmento del epicentro N=4. Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (TAL 10m); Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (TAL 4h).

La absorbencia de MPO en los segmentos medulares caudales al epicentro del grupo Naive, se comportó como grupo control, ya que no se encontró correlación ($r^2=0.0039$).

La prueba de regresión lineal muestra una correlación positiva baja en los tratamientos de SS IP 10 minutos postlesión ($r^2= 0.1383$), talidomida 10 minutos postlesión ($r^2= 0.2359$) y talidomida 4 horas IP postlesión ($r^2= 0.1560$). (Anexo E).

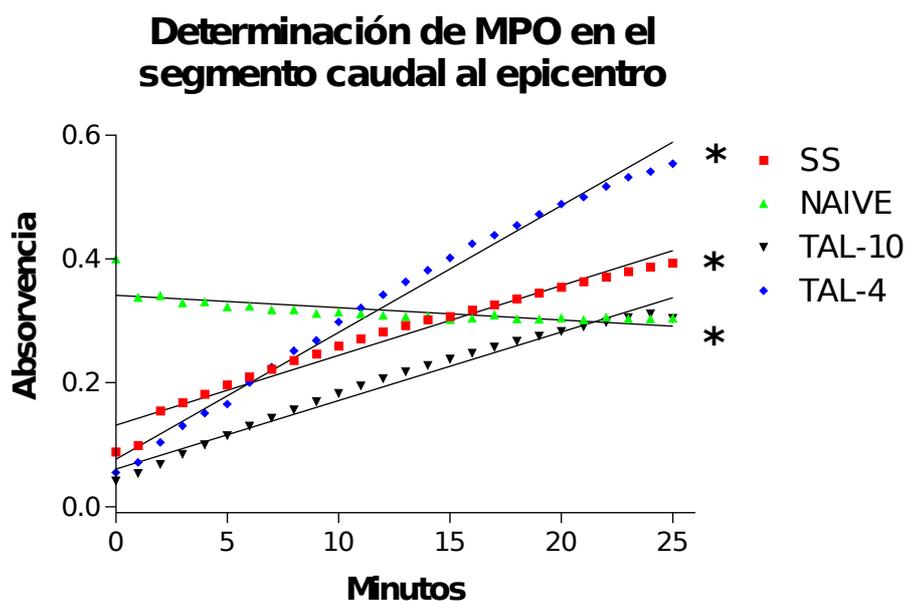


Figura 49. Determinación de MPO en el segmento caudal al epicentro N=4. Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (TAL 10m); Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (TAL 4h).

Los segmentos de médula espinal de ratas tratadas con talidomida IP 4 horas postlesión presentaron una delta de absorbencia de MPO significativamente mayor que los segmentos medulares de ratas del grupo Naive ($P<0.05$).

Los tejidos del grupo tratado con talidomida IP 10 minutos postlesión y SS IP 10 minutos postlesión mostraron una tendencia mayor no significativa de la delta de absorbencia de MPO que los tejidos medulares de ratas del grupo Naive

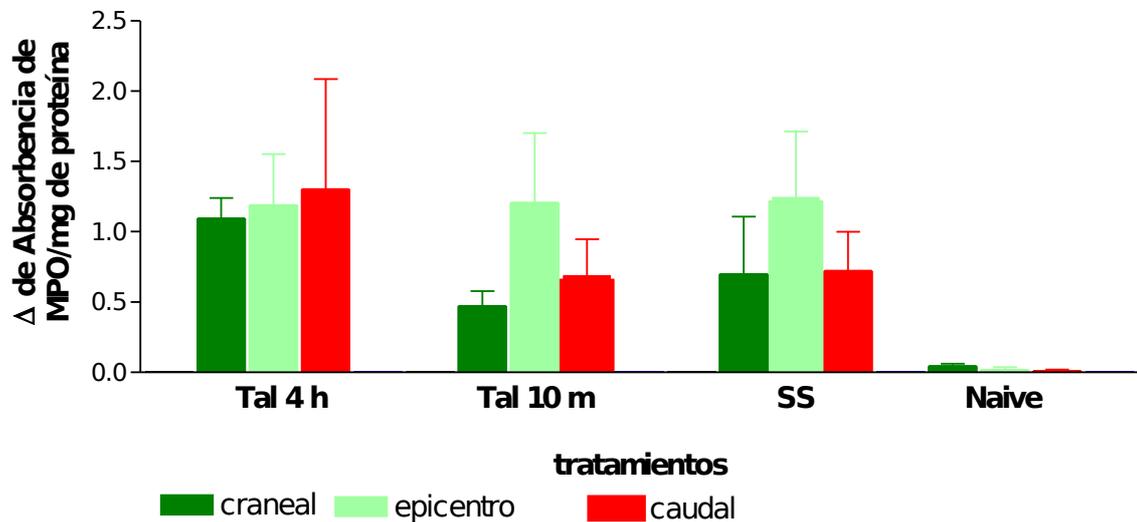


Figura 50. Determinación de delta de absorbancia de MPO por mg de proteína de tejido medular craneal al epicentro, epicentro y caudal al epicentro. (mg. de proteína/g. de tejido). \pm Error Estándar (ES). N=4. Lesión medular + Solución salina IP 10 minutos postlesión (SS); Lesión medular + talidomida IP 10 minutos postlesión (T 10m); Lesión medular + talidomida IP 4 horas postlesión (T 4h).