



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación del efecto del FILM en la recuperación motriz, producción de ceruloplasmina, nitritos y peroxidación lipídica en animales con lesión traumática en médula espinal.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

GABRIELA ELIZABETH BERMEO GÓMEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Raúl Silva García

ASESOR: Dr. Rubén Marroquín Segura

LUGAR DONDE SE LLEVÓ A CABO EL TRABAJO: Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN SXXI.

Laboratorio 1, Unidad Multidisciplinaria de Investigación, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Camina proyecto para curar la parálisis A.C. Tlalpan No. 4430 Col. Toriello Guerra, C.P. 14050, México, D.F.

2009



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

Para la mujer que más admiro y quiero, mi madre, la persona que me ha ayudado a ser la persona que soy y enseñarme a no darme por vencida, gracias a sus consejos, su dedicación, su tolerancia y sobre todo a su amor, mil gracias por todo sin ti no estaría aquí. Este trabajo y esfuerzo es dedicado a ti por todo lo que me has proporcionado en todos estos años. TE QUIERO MUCHO.

*Gracias a mi hermana Jessica quien me ha ayudado a ser una persona más fuerte y madura.
A mi hermana Karina y mi sobrina Fernanda, quienes son mi inspiración para continuar luchando por un futuro mejor y que me dan la fuerza para continuar con mis proyectos futuros, ayudándome a creer en mí y además tener fé en que todo en la vida es posible, aun cuando todo indique lo contrario. Las quiero mucho.*

A mis grandes amigas del CCH: Ruth, Perla, Maribel, Jessica, Jocelín y Marisol, con las que cuento en los peores momentos, que me guían con sus llamadas de atención, sus consejos, que me reconfortan para seguir luchando por mis metas, las quiero.

A mis amigos de la universidad con los que he compartido experiencias que me han dejado un gran aprendizaje.

A mis nuevas amigas Elisa y Vinnitsa, quienes me han enseñado a ver las cosas de manera diferente y a disfrutar más de la vida, gracias.

Al Dr. Raúl Silva García, por su paciencia y apoyo brindado, para que esto fuera posible, gracias por aceptarme para trabajar en este proyecto.

Y sobre todo a Dios que, me ha permitido llegar hasta aquí y que me dio la oportunidad de conocer a personas que han dejado huellas importantes en mi vida y que me han enseñado a ver que siempre hay un motivo para vivir, sin importar las adversidades que se nos presenten. Gracias por los ángeles que me enviaste para que me guiaran a través de mi vida, y que me han apoyado para ser la persona que soy, mil gracias por MI FAMILIA Y AMIGOS.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Raúl Silva García por su apoyo y por guiarme para que este trabajo fuera posible y para que fuera de calidad, sin usted esto no hubiera sido posible.

Al Dr. Antonio Ibarra y a la M en C. Susana Martiñón por su apoyo en todas las cirugías.

A Elisa García, por ayudarme en todo el proceso de este trabajo, gracias por tu apoyo amiga.

Al Dr. Rubén Marroquín por guiarme para que este trabajo fuera de calidad y enseñarme nuevas técnicas.

Gracias a Alejandra López por ayudarme en la parte experimental de este trabajo y por las molestias causadas.

A todos los que laboran en el Proyecto camina por todo el apoyo para la elaboración de esta tesis.

A todos los animales que tuvieron que dar su vida para que esto se lograra.

ÍNDICE

Resumen

1. Marco Teórico	
1.1. Sistema Nervioso Central (SCN)	1
1.1.1. Encéfalo	1
1.1.1.1. Rombencéfalo	2
1.1.1.2. Mesencéfalo	5
1.1.1.3. Prosencéfalo	5
1.1.2. Tallo encefálico	8
1.1.3. Médula espinal	8
1.1.4. Líquido cefalorraquídeo	11
1.2. Lesión en médula espinal (LME)	12
1.2.1. Tipos de LME	13
1.3. Fisiopatología de la lesión traumática en la médula espinal	14
1.4. Neuroprotección en la médula espinal	16
1.5. Respuesta inflamatoria después de una lesión en médula espinal	18
1.6. Producción de óxido nítrico	20
1.7. Peroxidación lipídica o lipoperoxidación	24
1.8. Ceruloplasmina	25
1.9. Participación de la respuesta inflamatoria en los procesos de destrucción, protección y restauración del tejido neural	27
1.10 Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM)	30
2. Planteamiento del problema	33
3. Hipótesis	33
4. Objetivos	34
5. Diseño de investigación	34
5.1. Tipo de estudio	34
5.2. Población	34
5.3. Criterios de inclusión y exclusión	34
5.4. Variables dependientes e independientes	35
6. Diagrama de flujo.	36
7. Material y métodos.	
7.1. Estandarización de la técnica de laminectomía	37
7.2. Estandarización de la Lesión Traumática de la Médula Espinal	37
7.3. Factor Inhibidor de la Locomoción de los Monocitos (FILM)	38
7.4. Grupo experimental 1	38
7.5. Cuidado de los animales	39
7.6. Evaluación motora BBB	39
7.7. Grupo experimental 2	40
7.8. Determinación y cuantificación de ceruloplasmina por inmunodifusión radial	40
7.9. Determinación y cuantificación de nitritos por el Método de Griess	40
7.10 Determinación y cuantificación de peroxidación lipídica por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA)	41

7.11 Método estadístico	41
7.12 Consideraciones éticas	42
8. Resultados	43
9. Discusión	47
10. Conclusiones	54
11. Perspectivas	55
12. Referencias	57
13. Anexos	
13.1 Anexo 1	71
13.2 Anexo 2	73
13.3 Anexo 3	74
13.4 Anexo 4	74
13.5 Anexo 5	75
13.6 Anexo 6	77

RESUMEN

La lesión traumática de medula espinal (LTME), ocasiona alteraciones estructurales y funcionales y ha sido catalogada como una enfermedad catastrófica debido a las secuelas que se producen sobre las funciones neurológicas, mismas que son el resultado de una serie de alteraciones funcionales a nivel neural que pueden ser desde el bloqueo transitorio de la conducción eléctrica, hasta la falta total de la misma, dependiendo del grado de lesión, desencadenando una serie de mecanismos que originan una destrucción del parénquima medular y un proceso neurodegenerativo crónico iniciado por la liberación de mediadores inflamatorios y otras sustancias que incrementan la necrosis y la desmielinización y así un proceso regenerativo o destructor.

El tratamiento desde el punto de vista médico tiene un elevado costo por la implicación de recursos tecnológicos y posteriormente por las limitaciones para poder reintegrar a los pacientes a sus actividades productivas previas. Actualmente, la incidencia de morbi-mortalidad sigue siendo considerablemente elevada, aún en los centros de atención especializados en este tipo de lesión, además que hay muy pocos medicamentos para tratar este tipo de padecimiento y en su mayoría no siempre se tienen los efectos deseados, ya que se deben utilizar en altas dosis y eso ocasiona que se presenten efectos secundarios que pueden llegar a ser severos y provocar otro tipo de padecimientos o simplemente no presentan efecto, ni negativo ni positivo, lo que hace que no sean factibles para utilizarlos en la clínica o que sean poco utilizables.

En este contexto fue de interés el estudio del pentapéptido FILM (Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos) como posibilidad terapéutica en la recuperación motriz en animales después de una LTME. El FILM tiene una secuencia Met-Gln-Cis-Asn-Ser, con características anti-inflamatorias demostradas tanto *in vitro* como *in vivo*.

El objetivo de esta tesis fue estudiar el efecto del FILM sobre la recuperación motriz, la producción de ceruloplasmina, nitritos y peroxidación lipídica, en animales que fueron sometidos a una LTME. Para llevar a cabo los objetivos se utilizaron ratas de la cepa Sprage Dawley, provocando una LTME moderada en un subgrupo y en otro una LTME

severa ambas lesiones fueron controladas y posteriormente se realizó la administración por difusión, directamente sobre el sitio de lesión del FILM o PBS (Solución Buffer de Fosfatos), posteriormente se evaluó la recuperación motriz, utilizando la prueba de habilidad locomotora a campo abierto “Basso, Beattie & Bresnahan” (BBB) durante 35 días para observar la recuperación. Además se determinó la producción de ceruloplasmina (inmunodifusión radial), nitritos (reacción de Griess) y peroxidación lipídica [formación de malondialdehído (MDA)] a las 3 horas y a los 7 días en animales con una LTME moderada.

Al realizar la prueba de habilidad locomotora en una LTME moderada, se observó que hay una diferencia significativa entre los grupos utilizados, proponiendo que el FILM tiene un efecto positivo en la recuperación motriz de los animales con lesión traumática en médula espinal, en una contusión moderada pero no en una severa ya que los grupos no muestran diferencia significativa en este tipo de lesión.

En la determinación de ceruloplasmina tanto a las 3 horas como a los 7 días no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los grupos utilizados, aun cuando los animales no están lesionados, esto se determinó utilizando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis.

En cuanto a la producción de nitritos mediante la reacción de Griess, se observa diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos de PBS y FILM, realizando la correlación entre los datos mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

Por último en la determinación de peroxidación lipídica por el método del ácido tiobarbitúrico no se observa diferencia en los resultados de los tres grupos, utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar los resultados.

Se concluyó que el FILM tiene un efecto positivo en la recuperación motriz después de una LTME moderada y que inhibe la producción de óxido nítrico después de 3h y 7 días después de la lesión. Pero no afecta a estos tiempos la producción de ceruloplasmina y la peroxidación lipídica.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

El sistema nervioso central (SNC) es una estructura extraordinariamente compleja que recoge millones de estímulos por segundo que procesa y memoriza continuamente, adaptando las respuestas del cuerpo a las condiciones internas o externas, por lo que es el encargado de regir el funcionamiento de los distintos aparatos del cuerpo humano, desempeña la mayoría de las funciones de la regulación del organismo. En general, en su más simple acción interviene un elemento nervioso (neurona sensitiva) que recoge las impresiones del medio ambiente o del interior del cuerpo y las transmite en forma de impulso nervioso, mediante sus prolongaciones, a otra neurona o célula efectora, estas neuronas sensitivas pueden estar situadas en la periferia como las células olfativas ó agrupadas en ganglios, como sucede con los nervios sensitivos raquídeos, o bien más profundamente colocadas, en el espesor del SNC. Las neuronas sensitivas a su vez, envían el impulso nervioso por medio de sus prolongaciones al órgano efector (músculo o glándula) donde se produce la reacción específica correspondiente (movimiento, secreción), como por ejemplo: las contracciones musculares, fenómenos viscerales y secreciones de algunas glándulas endocrinas. Este sistema recibe literalmente millones de datos con información procedentes de distintos órganos sensoriales, para luego integrarlos y determinar la respuesta adecuada que debe dar el organismo. El SNC está compuesto principalmente por dos partes: un largo tallo, la médula espinal y una masa voluminosa en su extremidad superior, el encéfalo, unidos por un corto segmento intermedio, el bulbo raquídeo (1).

1.1.1. ENCÉFALO.

Se encuentra dividido en tres partes (Tabla 1) (2).

Tabla 1. Divisiones del encéfalo

Divisiones	Conexiones	Cavidad central																
	Médula espinal	Conducto ependimario																
Rombencéfalo	Bulbo raquídeo Protuberancia Cerebelo	Cuarto ventrículo o vesícula rombencefálica																
Mesencéfalo	Pedúnculos cerebrales Lamina cuadrigémica	Acueducto de Silvio																
Prosencéfalo	<table border="0"> <tr> <td>Diencéfalo</td> <td>Epitálamo</td> <td rowspan="4">Tercer ventrículo o ventrículo medio</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Tálamo</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Hipotálamo</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Subtálamo</td> </tr> <tr> <td></td> <td> <table border="0"> <tr> <td>Telencéfalo</td> <td>Corteza cerebral</td> <td rowspan="2">Ventrículos laterales</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Cuerpo estriado</td> </tr> </table> </td> <td></td> </tr> </table>	Diencéfalo	Epitálamo	Tercer ventrículo o ventrículo medio		Tálamo		Hipotálamo		Subtálamo		<table border="0"> <tr> <td>Telencéfalo</td> <td>Corteza cerebral</td> <td rowspan="2">Ventrículos laterales</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Cuerpo estriado</td> </tr> </table>	Telencéfalo	Corteza cerebral	Ventrículos laterales		Cuerpo estriado	
Diencéfalo	Epitálamo	Tercer ventrículo o ventrículo medio																
	Tálamo																	
	Hipotálamo																	
	Subtálamo																	
	<table border="0"> <tr> <td>Telencéfalo</td> <td>Corteza cerebral</td> <td rowspan="2">Ventrículos laterales</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Cuerpo estriado</td> </tr> </table>	Telencéfalo	Corteza cerebral	Ventrículos laterales		Cuerpo estriado												
Telencéfalo	Corteza cerebral	Ventrículos laterales																
	Cuerpo estriado																	

1.1.1.1. Rombencéfalo.

Bulbo raquídeo.

Situado entre la médula espinal y la protuberancia, el bulbo raquídeo constituye en realidad una extensión en forma de pirámide de la médula espinal. El origen de la formación reticular, importante red de células nerviosas, es parte primordial de esta estructura. El núcleo del noveno, décimo, undécimo y duodécimo (IX, X, XI y XII) pares de nervios craneales se encuentra también en el bulbo raquídeo. Los impulsos entre la médula espinal y el cerebro se conducen a través del bulbo raquídeo por vías principales de fibras nerviosas tanto ascendentes como descendentes. También se localizan los centros de control de las funciones cardíacas, vasoconstrictoras y respiratorias, así como otras actividades reflejas, incluido el vómito. Las lesiones de estas estructuras ocasionan la muerte inmediata.

En el bulbo raquídeo se encuentran la sustancia blanca y la sustancia gris constitutivas de la médula, pero sufren tales transformaciones como la desaparición progresiva de los cordones posteriores y el entrecruzamiento de los haces motores y sensitivos segmentan la masa gris de las astas, lo que produce la aparición de nuevos elementos de sustancia gris y blanca propios del bulbo y la formación del cuarto ventrículo (3-4).

Protuberancia.

Situada entre el bulbo raquídeo y el mesencéfalo, está localizada enfrente del cerebelo. Consiste en fibras nerviosas blancas transversales y longitudinales entrelazadas, que forman una red compleja unida al cerebelo por los pedúnculos cerebelosos medios. Este sistema intrincado de fibras conecta el bulbo raquídeo con los hemisferios cerebrales. En la protuberancia se localizan los núcleos para el quinto, sexto, séptimo y octavo (V, VI, VII y VIII) pares de nervios craneales. Se encuentra constituida también por sustancia blanca y sustancia gris.

Cerebelo.

El cerebelo es la porción más voluminosa del cerebro posterior y constituye la parte del encéfalo situada en la región posterior de la base del cráneo, localizada por debajo del lóbulo occipital del cerebro y por detrás del tallo encefálico. Ocupa totalmente las fosas cerebelosas del hueso occipital aunque por debajo de la amígdala cerebelosa penetra en la parte superior del conducto raquídeo, donde se pone en contacto con la porción pósterolateral del bulbo. Tiene forma ovoide, aplanado de arriba, está formado por dos masas voluminosas, hemisferios cerebelosos, unidas por un saliente ánteroposterior y medio, segmentado en sentido transversal, y un lóbulo medio constituido por los vermis superior e inferior. Constituye una parte importante del sistema de control motor, siendo su función principal determinar la secuencia temporal de contracción de diferentes músculos durante los movimientos complejos de partes del cuerpo, en especial cuando ocurren de forma muy rápida. Está dividido en tres partes:

- 1) Arquicerebelo, lóbulo posterior o cerebelo vestibular
- 2) Paleocerebelo, lóbulo anterior o cerebelo espinal
- 3) Neocerebelo, lóbulo medio o cerebelo central

Como las demás partes del sistema nervioso central, el cerebelo está constituido por la sustancia gris y la sustancia blanca. La sustancia gris se encuentra en dos partes una central y otra superficial o cortical. En la superficial se reconocen a simple vista dos capas, una interna de color pardo, denominado estrato granuloso, y otra externa de color gris, llamada estrato cinereo o capa molecular; entre ambas capas se encuentra una estrecha zona constituida por una sola fila de los cuerpos de las células de Purkinje. La sustancia gris central está formada por varias masas grises situadas simétricamente en el interior de la sustancia blanca, denominadas núcleos dentados u olivas cerebelosas. Por dentro del núcleo dentado se encuentran varios núcleos como el núcleo dentado accesorio externo, núcleos dentados accesorios internos, núcleos del techo o núcleos fastigiales (3-4).

La sustancia blanca ocupa toda la porción central del cerebelo y está cubierta por la capa cortical. Rodea los núcleos grises centrales y emite prolongaciones y ramificaciones que penetran en el espesor de los lóbulos de las láminas adoptando una disposición arborescente, por lo que recibe el nombre de árbol de la vida; se han distinguido tres arboles: dos correspondientes a los lóbulos laterales y uno al vermis.

Cuarto ventrículo.

Es una cavidad situada en el interior del rombencéfalo; se halla en comunicación por abajo del conducto del epéndimo y por arriba del conducto del mesencéfalo llamado acueducto de Silvio. Esta ocupado por líquido cefalorraquídeo. Tiene forma romboidal, orientada hacia arriba y adelante, se pueden distinguir una cara anterior o piso, una cara posterior o techo, cuatro bordes y cuatro ángulos.

1.1.1.2. Mesencéfalo.

Se desarrolla a expensas de la vesícula cerebral media, cuya porción ventral se engruesa para constituir los pedúnculos cerebrales. La placa dorsal sufre igualmente un engrosamiento y se divide en dos porciones separadas por un surco medio, las cuales, más tarde, se dividen a su vez por un surco transversal de cuatro eminencias denominadas tubérculos cuadrigéminos. El conducto del epéndimo permanece muy angosto en esta región y constituye el acueducto de Silvio.

El mesencéfalo se compone de tres partes.

- La primera consiste en los pedúnculos cerebrales, sistemas de fibras que conducen los impulsos hacia, y desde la corteza cerebral.
- La segunda la forman los tubérculos cuadrigéminos, cuatro cuerpos a los que llega información visual y auditiva.
- La tercera parte es el canal central, denominado acueducto de Silvio, alrededor del cual se localiza la sustancia gris. La sustancia negra también aparece en el mesencéfalo, aunque no es exclusiva de éste. Contiene células que secretan dopamina. Los núcleos de los pares de nervios craneales tercero y cuarto (III y IV) también se sitúan en el mesencéfalo (5).

1.1.1.3. Prosencéfalo

Embriológicamente el prosencéfalo resulta del desarrollo que sufre la vesícula cerebral anterior, la cual por un estrangulamiento origina una porción anterior, llamada vesícula cerebral anterior secundaria o terminal y otra posterior o vesícula intermedia. La vesícula cerebral intermedia forma el diencéfalo o cerebro intermedio, mientras la vesícula cerebral anterior, también llamada yema o divertículo anterior, da origen al telencéfalo o cerebro hemisférico.

Diencéfalo.

De él derivan el tálamo, el epitálamo y el hipotálamo.

Tálamo: es una masa gris voluminosa, de forma ovoidea, con extremidad más estrecha anterior, situada dentro de la zona media del cerebro, entre los dos hemisferios cerebrales. Es un centro de integración de gran importancia que recibe las señales sensoriales y donde las señales motoras de salida pasan hacia y desde la corteza cerebral. Todas las entradas sensoriales al cerebro, excepto las olfativas, se asocian con núcleos individuales (grupos de células nerviosas) del tálamo.

Epitálamo: Comprende las formaciones situadas en la parte posterosuperior del tercer ventrículo, los cuales son la glándula pineal y sus anexos como la comisura blanca posterior el pedúnculo o estría habelunar y el triángulo de la habenula (3).

Hipotálamo: Está constituido por glomerados de sustancia gris, en el se pueden distinguir las siguientes partes: sustancia perforada posterior, tubérculos mamilares y tuber cinereum e infundíbulo.

Coordina los reflejos autonómicos del tronco encefálico y la medula espinal, activa los sistemas endocrinos y motor somático en el tronco encefálico o en centros superiores como el sistema límbico donde se generan emociones y motivaciones. Es el mayor regulador de la homeostasis incluyendo la temperatura corporal, el balance hídrico de electrolitos y el nivel de glucosa en sangre. Es el regulador más importante del sistema endocrino en virtud de sus conexiones con la hipófisis, esto incluye la innervación directa de la hipófisis posterior por núcleos hipotalámicos específicos y la conexión hormonal directa entre núcleos hipotalámicos en hipófisis anterior. De la parte basal del hipotálamo emerge el tallo hipofisiario que sale de la eminencia media y contiene el sistema portahipotalamo-hipofisiario encargado del transporte hacia la hipófisis anterior.

Región Subtalámica: Se halla situada por abajo del tálamo óptico y es considerado como un medio de unión entre los núcleos basales del cerebro anterior y la región del techo del mesencéfalo. Entre los elementos que componen la región subtalámica se encuentra en la

parte superior del núcleo rojo que ocupa la porción del pedúnculo cerebral y termina a la altura de los tubérculos mamilares. Esta rodeado por sustancia blanca formada por los ases dentadotalámicos y el lemnisco interno que los envuelve por fuera y atrás para ir al núcleo ventral del tálamo.

Telencéfalo ó Cerebro.

Constituye la masa principal del encéfalo y es lugar donde llegan las señales procedentes de los órganos de los sentidos y de las terminaciones nerviosas. El cerebro procesa toda la información procedente del exterior y del interior del cuerpo y las almacena como recuerdos. Aunque el cerebro sólo supone un 2 % del peso del cuerpo, su actividad metabólica es tan elevada que consume el 20 % del oxígeno. Se divide en dos hemisferios cerebrales, separados por una profunda fisura, pero unidos por su parte inferior por un haz de fibras nerviosas de unos 10 cm llamado cuerpo calloso, que permite la comunicación entre ambos.

Los ventrículos son dos espacios bien definidos y llenos de líquido que se encuentran en cada uno de los dos hemisferios. Son cuatro ventrículos conectados entre sí. El líquido cefalorraquídeo que circula en el interior de estos ventrículos y además rodea al SCN, sirve para proteger la parte interna del cerebro de cambios bruscos de presión y para transportar sustancias químicas.

En cada hemisferio se distinguen:

La corteza cerebral o sustancia gris, de unos 2 ó 3 mm de espesor, formada por capas de células amielínicas (sin vaina de mielina que las recubra). Debido a los numerosos pliegues que presenta, la superficie cerebral es unas 30 veces mayor que la superficie del cráneo.

La sustancia blanca, más interna, constituida sobre todo por fibras nerviosas amielínicas que llegan a la corteza.

1.1.2. TALLO ENCEFÁLICO.

Tallo que conecta el prosencéfalo con la médula espinal. Sus principales divisiones son: el mesencéfalo, la protuberancia y el bulbo raquídeo. A través de este se dirigen hacia arriba y hacia abajo varios tractos de fibras importantes que transmiten señales sensitivas de la médula espinal, principalmente al tálamo, y señales motoras desde la corteza cerebral a la médula espinal.

1.1.3. MÉDULA ESPINAL.

La médula espinal es la parte del SNC que se halla alojada en el conducto vertebral, es de forma cilíndrica, aplanada ligeramente de adelante hacia atrás, de manera que su diámetro transversal es mayor que el anteroposterior, siendo la diferencia de uno hasta 4 mm según la porción que se considere. La médula presenta dos abultamientos fusiformes, uno en la región cervical y otro en la porción lumbar, este último se adelgaza para formar el cono medular. El superior se extiende de la tercera vértebra cervical a la segunda torácica y alcanza su máxima dimensión a nivel de la sexta cervical; el inferior abarca de la novena a la doceava vértebra torácica. El abultamiento superior o braquial corresponde al origen de los nervios destinados a los miembros superiores y el inferior, también llamado abdominal o lumbar, al lugar donde emergen los nervios que van a los miembros inferiores.

La médula espinal transmite los impulsos ascendentes hacia el cerebro y los impulsos descendentes desde el cerebro hacia el resto del cuerpo. Transmite la información que le llega desde los nervios periféricos procedentes de distintas regiones corporales, hasta los centros superiores. El propio cerebro actúa sobre la médula enviando impulsos. La médula espinal también transmite impulsos a los músculos, los vasos sanguíneos y las glándulas a través de los nervios que salen de ella, bien en respuesta a un estímulo recibido, o bien en respuesta a señales procedentes de centros superiores del SNC.

La médula se halla protegida por tres membranas que la envuelven denominadas meninges y son:

- Δ La piamadre, es un delgado revestimiento fibroso y vascular del encéfalo y la médula, fijado con firmeza a su superficie e incluso penetra en todas las fisuras y surcos.
- Δ La aracnoides, es una estructura delicada, con fijación laxa en la superficie interna de la duramadre; esta queda separada de la piamadre por un espacio tabicado lleno de líquido cefalorraquídeo (rodea el encéfalo y la médula) llamado espacio subaracnoideo.
- Δ La duramadre, es un fuerte revestimiento fibroso que rodea todo el SNC, está unida con firmeza a la superficie interna del cráneo.

La médula espinal está dividida de forma parcial en dos mitades laterales por un surco medio hacia la parte dorsal y por una hendidura ventral hacia la parte anterior; de cada lado de la médula surgen 31 pares de nervios espinales, cada uno de los cuales tiene una raíz anterior y otra posterior.

Los nervios espinales se dividen en:

- Nervios cervicales: existen 8 pares denominados C1 a C8
- Nervios torácicos: existen 12 pares denominados T1 a T12
- Nervios lumbares: existen 5 pares denominados L1 a L5
- Nervios sacros: existen 5 pares, denominados S1 a S5
- Nervios coccígeos: existe 1 par

Los últimos pares de nervios espinales forman la llamada cola de caballo al descender por el último tramo de la columna vertebral (Fig. 1).

La médula espinal es de color blanco, más o menos cilíndrica y tiene una longitud de unos 45 cm. Tiene una cierta flexibilidad, pudiendo estirarse cuando se flexiona la columna vertebral (3-4).

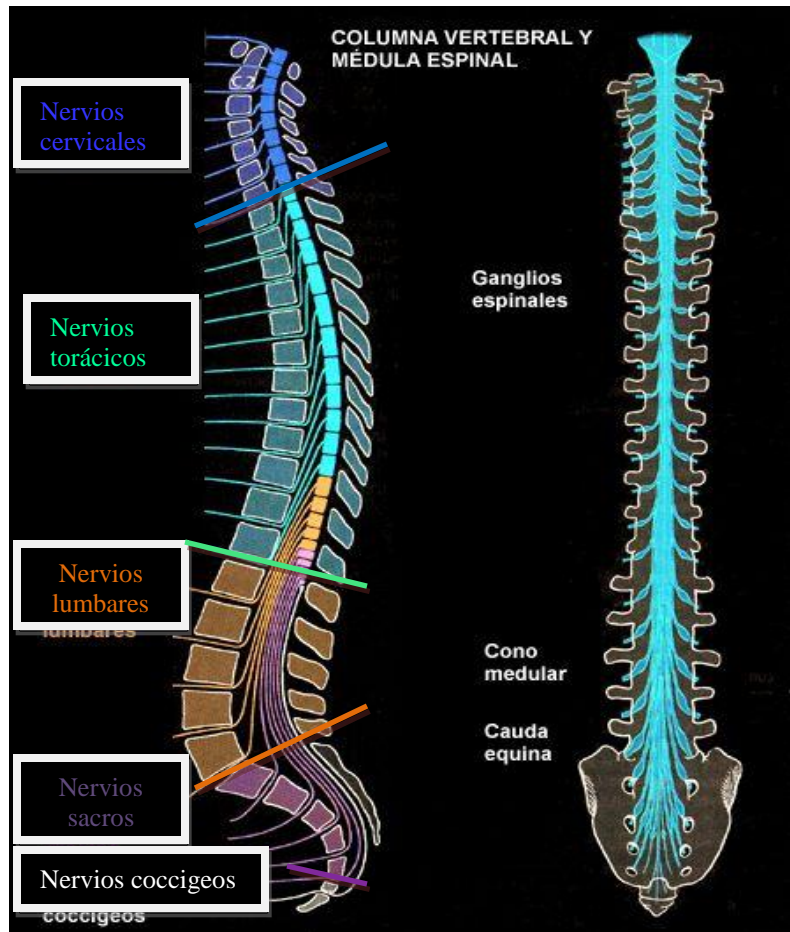


Fig. 1. Se muestra los 8 pares de nervios cervicales, los 12 torácicos, los 5 lumbares, los 5 sacros y el par coccígeo.

La médula espinal está constituida por *sustancia gris* y *sustancia blanca* que adoptan una distribución bastante regular. La sustancia blanca esta formada por dos tipos de fibras nerviosas, las mielinizadas y las amielínicas. Las fibras mielinizadas de conducción rápida forman haces (fascículos) que ascienden o descienden a diferentes distancias. El conjunto de fibras con una función común se denominan haces. Al examinar un corte transversal de la medula puede observarse que la sustancia gris presenta una disposición en forma de H. La parte horizontal de esta H se denomina comisura gris, y cada una de las puntas recibe el nombre de asta. En consecuencia, existen dos astas ventrales o anteriores y dos astas dorsales o posteriores, que a diferencia del cerebro se dispone internamente (Fig. 2).

La sustancia blanca se dispone en tres columnas o cordones de fibras, anterior o ventral, lateral y posterior o dorsal, que discurren de un nivel del sistema nervioso a otro. Las fibras que se extienden desde un lugar determinado a otro se agrupan en haces denominados fascículos.

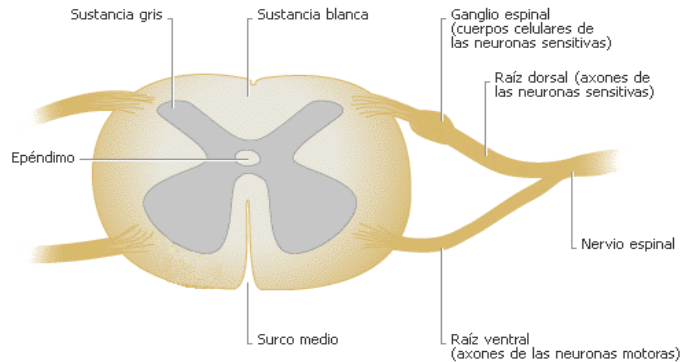


Fig. 2. Se muestra un corte transversal de la médula espinal donde se observan sus componentes.

1.1.4. LÍQUIDO CEFALORAQUÍDEO.

El líquido cefalorraquídeo es un fluido claro e incoloro que recubre el sistema nervioso central en su totalidad, como una cubierta acuosa en el espacio subaracnoideo. Su misión principal es servir de fluido amortiguador de los posibles traumatismos que pueda sufrir el sistema nervioso central y la médula espinal, así como nutrir ciertas células nerviosas y eliminar los desechos metabólicos de algunas de ellas. Existen estructuras profundas en el cerebro, diencefalo y el tallo encefálico, con gran contenido de líquido cefalorraquídeo denominadas ventrículos. Son cuatro los ventrículos:

Los ventrículos laterales 1 y 2, cada uno de ellos se ubican cerca del plano medio en cada hemisferio cerebral y se extienden desde el centro del lóbulo por delante hasta el centro del lóbulo occipital por atrás.

El tercer ventrículo, se ubica entre las dos mitades laterales del tálamo y también se extiende hacia delante y abajo, en el plano de la línea media entre las dos mitades del hipotálamo. El cuarto ventrículo es una cavidad amplia, de escasa profundidad, en forma de

rombo, que cubre la protuberancia y el bulbo, y se extiende desde el conducto del epéndimo de la porción superior de la médula central hasta el acueducto de Silvio en el mesencéfalo (1).

El líquido cefalorraquídeo normal, tiene los siguientes componentes (6):

Proteínas: 15-45 mg/ 100 ml

Glucosa: 50-85 mg/ 100 ml

Cloro: 720-750 mg/ 100 ml

Células: 0 -3 linfocitos / mm³.

1.2. LESIÓN EN MÉDULA ESPINAL (LME).

Antecedentes

La LME es un término amplio que se refiere al daño causado en la médula espinal debido a innumerables causas que originan condiciones indeseables que pueden culminar con la muerte.

Hace 5000 años los egipcios realizaron la primera descripción de una LME y sus efectos, desde entonces y hasta mediados de los años cuarenta, la mayoría de los pacientes morían durante las primeras semanas a consecuencia del trauma inicial, por infecciones y otras complicaciones sistémicas. Posteriormente, con el avance de distintas disciplinas científicas y clínicas se mejoró notablemente la posibilidad de sobrevivir. A pesar de ello, las incidencias de morbi-mortalidad siguen siendo considerablemente elevadas, aún en centros especializados en este tipo de lesión. El tratamiento médico y la recuperación del individuo tienen un alto costo debido a los recursos tecnológicos que se necesitan y las limitaciones que se observan para reintegrar al individuo en sus actividades productivas. En México, a diferencia de otros países, no se cuenta con un estudio epidemiológico que describa la incidencia, mortalidad, evolución postraumática y el costo de atención médica de este tipo de lesiones (7).

1.2.1. Tipos de LME.

La médula espinal al igual que el encéfalo, se encuentra protegida por el líquido cefalorraquídeo, por los huesos de la columna vertebral y el cráneo respectivamente. Desafortunadamente, si la fuerza de la violencia es de suficiente magnitud, estas estructuras protectoras pueden verse superadas por el daño consecutivo del tejido nervioso subyacente. Además pueden lesionarse los nervios craneales, raquídeos y los vasos sanguíneos.

Cuando ocurre la destrucción de un axón conduce a una degeneración completa de la parte que se ha separado del cuerpo celular nervioso, incluyendo la pérdida de la vaina de mielina. A este proceso se le denomina degeneración de Waller. Después de la lesión, los cuerpos de Nissl (sustancia cromatofílica) en las células se someten a cromatólisis, proceso en el cual los ribosomas pierden sus características y se observa que se disuelven en el citoplasma circundante. Algunas de las células afectadas se desintegran pero otras se recuperan con restauración de la sustancia de Nissl. Las células que se recuperan participan en el proceso de regeneración.

Existen varios tipos de lesión en la médula espinal como son:

- 1) Una lesión central pequeña casi siempre afecta al haz espinotalámico en ambos lados.
- 2) Una lesión central grande implica además de las vías del dolor, a las porciones de los haces adyacentes, la sustancia gris adyacente o ambas.
- 3) Lesión periférica irregular (herida penetrante o compresión de la médula) incluye a las vías largas y la sustancia gris, de manera que se anulan las funciones por debajo del nivel de la lesión. Ocurre de manera temprana una alteración de la función motora. El compromiso de las células motoras de las astas grises anteriores a nivel de la lesión da lugar a una parálisis parcial o total de los músculos, con pérdida del tono muscular.
- 4) La hemisección de la médula causa el síndrome de Brown-Séguar, puede ser resultado de heridas por balas o puñaladas. Los signos y síntomas son parálisis

ipsolateral de la motoneurona inferior en el segmento de la lesión, pérdida contralateral de las sensaciones de dolor y temperatura por debajo de la lesión (8).

- 5) La sección medular completa, da como resultado una pérdida completa de toda la sensibilidad y los movimientos voluntarios por debajo del nivel de la lesión. Pueden verse los siguientes aspectos clínicos característicos una vez terminado el período de shock medular.
 - a) Parálisis bilateral de neuronas motoras inferiores en el segmento de la lesión y atrofia muscular. Esto se debe a la lesión de las neuronas en las astas grises anteriores y posiblemente a la lesión de las raíces nerviosas del mismo segmento.
 - b) Parálisis espástica bilateral por debajo del nivel de la lesión, hay pérdida bilateral de los reflejos cutaneoabdominales, causados por una interrupción de los haces corticoespinales en ambos lados de la médula espinal.
 - c) Pérdida bilateral de toda la sensibilidad por debajo del nivel de la lesión. La pérdida se debe a la destrucción de los haces descendentes en los cordones posteriores y a la sección de los haces espinotalámicos laterales y anteriores en ambos lados.
 - d) Las funciones vesical e intestinal no están bajo control voluntario.

1.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL (LTME).

Después de producirse una lesión medular mecánica (lesión primaria) se desencadenan una serie de mecanismos autodestructivos (lesión secundaria) que originan una destrucción mayor del parénquima medular; finalmente, persiste un proceso neurodegenerativo crónico (9-11). Uno de los primeros mecanismos secundarios que aparecen después de la LTME es la pérdida de la regulación iónica, incrementándose los iones de sodio y calcio y disminuyendo los iones de potasio y magnesio, esto lleva a la suspensión del impulso nervioso y favorece la formación de edema (11-12). El exceso de calcio libre intracelular activa las proteasas neutras que destruyen los neurofilamentos, que son la parte fundamental del citoesqueleto axonal, observándose en las primeras horas o días poslesión un colapso y fragmentación axonal. Además el calcio libre también activa proteasas y fosfolipasas que actúan sobre la mielina destruyéndola (13). La activación de la fosfolipasa

A2 libera ácido araquidónico sustrato necesario para la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, sustancias que incrementan la respuesta inflamatoria (14).

Otro mecanismo que contribuye en una forma muy importante a incrementar el daño en la zona de lesión es la neurotoxicidad causada por radicales libres. Después de una lesión, se origina una gran producción de radicales libres (15). Existen sistemas protectores que evitan el incremento excesivo de especies oxidantes, entre ellos hay tres enzimas: la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa y la catalasa, sin embargo, la actividad de estas enzimas antioxidantes es particularmente baja en el SNC en comparación con otros tejidos (16), esto hace que este órgano sea particularmente sensible a los radicales libres,

Dentro de los principales radicales libres producidos por diferentes células después de una LTME y que son altamente neurotóxicos están el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el óxido nítrico (NO^{\cdot}).

Después de una LTME se desencadena una intensa respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos, células cebadas y una gran invasión de macrófagos al sitio de la lesión, tanto los neutrófilos como los macrófagos al ser activados producen $O_2^{\cdot-}$ y NO^{\cdot} [producido también por plaquetas, células endoteliales y células de la microglía (macrófagos del SNC)].

Todas estas alteraciones y fenómenos que ocurren a nivel celular tienen relación con la degeneración gradual tanto vascular como del tejido neural destruyendo el sustrato anatómico necesario para la recuperación neurológica (17). Es por ello necesario el uso de diversas estrategias terapéuticas que disminuyan el daño originado por la lesión secundaria.

Pero desde el punto de vista médico tiene un elevado costo por la implicación de recursos tecnológicos y posteriormente por las limitaciones para poder reintegrar a los pacientes a sus actividades productivas previas. Actualmente, la incidencia de morbi-mortalidad sigue

siendo considerablemente elevada, aún en los centros de atención especializados en este tipo de lesión (18,19),

1.4. NEUROPROTECCIÓN EN LA MÉDULA ESPINAL.

Los trasplantes al SNC han sido utilizados sobre todo con fines de regeneración y plasticidad neural, sin embargo, también han demostrado tener un efecto neuroprotector después de una LTME al disminuir el grado de destrucción de la zona lesionada y aumentar la sobrevivencia de los animales (20-24).

Además de los trasplantes, existen otras estrategias terapéuticas que pueden disminuir la destrucción del parénquima medular en la zona lesionada. Actualmente diferentes estudios han demostrado que también la utilización de fármacos y otras sustancias químicas pueden disminuir el grado de lesión del tejido neural. Se sabe por ejemplo, que el uso del glucocorticoide Metilprednisolona (MP) iniciado dentro de las primeras 8 h posteriores a una LTME y administrado a dosis altas durante 24 h, mejora la recuperación motora de los pacientes (25), sin embargo, también se ha demostrado que su uso puede tener efectos negativos ya que su administración es en altas dosis, lo que ocasiona hipertensión, incremento en la susceptibilidad a infecciones, alteraciones conductuales, etc., además se sabe que puede exacerbar la necrosis neuronal postisquémica e inhibir el crecimiento axonal (26-27).

El tratamiento con inhibidores de la síntesis de óxido nítrico (NOS) como NG-nitro-L-arginina metilester (L-NAME) administrados durante la fase aguda de la LTME en modelos experimentales, promueven una recuperación clínica significativamente mayor en los animales que recibieron el tratamiento con respecto a los que no (28).

Los antagonistas de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido propiónico-4-alfa-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol/keinato (AMPA/Kainato), se han propuesto como fármacos neuroprotectores, Li-Tator y Gorgulo y cols., (29,30) demostraron que el empleo de los fármacos antagonistas MK-801, 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoylbenzo-quinolina

(NBQX), administrados directamente en el sitio de la lesión pueden atenuar el daño excitotóxico mediado por aminoácidos excitatorios.

El empleo de fármacos anti-excitotóxicos como el sulfato de magnesio ($MgSO_4$) y el riluzol, funcionan como neuroprotectores. Lang-Lazdunski y col. (31) demostraron que el tratamiento con estos fármacos, previenen y atenúan el fenómeno necrótico que se observa después de una LTME en modelos experimentales, demostrando mayor efectividad con el $MgSO_4$ al prevenir la paraplejía originada por el daño en las motoneuronas.

Además se han empleado fármacos moduladores del metabolismo del ácido araquidónico, como el ibuprofeno que es un inhibidor de la ciclooxigenasa o el U63447A que inhibe la actividad de la sintetasa de tromboxanos, el tratamiento con estos fármacos en modelos animales limita el desarrollo de la isquemia poslesión y la recuperación neurológica (32).

La administración del antioxidante EPC-K1, una sustancia química que se une a la vitamina E y C a través de uniones fosfodiéster, ha demostrado disminuir la lesión y atenuar el daño en modelos experimentales de LTME (33).

El fármaco clenbuterol también se ha propuesto como un agente que promueve neuroprotección, se ha descrito que tiene la capacidad de revertir la atrofia muscular después de una LTME. El clenbuterol es un agonista del receptor β -2 adrenérgico, que al ser estimulado promueve que se expresen diversos factores tróficos, se ha visto también que por medio de este mecanismo se promueve regeneración y neuroprotección (34).

A la fecha ninguna de las estrategias antes mencionadas ha logrado proveer resultados clínicos satisfactorios, por lo que la investigación continua para encontrar una mejor terapia neuroprotectora.

Actualmente ha cobrado gran importancia el efecto que la respuesta inflamatoria pueda tener como factor que incremente la neurodegeneración.

1.5. RESPUESTA INFLAMATORIA DESPUÉS DE UNA LESIÓN EN MÉDULA ESPINAL.

Durante la respuesta inflamatoria se llevan a cabo diferentes eventos. Inicialmente existe un incremento en la permeabilidad vascular y la liberación de lípidos con la consiguiente activación de la vía de los eicosanoides y del factor activador de plaquetas. Se liberan interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (INF- γ) y también pequeños péptidos como la bradicina, y aminas como la histamina o 5 hydroxytriptamina (14), al incrementarse la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, se altera el flujo sanguíneo y favorece la agregación plaquetaria lo que trae como consecuencia el fenómeno de isquemia (35). Uno de los fenómenos más importantes que se lleva a cabo después de una LTME es la migración de un gran número de células inflamatorias residentes (células de la microglia) y de aquellas reclutadas de la periferia (macrófagos, linfocitos, etc.) (36). La infiltración de dichas células es indistinguible de la que se lleva a cabo en tejidos periféricos lesionados y es típica de las fases tempranas de la lesión. En las fases tardías de la lesión, se incluyen factores de crecimiento y/o producción de citocinas, depósito de la matriz celular y revascularización que son prevalentes en la LTME.

La respuesta inmune desarrollada después de una LTME involucra dos etapas de infiltración celular (36). La primera es dominada por células polimorfonucleares (PMN) y predomina durante las primeras horas (37). Los neutrófilos aparecen en la pared de las venas y vénulas adyacentes a la lesión, en las primeras 3 a 4 horas (38), permanecen en el tejido de 8 a 24 horas posteriores a la lesión (39,40). La respuesta inflamatoria se ve reflejada en el aumento del número de leucocitos en el líquido cefalorraquídeo (41), la infiltración de células PMN en el sitio de lesión (40), el incremento en los niveles de leucotrienos (LT), principalmente LTB₄, así como en la actividad de la mieloperoxidasa (42). Además, estudios experimentales han demostrado que entre 3 y 12 horas posteriores a la lesión, existe un aumento significativo de la molécula de adhesión intercelular I (ICAM-D), la cual participa en la infiltración tisular de los neutrófilos (43).

La segunda etapa de infiltración celular se caracteriza por la presencia de macrófagos, mismos que se observan en los primeros dos días y alcanzan un pico de los 5 a 7 días poslesión. Dos días después de la lesión existe proliferación y reclutamiento de macrófagos y microglía, siendo mayor de los 4 a 8 días poslesión. Durante esta fase hay también infiltración linfocitaria de los 3 a los 7 días poslesión (36,37,39).

La microglia activada y los macrófagos sanguíneos extravasados constituyen la mayoría de células inflamatorias presentes en el sitio de lesión (44). La presencia de estos dos tipos celulares forman parte de una respuesta temprana del sistema inmune innato a lesiones del SNC originadas por diversos mecanismos, incluyendo entre estos la isquemia y traumatismos mecánicos (45). Los macrófagos y las células de la microglia participan importantemente en los procesos desarrollados después de la lesión liberando citocinas y neurotoxinas (37,39).

En el cerebro y en la médula espinal existe una considerable heterogeneidad de macrófagos; la contribución relativa de una población particular, en la reacción inflamatoria local puede dictar si una cascada de eventos inicia como un proceso regenerativo o destructor, esto se ha enfatizado sobre todo en el caso de la microglia. Por lo tanto no es sorprendente que varias neuronas y axones mielinizados se preserven en el sitio de una lesión (46).

En condiciones normales la microglia se encuentra en estado de reposo su forma es ramificada con largas y finas ramas y no es fagocítica. Cuando esta célula es activada muestra hipertrofia y retracción de sus procesos dando como resultado una configuración robusta. Finalmente y después de diversos estímulos la microglia se puede diferenciar hacia una célula reactiva o fagocítica, misma que se caracteriza por mostrar extensiones cortas y a diferencia de la microglia ramificada, estas células además de ser fagocíticas son capaces de funcionar como células presentadoras de antígenos y de secretar citocinas, factores de crecimiento e intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) y de nitrógeno como el óxido nítrico (NO^{*}). Después de una LTME su epicentro se puede observar microglia activada

en la materia blanca y gris a partir del tercer día y hasta la cuarta semana principalmente en la parte ventral y caudal al epicentro de la lesión (36).

Otro elemento que participa importantemente en el proceso de infiltración leucocitaria son las quimiocinas, una subfamilia de citocinas que juegan un papel principal en el reclutamiento de leucocitos específicos a los sitios de inflamación como la interleucina 8 (IL-8), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-2), entre otras (47).

A pesar de que se confieren efectos benéficos a la respuesta inflamatoria, después de una LTME, esta respuesta puede ser la responsable de la necrosis del tejido lesionado y circundante (48-50), ya que juega un papel muy importante en la generación de ROI, mismos que dañan en forma importante el tejido neural.

1.6. PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO.

Otra molécula que es producida por diferentes tipos celulares después de una LTME y que puede dañar el parénquima medular es el NO[•]. El óxido nítrico es un radical libre soluble y gaseoso, que es secretado no sólo por las células endoteliales sino también por los macrófagos y neuronas cerebrales específicas. Se sintetiza a partir de la L- arginina, oxígeno molecular y NADPH, por acción de la enzima sintetasa del óxido nítrico (NOS) (51-53). Cuando se activan los receptores del tipo NMDA por acción del glutamato, se abren canales de Ca²⁺ acoplados al receptor, así como canales sensibles a voltaje aumentando la concentración de Ca²⁺ intracelular. El Ca²⁺ a su vez activa a la sintetasa óxido nítrico constitutiva (NOS_c), originando un incremento en la síntesis de NO[•].

La vida media del óxido nítrico es entre seis y diez segundos y como consecuencia de su reacción con el oxígeno y el agua se convierte en nitritos y nitratos. Esta molécula es producida por diferentes tipos celulares después de una LTME y puede dañar el parénquima medular (52). Las neuronas liberan NO[•] cuando el glutamato se une al receptor de NMDA. Esta unión provoca la entrada de iones Ca²⁺ a la neurona; los iones se unen a la calmodulina y se activa la sintetasa constitutiva de NO[•] (cNOS, del inglés, constitutive nitric

oxide synthase), este proceso se lleva a cabo en cuestión de milisegundos. Actualmente se sabe que el NO[•] no se almacena en las vesículas, ya que por medio de microscopía electrónica se ha localizado a la sintasa del NO[•] (NOS, del inglés, nitric oxide synthase) en el citoplasma de las neuronas del plexo mioentérico, lo cual implicaría que éste se sintetiza en el momento que se necesita. Su liberación depende de una simple difusión desde la terminación nerviosa, ya que en vez de actuar sobre una proteína receptora de membrana, el NO[•] se difunde hasta una neurona adyacente.

Al comparar la NOS con otras enzimas se han encontrado semejanzas solo con P-450 reductasa, siendo la función de transferencia de electrones de esta enzima mediada por tres cofactores que participan en esta canalización electrónica. Se comprende que la secuencia de aminoácidos en la enzima tenga lugares de reconocimiento para cada uno de estos tres cofactores: NADPH, flavina adenina dinucleótido y flavina mononucleótido. Cabe mencionar que además de estos sitios de unión la NOS posee otros sitios de los cuales carece la P450 reductasa como son: para la calmodulina y otro para la fosforilación (proteínas cinasas), siendo esta uno de los principales mecanismos de señalización del interior de las células. Las sintasas constitutivas producen NO[•] en cantidades picomolares por tiempo corto. La sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) normalmente no se encuentra expresada para hacerlo necesita un estímulo inmunológico/inflamatorio, es decir, la presencia de lipopolisacáridos (LPS) o de citocinas inflamatorias como TNF α , IL6, IL-1 e IFN γ , produce NO[•] en cantidades nanomolares, por períodos prolongados (54).

Una vez sintetizado el NO[•] se difunde fácilmente a los tejidos vecinos donde se une a la guanilato ciclasa soluble para activarla y catalizar entonces la transformación de guanosin trifosfato (GTP) en guanosin monofosfato cíclico (GMPC). El NO[•] puede unirse también a las proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial de forma reversible o irreversible, dependiendo de su concentración y puede ocasionar la muerte celular (54).

El NO[•] reacciona con el anión súper oxido para formar peroxinitrito ($O_2^{\cdot-} + NO^{\cdot} = ONOO^{\cdot}$). A pH fisiológico el peroxinitrito reacciona con las proteínas, los fosfolípidos, etc., o bien se descompone en productos citotóxicos como ion (NO_2^+), bióxido de nitrógeno (NO_2) y

radical OH^\bullet , así que parte de la toxicidad del NO^\bullet desacopla la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, produciendo radicales libres (55). Además del NO^\bullet tiene un efecto directo sobre aquellas enzimas en cuyos centros catalíticos existe hierro/sulfuro, como la ribonucleótido-reductasa, en la síntesis del ADN y tres enzimas, así como la succinato-ubiquinona en la cadena transportadora de electrones. Por otro lado, el NO^\bullet juega un papel importante sobre la respuesta inflamatoria, por estimulación de la ciclooxigenasa, aumentando la producción de prostaglandinas y troboxanos. Reduce la agregación y adhesión plaquetaria. El NO^\bullet producido por macrófagos actúa como un radical libre y es citotóxico para ciertos microorganismos y células tumorales. Aunque también ha sido implicado en diversas enfermedades inflamatorias y con el daño a tejido sano por la inhibición de varias enzimas, además de sus efectos tóxicos sobre macrófagos y células malignas (56).

El NO^\bullet puede virtualmente jugar un papel regulador en cualquier etapa del desarrollo de la respuesta inflamatoria. Su efecto parece depender en gran parte a la concentración del mismo, el microambiente celular y el estado de activación de las células sobre las cuales ejerza su acción. Las concentraciones bajas de NO^\bullet , que son producidas por las sintasas del óxido nítrico constitutivas endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS), inhiben la expresión de moléculas de adhesión, la síntesis de citocinas y quimiocinas así como la adhesión y migración de los leucocitos. Las concentraciones altas, que son producidas primordialmente por la iNOS son tóxicas y especialmente pro-inflamatorias (57).

El NO^\bullet es generado enzimáticamente por dichas sintasas, las cuales oxidan L- arginina a L- citrulina. Cada isoforma se expresa en diferentes células del organismo, la nNOS primordialmente en neuronas, la iNOS, en varios tipos de células después de estimulación inflamatoria (macrófagos) y la constitutiva eNOS primordialmente en el endotelio vascular.

Las tres isoformas tienen estructuras moleculares similares, son flavoproteínas y actúan como dioxigenasas usando el oxígeno molecular y NADPH para transformar L- arginina a L- citrulina y NO^\bullet .

El NO formado por la eNOS es responsable del mantenimiento del tono vascular y prevenir la adhesión de leucocitos y plaquetas a la pared vascular. El NO[•] formado por la nNOS actúa como un modulador o neuromediador en algunas neuronas centrales y en terminaciones nerviosas periféricas no-adrenérgicas o no-acetilcolinérgicas. A diferencia de las sintetas constitutivas iNOS produce NO[•] en mayores cantidades y por un tiempo mucho más prolongado es por ello que el NO[•] producido por iNOS, por sus altas concentraciones, ha sido relacionado con procesos inflamatorios. En microglía, macrófagos, monocitos y otras células, la inducción de iNOS y la presencia de L- arginina son suficientes para iniciar la generación de NO[•]. La inducción de iNOS puede ser iniciada por citocinas inflamatorias como IFN- γ , TNF α o IL-1, sin embargo cabe mencionar que su mejor inductor son los LPS (57).

La iNOS también ha sido involucrada de forma importante en los eventos desarrollados después de una LTME. La actividad de esta molécula se ha detectado 4 horas después de la lesión y su pico máximo se ha reportado de 24 a 72 horas incluso 7 días (57-59) poslesión. La expresión y la actividad de esta enzima después de una LTME es el resultado de la activación de la respuesta inflamatoria y del subsecuente reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y células de la microglía al sitio de lesión, reflejándose esto en el tiempo de actividad máxima de la iNOS (58-59). Las altas concentraciones de NO[•] generado por iNOS favorecen la formación de ONOO⁻, un compuesto altamente neurotóxico. De hecho, después de una LTME las concentraciones del ONOO⁻ son de 3 a 5 veces mayores a la normal llegando a tener su pico máximo a las 12 horas poslesión. Por otra parte el mismo NO[•] en grandes cantidades puede actuar como un radical libre y así inducir daño celular al promover el desequilibrio de la permeabilidad celular o bien de la microvasculatura. Un incremento en la permeabilidad vascular puede llevar a un edema vasogénico y con ello a cambios celulares (57). El NO[•] influye también en forma directa en la liberación de neurotransmisores, al estar incrementadas sus concentraciones puede estimular la liberación en exceso de glutamato, mismo que en estas circunstancias actúa primeramente hacia receptores NMDA promoviendo excitotoxicidad por el incremento intracelular de las concentraciones de Ca²⁺.

Los radicales libres conocidos incluyen el delta (δ) y sigma (σ) del oxígeno (O_2), el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y su principal precursor el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Otros radicales libres son el azufre (S), nitrógeno (N), cloro (Cl), carbono (C), estos radicales son susceptibles de asociarse con el oxígeno y formar otros radicales como el NO^{\cdot} .

La respuesta inflamatoria, es parcialmente responsable de la producción de radicales libres después de una LTME, dichas moléculas reactivas dañan las células nerviosas y endoteliales, originando el fenómeno conocido como peroxidación lipídica (interacción de los radicales libres con los ácidos grasos) (57).

1.7. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA O LIPOPEROXIDACIÓN.

La respuesta inflamatoria, es parcialmente responsable de la producción de radicales libres después de una LTME, dichas moléculas reactivas dañan las células nerviosas y endoteliales, originando el fenómeno conocido como lipoperoxidación.

El SNC es susceptible al daño por radicales libres, debido a que los lípidos de membrana son ricos en colesterol y ácidos grasos poliinsaturados, además de que es rico en hierro y ácido ascórbico (los cuales catalizan la producción de radicales libres) y cuenta con pocas defensas antioxidantes, por lo tanto las lesiones al SNC promueven un ambiente favorable para la producción de estos radicales y reacciones de lipoperoxidación.

La interacción de los radicales libres con los ácidos grasos se denomina lipoperoxidación. Los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de membrana y el colesterol son las estructuras celulares más susceptibles de ser atacados por los radicales libres. Los ácidos grasos son los constituyentes más comunes de los lípidos y las sustancias que confieren a estos últimos su característica polar. Un ácido graso es un ácido carboxílico alifático de cadena larga, la mayoría son ácidos monocarboxílicos que contienen cadenas lineales de hidrocarburos con un número par de átomos de carbono. Cuando el diseño es simple y

lineal, se dice que el ácido es saturado, de la misma manera cuando existen más enlaces separados casi siempre por un grupo metileno, se dice que los ácidos están insaturados (60).

El proceso de peroxidación lipídica comienza cuando el radical libre quita un átomo de hidrógeno de uno de los átomos de carbonos metilenos de la cadena hidrocarbonada para originar un radical libre lipídico. Puesto que los ácidos grasos poliinsaturados contienen grupos metileno separados por dobles enlaces que debilitan el enlace metileno C-H. El radical libre lipídico, para estabilizarse, sufre un reajuste molecular que produce un dieno conjugado. El dieno conjugado reacciona con el oxígeno molecular y se forma un radical peroxilo que puede dar lugar a endoperóxidos o bien tomar un átomo de hidrogeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente y formar de nuevo un radical libre lipídico y un hidroperóxido lipídico (61).

Los hidropéroxidos lipídicos son compuestos estables, pero si entran en contacto con iones metálicos de transición, producen más radicales que pueden iniciar y propagar otras reacciones en cadena, alterando la estructura de las membranas y por lo tanto su función. Por lo que es importante considerar, que la peroxidación lipídica varía dependiendo del tipo y severidad de la lesión. Los productos finales de la peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y alteran la permeabilidad vascular, la respuesta inflamatoria o la quimiotaxis (62).

1.8. CERULOPLASMINA

Tras un daño tisular (traumático, infeccioso, etc.), el organismo lleva a cabo una serie de complejas reacciones en procura de tres objetivos:

- 🍏 Aislar e inactivar el agente causal.
- 🍏 Prevenir el daño tisular.
- 🍏 Activar los mecanismos de reparación necesarios para retornar a la normalidad.

Este proceso llamado inflamación y las reacciones inmediatas que se llevan a cabo tras el daño constituyen la respuesta de fase aguda, que es desencadenada por la acción de varias citocinas sobre el SNC, las principales son la IL-1, IL-6 y el TNF. Estas citocinas son liberadas a partir del foco de inflamación y su concentración aumenta en el plasma (63).

Estos eventos provocan cambios en la síntesis de proteínas de fase aguda que aumentan en su nivel plasmático en la inflamación. La síntesis de estas proteínas se lleva a cabo principalmente en el hígado, ya que los hepatocitos incrementan la biosíntesis de estas proteínas incrementando consecuentemente su concentración, por lo que son llamados reactantes positivos de fase aguda y a su vez los hepatocitos disminuyen la síntesis de otras proteínas llamadas reactantes negativos de fase aguda (63).

Entre las proteínas de fase aguda que son reactantes positivos tenemos a la globulina α . Las globulinas α se subdividen en los grupos α_1 y α_2 . Dentro de las globulinas α_2 encontramos a la ceruloplasmina, su síntesis es inducida por la acción de la IL-6, por lo que es llamada proteína de fase aguda tipo 2. La ceruloplasmina es una proteína de color azul debido a su contenido de cobre y transporta el 90 % de este metal presente en el plasma, con peso de 132 kDa, un punto isoelectrico de 4.4, movilidad electroforética de 4.6. Clasificada dentro de las proteínas de cinética de evolución lenta, ya que aumenta su concentración en un 50 % sobre su nivel basal, alcanzando su pico detectable de 3-4 días, con una vida media de entre 3-6 días y retornando a la normalidad de los 10 a los 15 días (63-66).

También se sabe que la ceruloplasmina juega un papel de ferroxidasa que ayuda en la importación y exportación del hierro a través de la membrana celular, catalizando la conversión de hierro ferroso (Fe^{+2}) a su forma férrica (Fe^{+3}) (65-66).

Las funciones fisiológicas de la ceruloplasmina incluyen:

- * Transporte de cobre.
- * Coagulación.
- * Angiogénesis.

- * Ayuda en el estrés oxidativo por captación de radicales superóxidos y secuestro de iones libres de cobre.
- * Oxidación de lipoproteínas de baja densidad.
- * Homeostasis de hierro como ferroxidasa, catalizando la conversión de Fe^{+2} tóxico en Fe^{+3} no tóxico (66-68).

Esta proteína es abundante en suero pero no en la barrera hemato-encefálica por lo que no es posible su detección directamente en el SNC, al haber una gran cantidad de Fe^{+2} se incrementa el daño secundario y una disminución de la funcionalidad, originando una neurodegeneración (66).

Se ha encontrado que los niveles de ceruloplasmina sérica y la actividad del cobre incrementan en enfermedades autoinmunes o daño celular. El transporte de cobre en los conductos biliares es interrumpido por el colapso de estos y por lo tanto el cobre se acumula en el hígado, así es probable que los niveles de ceruloplasmina aumenten para metabolizar los acúmulos de cobre en el hígado. Sin embargo los niveles de ceruloplasmina en suero no son significativos para diagnosticar enfermedades autoinmunes, pero si en cicatrización del hígado cuando este dañado por factores físicos, químicos o biológicos (69).

1.9. PARTICIPACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LOS PROCESOS DE DESTRUCCIÓN, PROTECCIÓN Y RESTAURACIÓN DEL TEJIDO NEURAL.

La producción y liberación de citocinas proinflamatorias y quimiocinas es uno de los primeros eventos inflamatorios que se desencadenan después de una lesión en la médula espinal.

Citocinas como IL-1, IL-6 y TNF- α son conocidas como mediadores de respuestas inflamatorias periféricas, y son sintetizadas y liberadas por varias células en el SNC. TNF- α se encarga inmediatamente de reclutar neutrófilos al sitio de lesión al inducir la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1. También estimula la liberación de IL-8, que es

un importante factor quimiotáctico para neutrófilos. De esta manera TNF- α afecta la permeabilidad de las células endoteliales y como consecuencia daña la barrera hematoencefálica. Esta citocina posee también actividad citotóxica en contra de los oligodendrocitos y puede contribuir con ello a la desmielinización. TNF- α estimula también la proliferación e hipertrofia de astrocitos promoviendo con esto la formación de la cicatriz glial misma que funciona como barrera a una posible regeneración (70-72).

En diversos estudios se ha reportado que el reclutamiento de leucocitos en la médula espinal lesionada es una respuesta fisiológica asociada con la producción de citocinas y proteincinasas que están involucradas en la reparación del tejido lesionado. Los neutrófilos por ejemplo son las primeras células reclutadas con el objetivo de limpiar el sitio de posibles patógenos y restos celulares a través del proceso de fagocitosis (primeras fases de reparación,) sin embargo, al estar activados también dan inicio a la liberación de una importante cantidad de neurotoxinas tales como: especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales de nitrógeno (RN), así como quimiocinas y una variedad de enzimas que promueven la destrucción tisular (38,46).

La llegada de los neutrófilos se acompaña posteriormente por la presencia de otras células fagocíticas. Los macrófagos y las células de la microglia se incrementan en el sitio de lesión. Su llegada es un evento que de no ser modulado puede incrementar el daño tisular. Ambas células pueden ser estimuladas por proteínas del SNC y restos de mielina a través de los receptores CR3 y Toll-like iniciando con ello la liberación de mediadores inflamatorios y otras sustancias que incrementan la necrosis y la desmielinización (46).

La activación de los macrófagos se acompaña de la liberación de factores microbicidas como la mieloperoxidasa y elastasa, mismas que contribuyen indudablemente a la lesión tisular (73), de hecho algunos estudios han demostrado que el bloqueo farmacológico de los productos de estas células, promueve una mejor preservación anatómica y funcional después de una LTME (46,74). A pesar de lo antes mencionado, la participación de los macrófagos en la respuesta posterior a una LTME no es muy clara (75). La infiltración de monocitos y macrófagos después de una LTME tiene como objetivo remover los restos

celulares y estimular la infiltración de nuevos vasos sanguíneos y células parenquimales, ayuda además a la interacción con los linfocitos T, ya que actúan como células presentadoras de antígenos, regulando la activación y proliferación de estos (46).

Por otro lado la microglia, son células pluripotenciales capaces de desarrollar diferentes fenotipos. La severidad de la lesión determina la intensidad de la respuesta inflamatoria y por lo tanto la cantidad de células reclutadas en el sitio de lesión y la magnitud de la respuesta inmunológica debido a la interacción de la microglia con las células T, llevando a éstas a una especificidad antigénica que va a regular la respuesta inmunológica y las fases subsecuentes (76). La microglia libera factores neurotóxicos incluyendo óxido nítrico y citocinas proinflamatorias como son TNF- α e IL-1 β (77).

Por otra parte, la microglia activada al igual que los macrófagos, remueve los despojos celulares después de la lesión y promueve la neovascularización en el área de lesión con lo que se facilita la liberación de factores tróficos y nutrientes para la supervivencia y proliferación de las células migrantes en el área dañada (76).

Después de una LTME se desencadena una respuesta autoinmune contra constituyentes neurales (78-80). Esta respuesta incrementa el daño al tejido nervioso, o promueve protección (81-85), e incluso restauración (48,85-88) del tejido lesionado. Los linfocitos T, pueden actuar en forma positiva sobre el tejido nervioso ya sea mediante la liberación de citocinas y factores neurotróficos o bien mediante la liberación de quimiocinas para promover la migración de otros elementos del sistema inmune como los neutrófilos y los macrófagos que participan importantemente en los procesos de protección y regeneración axonal.

Las células inflamatorias son capaces de promover daño, protección o incluso restauración del tejido neural después de una lesión. Cuando la respuesta, se da en forma desmedida y sin control alguno, ésta puede ser capaz de promover una mayor destrucción del tejido sano de la misma forma en que lo haría una respuesta de hipersensibilidad celular. El desafío entonces es definir las formas para manipular las vías de señalización de estas células para

maximizar su potencial de reparación y simultáneamente minimizar su capacidad destructora inherente.

Diversas estrategias se han estudiado para poder modular la respuesta inflamatoria en otros modelos de lesión tal es el caso de FILM el cual podría emplearse como posibilidad terapéutica y así detener el daño neural. Por todo lo anterior resulta de interés el estudio del Factor Inhibidor de la Locomoción de los Monocitos (FILM) como posibilidad terapéutica para originar neuroprotección y recuperación motriz después de una LTME en ratas.

1.10. FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCIÓN DE MONOCITOS (FILM).

En el absceso hepático amebiano llama la atención la escasez de elementos inflamatorios en los estadios avanzados. Para explicar este fenómeno se propusieron fundamentalmente dos hipótesis, que no resultan necesariamente excluyentes: la “citólítica” y la “antimigratoria”. Según la primera, la ameba destruirá los leucocitos conforme estos fueran arribando al tejido infectado. La hipótesis “antimigratoria” propuesta por Pérez-Tamayo sugiere que la *Entamoeba histolytica* podría producir y liberar factores capaces de inhibir el arribo de los leucocitos al foco de infección (89). La falta de estos elementos inflamatorios tardíos pueden, a su vez, estar relacionados con la ausencia de tejido cicatricial y en consecuencia con la perfecta regeneración del parénquima hepático. En relación con esta segunda hipótesis, Kretschmer y col., demostraron que en el sobrenadante de cultivos axénicos de *E. histolytica* se encuentra un factor capaz de inhibir *in vitro* la locomoción de fagocitos mononucleares (FM), sin afectar la locomoción de neutrófilos polimorfonucleares (nPMN) y eosinófilos (ePMN) (90), cancela virtualmente la producción de intermediarios reactivos del oxígeno [ROI (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot})] y la síntesis inducida de óxido nítrico [RNI (NO^{\cdot})] pero ahora en FM y nPMN sin afectar a ePMN (91-92) induce un aumento importante de microtúbulos asociados al centríolo y en concentración del cAMP mientras que disminuye el cGMP) (93-96).

El FILM cuya secuencia es Met-Gln-Cis-Asn-Ser, de un peso molecular de 583Da y que posiblemente proviene de un péptido mayor o de una proteína que se divide por la acción de una proteasa tipo tripsina/serina, con características anti-inflamatorias (97).

Estudios de análisis de microarreglos, citometría de flujo, PCR tiempo real y determinación de proteínas por el método inmuno-enzimático (ELISA), han mostrado que el FILM tiene un importante papel en el equilibrio celular Th1-Th2 favoreciendo el balance hacia éste último ya que inhibe la producción de interleucinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12, INF- γ y favorece la producción de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 y IL-1r (en líneas celulares U-937 y MRC-5) haciendo evidente que el balance homeostático entre estas citocinas sea crítico en la modulación de la respuesta inflamatoria, además disminuye la expresión de moléculas quimioatrayentes como las quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 β , MIP-3 α , MIG, entre otras (98-101).

Resultados preliminares del efecto del pentapéptido sobre la expresión de genes en fibroblastos, sugieren que el FILM participa en procesos de angiogénesis, factores de crecimiento, síntesis/degradación de matriz extracelular, vasculogénesis, guía axonal ya que modifica la expresión de genes que intervienen con estos procesos como: Factores de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), trombopoyetina (Tpo), neuropilin, folistatina, efrinas, factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores neurotróficos (BDNF), entre otros(98,101-102).

In vivo el FILM retarda el arribo de mononucleares en ventanas de Rebuck en piel humana e inhibe la hipersensibilidad retardada cutánea al dinitroclorobenceno (DNCB) en cobayos y gerbos, abate la expresión de moléculas de adhesión VLA-4 y VCAM-1 en endotelio vascular pos-capilar y en monocitos de gerbos (90, 103-104).

Por otro lado mediante métodos *ab initio* se identificó la estructura química espacial y el sitio reactivo más probable del pentapéptido, identificando el segmento: ...Cis-Asn-Ser como la parte crítica funcional del factor. Los resultados geométricos, estructurales y de orbitales destacan la presencia de un grupo farmacóforo en la secuencia del FILM, el cual

podría ser relevante e imprescindible con respecto a la actividad anti-inflamatoria del mismo (105).

Los efectos biológicos inherentes al FILM sugieren una posible aplicación selectiva en la clínica.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La lesión traumática de médula espinal (LTME), ocasiona alteraciones estructurales y funcionales a nivel neuronal, desencadenando una serie de mecanismos que originan una destrucción del parénquima medular y un proceso neurodegenerativo crónico iniciado por la liberación de mediadores inflamatorios y otras sustancias que incrementan la necrosis y la desmielinización y así un proceso regenerativo o destructor. Por lo que es de interés el estudio de la aplicación del pentapéptido FILM como posibilidad terapéutica para originar neuroprotección y recuperación motriz en una LTME en ratas, ya que posee características anti-inflamatorias demostradas tanto *in vitro* como *in vivo*. Disminuyendo la cantidad de radicales libres en productos de oxido nítrico, lipoperoxidación y de algunas proteínas de fase aguda como la ceruloplasmina que aumentan en procesos inflamatorios.

3. HIPÓTESIS

El FILM promoverá la recuperación motriz y modificará la producción de ceruloplasmina, nitritos y peroxidación lipídica en animales sometidos a una lesión traumática de médula espinal.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar si el FILM ejerce algún efecto en la recuperación motriz, producción de ceruloplasmina, nitritos y peroxidación lipídica en animales con lesión traumática de médula espinal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- * Estandarizar la técnica de Laminectomía.
- * Estandarizar la técnica Lesión Traumática de la Médula Espinal (LTME), moderada y severa.
- * Conocer, manejar y aplicar la prueba de habilidad locomotora a campo abierto “Basso, Beattie & Bresnahan” (BBB). Anexo 1
- * Analizar la recuperación motora de los animales con LTME sometidos a un tratamiento pos- lesión con FILM.
- * Determinar y cuantificar la proteína de fase aguda ceruloplasmina en plasma de animales con una LTME.
- * Determinar y cuantificar nitritos por la reacción de Griess en plasma de animales con una LTME.
- * Determinar y cuantificar la peroxidación lipídica en plasma de animales con una LTME.

5. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

5.1. Tipo de estudio

Experimental y prospectivo.

5.2. Población objetivo

Ratas hembras Sprague Dawley, sanas de 200-250 g.

5.3. Criterios:

Inclusión: hembras Sprague Dawley sanas de 12 a 15 semanas de edad y con un peso aproximado entre 200- 250 g.

Exclusión: ratas que no cumplan con los criterios de inclusión y aquellas ratas que a los 7 días después de la lesión, en la prueba motora tengan una calificación de 10 o más en la escala de BBB y también aquellas que se hayan lesionado las patas traseras por factores externos a la lesión.

5.4. Variables

Independientes

Lesión traumática de la médula espinal (LTME). Daño en la médula espinal causado por el impacto con un cilindro de acero de 10 g de peso que se deja caer de una altura de 25 y 50 mm. El daño origina inflamación y destrucción del tejido de la médula espinal, así como pérdida parcial de la actividad motora en las extremidades posteriores del 100 % de los animales.

Administración del FILM. Posterior a la LTME, en el sitio de lesión se administró, por difusión, 50 µl de una solución de FILM con una concentración de 200 µg. Posteriormente se suturó la zona de la lesión.

Administración del PBS. Posterior a la LTME, en el sitio de lesión se administró, por difusión, 50 µl de una solución de PBS pH 7.4. Posteriormente se suturó la zona de la lesión.

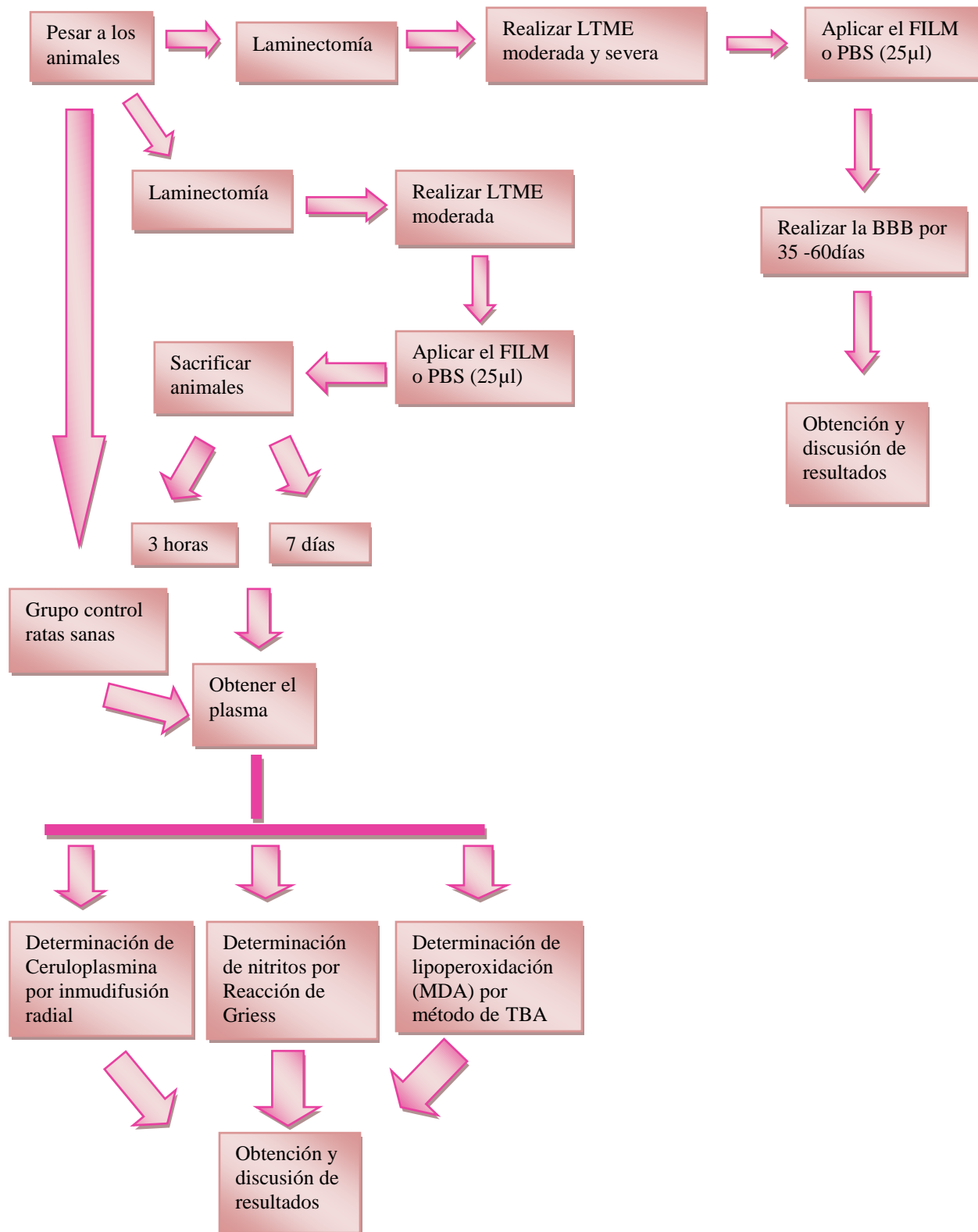
Dependientes

Producción de Ceruloplasmina. Proteína de fase aguda que aumenta en procesos inflamatorios.

Lipoperoxidación y oxido nítrico (nitritos). Productos formados por el aumento de radicales libres después de una lesión o un daño que ocasiona un proceso inflamatorio.

Neuroprotección. Estrategia terapéutica que previene o disminuye la degeneración secundaria a una lesión en la médula espinal. Mientras mayor es la neuroprotección menor será la destrucción del tejido neural y por lo tanto menor la pérdida de funciones neurológicas.

6. DIAGRAMA DE TRABAJO



7. Material y Métodos

7.1. *Estandarización de la Técnica de laminectomía.*

Las ratas se anestesiaron mediante la inyección intramuscular de una mezcla de clorhidrato de xilazina (10 mg/ Kg) y ketamina (50 mg/ Kg). Diez minutos después de dicha inyección y previa asepsia de la región torácico-lumbar, se localizo la 9ª y 10ª vértebras, se realizaron dos cortes longitudinales y se procedió a una laminectomía a nivel de la 9ª vértebra torácica hasta exponer la médula espinal, sin lesionarla (Fig. 3). Las ratas se suturaron en la zona de cirugía, primero músculo y luego piel, con hilo dexion absorbible en músculo e hilo de nylon en piel y después se colocaron en recuperación para tenerlas bajo cuidados especiales, como se menciona más adelante. Se evaluó si hubo o no daño en la médula al día siguiente, poniendo en una tabla a la rata y se observó si la rata presenta movimiento de sus extremidades al 100 %, determinando así que la realización de la técnica se llevo adecuadamente y de esta manera no influye en los resultados de la prueba motora.



Fig. 3. Proceso de Laminectomía

7.2. *Estandarización de la Lesión Traumática de la Médula Espinal (LTME).*

Las ratas fueron anestesiadas mediante la inyección intramuscular de una mezcla de clorhidrato de xilazina (10 mg/ Kg) y ketamina (50 mg/ Kg). Treinta minutos después de dicha inyección y previa asepsia de la región torácico-lumbar, se realizaron dos cortes longitudinales y se realizo una laminectomía a nivel de la 9ª vértebra torácica hasta exponer la médula espinal. Antes de realizar los experimentos se estandarizo la técnica de laminectomía para evitar dañar la medula espinal y que de esta manera no se alteren los

resultados en la recuperación motora. Posteriormente se hizo la LTME mediante una contusión. Para la contusión, se dejó caer un cilindro de 10 g de una altura de 25 o 50 mm (lesión moderada y lesión severa respectivamente) sobre el sitio expuesto, utilizando el impactador (Universidad de Nueva York NYU, USA), un aparato que ha demostrado infligir una lesión por contusión en la médula espinal bien calibrada (Fig. 4 y 5) (106).



Fig. 4. Proceso de Contusión



Fig. 5. Monitoreo estadístico del proceso de contusión

7.3. *Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM).*

El FILM se obtuvo de American Peptide Company Co. (Sunnyvale, CA, USA) (>95% de pureza) se disolvió una concentración de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en Solución PBS a un pH de 7.4. De esta mezcla se realizaron alícuotas y se guardaron a -70°C , hasta utilizarlo. Se aplicaron 25 μl (4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de la solución de FILM o PBS según sea el caso, en la zona quirúrgica después de la lesión directamente sobre el sitio donde el impactador realizó la lesión, asegurando con esto que el FILM o el PBS estuvo en contacto con la zona de lesión.

7.4. *Grupo experimental 1.*

Se realizaron 2 experimentos para cada grupo. Uno de lesión moderada y uno de lesión severa. Con 20 animales cada experimento.

Grupo A. Ratas con LTME + administración de PBS

Grupo B. Ratas con LTME + administración de FILM

En todos los casos a los animales se les aplicó la prueba de “BBB” por 35 días.

7.5. Cuidado de los animales.

Se colocaron las ratas lesionadas sobre camas con aserrín y con agua filtrada que se cambiaron diariamente hasta el término del estudio. La vejiga fue evacuada con ayuda de un masaje en el abdomen, dos veces al día (por la mañana y por la tarde) (Fig. 6), hasta que se logro la función normal de la micción, que se pierde por unos días debido a la lesión. Todas las ratas fueron monitoreadas cuidadosamente para evitar infección en el tracto urinario u otro signo de enfermedad sistémica. Durante los primero diez días y cuando se presento hematuria después de este periodo, recibieron un tratamiento de enrofloxacina en el agua con una dosis de 64 mg/ Kg/ día.



Fig. 6. Cuidados de los animales

7.6. Evaluación motora (BBB).

Se realizó cada 7 días desde el inicio hasta el final del estudio, mediante la utilización de la prueba de Habilidad Locomotora a Campo Abierto “BBB” (Fig. 7) donde la recuperación se califico en una escala de 0 (parálisis completa) a 21 (movilidad completa) (ver anexo) (107,108). Al final del estudio se evaluó y se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos para interpretar los datos en una gráfica y de esta manera se observo la eficacia del FILM con respecto al PBS.

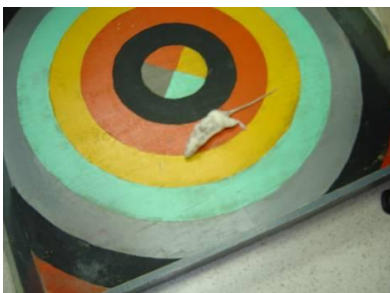


Fig. 7. Prueba de BBB

7.7. Grupo Experimental 2.

Se lesionaron 16 ratas divididas en dos grupos de 8 ratas cada uno y cada grupo se subdividió en 2 subgrupos de 4 ratas y se realizaron las determinaciones de ceruloplasmina, nitritos y peroxidación lipídica en plasma a las 3 horas y 7 días. Además se utilizó un grupo control de 4 ratas sin lesión y sin tratamiento (sanas).

7.8. Determinación y cuantificación de Ceruloplasmina por inmunodifusión radial.

Se prepararon las cajas (Falcon Dickson de 35 x 14 mm), pesando 0.3 g de agarosa (B.D. México) y se colocaron en un matraz de 250 mL, se les agrego 30 mL de agua destilada, posteriormente se colocó el matraz en una olla de presión de 21 L a que alcanzara 125 °C para disolver la agarosa y se dejó enfriar, se agregó azida de sodio al 0.01 % p/ v (J.T. Baker Xalostoc, México). Se colocaron 2 mL de agarosa al 1 % con una pipeta graduada a 6 tubos de ensayo etiquetados, se colocaron en baño María a 37°C durante 10 min, se prepararon las cajas, perfectamente limpias y secas, a los tubos que contienen 2 mL de agarosa por separado y de uno en uno se les agrego 150 µL de suero de conejo anticерuloplasmina y se mezcló bien en el vortex y se colocó en las cajas tubo por pozo, se dejó reposar y solidificar, después se realizaron perforaciones de 3 mm en cada pozo con agarosa, sin romper y en las posiciones del reloj (3,6,9 y 12).

Se colocaron 5 µL de cada muestra problema en el orificio de los pozos de las placas o se colocaron 5 µL del estándar de ceruloplasmina de rata y se refrigeraron durante 48 h, a las 48 h se midió el halo de inhibición con un regla milimétrica, se realizó el cálculo de ceruloplasmina utilizando el estándar.

7.9. Determinación y Cuantificación de Nitritos por el Método de Griess.

Se tomaron 100 µL de plasma de la rata y se adicionaron 300 µL de agua destilada (dilución 1:4), se le agregaron 20 µL de la solución de ZnSO₄ (Sigma chemical, USA) 30 % p/ v, se agitaron y se centrifugaron a 10,000 rpm/ 5 min. A los tubos con el cadmio activado (Anexo 3) se les decantó el NH₄Cl al 5 % con un pH de 9 y se les adicionó el sobrenadante del paso anterior, se taparon con papel parafilm y se colocaron en una plancha de agitación horizontal por 15 min, se centrifugaron los tubos a 3500 rpm/ 5 min y se

tomaron 200 μL del sobrenadante a los cuales se les adicionó 700 μL de agua destilada + 50 μL de sulfanilamida (E. Merck, F.R. Germany) (0.5 g/ 150 mL de ácido acético al 15 %) y se incubó por 10 min a temperatura ambiente, se adicionaron 50 μL del reactivo N-(1-naftil)- etilendiamino diclorhidrato (NED) (Sigma chemical, USA) (0.2 g/ 150 mL de ac. acético al 15 %), se mezcló y se incubó 30 min. a temperatura ambiente, se leyeron las muestras en el espectrofotómetro (Jenway 6305 uv/ vis.) a 540 nm y se determinó la concentración de nitritos y se reportaron los resultados con la utilización de la curva patrón de nitrito de sodio (Anexo 4)

7.10. Determinación y cuantificación de peroxidación lipídica por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA).

Se colectaron las muestras sanguíneas en tubos heparinizados y se centrifugaron a 3000 rpm/ 5 min, se separó el plasma y se agregó 10 μL de BHT (butiril-hidroxitolueno) (Sigma chemical, USA) 2 mM, se diluyó el plasma 1:5 (100 μL de plasma + 400 μL de PBS), se tomaron 400 μL del plasma y se le adicionó 50 μL de BHT 12.6 mM + 400 μL de ácido ortofosfórico 0.2 M (J.T. Backer, México), se mezclaron en vortex por 10 seg, después se adicionaron 50 μL de TBA 0.11 M (J.T. Backer, México) y se mezcló nuevamente en el vortex. La mezcla de reacción se colocó en un baño María a 90°C con los tubos tapados por 15 min., se enfriaron en hielo y se les agregó 1 ml de N- butanol (J.T. Backer, México) y 100 μL de solución saturada de NaCl (H y Cel de México), se agitó vigorosamente durante 30 seg, se centrifugaron a 5000 rpm/ 1 min., se transfirieron 500 μL de la fase de butanol a una celda, se leyó a 535 nm y a 572 nm para corregir la absorbancia. Se realizó la curva estándar de MDA (Anexo 5) para poder realizar los cálculos de las concentraciones de MDA (109).

7.11. Método estadístico.

Se realizó un análisis estadístico de todos los grupos y se verificó la distribución de los datos bajo la curva de normalidad. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica de análisis de varianza de Kruskal-Wallis ya que los datos no tienen una distribución normal con una $p < 0.05$.

7.12. Consideraciones éticas.

Para la realización del presente proyecto, se tomaron en cuenta los lineamientos establecidos por el reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud (Título séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación) y la Norma Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (110-111) (Anexo 6).

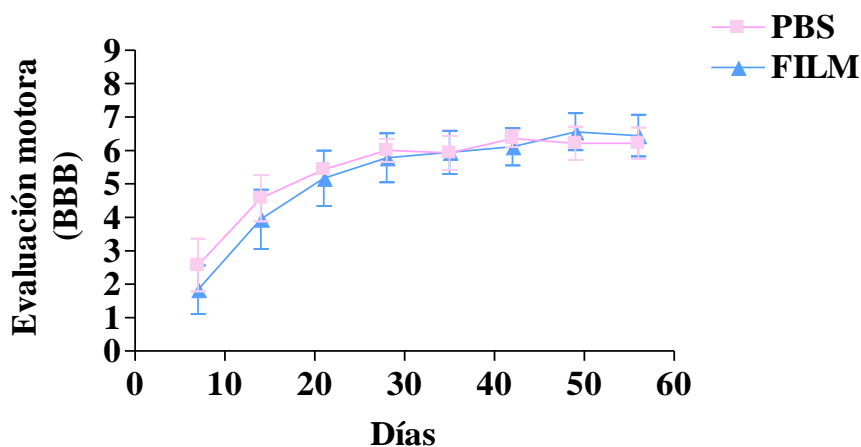
8. RESULTADOS

Las Gráficas 1 y 2, representan las curvas de recuperación motriz obtenidas mediante la escala de “BBB” y evaluados por 35- 60 días. La primera representa los datos obtenidos de una LTME moderada y la segunda de una LTME severa. En ambas gráficas se compara la recuperación motriz de los animales tratados con PBS y los tratados con FILM.

1

Gráfica 1. Evaluación motora mediante la prueba de “BBB” en ratas con lesión moderada

Evaluación motora mediante la prueba de "BBB" en ratas con Lesión Severa

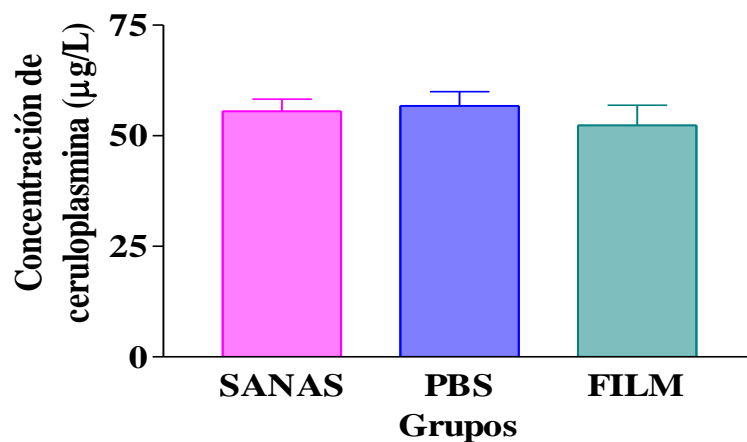


Gráfica 2. Evaluación motora mediante la prueba de “BBB” en ratas con lesión severa.

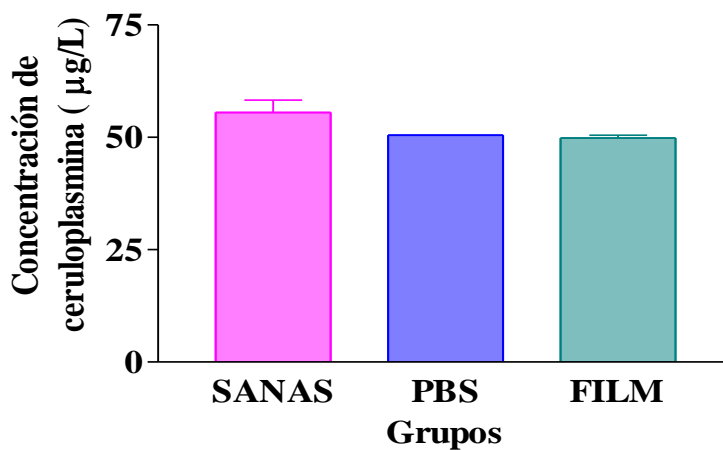
La gráfica 3 representa la determinación de ceruloplasmina mediante la técnica de Inmunodifusión radial, después de la LTME y la aplicación de los tratamientos. La gráfica A muestra la detección de la concentración de ceruloplasmina a las 3 h y la gráfica B la determinación de la concentración de ceruloplasmina a los 7 días. La correlación entre los grupos fue realizada mediante la prueba estadística Kruskal-Wallis.

Determinación de Ceruloplasmina

A)



B)

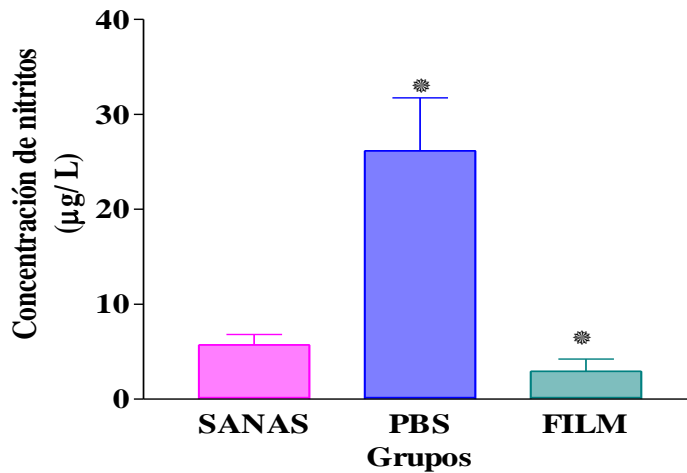


Gráfica 3. Determinación de ceruloplasmina a diferentes grupos y analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis sin diferencia significativa ($p > 0.05$) ($\bar{X} \pm ES$). A) Determinación a las 3 h, B) Determinación a los 7 días posterior a la LTME.

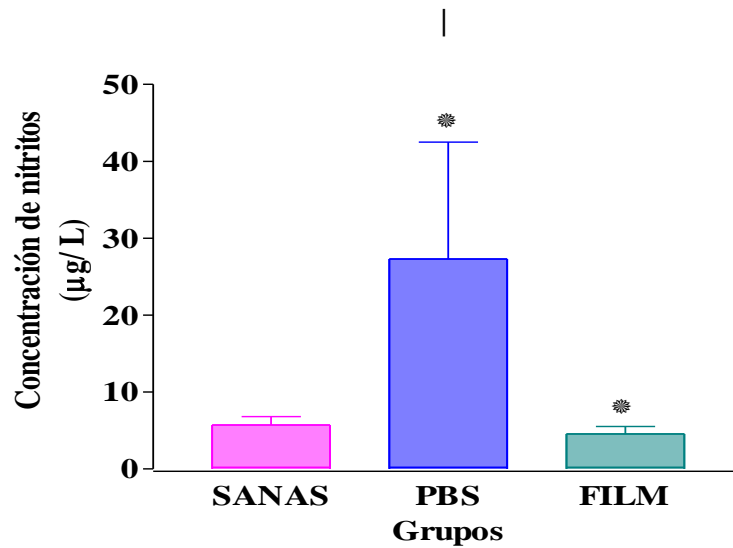
En la gráfica 4 se observa la determinación de nitritos mediante la reacción de Griess. La gráfica A) a las 3 h y la B) a los 7 días después de la LTME. Los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, encontrando diferencia significativa entre los grupos PBS y FILM al ser comparados entre sí.

Determinación de nitritos

A)



B)

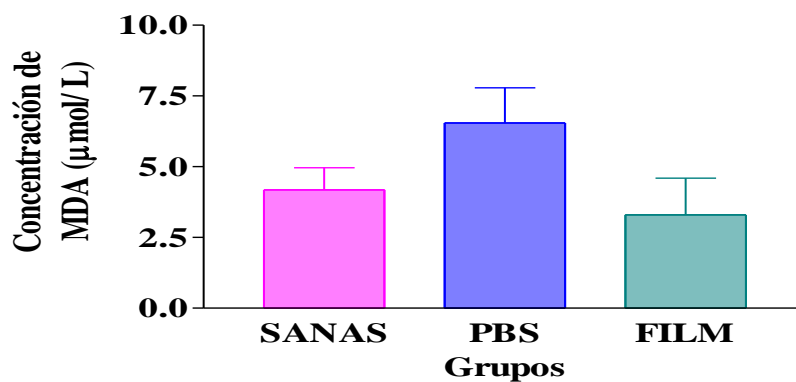


Gráfica 4. Determinación de nitritos a diferentes grupos y analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis con diferencia significativa ($p < 0.05$) ($\bar{X} \pm ES$). Gráfica A) Determinación a las 3 h, B) Determinación a los 7 días posterior a la LTME.

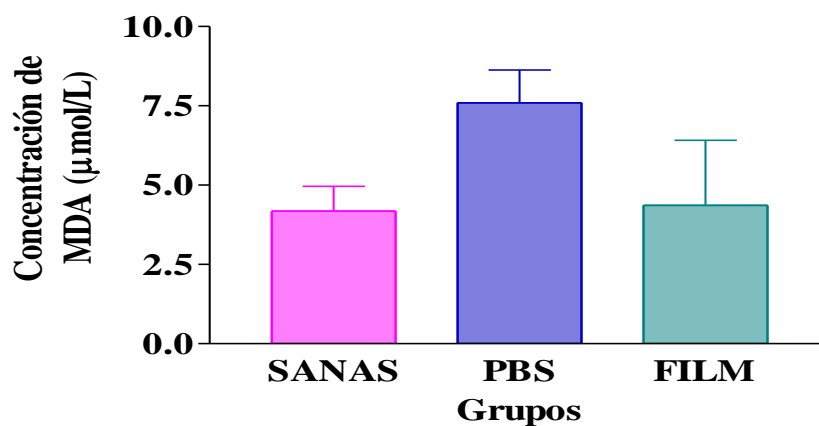
La Gráfica 5 representa la determinación de peroxidación lipídica, mediante la concentración de MDA a partir de BHT a las 3 h (A) y a los 7 días (B). Para la determinación de MDA se utilizó una curva estándar a partir de la cual se extrapolo la concentración de los problemas (PBS ó FILM) y el control (ratas sanas). Se compararon todos los grupos entre sí y los resultados fueron analizados mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis sin encontrar diferencias significativas.

Determinación de peroxidación lipídica

A)



B)



Gráfica 5. Determinación de peroxidación lipídica a diferentes grupos y analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis sin diferencia significativa ($p > 0.05$) ($\bar{X} \pm ES$). A) Determinación a las 3 h, B) Determinación a los 7 días posterior a la LTME

9. DISCUSIÓN.

La lesión traumática de medula espinal (LTME), ocasiona alteraciones estructurales y funcionales y ha sido catalogada como una enfermedad catastrófica debido a las secuelas que se producen sobre las funciones neurológicas, mismas que son el resultado de una serie de alteraciones funcionales a nivel neural que pueden ser desde el bloqueo transitorio de la conducción eléctrica, hasta la falta total de la misma, dependiendo del grado de lesión, desencadenando una serie de mecanismos que originan una destrucción del parénquima medular y un proceso neurodegenerativo crónico iniciado por la liberación de mediadores inflamatorios y otras sustancias que incrementan la necrosis y la desmielinización y así un proceso regenerativo o destructor (9-10).

El tratamiento desde el punto de vista médico tiene un elevado costo por la implicación de recursos tecnológicos y posteriormente por las limitaciones para poder reintegrar a los pacientes a sus actividades productivas previas. Actualmente, la incidencia de morbi-mortalidad sigue siendo considerablemente elevada, además que hay muy pocos medicamentos para tratar este tipo de padecimiento y en su mayoría no siempre se tienen los efectos deseados, ya que se deben utilizar en altas dosis y eso ocasiona que se presenten efectos secundarios que pueden llegar a ser severos y provocar otro tipo de padecimientos o simplemente no presentan efecto, ni negativo ni positivo, lo que hace que no sean factibles para utilizarlos en la clínica o que sean poco utilizables (18-19).

Uno de los fenómenos más importantes que se lleva a cabo después de una LTME es la migración de un gran número de células inflamatorias residentes (células de la microglia) y de aquellas reclutadas de la periferia (macrófagos, linfocitos) (36). En las fases tardías de la lesión, se incluyen factores de crecimiento y/o producción de citocinas, depósito de la matriz celular y revascularización que son prevalentes en la LTME.

La respuesta inmune desarrollada después de una LTME involucra dos etapas de infiltración celular (36). La primera es dominada por células polimorfonucleares (PMN) y predomina durante las primeras horas (37). Los neutrófilos aparecen en las primeras 3 a 4

horas (38), permanecen en el tejido de 8 a 24 horas posteriores a la lesión (39,40). Además, estudios experimentales han demostrado que entre 3 y 12 horas posteriores a la lesión, existe un aumento significativo de la molécula de adhesión intercelular I (ICAM-I), la cual participa en la infiltración tisular de los neutrófilos (43).

La llegada de los neutrófilos se acompaña posteriormente por la presencia de otras células fagocíticas. Los macrófagos y las células de la microglia se incrementan en el sitio de lesión. Su llegada es un evento que de no ser modulado puede incrementar el daño tisular. Ambas células pueden ser estimuladas por proteínas del SNC y restos de mielina a través de los receptores CR3 y Toll-like iniciando con ello la liberación de mediadores inflamatorios y otras sustancias que incrementan la necrosis y la desmielinización (46).

Kretschmer y col., demostraron que en el sobrenadante de cultivos axénicos de *E. histolytica* se encuentra un factor capaz de inhibir *in vitro* la locomoción de fagocitos mononucleares (FM), sin afectar la locomoción de neutrófilos polimorfonucleares (nPMN) y eosinófilos (ePMN) (90), el factor fue aislado, secuenciado y finalmente sintetizado, al péptido sintético se le han determinado los efectos biológicos demostrados con el péptido original entre otros varios efectos sobre moléculas inflamatorias o antiinflamatorias. La falta de elementos inflamatorios tardíos como las células mononucleares y los efectos sobre el proceso inflamatorio, pueden a su vez, estar relacionados con la ausencia de tejido cicatricial y en consecuencia con la perfecta regeneración del parénquima medular.

Debido a los efectos demostrados por el FILM y, a los escasos estudios que hay del mismo *in vivo*, decidimos probar el factor en un modelo con un proceso altamente inflamatorio como lo es la LTME y observar su efecto en la recuperación motriz en una contusión moderada y una severa. La aplicación de factor, mejoró la recuperación motriz en el grupo de LTME con lesión moderada como se observa en la grafica 1, comparado con el grupo tratado con PBS, indicando que probablemente haya una regeneración del tejido neuronal, y quizás una neuroprotección en el modelo por el efecto antiinflamatorio del FILM demostrado anteriormente en otro tipo de estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos resultados abre nuevas ventanas para el uso de este péptido en LTME que hasta la fecha no

había sido probado. Como lo indicamos anteriormente, este es el primer tipo de estudios en donde se utilizó el FILM como un posible tratamiento originando posiblemente una neuroprotección y evitando daño severo en el parénquima medular. Deseamos reiterar que aun no hay estudios que nos indiquen la mejor dosis y vía de administración adecuada para su aplicación.

Con respecto al efecto del FILM en la LTME con contusión severa, el grupo tratado con FILM y el tratado con PBS tuvieron resultados semejantes por lo que no hay diferencia significativa entre los grupos observados como se demuestra en la gráfica 2, lo que nos puede indicar que dependiendo del grado de lesión es la eficacia del factor. Lo recomendable en este caso es probar dosis repetidas o reforzar la dosis inicial con aplicación del factor por vías de administración diferentes y que nos permitan tener una mejor visión de la utilidad del FILM como neuroprotector y que además pueda ayudar no solo proteger, sino a regenerar nuevas células neuronales que permitan una mejora en los animales tratados con este factor.

Durante una LTME también hay un aumento en la respuesta de fase aguda, provocando modificaciones locales y sistémicas de la fisiología celular que sirven como control del daño, ya que se encargan de limpiar los residuos de la respuesta y comenzando la reparación del daño, un ejemplo de estas modificaciones es la síntesis de proteínas hepáticas de fase aguda que acompañan la inflamación, estas proteínas son llamadas reactantes positivas de fase aguda que son reguladas durante la inflamación. En este caso se realizó la determinación de una de estas proteínas, la ceruloplasmina. Esta proteína es abundante en suero por lo que se puede determinar su síntesis por el método de inmunodifusión radial, debido a que no puede ser detectada en la barrera hematoencefálica ya que su concentración es deficiente.

La ceruloplasmina se encarga de la homeostasis de hierro como ferroxidasa, catalizando la conversión de Fe^{+2} tóxico en Fe^{+3} no tóxico, entre otras funciones como la angiogénesis, el transporte de cobre y ayuda en el estrés oxidativo por captación de radicales superóxidos y secuestro de iones libres de cobre (65-66). En el proceso de la LTME se esperaba que esta

proteína de fase aguda disminuyera sus niveles en suero en el grupo al que le aplico el FILM ya que este *in vitro* inhibe la producción de interleucinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12, INF- γ y favorece la producción de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 y IL-1r (en líneas celulares U-937 y MRC-5) (98-101), y al ser la ceruloplasmina una proteína de fase aguda que depende de la acción de IL-6 para su síntesis, debería ser menor su concentración en este grupo. Sin embargo los resultados que se observa en la gráfica 3, muestran que no hay diferencia significativa en la producción de ceruloplasmina entre los grupos estudiados y esto puede deberse tanto a que el número de animales no fue el suficiente y que los tiempos para su detección no fueron los mas convenientes, debido a que el pico detectable en la concentración de ceruloplasmina es entre los 3 y 4 días posterior a una lesión (63-64) y no a las 3 h y 7 días como se determino en nuestro protocolo, además a los 7 días la concentración de ceruloplasmina regresa a su estado basal disminuyendo su concentración en suero, por lo anteriormente expuesto necesitamos realizar determinaciones a otros tiempos y con un mayor número de animales.

Además de los mecanismos ya mencionados hay otros que contribuyen en una forma muy importante a incrementar el daño en la zona de lesión y es la neurotoxicidad causada por radicales libres. Después de una lesión, se origina una gran producción de radicales libres (15). Existen sistemas protectores que evitan el incremento excesivo de especies oxidantes, entre ellos hay tres enzimas: la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa y la catalasa, sin embargo, la actividad de estas enzimas antioxidantes es particularmente baja en el SNC en comparación con otros tejidos (16), esto hace que este órgano sea particularmente sensible a los radicales libres,

Dentro de los principales radicales libres producidos por diferentes células después de una LTME y que son altamente neurotóxicos están el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el oxido nítrico (NO^{\cdot}). Después de una LTME se desencadena una intensa respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos, células cebadas y una gran invasión de macrófagos al sitio de la lesión, tanto los neutrófilos como los macrófagos al ser activados producen $O_2^{\cdot-}$ y NO^{\cdot} [producido también por plaquetas, células endoteliales y células de la microglía (macrófagos del SNC)].

El óxido nítrico es un radical libre soluble y gaseoso, que es secretado no sólo por las células endoteliales sino también por los macrófagos y neuronas cerebrales específicas. Se sintetiza a partir de la L- arginina, oxígeno molecular y NADPH, por acción de la enzima sintasa del óxido nítrico (NOS) (51-53). La vida media del óxido nítrico es entre seis y diez segundos y como consecuencia de su reacción con el oxígeno y el agua se convierte en nitritos y nitratos. Esta molécula es producida por diferentes tipos celulares después de una LTME y puede dañar el parénquima medular (52).

El NO[•] puede virtualmente jugar un papel regulador en cualquier etapa del desarrollo de la respuesta inflamatoria. Su efecto parece depender en gran parte a la concentración del mismo, el microambiente celular y el estado de activación de las células sobre las cuales ejerza su acción. Las concentraciones bajas de NO[•], que son producidas por las sintasas del óxido nítrico constitutivas endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS), inhiben la expresión de moléculas de adhesión, la síntesis de citocinas y quimiocinas así como la adhesión y migración de los leucocitos. Las concentraciones altas, que son producidas primordialmente por la iNOS son tóxicas y especialmente pro-inflamatorias (57).

La iNOS también ha sido involucrada de forma importante en los eventos desarrollados después de una LTME. La actividad de esta molécula se ha detectado 4 horas después de la lesión y su pico máximo se ha reportado de 24 a 72 horas o incluso 7 días (57-59) poslesión. La expresión y la actividad de esta enzima después de una LTME es el resultado de la activación de la respuesta inflamatoria y del subsecuente reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y células de la microglía al sitio de lesión, reflejándose esto en el tiempo de actividad máxima de la iNOS (58-59). Las altas concentraciones de NO[•] generado por iNOS favorecen la formación de ONOO⁻, un compuesto altamente neurotóxico.

El FILM *in vitro* cancela la explosión respiratoria mediada por quimioluminiscencia (ROI: H₂O₂, O₂, OH⁻) y la producción de óxido nítrico (RNI: NO[•]) en monocitos y neutrófilos humanos, todo ello sin afectar la viabilidad celular entre los efectos comprobados, todo de una manera selectiva (91-92).

Con respecto a lo anterior y con lo que observamos en la gráfica 4, se demuestra que el FILM tanto *in vitro* como *in vivo* inhibe la producción de NO^{*}, ya que en el grupo de ratas tratadas con el FILM hay una menor concentración de nitritos que en el grupo de ratas sanas y el grupo de animales tratado con PBS, tanto a las 3 h, como a los 7 días, aun así se debe realizar determinaciones con un mayor número de animales para evitar que el error que se obtuvo por algunos de los animales afecte los resultados y que por ser tan pocos no se puedan excluir, ya que no permitiría un buen análisis estadístico. De esta manera comprobamos que el FILM tiene un efecto antiinflamatorio no solo en un tipo de células (*in vitro*), sino también *in vivo*, donde interrelaciona un gran complejo celular, así en este tipo de lesión, los resultados obtenidos son alentadores para seguir realizando más trabajos experimentales que nos lleven a utilizar el FILM en la clínica.

Los radicales libres no solo son responsables de la producción de NO^{*} posterior a una LTME, sino que también dañan las células nerviosas y endoteliales, originando el fenómeno conocido como peroxidación lipídica (interacción de los radicales libres con los ácidos grasos) (57).

El SNC es susceptible al daño por radicales libres, debido a que los lípidos de membrana son ricos en colesterol y ácidos grasos poliinsaturados, además de que es rico en hierro y ácido ascórbico (los cuales catalizan la producción de radicales libres) y cuenta con pocas defensas antioxidantes, por lo tanto las lesiones al SNC promueven un ambiente favorable para la producción de estos radicales y reacciones de lipoperoxidación.

Los productos finales de la peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y alteran la permeabilidad vascular, la respuesta inflamatoria o la quimiotaxis (62) debido al daño que sufren las membranas celulares.

Por tal motivo es que se determinó la peroxidación lipídica *in vivo* ya que hasta ahora no hay estudios para demostrar que el FILM inhibe la lipoperoxidación, los resultados

obtenidos se expresa en la gráfica 5, y debido a los efectos biológicos conocidos del FILM sobre la producción de radicales libres, esperábamos que el factor fuera capaz de inhibir la peroxidación, aunque los datos representan una disminución de la peroxidación, pero esta no es significativa, pero existe una gran posibilidad que si se llegue a demostrar que el FILM disminuye significativamente la peroxidación, con un grupo mayor de animales y así tener un rango más grande y evitar que un animal que este fuera de rango, como fue el caso cause una gran diferencia en los resultados como lo fue el grupo de PBS que tiene un error estándar muy grande debido a que un animal esta fuera de rango y a que ese valor no se puede excluir estadísticamente, debido a que el grupo no lo permite ya que el mismo es pequeño.

Por todo lo anteriormente expuesto, es recomendable buscar la mejor dosis y vía de administración a la cual el FILM tenga el efecto benéfico deseado en todos los ámbitos analizados, además de que al ser una molécula pequeña, la probabilidad de tener efectos secundarios es mínima, y hasta el momento no se ha detectado ninguno, ya que la viabilidad celular *in vitro* está presente durante todo el proceso del análisis. La utilización de péptidos cada vez está siendo mayor y no solo contra procesos inflamatorios sino contra otros patológicos, así la aplicación del factor en la practica clínica, aunque se piense lejana, es esperanzadora.

Con todo lo anterior se puede decir que el FILM tiene un efecto benéfico en la recuperación motriz, siempre y cuando sea una lesión moderada y que *in vivo* inhibe la producción de óxido nítrico, pero no la peroxidación lipídica, además de que tampoco afecta la producción de ceruloplasmina a tiempos tan cortos, con una sola dosis y por esa vía de administración.

10. CONCLUSIONES

- ✂ El FILM tiene un efecto positivo en la recuperación motriz después de una LTME moderada, pero no en una severa.
- ✂ El FILM no afecta la producción de ceruloplasmina a las 3 h y 7 días.
- ✂ El FILM inhibe la producción de óxido nítrico en animales con una LTME moderada a las 3 h y 7 días después de dicha lesión.
- ✂ El FILM no afecta la peroxidación lipídica en una LTME después de 3 h, ni a los 7 días después de la lesión.

11. PERSPECTIVAS

La lesión en SNC, ocasiona alteraciones estructurales y funcionales por lo cual ha sido catalogada como una enfermedad catastrófica debido a las secuelas que se producen sobre las funciones neurológicas, mismas que son el resultado de una serie de alteraciones funcionales a nivel neural que pueden ser desde el bloqueo transitorio de la conducción eléctrica, hasta la falta total de la misma.

El tratamiento desde el punto de vista médico tiene un elevado costo por la implicación de recursos tecnológicos y posteriormente por las limitaciones para poder reintegrar a los pacientes a sus actividades productivas previas, e incluso llegan a morir. Actualmente, la incidencia de morbi-mortalidad sigue siendo considerablemente elevada, aún en los centros de atención especializados en este tipo de lesión, ya que hay muy pocos medicamentos para tratar este tipo de padecimiento y en su mayoría no siempre se tienen los efectos deseados, ya que se deben utilizar en altas dosis y eso ocasiona que se presenten efectos secundarios que pueden llegar a ser severos y provocar otro tipo de padecimientos o simplemente no presentan efecto lo que hace que no sean factibles para utilizarlos en la clínica o que sean poco utilizables.

Por lo que es importante el desarrollo de nuevos medicamentos para la búsqueda de la recuperación de estos padecimientos. En este caso se desea estudiar el FILM, para tratar este tipo de lesión, deseando tener los efectos secundarios mínimos o sin estos efectos, que la mayoría de los medicamentos que están en el mercado presentan para este tipo de patología, lo que impide que sean poco utilizados en la clínica.

En el caso del particular del FILM al parecer serian mínimos debido a que es una molécula pequeña, lo que lo haría su uso más factible.

Además de que se pretende buscar otros efectos benéficos sobre proteínas de fase aguda, distintos tipos de radicales libres u otra forma de determinarlos, la determinación de

citocinas pre y pro inflamatorias, la búsqueda de la regeneración de neurofilamentos y la neuroprotección que el FILM puede brindar después de una LTME.

Asimismo establecer las dosis óptimas y la mejor vía de administración para poder utilizar al FILM en la clínica que es el objetivo principal.

12. REFERENCIAS

- 1.- Purves D y cols. Invitación a la Neurociencia. Editorial Médica Panamericana. México. 2001;45-89.
- 2.- Quiroz GF. Tratado de Anatomía Humana. México: Editorial Porrúa; 1952.
- 3.- Guyton AC. Anatomía y Fisiología del Sistema Nervioso. Madrid, España: Editorial Panamericana; 1994;34-67.
- 4.- García Vences Edna Elisa. Informe Final del Servicio Social Legal “Comparación del efecto neuroprotector de la inmunización con el péptido A91 contra la administración del antioxidante glutatión monoetil ester en un modelo de lesión por compresión en médula espinal”. Instituto Mexicano del Seguro Social, CMN Siglo XXI, México D.F. Octubre del 2004;10-47.
- 5.- Carpenter BM y cols. Neuroanatomía. Buenos Aires, Argentina: Editorial Panamericana; 1994.
- 6.- Snell SR. Neuroanatomía Clínica. 3ª Edición. México: Editorial Médica Panamericana; 1994.
- 7.- Newman WS y cols. Neurología y Neurofisiología Clínica. 5ta. Edición. México: El Manual Moderno; 2003.
- 8.- Decroot J. Neuroanatomía Correlativa. 9a edición. México: El Manual Moderno; 1993.
- 9.- Goodkin R and Cambell JB. Sequential pathologic changes in spinal cord injury. Arch Neurol 1979;30:197-201.
- 10.- Balentine JD. Calcium toxicity as a factor in spinal cord injury. Surv Synth Path Res 1983;2:184-193.

- 11.- Lemke M, Demediuk P, McIntosh TK, Vink R, Faden AI. Alterations in tissue Mg⁺⁺, Na⁺ and spinal cord edema following impact trauma in rats. *Bioch Cioph Res Com* 1987;147:1170-1175.
- 12.- Young W, Koreh I. Potassium and calcium changes in injured spinal cords. *Brain Res* 1986;365:42-53.
- 13.- Balentine JD. Spinal cord trauma: In search of the meaning of granular axoplasm and vesicular myelin. *J Neuropath Exp Neurol* 1988;47:77-92.
- 14.- Williams KI, Higgs GA. Eicosanoids and inflammation. *J Pathol* 1988;156:101-110.
- 15.- Braugher JM, Hall DE. Involvement of lipid peroxidation in CNS injury. *J Neurotrauma* 1992;Suppl1:1-7.
- 16.- Asperg A & Totmar O. Oxidative stress decreases antioxidant enzyme activities in reaggregation cultures of brain cells. *Free Radical Biol Med* 1994;17:511-516.
- 17.- Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* 1990;27:1-11.
- 18.- Bedbrook GM. The development and care of spinal cord paralysis (1918-1986). *Paraplegia* 1987;25:172-184.
- 19.- Stover SL, Fine PR. The epidemiology and economics of spinal cord injury. *Paraplegia* 1987;25:225-228.
- 20.- Aguayo AJ, Bray GM, Rasminsky M, Zwimpfer T, Carter D, Vidal-Sanz M. Synaptic connections made by axons regenerating in the central nervous system of adult mammals. *J Exp Biol* 1990;153:199-224.

- 21.- Gelderd JB, Quarles JE. A preliminary study of homotopic fetal cortical and spinal cotransplants in adult rats. *Brain Res Bull* 1990;25:35-48.
- 22.- Stokes BT, Reier PJ. Fetal grafts alter chronic behavioral outcome after contusion damage to the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 1992;116:1-12.
- 23.- Jakeman L, Reier PJ. The response of corticospinal tract fibers following injury and transplantation in the adult rat spinal cord. *Soc Neurosci Abstr* 1987;13:750.
- 24.- Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I, Franco-Bourland R, Salgado-Ceballos H, Ibarra A, Larriva-Sahd J. Neuroprotection of completely lacerated spinal cord of adult rats by homotopic and heterotopic transplantation. *Restor Neurol Neurosci* 1994;7:61-70.
- 25.- Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leosummers L, Maroon J. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med* 1990;322:1405-1411.
- 26.- Goodman GA. *The pharmacological basis of the therapeutics*. New York: Mc Graw-Hill;1990.
- 27.- Bracken MB, Holford TR. Effect of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NACIS 2. *J Neurosurg* 1993;79:500-507.
- 28.- Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Tsuchiya K, Niwa M, Tsutsunishita Y, Fukuzawa K. Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord. *J Free Rad Biol Med* 1996;20:1-9.
- 29.- Li S, Tator CH. Action of locally administered NMDA and AMPA/Kainate receptor antagonists in spinal cord injury. *Neurol Res* 2000;22(2):171-180.

- 30.- Gorgulu A, Kiris T, Unal F, Turkoglu U, Kucuk M, Cobanoglu S. Superoxide dismutase activity and the effects of NBQX and CPP on lipid peroxidation in experimental cord injury. *Res Exp Med (Berl)* 2000;199(5):258-293.
- 31.- Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Dupont H, Widmann C, Lazdunski M. Prevention of ischemic spinal cord injury: comparative effect of magnesium sulfate and riluzole. *J Vasc Surg* 2000;32(1):179-189.
- 32.- Faden AI, Salzman S. Pharmacological strategies in CNS trauma. *TIPS* 1992;13:29-35.
- 33.- Fujimoto T, Nakamura T, Ikeda T, Taoka Y, Takagi K. Effects of EPC-K1 on lipid peroxidation in experimental cord injury. *Spine* 2000;25(1):24-29.
- 34.- Zeman RJ, Feng Y, Peng H, Etlinger JD. Clembuterol, a 2-Adrenoceptor agonist, improves locomotor and histological outcomes after spinal cord contusion in rats. *Exp Neurol* 1999;159:267-273.
- 35.- Hallenbeck JM, Jacobs TP and Faden AI. Combined PGI₂, indomethacin, and heparin improves neurological recovery after spinal trauma in cats. *J Neurosurg* 1983;581:749-754.
- 36.- Popovich G, Wei P and Stokes BT. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol* 1997;377:443-464.
- 37.- Blight AR. Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1992;9 (Suppl 1):S83-S91.
- 38.- Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, Naruo M, Okabe H and Takatsuki K. Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 1997;79:1177-1182.

- 39.- Dusart and Schwab ME. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1994;6:712-724.
- 40.- Means ED and Anderson DK. Neuronophagia by leukocytes in experimental spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 1983;42:707-719.
- 41.- Travlos A, Anton HA and Wing PC. Cerebrospinal fluid cell count following spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 1994;75:293-296.
- 42.- Hsu CY, Halushka PV, Hogan EL and Cox RD. Increased thromboxane level in experimental spinal cord injury. *J Neurol Sci* 1986;74:289-296.
- 43.- Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Nakauchi K, Niwa M, Kawai Y and Fukuzawa K. Involvement of an intercellular adhesion molecule-1-dependent pathway in the pathogenesis of secondary changes after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 1996;66:1525-1531.
- 44.- Popovich GP, Guan Z, Wei P, Huitinga I, Nvan R and Stokes BT. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury 14. *Exp Neurol* 1999;158:351-365.
- 45.- Mueller CA, Schluesener HJ, Conrad S, Meyermann R and Schwab JM. Spinal cord injury induces lesional expression of the proinflammatory and antiangiogenic cytokine EMAP II. *J Neurotrauma* 2003;20:1007-1015.
- 46.- Popovich PG and Jones TB. Anipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:13-17.
- 47.- Zwijnenburg PJ, Polfliet MM, Florquin S, Van den Berg TK, Dijkstra CD, Van Deventer SJ, Roord JJ, Van der T and Van Furth AM. CXC-chemokines KC and

macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) synergistically induce leukocyte recruitment to the central nervous system in rats. *Immunol Lett* 2003;85:1-4.

48.- Lotan M and Schwartz M. Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. *FASEB* 1994;8:1026-1033.

49.- Rothwell NJ and Relton JK. Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the CNS. *Neurosci Biobehav Rev* 1993;17:217-227.

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

51.- Guzik TJ, Korbut R and Mek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 2003;54:469-487.

52.- Hamada Y and et al. Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord. *J Free Rad. Biol Med* 1996;20:1-9.

53.- Cornutte JT and et al. Chronic granulomatous disease due to a defect in the cytosolic factor required for nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase activation. *J Clin Invest* 1988;81:606.

54.- López Jaramillo P. Óxido Nítrico y Dolor. *UNAB Med* 2001;4: 31-37

55.- Siegel GJ and et al. Basic neurochemistry molecular, celular and medical aspects. 6ª Edition. New York: Lippincott Raven; 1998.

56.- Stauton E, Todd WE, Mason HS, Van JT. Bioquímica médica. 4ta edición. México: Interamericana; 1966.

57.- García Vences Edna Elisa. Tesis de Maestría (FMVZ, UNAM). “Análisis de la expresión del gen que codifica para la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS), en

animales con lesión traumática de médula espinal inmunizados o no con péptidos neurales". Instituto Mexicano del Seguro Social, CMN Siglo XXI, México D.F. Junio del 2008;31-45.

58.- Diaz-Ruiz A, Ibarra A, Perez-Severiano F, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Rios C. Constitutive and inducible nitric oxide synthase activities after spinal cord contusion in rats. *Neurosci Lett* 2002;319:129-132.

59.- Nakahara S, Yone K, Setoguchi T, Yamaura I, Arishima Y, Yoshino S, Komiya S. Changes in nitric oxide and expression of nitric oxide synthase in spinal cord after acute traumatic injury in rats. *J Neurotrauma* 2002;19:1467-1474.

60.- Garnier and Suillerot. Kinetic and mechanism of vesicle lipoperoxide decomposition by Fe (II). *Biochim Biophys Acta* 1984;794:307-312.

61.- Bucala R, Cerama A. Advance glicolastion: chemistry, biology and implication for diabetes and aging. *Adv pharmacology* 1992;23:1-34.

62.- Stites PD, Terr IA: *Inmunología humana*. Editorial el manual moderno. México. 1994;345-360.

63.- Bauman H and Gauldie J. The acute phase response. *Immunol* 1994;2:74-80.

64.- Walshe JM. Wilson's disease: the importance of measuring serum ceruloplasmin non-immunologically. *Ann Clin Biochem* 2003;40:115-121.

65.- Stevens A, Lows J. *Anatomía patológica*. 2da edición. Madrid: Harcourt; 2001.

66.- Rathore KI, Kerr BJ, Redensek A, López-Vales R, Jeong Suh YJ, Ponka P and David S. Cerulopasmin protects injured spinal cord from iron-mediated oxidative damage. *J Neuroscience* 2008;28:12736-12747

67.- Stauton E, Todd WE, Mason HS, Van Bruggen JT. *Bioquímica médica*. 4ta edición. México: Interamericana; 1966.

- 68.- Das D, Tapryal N, Goswami SK, Fox PL, Mukhopadhy CK. Regulation of ceruloplasmin in human hepatic cells by redox active copper: identification of a novel AP-1 site in the ceruloplasmin gene. *Biochem J* 2007;402:135-141.
- 69.- Worwood M, Taylor DM, Hunt AH. Copper and Manganase concentration in biliary cirrhosis of liver. *Med J* 1968;344-346.
- 70.- Camand E, Morel MP, Faissner A, Sotelo C and Dusart I. Long-term changes in the molecular composition of the glial scar and progressive increase of serotonergic fibre sprouting after hemisection of the mouse spinal cord. *Eur J Neurosci* 2004;20:1161-1176.
- 71.- McPhail LT, Plunet WT, Das P and Ramer MS. The astrocytic barrier to axonal regeneration at the dorsal root entry zone is induced by rhizotomy. *Eur J Neurosci* 2005;21:267-270.
- 72.- Wang CX, Reece C, Wrathall JR, Shuaib A, Olschowka JA and Hao C. Expression of tumor necrosis factor alpha and its mRNA in the spinal cord following a weight-drop injury. *Neuroreport* 2002;13:1391-1393.
- 73.- Giulian D, Corpuz M, Chapman S, Mansouri M and Robertson C. Reactive mononuclear phagocytes release neurotoxins after ischemic and traumatic injury to the central nervous system. *J Neurosci Res* 1993;36:681-693.
- 74.- Blight AR. Effects of silica on the outcome from experimental spinal cord injury: implication of macrophages in secondary tissue damage. *Neuroscience* 1994;60:263-273.
- 75.- Li H, Wallerath T and Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 2002;7:132-147.
- 76.- Shaked I, Porat Z, Gersner R, Kipnis J and Schwartz M. Early activation of microglia as antigen-presenting cells correlates with T cell-mediated protection and repair of the injured central nervous system. *J Neuroimmunol* 2004;146:84-93.

- 77.- Woo MS, Jung SH, Hyun JW and Kim HS. Differential regulation of inducible nitric oxide synthase and cytokine gene expression by forskolin and dibutyryl-cAMP in lipopolysaccharide-stimulated murine BV2 microglial cells. *Neurosci Lett* 2004;356:187-190.
- 78.- Popovich PG, Stokes BT and Whitacre CC. Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. *J Neurosci Res* 1996;45:349-363.
- 79.- Hauben E, Nevo U, Yoles E, Moalem G, Agranov E, Mor F, Akselrod S, Neeman M, Cohen IR and Schwartz M. Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury. *Lancet* 2000;355:286-287.
- 80.- Ibarra A, Correa D, Willms K, Merchant MT, Guizar-Sahagun G, Grijalva I and Madrazo I. Effects of cyclosporin-A on immune response, tissue protection and motor function of rats subjected to spinal cord injury. *Brain Res* 2003;979:165-178.
- 81.- Schwartz M. T cell mediated neuroprotection is a physiological response to central nervous system insults. *J Mol Med* 2001;78:594-597.
- 82.- Ibarra A, Hauben E, Butovsky O and Schwartz M. The therapeutic window after spinal cord injury can accommodate T cell-based vaccination and methylprednisolone in rats. *Eur J Neurosci* 2004;19:2984-2990.
- 83.- Kipnis J, Mizrahi T, Hauben E, Shaked I, Shevach E and Schwartz M. Neuroprotective autoimmunity: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15620-15625.

- 84.- Kipnis J, Mizrahi T, Yoles E, Ben-Nun A and Schwartz M. Myelin specific Th1 cells are necessary for post-traumatic protective autoimmunity. *J Neuroimmunol* 2002;130:78-85.
- 85.- Schwartz M, Moalem G, Leibowitz-Amit R and Cohen IR. Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci* 1999;22:295-299.
- 86.- Lazarov-Spiegler O, Solomon AS, Zeev-Brann AB, Hirschberg DL, Lavie V and Schwartz M. Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. *FASEB* 1996;10:1296-1302.
- 87.- Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M and Schwartz M. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 1998;4:814-821.
- 88.- Bomstein Y, Marder JB, Vitner K, Smirnov I, Lisaey G, Butovsky O, Fulga V and Yoles E. Features of skin-coincubated macrophages that promote recovery from spinal cord injury. *J Neuroimmunol* 2003;142:10-16.
- 89.- López Ruíz Alma Karina. Tesis de Licenciatura (FES Zaragoza, UNAM) “Efecto anti-inflamatorio del factor inhibidor de la locomoción de los monocitos (FILM) en la inflamación producida en lesiones controladas postraumáticas en ratas Wistar”, CMN Siglo XXI IMSS- Instituto Nacional de Rehabilitación. Laboratorio de Biomecánica SS, México D.F. Octubre 2008.
- 90.- Kretschmer R, Collado ML, Pacheco MG, Salinas MC, López-Osuna M, Leucona M, Castro EM, Arellano J. Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol* 1985;7(5):527-543.

- 91.- Rico G, Díaz-Guerra, Giménez-Scherer JA, Kretschmer RR. Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leukocytes. Arch Med Res 1992;23(2):157-159
- 92.- Rico G, Leandro E, Rojas S, Giménez-Scherer JA and Kretschmer RR. The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. Parasitol Res 2003;90(4):264-267
- 93.- Giménez-Scherer JA, Pacheco Cano MG, Cruz de Lavin E, Hernández-Jauregui P, Merchant MT, Kretschmer RR. Ultrastructural changes associated with the inhibition of monocyte chemotaxis caused by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. Lab Invest 1987;57(1):45-51
- 94.- Rico RG, Díaz GO, Kretschmer RR. Cyclic nucleotide changes induced in human leukocytes by a product of axenically grown *Entamoeba histolytica* that inhibits human monocyte locomotion. Parasite Res 1995;81(2):158-162.
- 95.- Rico G, Ximenez C, Ramos F and Kretschmer RR. Production of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) by axenically grown *Entamoeba histolytica*: Synthesis or degradation? Arch Med Res 1997;28Spec:235-236
- 96.- Kretschmer RR, Rico RG, Giménez-Scherer J. A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 2001;112(2):201-209.
- 97.- Silva-García R, Blanco-Favela F, Villegas-Sepúlveda N, Torres A, Rico-Rosillo G. Prediction In Silico of the nucleotide sequence that originates the MLIF by data bases. In press. In Silico Biology 2007.
- 98.- Silva-García R, Estrada-García I, Ramos-Payán R, Torres-Salazar A, Arenas-Aranda D, Morales-Martínez ME, Giménez-Scherer JA, Blanco-Favela F, Rico-Rosillo G. The effect of anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica* on gene expression in the U-937 monocytic line. Inflamm Res 2008;57:145-150

- 99.- Ledesma SY. Efecto modulador del FILM sobre la regulación de IL-1 β en células mononucleares humanas. XVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Inmunología. Chihuahua, Chihuahua 2006.
- 100.- Sara Rojas, Guadalupe Rico, Julia Pérez, Juan Velázquez, Raúl Silva, Esther Morales, Roberto Krestchmer. Cytokine expression in CD4+ cells exposed to the monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica*. Parasitol Res 2006;98:493-495
- 101.- Utrera-Barillas D, Velázquez JR, Enciso A, Cruz SM, Rico RG, Curiel Quesada E, Teran LM, Kretschmer RR. An anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica* down-regulates the expression of pro-inflammatory chemokines. Parasite Immunol 2003;25(10):475-482
- 102.- Velazquez JR, Utrera BD, Zentella A, García BE, Ledesma SY, Kretschmer RR. The amebic anti-inflammatory monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) modifies the NF- κ B nuclear translocation in human monocytes. Eur Cytokine Netw. 2003;14:64
- 103.- Giménez-Scherer J, Rico R, Fernández-Diez J Kretschmer RR. Inhibition of contact cutaneous delayed hypersensitivity reactions to DNCB in guinea pigs by the Monocyte Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) produced by axenically grown *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res 1997;28 suppl:237-238
- 104.- Giménez-Scherer JA, Arenas E, Díaz L, Rico RG, Fernández, Kretschmer RR. Effect of the Monocyte Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) Produced by *Entamoeba histolytica* on the Expression of Cell Adhesion Molecules (CAMs) in the Skin of Guinea Pigs. Arch Med Res 2000;31(4suppl):92-93.
- 105.- Soriano-Correa C, Sánchez-Ruiz JF, Rico-Rosillo G, Giménez-Scherer JA, Velásquez RJ, Kretschmer RR. Electronic structure and physicochemical properties of the anti-

inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica*: A theoretical study. J Mol Structure: THEOCHEM 2006;769: 91-95

106.- Young W. Spinal cord regeneration. Science. 1996;273:451.

107.- Basso DM, Beattie MS & Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J Neurotrauma 1995;12:1–21.

108.- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transaction. Exp Neurol 1996;139:244-256.

109.- Perez Hernandez Carlos Geovany. Tesis de Licenciatura (FES Zaragoza, UNAM). “Evaluación de la actividad fagocítica y radicales libres de los extractos de barreta (*Helietta parvifolia*) en un modelo de rata”, México D.F. Febrero 2009.

110.-Ley General de Salud. Título Séptimo: De la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación. 6ª ed. México, D.F: Editorial Porrúa; 1990.

111.- Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. NOM. 062-Z00-1999.

ANEXOS

1. ANEXOS

11.1 ANEXO 1

Escala de BBB

Puntaje	Observación
0.	No se observa movimiento en patas traseras (PT).
1.	Movimiento limitado (arco < 50%) de una o dos articulaciones, usualmente cadera y/o rodilla.
2.	Movimiento amplio (arco > 50%) de una articulación con o sin movimiento limitado de la otra.
3.	Movimiento amplio de las articulaciones.
4.	Movimiento limitado de las tres articulaciones de PT (cadera, rodilla y tobillo).
5.	Movimiento limitado de dos articulaciones y amplio de la tercera.
6.	Movimiento amplio de dos articulaciones y limitado de la tercera.
7.	Movimiento amplio de las tres articulaciones de PT (cadera, rodilla y tobillo).
8.	Movimientos rítmicos (coordinados) de ambas PT sin soporte de peso o colocación de la planta pero sin soportar peso.
9.	Colocación plantar con soporte de peso cuando no esta caminando o pasos ocasionales (< o = al 50%), frecuentes (51% a 94%), o constantes (95% a 100%) con soporte de peso dorsal, sin apoyo plantar.
10.	Pasos ocasionales con soporte de peso plantar, sin coordinación entre patas delanteras (PD) y PT.
11.	Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar, sin coordinación entre PD y PT.
12.	Pasos frecuentes constantes con soporte de peso plantar y coordinación ocasional entre PD y PT.
13.	Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar y coordinación frecuente entre PD y PT.

14. Constantemente da pasos con soporte de peso plantar, coordinación constante entre PD y PT, y hay rotación interna o externa de la pata, principalmente hacer contacto con el piso o al despegar. También pasos plantares frecuentes, coordinación constante entre PD y PT y pasos dorsales ocasionales.
15. Pasos plantares y coordinación entre PD y PT constantes. No separa los dedos solo ocasionalmente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predomina la alineación paralela de la pata al cuerpo.
16. Pasos plantares y coordinación entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre frecuentemente cuando avanza la pata hacia adelante. Al hacer contacto con el piso predomina la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero la rota al levantarla.
17. Lo mismo pero al levantar la pata la mantiene alineada (sin rotar).
18. La separación de los dedos es constante durante la marcha. Al hacer contacto con el piso predomina la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero la rota al levantarla.
19. Pasos plantares y coordinación entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre constantemente durante la marcha. Al hacer contacto con el piso y levanta, predomina la alineación paralela de la pata al cuerpo. Arrastra la cola parte o todo el tiempo.
20. Pasos plantares, marcha coordinada y separación de dedos constantes. Al hacer contacto con el piso y levantar, predomina la alineación paralela de la pata al cuerpo, cola levantada constantemente e inestabilidad de tronco.
21. Igual pero tronco constantemente estable (108).

13.2. Anexo 2

Resultados de la Prueba de BBB Primer Experimento Lesión Severa

No de Rata/Grupo	Día 7			Día 14			Día 21			Día 28			Día 35			Día 42			Día 49			Día 56		
	D	I	Ŷ	D	I	Ŷ	D	I	Ŷ	D	I	Ŷ	D	I	Ŷ	D	I	Ŷ	D	I	Ŷ	D	I	Ŷ
1/A	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	8	7.5	6	8	7	
2/A	1	2	1.5	5	5	5	5	5	5	7	7	7	7	8	7.5	6	6	6	5	6	5.5	6	7	6.5
4/B	7	8	7.5	8	8	8	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	10	9	9.5	10	10	10
5/B	0	2	1	1	2	1.5	2	2	2	5	6	5.5	5	6	5.5	2	5	3.5	6	6	6	5	5	5
6/B	1	2	1.5	3	6	4.5	5	6	5.5	6	6	6	5	6	5.5	6	6	6	6	6	6	7	7	7
7/B	1	1	1	2	6	4	5	6	5.5	5	6	5.5	5	7	6	5	5	5	6	6	6	5	5	5
9/A	2	2	2	4	1	2.5	7	3	5	7	2	4.5	7	2	4.5	6	6	6	6	2	4	6	2	4
11/B	0	1	0.5	1	2	1.5	2	5	3.5	5	5	5	5	5	5	5	6	5.5	6	7	6.5	6	7	6.5
12/A	2	0	1	6	6	6	6	6	6	7	6	6.5	2	6	4	7	6	6.5	6	6	6	6	5	5.5
13/A	2	2	2	5	5	5	5	6	5.5	6	6	6	6	8	7	5	6	5.5	6	6	6	6	6	6
14/A	0	1	0.5	1	2	1.5	6	5	5.5	5	6	5.5	6	6	6	6	6	6	7	6	6.5	†	†	†
15/B	1	1	1	3	2	2.5	6	5	5.5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7	6.5
16/B	1	2	1.5	7	7	7	7	6	6.5	7	8	7.5	7	8	7.5	8	8	8	8	8	8	8	8	8
17/A	5	5	5	6	6	6	5	5	5	5	6	5.5	6	5	5.5	7	8	7.5	8	8	8	8	8	8
19/B	0	1	0.5	0	1	0.5	2	2	2	2	1	1.5	2	2	2	5	5	5	2	5	3.5	2	5	3.5
20/B	2	2	2	6	6	6	5	7	6	7	7	7	7	7	7	7	6	6.5	8	7	7.5	6	7	6.5

D= Pata trasera derecha

A= Grupo tratado con PBS

I= Pata trasera izquierda

B= Grupo tratado con FILM

Ŷ= Promedio de ambas patas traseras

13.3. ANEXO 3.

Activación del Cadmio

Se colocaron en tubos de 13 x 100, 0.5 g de cadmio metálico en la campana de extracción y se plateó con una solución acuosa de CuSO_4 al 5 % (2 mL), se pusieron en un rocker por 10 min hasta que el cadmio se plateó, se lavó exhaustivamente con agua destilada para eliminar el cobre, se lavó 3 veces con el tubo lleno y después se lavó con HCl 0.1N para remover todo el hidróxido de cobre II con el tubo lleno, después se lavó el cadmio con NH_4Cl (solución acuosa al 5 %) ajustando el pH a 9 con borato de sodio y se guardó en esta solución hasta el día del ensayo.

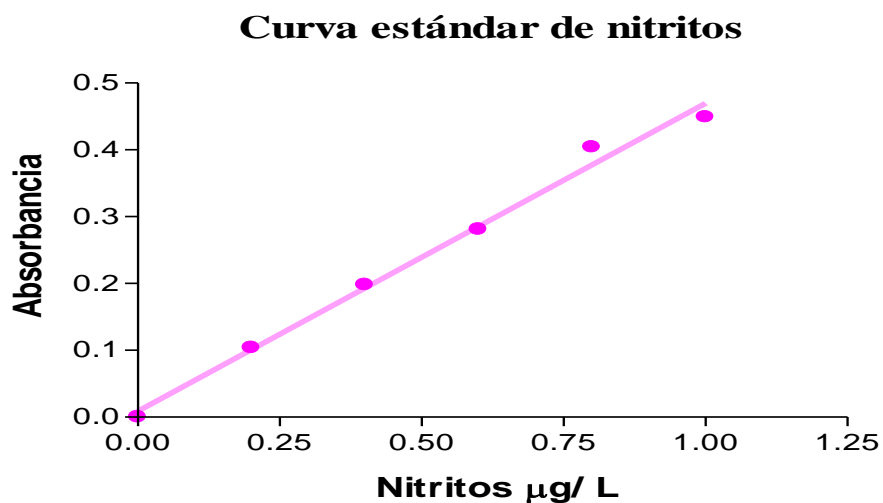
13.4. ANEXO 4.

Curva patrón de nitritos

Tubo	STD (μL) ($2\mu\text{g}/\text{mL}$)	STD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Agua destilada (μL)	Absorbancia
1	0	0	900	0
2	100	0.2	800	0.104
3	200	0.4	700	0.198
4	300	0.6	600	0.281
5	400	0.8	500	0.404
6	500	1.0	400	0.449

Se agregó 50 μL de sulfanilamida y se incubó por 10 min a temperatura ambiente, se adicionaron 50 μL del reactivo N-(1-naftil)-etilendiamino diclorhidrato (NED) y se mezcló y se incubó 30 min. a temperatura ambiente y la reacción se leyó a 540nm.

La Gráfica 6 muestra la curva estándar que se tomo como parámetro para determinar la concentración de nitritos en las muestras obtenidas.



Gráfica 6. Curva estándar de nitritos para determinar la concentración de las muestras problemas

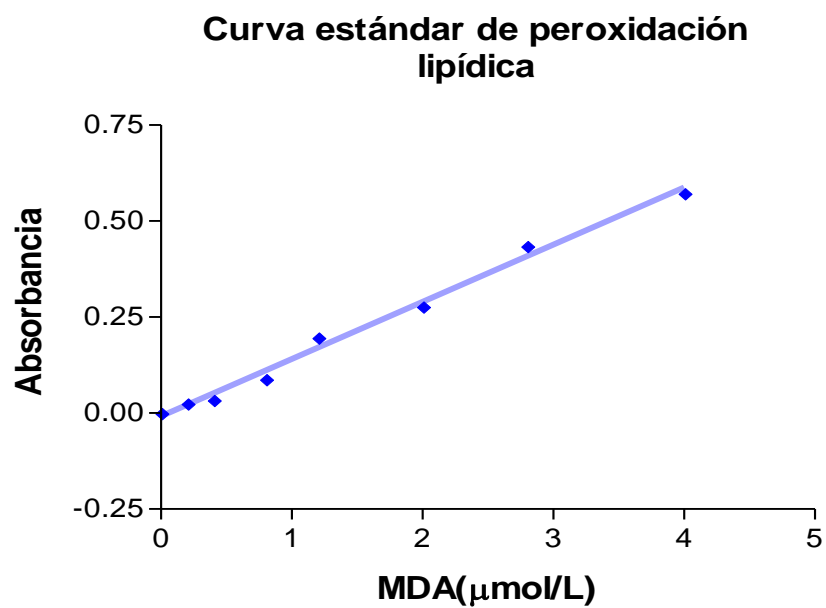
13.5. ANEXO 5.

Curva Patrón de Peroxidación lipídica

Tubos	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	TMP (μL)	H₃PO₄ (μL)	TBA (μL)	Agua (μL)	Absorbancia
Blanco	0	0	3.0	1.0	1.0	0.0
1	0.2	5	3.0	1.0	1.0	0.035
2	0.4	10	3.0	1.0	0.99	0.051
3	0.8	20	3.0	1.0	0.98	0.116
4	1.2	30	3.0	1.0	0.97	0.185
5	2.0	50	3.0	1.0	0.95	0.192
6	2.8	70	3.0	1.0	0.93	0.428
7	4.0	100	3.0	1.0	0.90	0.583

Todos los tubos se taparon con papel parafilm y se incubaron a 90 °C, por 15 min., por último se leyeron a 535nm.

La Gráfica 7 representa la curva patrón de peroxidación lipídica para la determinación de las muestras.



Gráfica 7. Curva estándar de peroxidación lipídica, con una regresión lineal, para determinar la concentración de las muestras problemas.

13.6. ANEXO 6

NORMAS PARA EL USO Y CUIDADO DE LOS ANIMALES

REGLAMENTO de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.-
Presidencia de la República.

MIGUEL DE LA MADRID H., Presidente Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos, en ejercicio de la facultad que confiere al Ejecutivo Federal la fracción I del Artículo 89 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos y con fundamento en los artículos 1o., 2o., fracción VII, 3o. fracción IX, 4o., 7o., 13 apartado "A" fracciones I, IX, X, apartado "B" fracciones I y VI, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103 y demás relativos a la Ley General de Salud, y

CONSIDERANDO

Que en virtud del Decreto por el que se adicionó el Artículo 4o. Constitucional, publicado en el **Diario oficial de la Federación** de fecha 3 de febrero de 1983, se consagró como garantía social, el Derecho a la Protección de la Salud;

Que el 7 de febrero de 1984 fue publicada en el **Diario Oficial de la Federación** la Ley General de Salud, reglamentaria del párrafo tercero del Artículo 4o. de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, iniciando su vigencia el 1o. de julio del mismo año;

Que en la mencionada Ley se establecieron y definieron las bases y modalidades para el acceso a los servicios de salud, así como la distribución de competencias entre la Federación y las Entidades Federativas en Materia de Salubridad General, por lo que resulta pertinente disponer de los instrumentos reglamentarios necesarios para el ejercicio eficaz de sus atribuciones;

Que dentro de los programas que prev el Plan Nacional de Desarrollo 1983-1988, se encuentra el de Salud, el cual, como lineamientos de estratégicas, completa cinco grandes áreas de política siendo la última la "Formación, Capacitación e Investigación" dirigida fundamentalmente al impulso de las áreas biomédicas, médico-social y de servicios de salud de ahí que el Programa Nacional de Salud 1984-1988 desarrolla el Programa de Investigación para la salud, entre otros, como de apoyo a la consolidación del Sistema Nacional de Salud en aspectos sustanciales, teniendo como objetivo específico el coadyuvar al desarrollo científico y tecnológico nacional tendiente a la búsqueda de soluciones prácticas para prevenir, atender y controlar los problemas prioritarios de salud, incrementar la productividad y eficiencia tecnológica del extranjero.

Que la Ley General de Salud ha establecido los lineamientos y principios a los cuales deberá someterse la investigación científica y tecnológica destinada a la salud, correspondientes a la Secretaría de Salud orientar su desarrollo;

Que la investigación para la salud es un factor determinante para mejorar las acciones encaminadas a proteger, promover y restaurar la salud del individuo y de la sociedad en general; para desarrollar tecnología mexicana en los servicios de salud y para incrementar su productividad, conforme a las bases establecidas en dicha Ley;

Que el desarrollo de la investigación para la salud debe atender a aspectos éticos que garanticen la dignidad y el bienestar de la persona sujeta a investigación;

Que el desarrollo de la investigación para la salud requiere del establecimiento de criterios técnicos para regular la aplicación de los procedimientos relativos a la correcta utilización de los recursos destinados a ella;

Que sin restringir la libertad de los investigadores, en el caso particular de la investigación que se realice en seres humanos y de la que utilice materiales o procedimientos que conlleven un riesgo, es preciso sujetarse a los principios científicos, éticos y a las normas de seguridad generalmente aceptadas, y

Que la investigación en seres humanos de nuevos recursos profilácticos, de diagnósticos, terapéuticos y de rehabilitación, debe sujetarse a un control para obtener una mayor eficacia y evitar riesgos a la salud de las personas, he tenido a bien expedir el siguiente

REGLAMENTO DE LA LEY GENERAL DE SALUD EN MATERIA DE INVESTIGACION PARA LA SALUD

TITULO SEPTIMO

De la Investigación que incluya a la utilización de animales de experimentación.

CAPITULO UNICO

ARTICULO 121.- En las investigaciones experimentales con animales, referidas a la salud humana, se deberán llenar los requisitos que establezcan las normas de las propias instituciones de salud, autorizadas por la Secretaría y satisfacer lo señalado en este Capítulo.

ARTICULO 122.- Las investigaciones se diseñarán a modo de evitar al máximo el sufrimiento de los animales.

ARTICULO 123.- Cuando sea necesario sacrificar a un animal de experimentación, se empleará un procedimiento que asegure en lo posible su muerte sin sufrimiento.

ARTICULO 124.- Los bioterios deberán estar de acuerdo con la especie, conformación corporal, hábitos, preferencias posturales y características locomotoras de los animales, para proporcionarles comodidad, excepto cuando las variables experimentales justifiquen otras situaciones.

ARTICULO 125.- Los bioterios de producción o mantenimiento crónico serán supervisados por profesionales calificado y competente en la materia y deberán permitir el crecimiento, maduración, reproducción y comportamiento normal de los animales, de conformidad con las normas que la propia institución emita.

ARTICULO 126.- El titular de la institución de salud en donde se realice investigación a la que se refiere este Capítulo, deberá establecer y vigilar el cumplimiento de las medidas de seguridad para el cuidado y manejo de los animales, así como las medidas de profilaxis y vacunación necesarias para la protección del personal ocupacionalmente expuesto.

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

PUBLICADA EN EL DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN EL 22 DE AGOSTO DE 2001.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.-
Secretaría

de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999, ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCION, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO.

LILIA ISABEL OCHOA MUÑOZ, Coordinadora General Jurídica de la Secretaría de Agricultura,

Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, con fundamento en los artículos 35 fracción IV de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; artículos 4o. fracción III, 12 fracción XIV, 17 y 18 fracción VI de la Ley Federal de Sanidad Animal; 38 fracción II, 40, 41, 43 y 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 15 fracciones XXX y XXXI del Reglamento Interior de esta dependencia, y

CONSIDERANDO

Que es atribución de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación formular, aplicar y, en el ámbito de su competencia, expedir las disposiciones y medidas zoonosanitarias necesarias para verificar y certificar el cumplimiento de las mismas.

Que es función de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, fomentar la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio mediante la aplicación de técnicas tendientes a garantizar la producción, proteger la salud y favorecer el buen uso de los animales de laboratorio.

Que en la actualidad, la falta de planeación en la producción de animales de laboratorio, la carencia de criterios uniformes relacionados con las actividades encaminadas al cuidado, manejo y utilización de animales con fines de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza, han provocado que el cuidado, el trato y la aplicación de técnicas experimentales practicadas en estos animales, sea ejercida en forma inadecuada, representando graves daños en el bienestar de los mismos.

Que para lograr resultados confiables en la investigación científica, la docencia biomédica y el control de calidad, así como utilizar el menor número de animales posible, es necesario contar con animales de laboratorio en condiciones óptimas.

Que cuando se utilizan para fines experimentales procedimientos cuestionables, inaceptables o contrarios a los principios de ética, éstos pueden causar graves daños en el bienestar de los animales.

Que el trato y la atención inadecuada relacionada con las maniobras para la movilización de los animales de laboratorio, contribuye a elevar los factores de estrés que los hacen susceptibles a contraer enfermedades.

Que en virtud de lo anterior y como consecuencia del proceso de globalización en el que México se encuentra inmerso, es necesario establecer criterios uniformes que permitan regular eficientemente la operación de las actividades relacionadas con la producción, cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio, a fin de favorecer el bienestar de éstos, protegiendo al mismo tiempo su salud.

Que para alcanzar los objetivos señalados en los párrafos anteriores, con fecha 6 de diciembre de 1999, se publicó en el **Diario Oficial de la Federación**, el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, iniciando con ello el trámite a que se refiere la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; razón por la cual, con fecha 18 de junio de 2001, se publicaron las respuestas a los comentarios recibidos con

relación a dicho proyecto. Que en virtud del resultado del procedimiento legal antes indicado, se modificaron los diversos puntos que resultaron procedentes y por lo cual, se expide la presente Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.