



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
“MANUEL VELASCO SUÁREZ”

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA RADIACIÓN IONIZANTE A DOSIS
BAJAS SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN, LA ACTIVIDAD DE LA
MIELOPEROXIDASA Y DE LA SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO INDUCIBLE
EN UN MODELO DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL EN
RATAS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:
CLAUDIA KATIUSKA GONZÁLEZ VALDEZ

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES ARACELI DÍAZ RUIZ
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

MÉXICO, D.F.,

noviembre 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi esposo
Héctor Alva Sánchez
y a mi hijo
Rafael Alva González

A mis padres
Ma. Martha Valdez Angulo
Álvaro H. González Serrano

A mis hermanos, cuñados y sobrinos

Agradecimientos

Por el apoyo brindado para llevar a cabo este proyecto de investigación, proporcionando la infraestructura, bioterio, laboratorios y el equipo para la realización de los tratamientos con radioneurocirugía:

- Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”
- A la Dra. Teresita Corona Vázquez, Directora del Instituto
- Al Dr. Miguel Ángel Celis López, Director Médico del Instituto
- Al Dr. Camilo Ríos Castañeda, Jefe del laboratorio de Neuroquímica del Instituto
- Al Dr. Sergio Moreno Jiménez, Jefe de la Unidad de Radioneurocirugía del Instituto

Por su participación en las cirugías y la realización de la contusión de ratas:

- Al Centro de Investigación IMSS /Proyecto CAMINA
- A la Dra. Hermelinda Salgado Ceballos, Investigadora de Proyecto CAMINA

Por la beca del programa de becas nacionales para estudios de posgrado, en el periodo de febrero 2009 a enero 2011:

- CONACyT

Agradecimientos

A la Dra. Ma. de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz por su dirección y asesoría durante esta tesis y por proporcionarme el conocimiento de manera continua, su confianza, su paciencia y amistad.

Para los miembros del comité sinodal por la revisión y enriquecimiento de esta tesis: Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz, Dra. Rebecca Elizabeth Franco Bourland, Dr. José Efrén Israel Grijalva Otero, Dr. Fiacro Jiménez Ponce, Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza.

Al Dr. Sergio Moreno Jiménez por su apoyo total para llevar a cabo las radiocirugías.

Al Dr. Camilo Ríos Castañeda por su asesoría, consejos y apoyo brindado en el laboratorio de Neuroquímica.

Al Dr. Sergio Montes López por su colaboración fundamental en los ensayos, por su tiempo y conocimiento.

A la Dra. Francisca Pérez Severiano por su participación en la realización de los ensayos bioquímicos y su paciencia.

Al M. en C. José Manuel Lárraga Gutiérrez por su dedicación para la elaboración de los planes de tratamiento de radiocirugía y el apoyo otorgado.

A M. en C. Mariana Hernández Bojórquez por su ayuda incondicional, por compartir el conocimiento, por su colaboración en las radiocirugías y su gran amistad.

Al Dr. Héctor Alva Sánchez por su infinito apoyo y paciencia al transmitirme el conocimiento de una manera amorosa, por todo su tiempo. Mi infinito agradecimiento.

Tabla de Contenido

1	RESUMEN	7
2	ANTECEDENTES	12
2.1	Epidemiología de la lesión traumática de la médula espinal.....	12
2.2	Fisiopatología de la lesión traumática de la médula espinal.....	13
2.3	Excitotoxicidad y radicales libres	14
2.4	Estrés oxidativo y lipoperoxidación asociados con la LTME	16
2.5	Modulación de la respuesta inflamatoria después de una LTME	19
2.6	Estrategias desarrolladas para la reparación de la médula espinal lesionada.....	21
2.7	Radiación ionizante	23
2.8	Radiocirugía.....	24
2.9	Radiación, estrés oxidativo e inflamación	25
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
4	JUSTIFICACIÓN	34
5	HIPÓTESIS	35
6	OBJETIVOS.....	36
6.1	Objetivo general	36
6.2	Objetivos específicos.....	36
7	METODOLOGÍA.....	37
7.1	Consideraciones éticas para el uso de animales en la experimentación.....	37
7.2	Diseño experimental.....	37

7.3	Definición de las variables.....	39
7.3.1	Variables independientes	39
7.3.2	Variables dependientes.....	39
7.4	Estadística.....	41
7.4.1	Tamaño de muestra.....	41
7.4.2	Análisis estadístico	41
7.5	Definiciones operacionales	42
7.5.1	Modelo de LTME por contusión moderada.	42
7.5.2	Tratamiento con radiocirugía	42
7.5.3	Lipoperoxidación (LP)	42
7.5.4	Actividad de la mieloperoxidasa (MPO).....	42
7.5.5	Actividad de la sintasa del óxido nítrico inducible (SONi).....	42
7.6	Descripción de técnicas	43
7.6.1	Modelo de lesión por contusión	43
7.6.2	Radiocirugía	45
7.6.3	Ensayo de lipoperoxidación.....	48
7.6.4	Ensayo de la actividad de la mieloperoxidasa	48
7.6.5	Ensayo actividad de la sintasa del óxido nítrico inducible	49
7.6.6	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	51
7.7	Consideraciones financieras	51
7.8	Lugar donde se realizó la investigación	52
8	RESULTADOS	53
8.1	Resultados del ensayo de la lipoperoxidación	53

8.2	Resultados del ensayo de la mieloperoxidasa	55
8.3	Resultados del ensayo de la actividad de la sintasa de óxido nítrico inducible	57
9	DISCUSIÓN	59
9.1	Sesgos y limitaciones del estudio	64
10	CONCLUSIONES	67
10.1	Estudios futuros	67
11	REFERENCIAS.....	68

Introducción: La lesión traumática de la médula espinal (LTME) es uno de los padecimientos de mayor impacto social, económico y psicológico que afecta con mayor frecuencia a la población económicamente activa. Ocasiona una discapacidad severa asociada con una morbi-mortalidad alta. En Estados Unidos, Canadá, Australia, España, Italia y México se presentan anualmente casos nuevos de LTME en un intervalo de 25 a 55, 47.9 a 52, 14.5, 30, 18 a 20 y 18.6 por cada millón de habitantes, respectivamente. Se estima que a nivel mundial 2.5 millones de personas viven con secuelas de una LTME, con más de 130,000 nuevas lesiones reportadas cada año. Se considera que el deterioro en la función es generado tanto por la lesión mecánica directa como por todos los mecanismos fisiopatológicos secundarios inducidos por el trauma inicial.

Los abordajes terapéuticos intentados hasta el momento para una LTME pueden resumirse de la siguiente manera: 1) reducción del edema y de la producción de radicales libres, 2) rescate del tejido neuronal en riesgo de morir por procesos de daño secundario, 3) control de la inflamación, 4) disminución del proceso de desmielinización y del déficit en la conducción, 5) promoción del crecimiento neuronal por medio de un ambiente extracelular favorable, 6) instalación de terapias de reemplazo celular, 7) uso de enzimas que degraden la cicatriz glial para favorecer la reconexión axonal, 8) terapias de rehabilitación para reaprender habilidades motoras y 9) reestablecimiento de la función motora por estimulación eléctrica, entre otros. A pesar de los múltiples esfuerzos para desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas a revertir el daño neurológico provocado por la lesión primaria, no se han podido obtener resultados contundentes, por lo que se siguen explorando nuevas opciones de tratamiento. Con base en esto, en un estudio previo realizado por nuestro grupo en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, se probó el efecto neuroprotector de la

radiación ionizante (RI). Se inició el tratamiento de radiación ionizante a diferentes tiempos, asimismo, se probaron dosis de radiación diferentes. Los resultados demostraron que los animales tratados 2 h después de la lesión con 2 Gy incrementaron la respuesta funcional al ser comparados con el grupo control. Sin embargo, no se conocen los mecanismos por los cuales la radiación ionizante ejerce este efecto neuroprotector.

Objetivo: Caracterizar el posible efecto anti-oxidante (lipoperoxidación) y antiinflamatorio (mieloperoxidasa, sintasa de óxido nítrico inducible) de la radiación ionizante impartida a dosis bajas en un modelo de lesión traumática de la médula espinal por contusión moderada en ratas.

Material y métodos: Se utilizaron 96 ratas Wistar, hembras, con peso de 200 a 250 g. Los animales fueron sometidos a un modelo de lesión traumática de la médula espinal por contusión moderada a nivel de T9 con un equipo New York, Spinal Cord Impacto. La radiocirugía se realizó 2 h después de la contusión. A las 24 h de la contusión se sacrificaron las ratas para realizar ensayos bioquímicos de lipoperoxidación (LP) y mieloperoxidasa (MPO) y a las 72 h para la medición de la actividad sintasa de óxido nítrico inducible (SONi). La radiocirugía se realizó con un equipo Novalis dedicado de 6 MV (Brain Lab, Inc.).

Resultados: Se observó un valor basal (en el grupo de las ratas laminectomizadas) de lipoperoxidación de 104.57 ± 4.96 (UF/g de tejido) que se incrementa por efecto de la lesión (145.45 ± 9.54 UF/g). En los animales sin lesión que recibieron radiación ionizante se observó un incremento en la lipoperoxidación del 30.2% comparado con el grupo solamente laminectomizado, mientras que el grupo con lesión traumática y con tratamiento de radiación ionizante mostró un valor promedio de 135.56 ± 7.38 UF/g. La actividad basal de la mieloperoxidasa fue de 0.1124 ± 0.033 U.I.MPO/g/min, mientras que en los animales con laminectomía y con radiación el valor fue de 0.3386 ± 0.116 U.I.MPO/g/min. En el grupo de lesión sin radiación se observó un incremento de dicha actividad por efecto del daño (1.0946 ± 0.102 U.I.MPO/g/min). La actividad de la mieloperoxidasa en el grupo con lesión y tratado con radiación mostró un incremento del 52% (1.082 ± 0.171 U.I.MPO/g/min) con respecto al valor del grupo control. La actividad basal de la SONi en el grupo con laminectomía sin tratamiento fue de 0.145 ± 0.033 ng/L- citrulina/g/min, similar a la observada en los animales con laminectomía y con radiación (0.146 ± 0.032

ng/L- citrulina/g/min); en el grupo de lesión sin radiación pudimos observar un incremento de dicha actividad por efecto del daño (0.27 ± 0.06 ng/L-citrulina/g/min). La actividad de la SONi del grupo con lesión y con radiación mostró un incremento del 48.7% (0.22 ± 0.03 ng/L-citrulina/g/min) con respecto al grupo con solo laminectomía.

Conclusiones: Los resultados indican que la radiación ionizante tiene un efecto parcialmente antioxidante y antiinflamatorio después de la lesión de médula espinal.

Palabras clave: trauma medular, inflamación, antioxidante, radiación ionizante.

Introduction: The traumatic spinal cord injury (TSCI) is a pathologic condition with a major social, economic and psychological impact which affects the economically active population with an increasing frequency. It causes a severe disability associated with a high morbid-mortality. In the United States, Canada, Australia, Spain, Italy and Mexico the number of new cases per year are in the ranges of 25 to 55, 47.9 to 52, 14.5, 30, 18 to 20 and 18.6 per million habitants, respectively. It is estimated that 2.5 million people live with sequelae from TSCI worldwide, with approximately 130,000 new cases reported each year. The detriment in the motor function is considered to be generated from both the TSCI and the secondary physiopathologic mechanisms induced after the initial trauma.

The therapeutic approaches which have been tried so far can be summarized in the following way: 1) reduction of the edema and free radical production, 2) preservation of the neural tissue in risk of dying from the secondary damage, 3) swelling control, 4) reduction in the demyelination process and in the conduction deficit, 5) neural growth promotion through a favorable extracellular environment, 6) implementation of cellular replacement therapies, 7) the use of glial scar degrading enzymes to favor axonal reconnection, 8) rehabilitation therapies for movement recovery and 9) to reestablish motor function through electric stimulation. Despite of the multiple efforts to develop therapeutic strategies to revert the neurological damage caused by the primary injury, convincing results have not been obtained and therefore new strategies are still being explored. Based on this assertion, the neurochemistry research group at the National Institute of Neurology and Neurosurgery Manuel Velasco Suarez carried out a project to study the neuroprotective effect of ionizing radiation. In that work, radiation therapy was initiated at different times after a spinal cord injury induced in rats. The effect of different radiation doses was also explored. Their results showed that animals treated with radiation doses of 2 Gy 2 h post injury-induction had a significant motor recovery when compared to the control group. However, the underlying processes involved in the neuroprotection mechanisms related to ionizing radiation doses are unknown.

Objective: To characterize the possible antioxidant (lipid peroxidation) and anti-inflammatory (myeloperoxidase, inducible nitric oxide synthase) effects that low-

doses from ionizing radiation has in a moderate traumatic spinal cord injury model in rats.

Materials and Methods: Ninety-six female Wistar rats, weighing 200-250 g were used. The animals were subject to a moderate TSCI at T9 level induced with a New York, Spinal Cord Impactor. Radiosurgery was performed 2 h post-injury using a dedicated Novalis 6 MV linear accelerator (Brain Lab, Inc.). The rats were sacrificed 24 hours after the contusion to carry out the laminectomy to perform the biochemical assays of lipid peroxidation and myeloperoxidase. The inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity was measured 72 h post-injury.

Results: A basal lipid peroxidation value in the rats with laminectomy of 104.57 ± 4.96 (fluorescence units/grams of tissue) was observed. This value is 30.2% higher for the contused rats, and rats with contusion and radiation dose showed lipid peroxidation values of 135.56 ± 7.38 FU/g. The basal myeloperoxidase activity was 0.1124 ± 0.033 U.I.MPO/g/min, while in animals with laminectomy and radiation an average of 0.3386 ± 0.116 U.I.MPO/g/min was obtained. In the injury with no radiation group a higher activity was observed (1.0946 ± 0.102 U.I.MPO/g/min). The myeloperoxidase activity in the injury and radiation group was 52% higher (1.082 ± 0.171 U.I.MPO/g/min) compared to the control group. The basal iNOS activity was 0.145 ± 0.033 ng/L-citrulin/g/min, similar to that observed in rats with laminectomy and treated with radiation (0.146 ± 0.032 ng/L-citrulin/g/min). In the injury with no radiation group an average higher value was observed (0.27 ± 0.06 ng/L-citrulin/g/min). The iNOS activity of the injury and radiation group was 48.7% higher with respect to the laminectomy only group.

Conclusions: Results from this work indicate that ionizing radiation has a partial antioxidant and anti-inflammatory effect after a spinal cord injury.

Keywords: spinal cord injury, inflammation, antioxidant, ionizing radiation.

2.1 Epidemiología de la lesión traumática de la médula espinal

La lesión traumática de la médula espinal es uno de los padecimientos neurológicos de mayor impacto en la vida del individuo y de la sociedad en general. Afecta principalmente a la población económicamente activa y se traduce en una discapacidad severa asociada a una alta morbi-mortalidad [Dryden y cols., 2003]. La información acerca de su incidencia y prevalencia se ha documentado a través de estudios realizados principalmente en Europa y Norteamérica. Se ha reportado por distintos autores que en Australia, Italia y España el número de casos nuevos anuales de LTME se encuentran en un intervalo de 14.5 [O'Connor 2002], 18 a 20 [Pagliacci y cols. 2003], 30 [Rodicio y cols. 2012] por millón de habitantes respectivamente.

En Italia se menciona que la mayor incidencia de casos con LTME se presenta en la población masculina respecto a la femenina con una relación 4:1; dicha población presenta un pico máximo de incidencia entre los 20 y los 35 años de edad. En estos pacientes con trauma medular el 31.7% presenta paraplejía, 24% paraparesia, 19% cuadriplejía y el 20.9% cuadriparesia [Pagliacci y col. 2003]. En Norteamérica se reportan una incidencia de casos nuevos anuales con un intervalo de 25 a 55 para Estados Unidos [Woodruff y Baron 1994], de 47.9 a 52 para Canadá [Dryden y cols. 2003] y en México 18.6 [Pardini 1998] casos por millón de habitantes.

En los Estados Unidos se estima un costo anual de atención médica para los pacientes con LTME de \$66,626 dólares anuales. Se estima que el tiempo medio de sobrevivencia de un paciente con secuelas de trauma medular, con edad entre los 20 y 40 años, es de 21 a 45.8 años posteriores a la lesión. Se espera una sobrevivencia mínima de 40 años promedio [Blumer y Quine 1995. www.nscisc.uab.edu. Febrero 2011].

En México no existen informes exactos de la incidencia y la prevalencia de la lesión LTME, sin embargo, se estima que hay una incidencia de 18 casos anuales por millón de habitantes. Se reporta por Pardini [1998], que en el periodo entre 1993 y 1997 se registraron 525 casos de trauma medular en México y en el D.F., se reportó que en el año 2012, hubo 102 casos nuevos, teniendo un predominio en el sexo masculino [discapacinet.gob. mx, 2012].

Los antecedentes epidemiológicos señalan claramente que la LTME es un problema con una incidencia cada vez mayor, que tiene repercusiones económicas y sociales muy importantes. Por este motivo, se han formado diversas fundaciones en todo el mundo que destinan anualmente cientos de millones de dólares para apoyar a las investigaciones encaminadas a resolver este problema. Sin embargo, hasta la fecha se cuenta únicamente con tratamientos con efectos terapéuticos limitados.

2.2 Fisiopatología de la lesión traumática de la médula espinal

En las etapas tempranas de la LTME se observa un proceso isquémico debido al daño ocasionado a la microcirculación sanguínea, generando una falla energética que se traduce en la pérdida de la regulación iónica. Este evento involucra la movilización de cationes monovalentes y divalentes como K^+ Na^+ (incremento de las concentraciones extracelulares), Ca^{2+} (incremento de las concentraciones intracelulares), respectivamente, lo que lleva al choque medular durante las primeras 24 h después del daño [Hulsebosch 2002]. Con este evento, se produce una falla generalizada en los fascículos adyacentes. Dentro de los primeros 15 minutos después de la lesión, se observa un incremento en las concentraciones de glutamato y otros aminoácidos excitadores (6-8 veces mayor que las concentraciones normales) como consecuencia del incremento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular por la despolarización de la membrana plasmática [Agrawal y Fehling 1997]. Los neurotransmisores como el glutamato y aspartato se unen a sus receptores metabotrópicos o ionotrópicos de los tipos NMDA y AMPA/kainato, los cuales tienen asociado un canal de Ca^{2+}/Na^+ . Durante este proceso se incrementa aun más el Ca^{2+} intracelular, activándose diversas enzimas dependientes de Ca^{2+} como: la sintasa del óxido nítrico constitutiva, la fosfolipasa C, la fosfolipasa A₂, diversas cinasas, fosfatasa, etc. Esto inicia la

señalización de segundos mensajeros y la generación de radicales libres (RL) que llevan a la célula a un estado de estrés oxidativo, estado donde se pierde el balance entre la generación de RL y la capacidad de las defensas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, etc.) para contrarrestarlos [Juurlink y Paterson 1998]. Asimismo, se activan proteasas, como la calpaína, que destruyen la mielina favoreciendo un proceso desmielinizante [Ray y cols. 2003]. Como consecuencia de estos eventos, se promueve la muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis. Otro evento que juega un papel muy importante en la etapa aguda de la lesión es la respuesta inflamatoria la cual desencadena diversas cascadas metabólicas que llevan a la producción de RL y al daño celular. La respuesta inflamatoria que se induce en las etapas tempranas de la lesión daña al tejido nervioso y se caracteriza por la infiltración de neutrófilos, eosinófilos, basófilos macrófagos y la activación de la microglía [Tjoa y cols. 2003].

2.3 Excitotoxicidad y radicales libres

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante del sistema nervioso central y juega un papel muy importante en la transmisión sináptica de la médula espinal. El glutamato se une a tres clases de receptores: los metabotrópicos (mGluR), los activados por el agonista N-metil-D-aspartato (NMDA) altamente regulados por más de seis ligandos endógenos (glutamato, glicina, poliaminas, Mg^+ , Zn^{2+} , y H^+) y los activados por el ácido propiónico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA)/kainato (KA) [Siegel y cols. 2006].

Después de una LTME se observa la liberación del glutamato en grandes cantidades dando como resultado un estado excitotóxico que se refiere a una sobre-estimulación de sus receptores, lo que origina un incremento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular y que a su vez desencadena la activación de diversas enzimas tales como proteasas, fosfolipasas y endonucleasas [Choit 1992]. La concentración elevada de Ca^{2+} inicia la cascada de activación de las proteínasas, la alteración en el metabolismo y la generación de RL. Muchos de estos eventos inician tempranamente ocasionando la muerte celular. La concentración elevada de Ca^{2+} intracelular activa proteasas de cisteína como la calpaína que daña el citoesqueleto. Las endonucleasas también son activadas y ocasionan el rompimiento del ADN, lo que a su vez dispara los procesos apoptóticos o de

muerte celular programada. Este incremento de calcio intracelular desencadena además la activación de cinasas, especialmente las que son dependientes de Ca^{2+} /calmodulina, y las dependientes de Ca^{2+} (PKC). Este incremento de calcio intracelular modifica los canales iónicos, algunos receptores como los NMDA, los AMPA/Kainato y los canales iónicos de Ca^{2+} sensibles a voltaje incrementando aún más la concentración intracelular de Ca^{2+} . El incremento en la concentración de Ca^{2+} favorece la producción de RL por varias vías como son: 1) la activación de la fosfolipasa A2 que libera ácido araquidónico de las membranas lipídicas para iniciar la síntesis de eicosanoides y RL, 2) la unión del glutamato con los receptores NMDA activan a la sintasa del óxido nítrico constitutiva endotelial (SONe) y neuronal (SONn), cuya acción es dependiente de calcio. Con este fenómeno se incrementa la producción de ON^{\bullet} que, al combinarse con el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), favorece la formación del peroxinitrito, una molécula altamente reactiva y citotóxica. Por otra parte, se ha observado que durante el estado excitotóxico se genera un desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria con la subsecuente generación de más RL [Reynolds y Hastings, 1995].

Algunos estudios indican que la activación de receptores NMDA y AMPA/KA pueden mediar la excitotoxicidad y contribuir a incrementar los procesos neurodegenerativos después de una LTME [Faden y Simon 1988]. El mecanismo de la muerte neuronal disparado por el glutamato se cree que es típicamente necrótico [Choit, 1992], pero el glutamato también puede inducir muerte por apoptosis [Portera-Cailliau y cols. 1997] (ver figura 1).

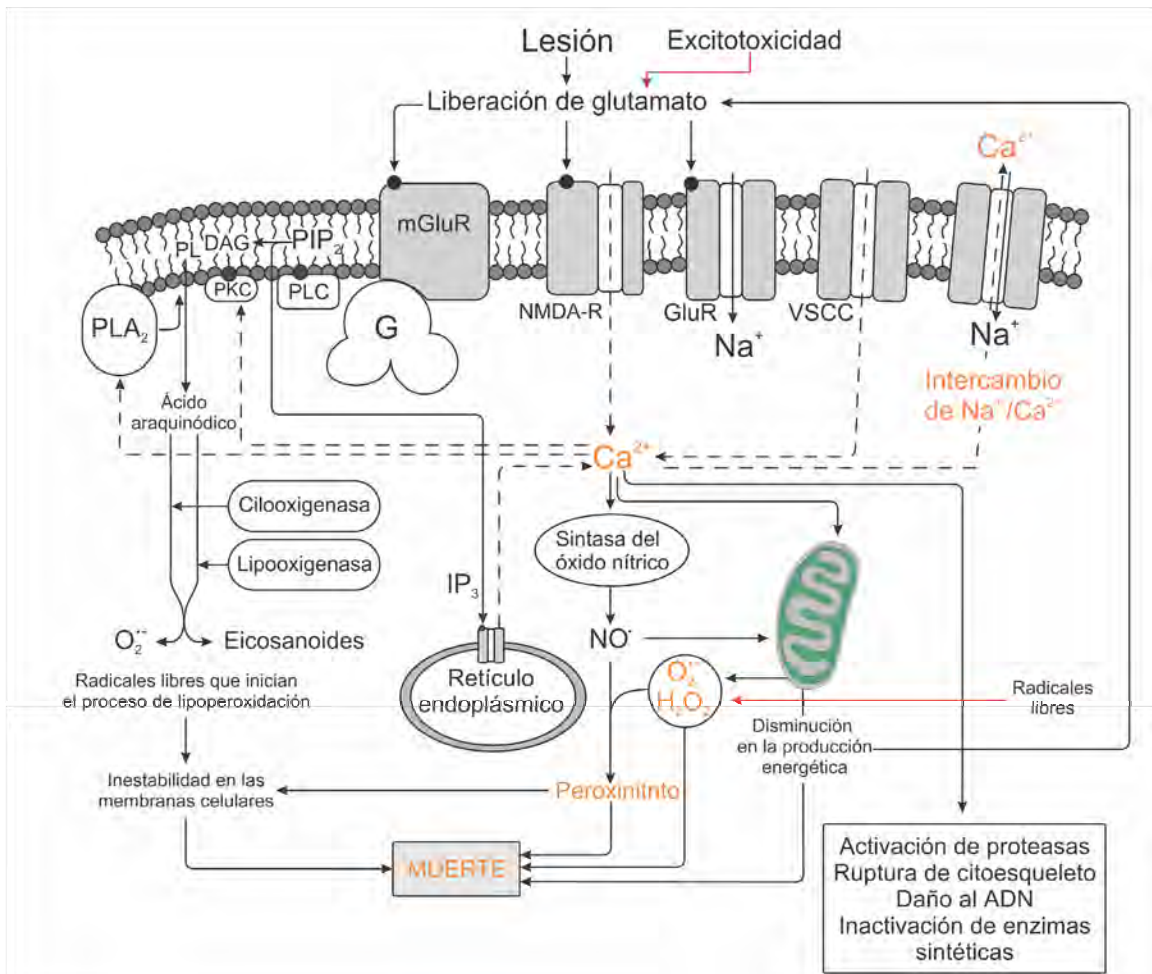


Figura 1. mGluR: receptor metabotrópico de glutamato; NMDA-R: receptor N-metil-D-aspartato/AMPA/KA; receptor activado por α -amino-3-hidroxi-5-metil-4isoxazol/kainato; PL: fosfolípidos; PLA₂: fosfolipasa A₂; DAG: diacilglicerol; PLC: fosfolipasa C; PKC: proteína cinasa C; G: proteína G; PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; IP₃ inositol 1,4,5-trisfosfato; NO[•]: óxido nítrico; O₂^{•-}: radical superóxido; H₂O₂: peróxido de hidrógeno; VSCC: canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje. (Diagrama modificado de Siegel y cols., 2006).

2.4 Estrés oxidativo y lipoperoxidación asociados con la LTME

En la mitocondria se lleva a cabo la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa, proceso en el cual el oxígeno (O_2) es reducido hasta H_2O . El O_2 acepta electrones, uno a la vez, en un evento secuencial generando anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y agua. En condiciones normales, la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) es

probablemente menor al 5%, sin embargo esta producción puede incrementarse cuando la concentración de Ca^{2+} y/o Na^+ aumentan súbitamente como respuesta al proceso excitotóxico [Dykens 1994]. Un exceso de $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede llevar a la formación de muchas otras especies reactivas incluyendo el OH^\bullet y los radicales libres de peroxihidroxilo (OH_2^\bullet). A pH fisiológico el $\text{O}_2^{\bullet-}$ tiende a dismutarse formando H_2O_2 y oxígeno a través de las diversas isoformas de la enzima superóxido dismutasa (SOD). El H_2O_2 es a su vez destoxificado por la catalasa, enzima que se encuentra localizada principalmente en los peroxisomas, proceso que también es catalizado por la enzima glutatión peroxidasa.

El H_2O_2 no es un radical libre pero puede fácilmente difundirse a través de las membranas biológicas con un diámetro semejante al $\text{O}_2^{\bullet-}$. Así los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno pueden generar un daño citotóxico en sitios distantes al de su generación. La reacción entre el H_2O_2 y $\text{O}_2^{\bullet-}$ se ha denominado ciclo de Haber Weiss, proceso por el cual se favorece la producción del radical OH^\bullet altamente reactivo. Cuando el H_2O_2 se encuentra en presencia de metales de transición como el hierro y el cobre, se generan altas concentraciones de OH^\bullet por medio de la reacción de Fenton [Aust y cols. 1985]. Sin embargo, no toda la concentración de los metales está en forma libre, existe una parte unida a proteínas como el hierro que se une a la ferritina aunque en esta forma el hierro no cataliza la reacción para formar radicales libres.

Por su alta reactividad, el radical OH^\bullet se considera el más potente oxidante en los sistemas biológicos. El OH^\bullet tiene una vida media corta por lo que tiene una capacidad de difusión limitada (aproximadamente 0.01 del diámetro de la proteína). Existen algunas defensas antioxidantes que tienen la capacidad de atrapar este radical como la metalotioneína. La metalotioneína es una proteína intracelular de bajo peso molecular que consta de 61 a 62 residuos de aminoácidos no aromáticos, con gran contenido de cisteínas (25-30%), que no forma puentes disulfuro y tiene alta afinidad por los metales, se encuentran unidos de 5-7 átomos de zinc, 12 de cobre o 7 átomos de cadmio por mol de proteína [Ebadi y cols. 1996; Aschner 1997]. También se ha demostrado que el ácido salicílico es un potente atrapador de radicales OH^\bullet [Mohanakumar y cols. 2000], así como el α -tocoferol (vitamina E) y el ácido ascórbico. Ambos reaccionan directamente con el OH^\bullet para formar productos más estables, pero se sabe que el α -tocoferol previene el daño

oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados y de proteínas con altos contenidos de grupos tioles que se encuentran en las membranas [Facchinetti y cols. 1998], mientras que el ascorbato es un atrapador soluble en agua que es requerido como cofactor de varias hidroxilasas [Padh 1991]. Más aún, el ascorbato y el α -tocoferol pueden actuar sinérgicamente en la inhibición de las reacciones de oxidación. Finalmente, se ha reportado que el óxido nítrico (NO^\bullet) y algunos donadores de ON^\bullet como la nitroglicerina pueden suprimir la generación de OH^\bullet , tanto *in vitro* como *in vivo* [Mohanakumar y cols. 2002].

Se sabe que el NO^\bullet tiene una participación importante en la etapa aguda de la lesión durante la generación del estrés oxidativo. En el trabajo realizado por Díaz-Ruiz y cols. [2002] se demostró que existe un incremento del 138% comparado con el grupo control no lesionado en la actividad de la SON constitutiva 4 h después de la lesión, y un incremento del 103% en la actividad de la SON inducible cuando fue evaluada 72 h después del daño. También Xu y colaboradores [Xu y cols. 2000] en un modelo de lesión medular midieron la producción de NO^\bullet curso temporal por medio de una técnica de electrodos sensibles a NO^\bullet , y demostraron que el NO^\bullet se incrementa inmediatamente después de la lesión. Estos resultados indican que el ON^\bullet es sintetizado por la SON constitutiva, como consecuencia de la activación de los receptores de glutamato en las neuronas, mientras que la síntesis de NO^\bullet en las células gliales se produce por actividad de la SON inducible, probablemente inducida por citocinas [Bolanos y cols. 1997]. La actividad de las isomorfias SON_n, SON_i, SON_e, se mantiene en neuronas, microglía y células endoteliales, respectivamente, en todos los estadios después de la lesión. En el trabajo de Bolaños y cols. [1997] se determinó el curso temporal de la producción de peroxinitrito detectado por nitro-tirosina después de una lesión y demostraron que existe un incremento de 3 a 5 veces en la concentración de peroxinitrito, sugiriendo que el peroxinitrito juega un papel importante en el daño secundario después de la lesión. En este trabajo los autores sugieren que este incremento en la concentración de peroxinitrito puede ser debido al incremento de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y NO^\bullet . Por el método de HPLC (*high purity liquid chromatography*), también demostraron que la concentración de nitrotirosina en proteínas es significativamente más alta en el tejido lesionado que en el tejido control, lo cual indica que después de una LTME se induce la nitración de proteínas. Las concentraciones altas de peroxinitrito pueden dañar las células por la oxidación de las membranas lipídicas además de

las proteínas o por la formación directa de radicales hidroxilo. Se ha reportado que los RL y las especies reactivas de NO[•] desencadenan el fenómeno de lipoperoxidación [Quian y Liu 1997], estos autores sugieren que la excesiva producción de ON[•] y RL tiene un efecto directo en el daño secundario originado después de una LTME. Se reportó en 1999 [Díaz-Ruiz y cols.] que la LP en el trauma medular en un modelo de ratas, se aumenta a las 24 h después de la lesión en el grupo control.

2.5 Modulación de la respuesta inflamatoria después de una LTME

Después de producirse una LTME se inicia una importante respuesta inflamatoria que se caracteriza por la producción de diversas citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias sintetizadas por las células endoteliales [Acarin y cols. 2000]. Asimismo, las células endoteliales incrementan la expresión de diversas moléculas de adhesión como las selectinas, las ICAM-1 y las VCAM (por sus siglas en inglés *intercellular adhesion molecule-1* y *vascular cell adhesion molecule-1*, respectivamente). Más tarde, los neutrófilos se unen a estas moléculas a través de sus receptores L-selectina, LFA-1 y VLA-4 respectivamente, iniciándose así la migración de neutrófilos al tejido lesionado en unos pocos minutos [Carlson y cols. 1998]. Subsecuentemente, los macrófagos también inician su migración al sitio de la lesión.

Tanto los neutrófilos como los macrófagos inician la fagocitosis de los detritus, desencadenando lo que se conoce como estallido respiratorio, lo que lleva a la excesiva producción de RL y al estrés oxidativo [Carlson y cols. 1998]. Los RL producidos durante el estallido respiratorio son excelentes bactericidas, sin embargo, durante la lesión medular también dañan al tejido circundante. Se ha demostrado que después de producirse una LTME se incrementa la síntesis de diversas sustancias que son pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la interleucina 1 (IL-1) y los metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos). Estas moléculas favorecen la activación y migración de más leucocitos al sitio de la lesión, lo que a su vez incrementan la síntesis de moléculas de adhesión en las células endoteliales [Ghirnikar y cols. 2000], exacerbando el daño secundario.

La inflamación generada después de la LTME contribuye a la disminución de la capacidad de recuperación dada por la formación de la cicatriz fibrilar, la progresiva formación de cavidades quísticas y la muerte de las neuronas ya sea por apoptosis o por necrosis [Hausman 2003]. Finalmente, se sabe que la respuesta inflamatoria desencadenada después de la LTME es de mayores proporciones comparada con la producida después de un traumatismo en la corteza cerebral [Schnell y cols. 1999]. Diversos autores sugieren que las moléculas específicas que promueven la inflamación juegan un papel muy importante en la neuropatología del daño secundario [Carlson y cols. 1998; Fitch y cols. 1999].

Con base en estos antecedentes, se ha propuesto desarrollar diversas estrategias para modular la respuesta inflamatoria después de la lesión. Entre las estrategias están la atenuación de la migración de los leucocitos, la inhibición de la activación de neutrófilos, etc. Utilizando anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra las moléculas de adhesión, que incluyen la selectina-P e ICAM-1. Hamada y cols., y Taoka y cols. [Hamada y cols. 1996; Taoka y cols. 2011] demostraron que esta estrategia tiene efectos neuroprotectores después de una LTME. El empleo de anticuerpos monoclonales contra la integrina alfa-D, una proteína de adhesión al endotelio vascular para macrófagos y neutrófilos, también tiene efectos neuroprotectores [Mabon y cols. 2000].

Como se mencionó anteriormente, después de una LTME se incrementa la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos alterando el flujo sanguíneo y favoreciendo la agregación plaquetaria, lo que trae como consecuencia el fenómeno de isquemia. Para tratar de contrarrestar este fenómeno se han desarrollado estrategias terapéuticas para inhibir a las enzimas responsables de la síntesis de estas moléculas. En un modelo experimental de LTME en gatos, se probó la eficacia de la naloxona comparada con una combinación de indometacina/heparina (4 mg/kg y 300 U/kg, respectivamente) y prostaciclina (200 ng/kg/min). Los tratamientos farmacológicos fueron iniciados 1 hora después de la lesión y los resultados demostraron una recuperación neurológica significativamente mayor en todos los grupos tratados cuando fueron comparados con el control, al cual se le administró placebo [Hallenbeck y cols. 1983]. Por otra parte Naruo y cols. en el 2003 desarrollaron un tratamiento con prostaglandina. El potente vasodilatador inhibe la activación de neutrófilos y la producción del TNF α después de una LTME

[Naruo y cols. 2003]. Los resultados de ese trabajo demostraron que existe una disminución en la cantidad de neutrófilos en el área de lesión (medición indirecta a partir de la actividad de la enzima mieloperoxidasa), una disminución en la cantidad de TNF α , una reducción en la hemorragia en el sitio de la lesión y una mejor función motora. Con estas observaciones los autores sugieren que la recuperación funcional se debe a una inhibición de la activación de los neutrófilos.

Algunos trabajos realizados en modelos de isquemia-reperfusión apoyan la idea de que la presencia de las células inflamatorias, como los neutrófilos, incrementan el daño al tejido nervioso [Wang y Feuerstein 2000]. Los neutrófilos activados, además de generar especies reactivas de oxígeno, también sintetizan la elastasa, una enzima que tiene la capacidad de degradar numerosas proteínas de la matriz extracelular como colágeno, elastina, fibrina, fibronectina y laminina así como proteínas solubles como factores de coagulación, complemento, citocinas e inhibidores de proteasas.

En un estudio realizado por Taoka y cols. en el que utilizaron dos inhibidores de la elastasa, el Eglin C y el L658,758, en un modelo de lesión por compresión medular en ratas, demostraron que la hemorragia intra-medular observada 24 h después del daño se atenúa en los grupos tratados con dichos fármacos [Taoka y cols. 2011]. Asimismo, se observó una menor acumulación de neutrófilos en la zona de lesión, por lo que los autores sugieren que el uso de estos fármacos podría tener efectos benéficos en la vasculatura de la médula espinal. Por otra parte, otro inhibidor de la elastasa, el ONO-5046 fue probado en un modelo de lesión por compresión [Tonai y cols. 2001]. Dicho fármaco redujo la infiltración de neutrófilos y el daño neurológico al inhibir la síntesis de citocinas inducibles quimio-atrayentes de los neutrófilos (CINC-1), favoreciendo una mejoría en la actividad locomotriz de los animales tratados.

2.6 Estrategias desarrolladas para la reparación de la médula espinal lesionada

Como se ha expuesto previamente, la LTME se presenta como un problema complejo y los esfuerzos experimentales desarrollados hasta el momento no han logrado encontrar una estrategia lo suficientemente efectiva como para reconstituir

los circuitos axonales originales con una terapia única [Bradbury y McMahon, 2006] [Rabchevsky y cols. 2011]. Se ha abordado el problema con propuestas de trasplantes de células precursoras de oligodendrocitos para la remielinización del tejido medular contundido [Cao y cols. 2010]. Estrada-Mondacar y colaboradores describen la posibilidad del uso de la medicina regenerativa como tratamiento para la lesión medular a base de la implantación de células madre neurogénicas [Estrada-Mondacar y cols. 2007].

Otro de los tratamientos para las lesiones medulares han sido las intervenciones farmacológicas [Alexander. G. Rabchevsky y cols. 2011]. Algunas de ellas son:

1. El uso del riluzole actuando como neuroprotector, inhibiendo la liberación del glutamato [Kitsman 2009; Coderre y cols. 2007].
2. La eritropoyetina-metilprednisolona como efecto antiapoptótico, antiinflamatorio [Won y cols. 2007; Vitellano-Zuccarello y cols. 2007] e inhibidor de la generación de radicales libres en la lesión medular [Yazíhan y cols. 2008].
3. La minociclina con efectos antiapoptóticos y antiinflamatorios [Marchad y cols. 2009].

Otras estrategias incluyen el depósito de GTPasa's, AMP cíclico, moléculas que modulan la interacción de inhibidores asociados a la mielina como anticuerpos anti Nogo-A o contra el receptor de Nogo-A. También se describió por Klapka y cols. (2005) el empleo de modificadores de la matriz celular que suprimen transitoriamente la síntesis de colágeno (Condroitinasa AB), impidiendo la producción de glucosaminoglucanos, mejorando el ambiente extracelular y promoviendo el crecimiento axonal con resultados variables. [Klapka y cols. 2005; Kwon- Brain y cols. 2011].

Por el momento no existe una terapéutica que haya demostrado su eficacia para atenuar y reparar el daño de la lesión medular. Recientemente se ha propuesto el uso de la radiación ionizante conformacional como tratamiento neuroprotector en la LTME.

2.7 Radiación ionizante

La radiación se clasifica en dos principales categorías: ionizante y no ionizante. Se dice que un átomo queda ionizado cuando pierde o gana uno o varios electrones.

Radiación no ionizante: esta radiación no puede ionizar a la materia debido a que es de energía baja [Podgorsak 2006].

Radiación ionizante: se caracteriza por la capacidad de extraer electrones de los átomos de la materia con los que interacciona. Esto puede ocurrir de una manera directa o indirecta por lo que la RI se puede clasificar en dos grupos:

- 1) Radiación directamente ionizante: su efecto se debe a partículas cargadas las cuales depositan energía en el medio a través de una interacción de Coulomb con los electrones de los átomos en el medio. A este grupo pertenecen los electrones, protones, partículas alfa y otros iones pesados [Podgorsak 2006].
- 2) Radiación indirectamente ionizante: se refiere a partículas sin carga eléctrica como neutrones y fotones (rayos-X y rayos gamma). Son indirectamente ionizantes ya que sufren otro tipo de interacciones que dan lugar a la aparición de partículas cargadas secundarias, las cuales producen la ionización.

Los rayos-X son fotones que se producen al hacer incidir un haz de electrones sobre un blanco, típicamente metálico. La emisión de los rayos-X se produce de dos maneras: cuando los electrones, a su paso a través del material que forma el blanco, pierden energía en la forma de radiación de frenado (*Bremsstrahlung*) y cuando los electrones ionizan a los átomos del blanco, produciéndose la emisión de fotones con energía discreta característica del material. Los rayos-X producidos por haces de electrones de energía entre 120 y 300 keV se les conoce como rayos-X de ortovoltaje.

Los rayos gamma son fotones que provienen de un núcleo atómico inestable (radionúclido) y que llevan una cantidad de energía bien definida característica del radionúclido en cuestión. Por ejemplo, el cobalto-60 es un radionúclido inestable cuyos rayos gamma son de 1.17 MeV y 1.33 MeV y que es ampliamente utilizado en equipos de radioterapia [Podgorsak 2006].

Dentro de la radioterapia existen 2 formas de depositar la radiación: en una sola dosis durante una sola sesión llamada *radiocirugía*, y la *radioterapia estereotáctica fraccionada*, que consiste en un esquemas de dosis depositada en varias sesiones hasta completar la dosis total de tratamiento [Kondziolka y cols. 2004].

2.8 Radiocirugía

La radiocirugía fue descrita por primera vez por el Dr. Leksell del Instituto Karolinska en Estocolmo, Suecia en 1949, quien la definió como la destrucción completa y precisa de un blanco formado por células sanas o patológicas, sin provocar un daño por radiación en tejido sano circundante [Leksell 1958]. El principio fundamental de la radiocirugía es la de causar daño selectivo al tejido que interesa tratar. Este proceso se da principalmente por la producción de iones y radicales libres generados por el depósito de energía de la radiación. Los efectos de la radiación pueden producir daño suficiente al material genético de las células expuestas limitando su capacidad de reparación y replicación. Es por esto que aquellos tejidos que presentan tasas de crecimiento alto son los más afectados. La dosis es la cantidad de energía depositada por la radiación por unidad de masa en un tejido y que está relacionada con el grado de inactivación biológica. Se mide usualmente en grays (Gy), donde 1 Gy se define como 1 J/kg [Podgorsak 2006].

Inicialmente, la radiación se usó para tratar tumores cerebrales con un instrumento que utilizaba protones acelerados por un ciclotrón. En 1968 el Dr. Leksell desarrolló el *Gamma-Knife*, que consiste de un sistema de radiocirugía que emplea una fuente de ^{60}Co (rayos gamma) como fuente de radiación y un marco rígido de referencia, llamado marco de estereotaxia. El marco de estereotaxia establece un sistema de coordenadas que sirve de guía para que, por medio de imágenes, se ubiquen las estructuras a tratar y se diseñe el plan de tratamiento que incluye la protección de los tejidos sanos.

El acelerador lineal (LINAC, *linear accelerator*, en inglés), es otro tipo de instrumento de radioterapia introducido por Betti y Derechinsky [1984] a mediados de 1980. Este equipo utiliza un acelerador lineal para generar un haz de rayos-X de alta energía (hasta 6 MeV). Los LINAC consisten de un *gantry* el cual puede rotar y desplazarse alrededor del paciente para dirigir el haz de radiación

desde distintos ángulos. La combinación de los movimientos del *gantry* y de la mesa del paciente hace posible realizar una planeación de tratamiento de tal manera que se concentra la dosis impartida al volumen a tratar mientras que se minimiza la dosis a los órganos sanos. Además, el LINAC tiene la capacidad de modificar el diámetro del haz de radiación ajustándolo al tamaño de la lesión a través de un colimador multihoja. Este colimador consiste de unas hojas metálicas que pueden ser desplazadas dinámicamente durante el tratamiento de tal manera que el haz de radiación adquiere la forma del volumen blanco. De la misma manera que en los tratamientos con el *Gamma Knife*, se emplea un marco de estereotáxia para realizar la planeación del tratamiento con un LINAC [Shrieve 2006].

2.9 Radiación, estrés oxidativo e inflamación

Por muchas décadas, se ha reportado que la radiación a dosis bajas es efectiva en el tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas así como en padecimientos degenerativos acompañados de dolor [Micke y Seegenschmiedt 2002]. Los conceptos recientes están basados en estudios con niveles de evidencia tipo III, IV, recomendando dosis únicas de 0.3-1.0 Gy en 4-5 fracciones para enfermedades agudas y 1-3 fracciones por semana para patologías crónicas con una dosis total de 3-5 Gy y 12 Gy, respectivamente.

El tratamiento con radiación a dosis bajas ha sido empleado en las siguientes patologías: psoriasis, absceso necrotizante, tendinitis, enfermedad degenerativa articular exacerbada o refractaria, dolor por osteoartritis, epicondilopatía humeri, orbitopatía endocrina, síndrome de calcaneodinea, o para la prevención de osificación heterotópica [Trott 1994; Keilhoz y cols. 1995, Seegenschmiedt y cols. 1996, 1997; Seegenschmiedt y Keilholz 1998].

Debido a que los resultados han sido satisfactorios se han caracterizado los posibles mecanismos de acción iniciando con la respuesta inflamatoria, como en el caso del modelo experimental de granuloma inflamatorio [Appleton y cols. 1993, Vane y cols. 1994]. En este estudio, se utilizó un esquema de radiación de 2 Gy administrados durante 2 días, tanto en la fase inflamatoria aguda como en la crónica. Los pacientes fueron tratados con 5 o 6 dosis diarias de 0.5 Gy durante 2 o

hasta 6 días y las evaluaciones bioquímicas se realizaron en el día 7 después de la inducción del granuloma. En ese trabajo se estudió la expresión de la SONi y de la hemoxigenasa-1 (HO-1) utilizando las técnicas de Western blot e inmunohistoquímica, [Hildebrandt y cols. 1998; Schaue y cols. 2005]. Los resultados demostraron una disminución tanto en la expresión como en la presencia de la SONi en el tejido del granuloma durante la fase aguda de la inflamación, pero en contraste, la expresión de la HO-1 se incrementó en todos los grupos radiados. Estos resultados indican que el NO[•] participa en la citotoxicidad generada por los macrófagos durante la inflamación aguda y que la RI tiene un efecto anti-inflamatorio y analgésico [Abramson y cols. 2001].

Asimismo, Hildebrandt y cols. [2000, 2003] y Liebmann y cols. [2004] utilizando dosis fraccionada de 5 x 0.5 Gy o 5 x 1.0 Gy en un modelo de osteoartritis en rata, obtuvieron resultados similares a los descritos para el modelo de granuloma, ya que se observó una reducción en la actividad de la SONi y un incremento en la actividad de la HO-1 en el día 21 y 30 después de la inducción de la enfermedad. Cabe mencionar que los macrófagos son una fuente importante de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la respuesta inflamatoria activando el estallido respiratorio oxidativo, por lo que esta reducción podría traducirse en un posible efecto anti-oxidante.

Schaue y cols. [2002] investigaron los efectos del tratamiento con radiación a dosis bajas durante el estallido oxidativo de los macrófagos RWA 264.7 después de su estimulación con acetato de forbol miristato (PMA) o Zymosan. Los resultados demostraron que las dosis bajas de radiación (0.3-0.6 Gy) redujeron significativamente la actividad del estallido oxidativo y la producción de superóxido. Concluyeron que la disminución de los productos reactivos intermedios del oxígeno quizá contribuye al efecto terapéutico local de la radiación a dosis bajas [Rödel y cols. 2007].

Por otra parte, Kalderon y cols. [1990] en su primer estudio de un modelo de contusión medular en ratas, utilizaron un generador de rayos X, una unidad híbrida de ortovoltaje operando a 320 kV, 10 mA con 0.5 mm de Cu como filtro, a una distancia de la piel del animal de 50 cm y se impartió un tratamiento de dosis única de 10 Gy en las semanas 1, 2, 3 y 4 posteriores a la lesión. Encontraron que la radiación fue efectiva en prevenir la degeneración del tejido cuando se aplicó

dentro de la tercera semana posterior a la lesión, con su máximo efecto en los días 17-18 posterior a la lesión. En el análisis histológico se pudo observar una reducción de la cantidad de astrocitos reactivos en el sitio de la lesión. Las dosis impartidas antes o después de la tercera semana fueron inefectivas en prevenir la formación de la cicatriz glial, demostrando que la radiación había permitido la restitución estructural y la continuidad de una gran cantidad de axones corticoespinales a través de la lesión inicial. Posteriormente Kalderon y colaboradores [1996], realizaron un estudio longitudinal con seguimiento histológico en un modelo de sección de la médula espinal en ratas hasta los 3 meses posteriores al daño. Los resultados indicaron que se activan diversos mecanismos intrínsecos después de la lesión y que continúa hasta las tres semanas posteriores a la lesión. Sin embargo, para la cuarta semana este proceso decae resultando en una cicatriz permanente, ya que en los primeros días posteriores a la lesión, la médula lesionada se encuentra dividida en dos secciones separadas y durante la 2ª semana los extremos parecen haberse conectado y sus márgenes se desvanecen. En los días 17 y 19 la médula parece haberse fusionado con pocas señas del daño inicial. El proceso de deterioro inicia en la semana 4 con sitios discretos de desintegración tisular que se extienden hasta el 2º mes resultando en dos extremos medulares separados por una larga cavidad.

Posterior a esos hallazgos, ese mismo grupo diseñó una serie de trabajos para determinar la efectividad de la radiación en la recuperación tisular y funcional en un modelo de sección de la médula espinal en rata. Para demostrar la relevancia funcional de estos hallazgos, diseñaron un segundo estudio [Kalderon y cols. 1996b] en el cual evaluaron la recuperación utilizando una prueba electrofisiológica para valorar la actividad de los músculos de los cuatro miembros inervados por moto-neuronas distales a la lesión. Fue un estudio aleatorizado y controlado utilizando ratas adultas sometidas a una sección medular con bisturí. Se les impartieron dosis únicas de 20 Gy en los días 17-18 y se realizaron análisis a los 2 y 5 meses posteriores al tratamiento. Los resultados del estudio demostraron restitución de la función neurológica, lo que implicó que los axones corticoespinales regenerados reestablecieron su conexión con neuronas dentro del campo irradiado, y con suficiente función para mejorar el movimiento en los animales tratados (ver figura 2) [Kalderon y cols. 1996b].

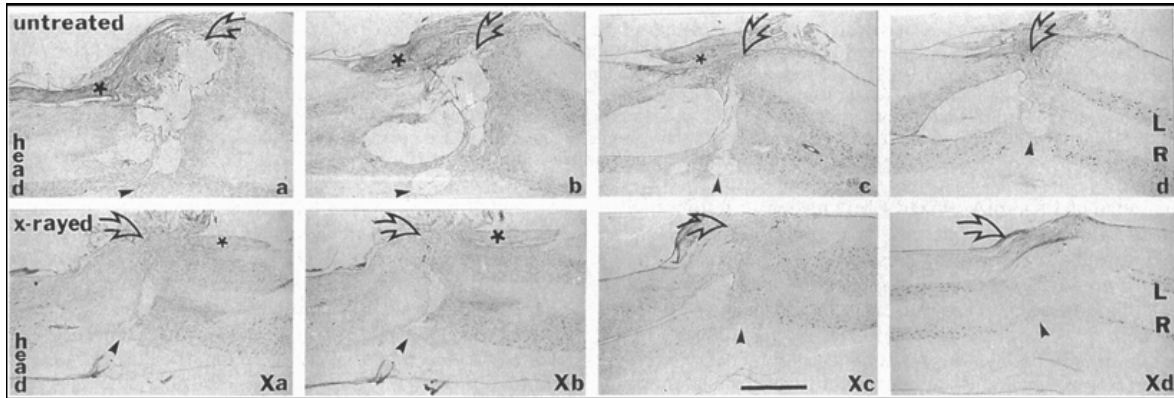


Figura 2. Hallazgos morfológicos del sitio de la lesión mostrando secciones horizontales teñidas con metionina en dos médulas espinales lesionadas, sin radiación (a-d) y con radiación (Xa-Xd). Nótese en la médula no tratada la cavitación y la degeneración del tejido en el sitio de la incisión. La incisión en la médula tratada desapareció y la continuidad estructural se estableció casi por completo.

Con base en estos hallazgos Kalderon y cols. [2001], diseñaron otro protocolo de radiación utilizando varias dosis fraccionadas. Encontraron que cuando se administran 24.2 Gy en 11 fracciones o 20.4 Gy en 6 fracciones, iniciando en el día 15 posterior a la lesión, se observan mejores resultados previniendo la formación de quistes y la pérdida de tejido medular.

Por otra parte, se han publicado otros dos estudios por autores independientes que muestran resultados contradictorios a los publicados por este autor. El grupo de Zeman y cols. [2001] proponen que en el caso de la LTME por contusión la degeneración del tejido medular inicia más rápidamente, lo que ubica una ventana de tratamiento más temprana que aquella propuesta para el modelo de sección medular. En su estudio los autores emplearon el sistema de lesión por contusión diseñado en la Universidad de Nueva York (*New York University Wight-drop device*) (NYUD) y realizaron lesiones a nivel de T10 para posteriormente impartir la radiación con una unidad de rayos X de ortovoltaje (Maxima-R-100 Type 1, General Electric). Los animales fueron divididos en seis grupos diferentes de acuerdo al tiempo en que se administró una dosis única de 20 Gy. Se radiaron de la siguiente manera: a un grupo a los 20 minutos, otro al 1er día, al 2do día, al 4to día, al 7mo día y al día 17 posterior a la lesión. Los resultados fueron consistentes con una respuesta parcial de la función motora promovida por la radiación cuando el sitio de la lesión fue radiado entre los 20 minutos y 2 días. Resaltó que posterior a

este tiempo no se encontró ninguna respuesta, un dato en oposición a lo publicado por Kalderon.

Un grupo independiente en Francia [Ridet y cols. 2000] utilizó un modelo de compresión medular mediante la inserción y expansión progresiva de un globo de sonda de Foley en el espacio epidural en ratas. Posteriormente, las ratas fueron sometidas a un protocolo de radiación generado por un equipo de rayos X de orthovoltaje que operaba a 100 kV (Philips, Eindhoven, Netherlands) con un isocentro estimado en un área de 2 centímetros de radiación total impartiendo en el segundo día dosis crecientes de 2, 5, 10 y 20 Gy. Los resultados demostraron una mayor recuperación funcional en aquellos animales que recibieron la dosis de 2 Gy. Esta recuperación fue evaluada 30 días después del daño con la escala de Tarlov y la de Rivlin y Tator.

Zeman y colaboradores realizaron en el 2008 un estudio con un modelo de lesión medular tipo moderado con el impactador New York y posteriormente impartiendo radiación ionizante a las 2 h después de la lesión. En ese trabajo utilizaron dosis de 10, 15 y 25 Gy y observaron una mejoría motora y una mejor preservación de tejido en las ratas tratadas con 10 Gy.

En un proyecto del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, encabezado por Galván se realizó un estudio piloto en el cual a 36 ratas hembras sometidas a una LTME por contusión moderada fueron tratadas con RI [Galván y cols. 2008 en prensa]. A las ratas se les impartió una dosis de 14 Gy a diferentes tiempos (2 h, 1, 2, 7 y 14 días) después del daño con un equipo de radiocirugía Novalis dedicado de 6 MV. Los resultados demostraron una mejor recuperación en los animales tratados con RI 2 h después de la lesión (ver figura 3). Con base en esta información, se desarrolló un nuevo estudio modificando la dosis de radiación (2, 4, 10 y 14 Gy) para poder establecer el mejor tiempo y la mejor dosis neuroprotectora en ratas con el mismo modelo de daño. En los resultados se pudo observar la mejor recuperación motora en las animales tratados 2 h después del daño con una dosis de 2 Gy (ver figura 4) [González y cols. 2008 en prensa].

Un resumen de los trabajos de modelos de LTME tratados con RI se presenta en la tabla 1.

Con base en estos resultados, en el presente trabajo se exploraron los mecanismos neuroprotectores de la RI impartida a dosis bajas en virtud de su posible efecto anti-oxidante y anti-inflamatorio, ya que hasta el momento no se conoce cuál es su participación durante la etapa aguda después del daño.

Tabla 1. Trabajos realizados con radiación ionizante y LTME

Autor	Modelo	Dosis (Gy)	Tiempo de tratamiento	Equipo	Resultado
Kalderon, 1990	Sección Medular (SM)	10	1,2,3,4 semanas	Ortovoltaje	Favorece la regeneración y la disminución de astrocitos
Kalderon, 1996	SM	20	17 y 18vo. Día	Ortovoltaje	Evaluación con pruebas electrofisiológicas donde se correlaciona que, si tiene restitución estructural, entonces hay mejoría muscular.
Kalderon, 2001	SM	24.2 en 11 sesiones 20.4 en 6 sesiones	15vo. Día	Ortovoltaje	Previene el quiste y la pérdida del tejido medular
Ridet , 2000	Compresión	2,5,10,20	2do. Día	Ortovoltaje	Mayor recuperación motora con 2Gy
Zeman 2001	Contusión	20	20min, 1,2,4,7,17 días	Ortovoltaje	Degeneración inicia rápidamente (a los 20 min
2008	Contusión	10, 15, 25	2 h	6 MV	Mejoría con 10 Gy

Sección medular (SM), gray (Gy), megavolts (MV)

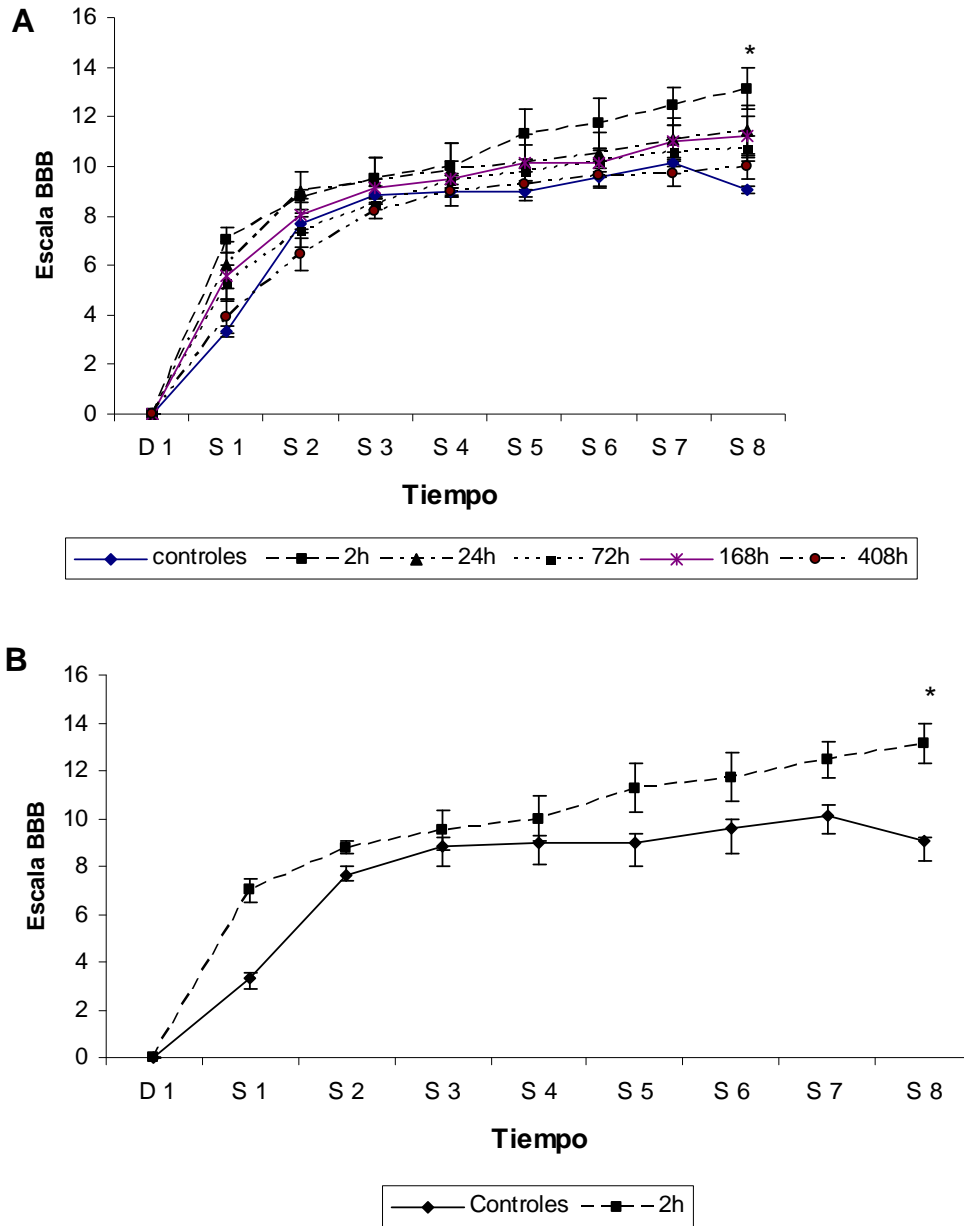


Figura 3. Recuperación funcional evaluada con la escala de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) durante dos meses en animales sometidos a una LTME y tratados con 14 Gy. Los animales fueron tratados a diferentes tiempos: Control: LTME sin tratamiento; D1: evaluación 24 h después del daño, S: semanas. Panel A: Gráfica en la que se muestran todos los grupos evaluados, Panel B: Gráfica en la que se muestra solo el grupo control y el grupo tratados 2 h después del daño con 14 Gy y que mostró la mejor recuperación funcional. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett (* $p < 0.05$).

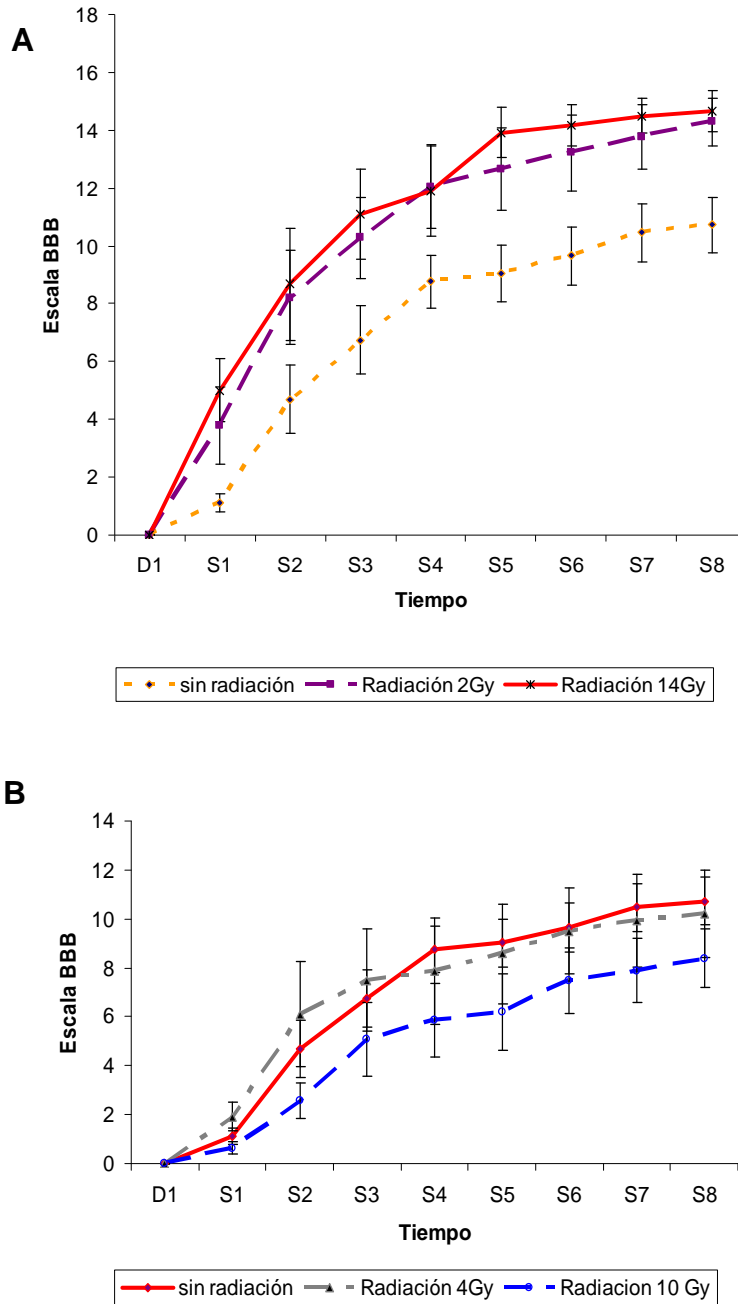


Figura 4. Recuperación funcional evaluada con la escala BBB durante dos meses de animales sometidos a una LTME y tratados con dosis diferentes de radiación ionizante 2 h después del daño. Gy: (grays), Control: LTME sin tratamiento; D1: evaluación 24 h después del daño, S: semanas. Panel A: Grafica en la que se muestran el grupo control y los grupos tratados con 2 y 14 Gy y que mostraron la mejor recuperación funcional. Panel B: Gráfica en la que se muestra el grupo control y los grupos tratados 2 h después del daño con 4 y 10 Gy. ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett (* $p < 0.05$).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que la lesión traumática de la médula espinal genera la activación de procesos de estrés oxidativo y de inflamación, lo que provoca un daño importante a nivel medular que clínicamente se manifiesta por la alteración de la capacidad motora de las extremidades. Para este padecimiento se han propuesto varios tratamientos sin que hasta el momento ninguno de ellos haya presentado una respuesta satisfactoria y contundente para la mejoría de la función motora. Se sabe por un estudio del grupo de trabajo del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía encabezado por González y Díaz Ruiz, que con la radiación ionizante a dosis bajas (2 Gy) impartida 2 h después de la LTME en un modelo experimental de ratas se tiene mejoría motora y buena preservación del tejido medular. Debido a estos resultados se cree que la RI juega un papel importante en la respuesta inflamatoria y sobre el estrés oxidativo. Por este motivo, en este trabajo se propuso estudiar lo siguiente:

¿Existirá una disminución en la respuesta del estrés oxidativo (lipoperoxidación) y de la inflamatoria (mieloperoxidasa y sintasa del óxido nítrico inducible) en un modelo de lesión traumática de médula espinal en ratas por efecto de la radiación ionizante a dosis bajas?

4 JUSTIFICACIÓN

La lesión traumática de la médula espinal es un padecimiento de consecuencias discapacitantes irreversibles con implicaciones importantes en la calidad de vida de los pacientes. Es un problema de salud en México con una incidencia del 18.6 casos nuevos anuales por cada millón de habitantes y la incidencia mayor es en la edad productiva, entre los 20 y 30 años. En aquellos pacientes que sobreviven al trauma medular, tiene una morbilidad alta y están destinados a un cambio total de calidad de vida. Los costos de la atención de estos enfermos aumentan de manera importante tanto para del país como para la familia. A pesar de los esfuerzos realizados a nivel mundial en las últimas tres décadas, no existe ningún tratamiento eficaz que revierta el daño producido. Por este motivo se siguen desarrollando diversas alternativas terapéuticas.

En un estudio previo realizado por el grupo del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, se probó el efecto neuroprotector de la RI en la lesión traumática de la médula espinal iniciando el tratamiento a diferentes tiempos y dosis de radiación. Por lo que en este trabajo se realizó un estudio para caracterizar el efecto neuroprotector de la RI, con base en su efecto anti-oxidante y anti-inflamatorio, en un modelo de lesión traumática de la médula espinal por contusión moderada en ratas.

Hipótesis de trabajo

Si la radiación ionizante administrada a dosis de 2 Gy 2 h después de una lesión traumática de médula espinal en ratas regula el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria, entonces debería observarse una disminución de la respuesta de la lipoperoxidación, de la actividad de la mieloperoxidasa y de la actividad de la sintasa del óxido nítrico inducible al ser evaluados en el tejido nerviosos lesionado en la etapa aguda después del daño.

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la radiación ionizante a dosis bajas sobre la lipoperoxidación, la actividad de la mieloperoxidasa y la sintasa de óxido nítrico inducible en un modelo de lesión traumática de la médula espinal en ratas.

6.2 Objetivos específicos

En un modelo de lesión traumática de la médula espinal en ratas tratadas con RI:

1. Evaluar el efecto anti-oxidante de la RI con base en la cantidad de lipoperoxidación presente en el tejido nervioso lesionado durante la fase aguda después del daño.
2. Evaluar el efecto anti-inflamatorio de la RI, con base en la actividad de la enzima mieloperoxidasa en el epicentro de la lesión.
3. Determinar el efecto anti-inflamatorio de la RI, con base en la actividad de la sintasa de óxido nítrico inducible presente en el tejido nervioso lesionado.

7.1 Consideraciones éticas para el uso de animales en la experimentación

Para la realización del presente proyecto, se siguieron los lineamientos establecidos a nivel internacional y nacional por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio".

7.2 Diseño experimental

Se realizó un estudio experimental, aleatorizado y ciego.

Animales:

Se utilizaron 96 ratas de la cepa Wistar adultas hembras de 200 a 250g de peso, con libre acceso al agua y al alimento (Purina Chow, Purina, México).

Los animales fueron sometidos a laminectomía y a un modelo de lesión traumática de la médula espinal por contusión moderada (control positivo) o bien se les practicó una laminectomía sin lesión (control negativo). Las ratas se dividieron en cuatro grupos experimentales de la siguiente manera:

Grupo 1 Animales con laminectomía, sin LTME y sin radiación ionizante (n=7 a 9).

Grupo 2 Animales con laminectomía, sin LTME y con RI (n=7 a 9), iniciando la radiación dos horas después del procedimiento quirúrgico con una dosis de 2 Gy.

Grupo 3 Animales con laminectomía, con LTME y sin RI (n=7 a 9).

Grupo 4 Animales con laminectomía, con LTME y con RI (n=7 a 9), iniciando la radiación dos horas después de la lesión con una dosis de 2 Gy.

Se realizaron tres ensayos bioquímicos para evaluar el estrés oxidativo (lipoperoxidación) y la respuesta inflamatoria (actividad de la enzima MPO y de la sintasa del óxido nítrico inducible) generada después del daño. Con este fin, se utilizaron un total de 96 ratas divididas en 4 grupos, como se muestra en la figura 5.

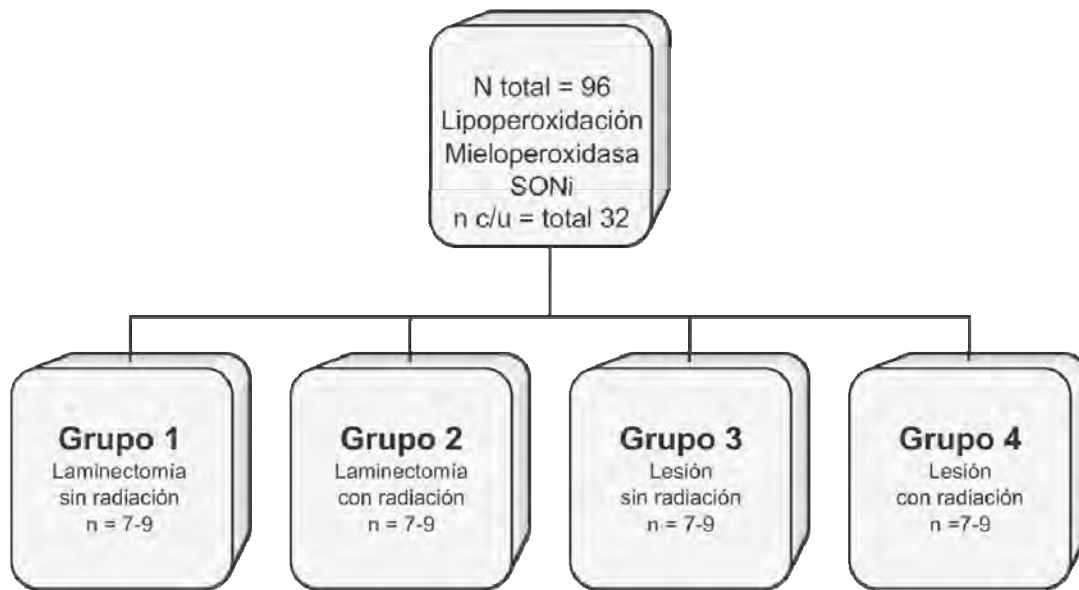


Figura 5. Grupos experimentales con 7 a 9 animales por grupo. Posterior a la obtención de la muestra de tejido medular se les realizó el ensayo correspondiente al tiempo ya establecido.

7.3 Definición de las variables

7.3.1 VARIABLES INDEPENDIENTES

1. Radiocirugía

7.3.2 VARIABLES DEPENDIENTES

1. La cantidad de lipoperoxidación, medida en UF/g de tejido en el sitio de la lesión, evaluada a las 24 h después del procedimiento quirúrgico.
2. La actividad de la mieloperoxidasa, medida en U.I de MPO/mg de proteína / min presente en el sitio de la lesión, evaluada a las 24 h después del procedimiento quirúrgico.
3. La actividad de la sintasa del óxido nítrico inducible, medida en ng de L. citrulina/500 mg de proteína/30 min presente en el sitio de la lesión, evaluada a las 72 h después del procedimiento quirúrgico.

En la tabla 2 se presenta un resumen de las variables consideradas en este trabajo.

Tabla 2. Variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Instrumento	Tipo de variable	Codificación
Tratamiento de radiocirugía	Tratamiento con radiación ionizante impartido en una sola dosis.	Fijación de los animales en un sistema estereotáctico, adquisición de las imágenes tomográficas, realización del plan de tratamiento y aplicación de dosis de 2 Gy en el sitio de la lesión medular 2 h posteriores a la LTME.	Equipo de radiocirugía, acelerador lineal dedicado Novalis de 6 MV	Independiente	Gray (Gy)
Lipoperoxidación (LP)	Técnica de cuantificación de productos finales de la lipoperoxidación Indicador de antioxidación	Los animales sacrificados 2 h después de la LTME, posteriormente se realizó el ensayo bioquímico.	Técnica descrita por Triggs y Willmore, espectrofotómetro de luminiscencia Perkin–Elmer LS50B	Dependiente	Unidades de luminiscencia por gramo de tejido
Mieloperoxidasa (MPO)	Técnica que evalúa la actividad de la enzima de mieloperoxidación. Indicador antiinflamatorio	Los animales sacrificados 2 h después de la LTME, posteriormente se realizó el ensayo bioquímico	Técnica descrita por Barone y Cols.	Dependiente	Unidades internacionales de actividad de la enzima mieloperoxidasa por gramo de tejido por minuto
Sintasa de óxido nítrico inducible (SONi)	Técnica que cuantifica la actividad de la enzima SONi	Los animales sacrificados 2 h después de la LTME , posteriormente se realizó el ensayo bioquímico	Técnica descrita por Bredt y Snyder	Dependiente	ng de L- citrulina/ mg de proteína/ 30 min

Lesión traumática de médula espinal (LTME), gray (Gy), sintasa de oxido nítrico inducible (SONi), lipoperoxidación (LP), mieloperoxidasa (MPO).

7.4 Estadística

7.4.1 TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de la muestra se definió con la fórmula de diferencia de medias para comparaciones de múltiples grupos, la cual utiliza el ajuste de Bonferroni a la expresión para la comparación de dos grupos. La fórmula para calcular el tamaño de la muestra n para probar que existe una diferencia de medias con un nivel de significancia α y una potencia de la prueba $1-\beta$ para m grupos está dada por [Witte y cols. 2000, Rosenberger y Lachin 2002]:

$$n = \left\{ \frac{(z_{\alpha/m} + z_{\beta}) \cdot \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}}{\mu_1 - \mu_2} \right\}^2$$

Para $m=4$, $z_{\alpha/m}$ vale 2.24 para un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0.05$), z_{β} vale 0.84 para una potencia de 80%; μ_1 y μ_2 son las medias de dos grupos con desviaciones estándar σ_1 y σ_2 , respectivamente, de un estudio previo. En este caso se tomaron los valores de SONi publicados por Díaz-Ruiz y cols. [2002] quienes reportaron para el grupo control un valor de 23.3 ± 2.7 ng L-citrulina/mg de proteína/30 min y para el grupo con LTME de 30.5 ± 5.7 ng L-citrulina/mg de proteína/30 min. Con estos valores y sustituyendo en la expresión anterior se obtiene $n= 7.47$, por lo que se seleccionó un número de ratas por grupo de 7 a 9.

7.4.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio de una prueba paramétrica ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Tukey y Dunnett, tomando como valor significativo a $p<0.05$, esto se realizó después de corroborar que los valores mostraron una homogeneidad de varianzas determinada con la prueba de Levene y una distribución normal aplicando la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó el programa de cómputo SPSS versión 17.0.

7.5 Definiciones operacionales

7.5.1 MODELO DE LTME POR CONTUSIÓN MODERADA.

La lesión se realizó con un equipo desarrollado y validado en la New York University, con el que se pudo generar un daño por contusión moderada de la médula espinal en ratas, que es altamente reproducible [Basso y cols. 1996].

7.5.2 TRATAMIENTO CON RADIOCIRUGÍA

La impartición de la dosis por radiación se realizó con un equipo de radiocirugía dedicado Novalis de 6 MV. Las ratas se colocaron en un sistema de fijación estereotáctico para adquirir las imágenes de tomografía computarizada necesarias para realizar el plan de tratamiento. Usando los principios de estereotaxia, se impartió una dosis de 2 Gy en el sitio de la lesión medular 2 h posteriores al daño.

7.5.3 LIPOPEROXIDACIÓN (LP)

Con esta técnica se cuantificaron los productos finales de la LP. Los animales se sacrificaron 24 h después del procedimiento quirúrgico y el tejido nervioso de la médula espinal fue procesado por medio de la técnica descrita por Triggs y Willmore [1984].

7.5.4 ACTIVIDAD DE LA MIELOPEROXIDASA (MPO)

Con este ensayo se evaluó la actividad de la enzima MPO. Las ratas se sacrificaron 24 h después del daño de acuerdo con los reportados por Carlson y cols. [1998], como pico máximo de la actividad de la MPO después de una LTME. La actividad de dicha enzima fue determinada por medio de la técnica descrita por Barone y cols. [1991] y Bradley y cols. [1982]. Los resultados se reportan en unidades internacionales de actividad de la enzima mieloperoxidasa por gramo de tejido por minuto.

7.5.5 ACTIVIDAD DE LA SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO INDUCIBLE (SONI)

Con este ensayo se cuantificó la actividad de la enzima SONi. Los animales fueron sacrificados 72 h después de la lesión, de acuerdo con lo reportado por Diaz-Ruiz y colaboradores [2002] como pico máximo de actividad de la SONi después de una

LTME y la actividad fue evaluada por medio de la técnica descrita por Bredt y Snayder [1990].

7.6 Descripción de técnicas

Las ratas fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Se asignaron de manera aleatoria a uno de los 4 grupos experimentales y finalmente se transportaron al Centro de Investigación "IMSS/Proyecto CAMINA" donde se les realizó la cirugía y la lesión.

7.6.1 MODELO DE LESIÓN POR CONTUSIÓN

Antes de realizar la cirugía las ratas se anestesiaron, con previa asepsia abdominal, con una mezcla de ketamina (77.5 mg/kg de peso) y xilocina (12.5 mg/kg de peso) por vía intraperitoneal. En condiciones de asepsia y antisepsia, se realizó una laminectomía a nivel de T9 exponiendo la médula espinal con la dura madre íntegra (ver figura 6). Las ratas se colocaron en un equipo especializado llamado N.Y. Spinal Cord Impactor con el cual se produjo la lesión por contusión. La lesión se realizó mediante la caída de un cilindro metálico de 10 g de peso de una altura de 25 mm ocasionando una lesión por contusión tipo moderada.

Este modelo experimental de lesión fue desarrollado en la Universidad de Nueva York [Basso DM y cols. 1996]. El equipo cuenta con un programa para analizar la lesión siguiendo diversos parámetros como el grado de compresión del tejido medular, la velocidad, el tiempo y la altura con que impacta el cilindro metálico al tejido nervioso (ver figura 7). Posterior al trauma, los animales fueron suturados y colocados en una cámara de cuidados intensivos para pequeñas especies (Schoer Manufacturing Co., Kansas City. MO) para su recuperación. Se mantuvieron en cajas individuales de acrílico con aserrín estéril y recibieron comida y agua a libre demanda hasta su sacrificio.

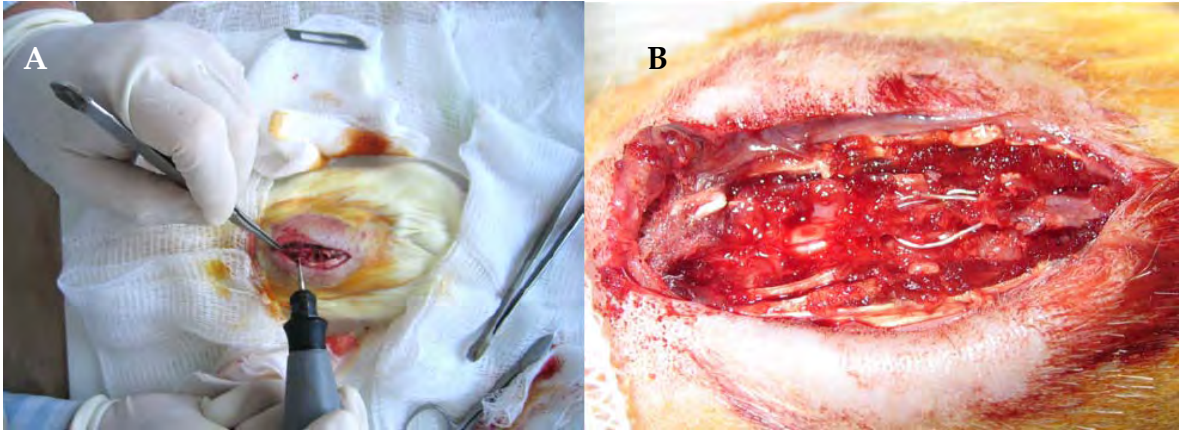


Figura 6. Procedimiento quirúrgico de laminectomía, exponiendo el tejido medular a nivel de T9. Panel A: imagen que ilustra procedimiento de laminectomía. Panel B: imagen donde se observa la médula espinal expuesta.

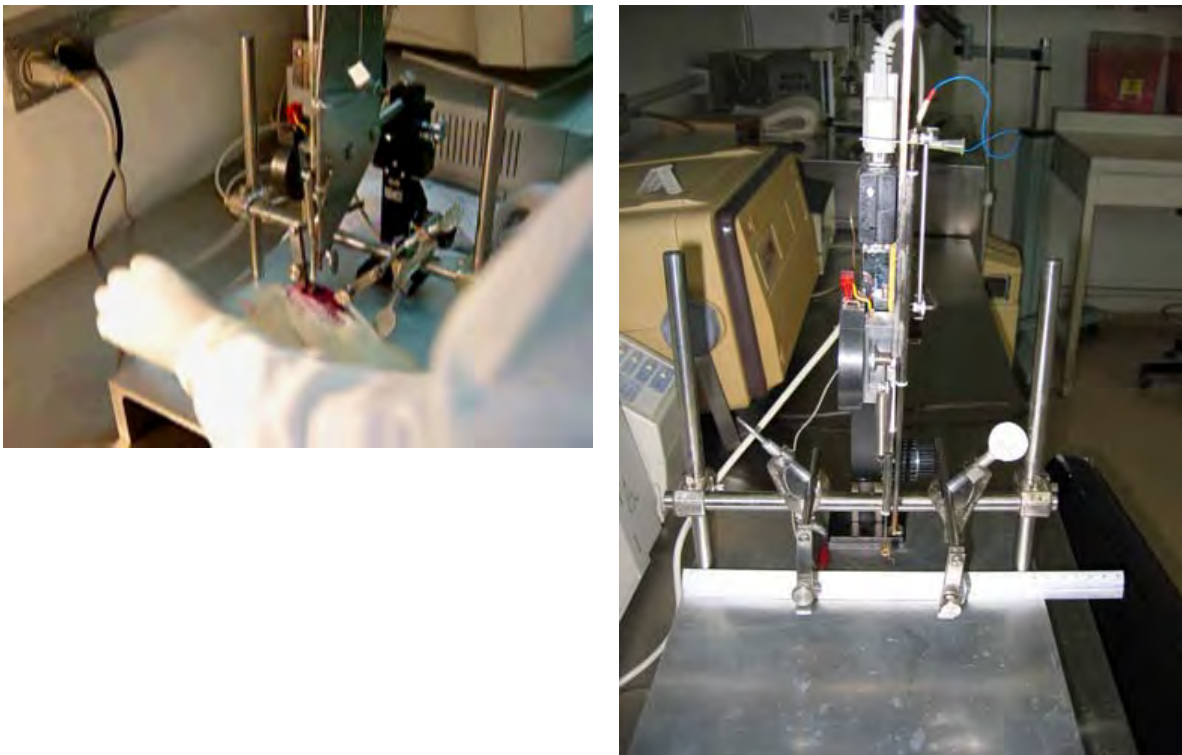


Figura 7. Equipo New Cork Spinal Cord Impactor con el que se realizó la contusión medular.

7.6.2 RADIOCIRUGÍA

Las ratas se fijaron en posición decúbito ventral y de forma independiente en un sistema estereotáctico de fijación, diseñado y validado por Galván y cols. [2010], (ver figura 8). Con el estudio de tomografía se obtuvieron imágenes de cortes axiales y sagitales de 1 mm de grosor que sirvieron para la definición del sitio de la lesión. El estudio se realizó con un tomógrafo helicoidal multicorte (CT/i Hispeed general Electric Inc.) que se muestra en la figura 9. Las imágenes fueron transferidas al sistema de planeación (figura 10) de la Unidad Novalis de la Unidad de radioneurocirugía del INNyN. Con base a las imágenes tomográficas se diseñó el plan de tratamiento y la impartición de la dosis se realizó con el acelerador lineal, Novalis dedicado de 6 MV, Brain Lab, Inc. Una fotografía del acelerador se incluye en la figura 11.

Se diseñó un protocolo radioquirúrgico conformado por una dosis única de 2 Gy/min manteniendo una distancia de 100 cm entre el colimador secundario y la piel del roedor y con un campo de radiación de 25 mm de largo y 20 mm de ancho (medidas que sirvieron para definir el blanco). El animal se colocó con el sistema estereotáctico de fijación sobre la mesa de tratamiento del sistema Novalis para impartir la dosis previamente descrita.

Una vez finalizando el procedimiento de radiocirugía las ratas se colocaron nuevamente en la unidad de cuidados intensivos para su recuperación y regresaron posteriormente a su caja de acrílico individual para continuar con los cuidados postratamiento y el ensayo correspondiente.

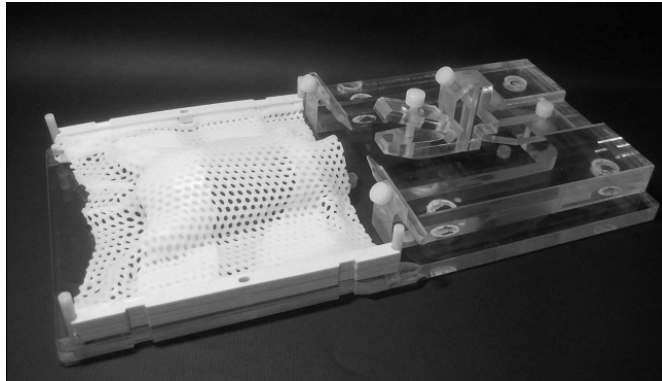


Figura 8. Sistema estereotáctico de fijación de ratas, para poder realizar el tratamiento de radiación ionizante.



Figura 9. Fotografía de una rata colocada en el sistema de fijación estereotáctica en el momento en que se le realiza la tomografía computarizada con una caja de localización para la planeación del tratamiento. Equipo tomógrafo es helicoidal multicorte (CT/i Hispeed General Electric Inc.)

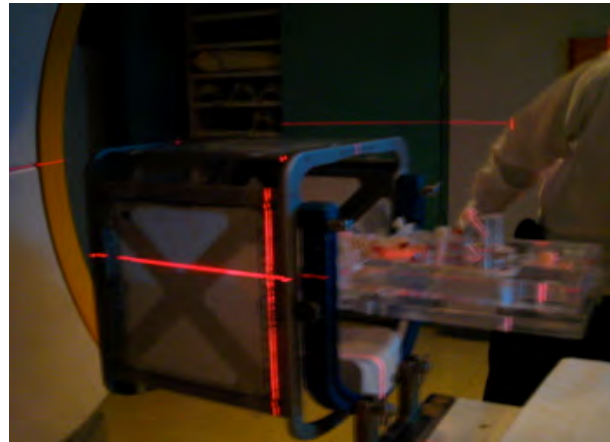
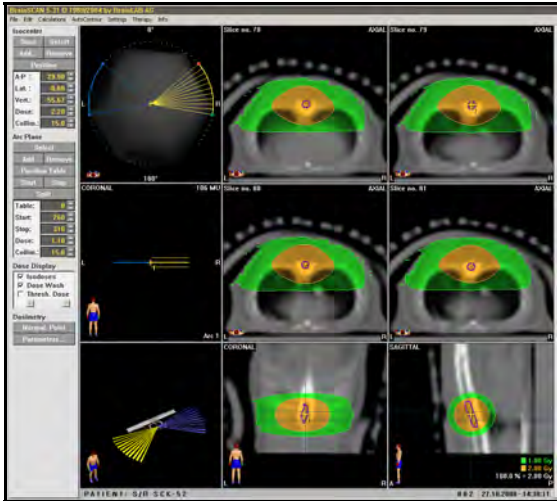


Figura 10. A la izquierda se muestra la planeación del tratamiento con radiación ionizante, con una distribución de dosis de 2 Gy al isocentro. A la derecha se observa a una rata en el momento de la colocación sobre la mesa de tratamiento para recibir la radiación ionizante.



Figura 11. Acelerador lineal, Novalis dedicado de 6 MV (Brain Lab, Inc.)

7.6.3 ENSAYO DE LIPOPEROXIDACIÓN

Se utilizaron 32 animales, ocho por cada grupo experimental. Se determinó la cantidad de productos finales de la lipoperoxidación por medio de la técnica descrita por Triggs y Willmore [1984]. Los animales fueron sacrificados 24 h después de la lesión, de acuerdo con lo reportados por Diaz-Ruiz y cols. [1999], como pico máximo de LP.

Técnica: Las ratas se sacrificaron y se obtuvo un segmento de tejido medular de aproximadamente 1 cm de longitud. El tejido se pesó y se homogenizó en 3 ml de solución salina (0.9% NaCl). Se tomó una alícuota de 1 ml y se le incorporaron 4 ml de una mezcla de cloroformo y metanol (2:1 v/v), dejándolo reposar durante 30 min en hielo para permitir la separación de la fase clorofórmica. La muestra se leyó con un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS50B, a una longitud de onda 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. La sensibilidad del espectrofotómetro se ajustó a 330 unidades de fluorescencia con una solución estándar de quinina (0.1 µg/ml); los resultados fueron expresados en unidades de fluorescencia por gramo de tejido.

7.6.4 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA MIELOPEROXIDASA

Se formaron 4 grupos de 7-9 ratas las cuales se sacrificaron 24 h después de la lesión, tiempo descrito como pico máximo de la actividad de la mieloperoxidasa después de una lesión traumática medular, de acuerdo con lo reportado por Carlson y cols. [1998].

Técnica: Veinticuatro horas después de la LTME, se anestesiaron a las ratas con pentobarbital sódico y perfundidas por vía intracardiaca con 200 ml de solución salina isotónica a 25°C a una presión de 100 mmHg. Posteriormente, se les retiró el segmento de la médula espinal lesionada y se congeló a -80°C para su posterior análisis [Barone FC y cols., 1991]. Las muestras de tejido fueron descongeladas sobre hielo y pesadas para determinar la cantidad de tejido en gramos. Cada segmento fue homogeneizado en 4 ml de Tris-HCl a una concentración de 50 mM con un pH de 7.4 a una temperatura de 4°C. Se tomó una alícuota de 1 ml (25%) para realizar la técnica de actividad de la MPO. Se agregaron 20 ml de búfer de fosfatos (5 mM) a la muestra (1 ml) y ésta fue homogeneizada y centrifugada a 30,000 g durante 30 min a 4°C y el sobrenadante fue desechado. Después de

decantar el sobrenadante, la pastilla fue extraída por suspensión en una solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0.5% (HTAB: sigma) en búfer de fosfatos 50 mM (pH 6.0, 25°C) por 2 min.

Del tejido original se tomó una cuarta parte y la cantidad de búfer que se agregó fue en una relación de 1:10 [Bradley y cols., 1982]. Las muestras fueron congeladas en hielo seco inmediatamente después y se realizaron tres ciclos de congelamiento y descongelamiento sonicando durante 10 s a 25°C entre cada ciclo. Después de la última sonicación, las muestras fueron incubadas a 4°C durante 20 min y centrifugadas a 12,500 g durante 15 min a 4°C [Barone y cols. 1991]. Se tomó una alícuota de 0.1 ml del sobrenadante y se adicionó 29 ml de una solución de dihidroclorhidrato de *o*-dianisidina y H₂O₂ al 0.0005% en búfer de fosfatos (50 mM, pH 6). Los cambios en la absorbancia a 460 nm fueron medidos en intervalos de 15 s durante 2 min en un espectrofotómetro. La actividad de MPO fue calculada como la cantidad de MPO requerida para metabolizar 1 mol de H₂O₂/min a 25°C. La actividad de MPO se expresó en U/g de peso húmedo de tejido.

7.6.5 ENSAYO ACTIVIDAD DE LA SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO INDUCIBLE

Se formaron los mismos grupos que en el ensayo anterior y los animales fueron sacrificados a las 72 h de acuerdo con lo reportado Díaz-Ruiz y colaboradores [2002], como el pico máximo de la actividad para la SONi después de una lesión. Posteriormente, el tejido lesionado fue procesado para su análisis por medio de la técnica descrita por Bredt y Snyder [1990].

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

pureza 99%, PPO (MERCK-México S.A.) pureza 99%, POPOP (MERCK-México S.A.) pureza 99%, Metanol (J.T. Baker S.A. de C.V. México) pureza 99%, propilenglycol (J.T. Baker S.A. de C.V. México) pureza 99.9%.

Todas las ratas se sacrificaron por decapitación a las 72 h (de acuerdo a lo descrito previamente en el diseño experimental) después de la LTME o laminectomía y se obtuvo una muestra de tejido de aproximadamente 1 cm del sitio de lesión. La muestra se homogeneizó en una solución buffer (50 mM Tris-HCL, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM FGTA y 0.1% de mercaptoetanol; pH 7.5), conteniendo un inhibidor de proteasas (2 μ M/ml de aprotinin, 100 μ M de leupeptin, 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoride, 10 μ g/ml de inhibidor de tripsina) y 0.1% NP-40. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido hasta ser utilizadas.

Para llevar a cabo la determinación de la actividad de la sintasa del óxido nítrico fue necesario realizar un ensayo previo de cuantificación proteínica por medio de la técnica de Bradford [1976] con el objetivo de establecer la concentración de 500 μ g de proteína requerida para este estudio. Las muestras se descongelaron y rehomogeneizaron; se tomó una alícuota de 500 μ g, y se adicionó una mezcla con 10 μ M L-arginina, 2.5 mM CaCl₂, 10 μ M calmodulina, 30 μ M de tetrahidrobiopeptin, 1 mM NADPH, 0.2 μ Ci [³H] L-arginina. El volumen se ajustó a 200 μ l con solución homogeneizadora, se incubaron a 37°C durante 30 min para activar la reacción.

Finalmente, las muestras fueron transferidas a hielo y se les adicionó una solución fría de (20 mM HEPES, 2 mM EDTA, 2mM EGTA; a pH 5.5), solución de terminación de la reacción (solución-stop). Los volúmenes totales de las muestras fueron pasados por columnas con 1 ml de resina de intercambio catiónico (Dowes-50W-X8), equilibradas con solución-stop. Los tubos prueba fueron lavados con 1 ml de agua destilada y la solución fue colectada dentro de viales con 5 ml de líquido de centelleo. La citrulina marcada con tritio (³H₂O) fue evaluada en un contador de centelleo Beckman LS6500. Mediante ésta técnica se evaluó la [³H] L-citrulina, que es el producto final de la actividad enzimática de SONi con la L-arginina (ver figura 12).

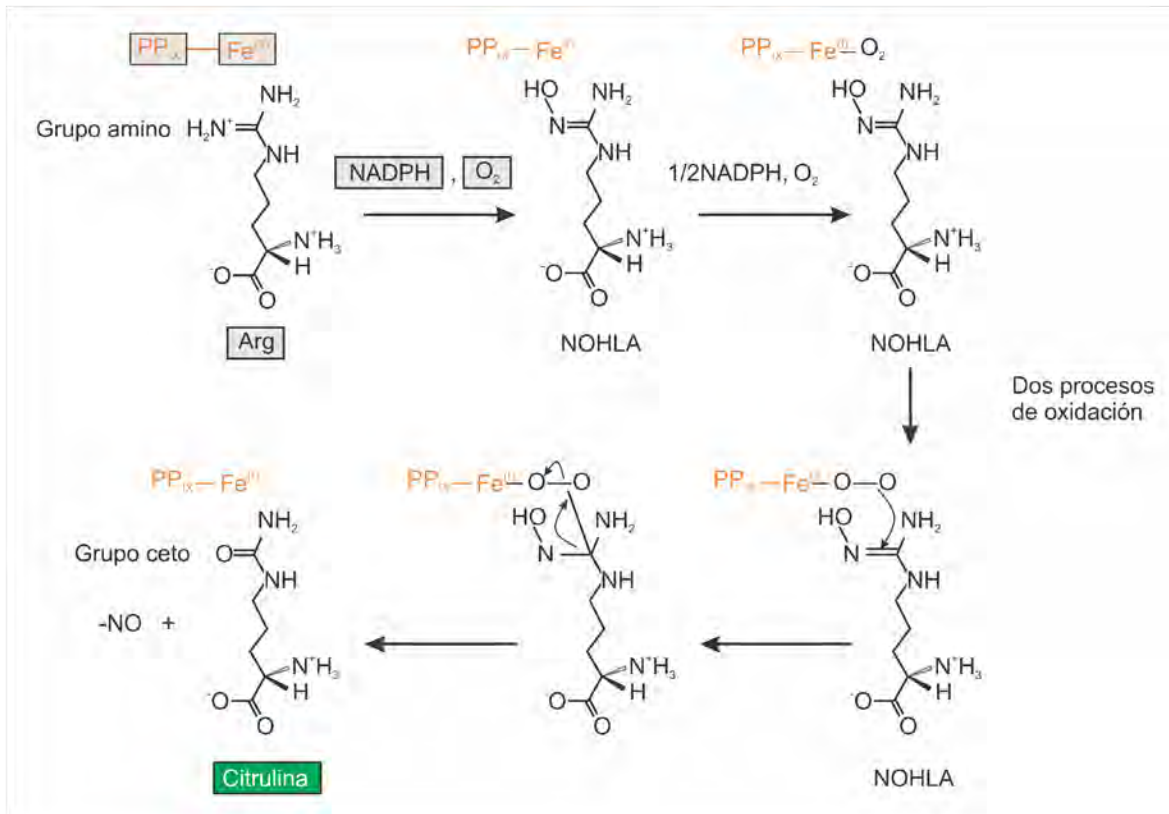


Figura 12. Proceso de doble oxidación de la L- arginina, obteniendo como resultado final la [^3H] L- citrulina.

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

7.6.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

La cantidad de proteína presente en cada muestra se analizó con la técnica de Bradford [Bradford MM, 1976].

7.7 Consideraciones financieras

Los gastos del estudio fueron cubiertos con recursos del Departamento de Neuroquímica y por la Unidad de Radioneurocirugía del Instituto Nacional de Neurología y Neurología "Manuel Velasco Suárez".

7.8 Lugar donde se realizó la investigación

- Unidad de Radioneurocirugía, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”
- Departamento de Neuroquímica, Edificio de Investigación, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”
- Centro de Investigación “IMSS/Proyecto CAMINA”

8.1 Resultados del ensayo de la lipoperoxidación

Los resultados para el grupo con laminectomía muestran un valor basal de lipoperoxidación de 104.57 ± 4.96 unidades de fluorescencia por gramo de tejido mientras que para el grupo con lesión fue de 145.45 ± 9.54 UF/g. Los animales sin lesión que recibieron radiación ionizante muestran un nivel de 30.2% mayor en la lipoperoxidación comparado con el grupo sin lesión y sin radiación, mientras que el grupo con lesión traumática y con tratamiento de radiación ionizante mostró un valor promedio de 135.56 ± 7.38 UF/g. Estos resultados se muestran gráficamente en la figura 13. Como se puede observar, el tratamiento con radiación ionizante incrementa los valores de lipoperoxidación en los animales sin lesión y con lesión, así como la lesión traumática aumenta los valores de lipoperoxidación. Pero la combinación de lesión más el tratamiento con radiación no suma ni potencia el efecto, lo que nos sugiere un posible mecanismo de activación de enzimas antioxidantes que pueden estar atenuando al estrés oxidativo.

En la figura 14 se muestra un box-plot de los resultados de la medición de la lipoperoxidación de los cuatro grupos de ratas. La línea media del box-plot representa la mediana, los cuartiles reflejan en el tamaño de la caja y los símbolos cuadrados sólidos los valores promedio. Los símbolos de cruces arriba y abajo del box-plot corresponden a los valores máximo y mínimo respectivamente. De esta figura se aprecia que el grupo con laminectomía es el valor promedio y mediana de lipoperoxidación menor. También se puede visualizar gráficamente que el grupo de LMTE+Rad tiene lipoperoxidación promedio y sobre todo, mediana por debajo del grupo solamente con LMTE.

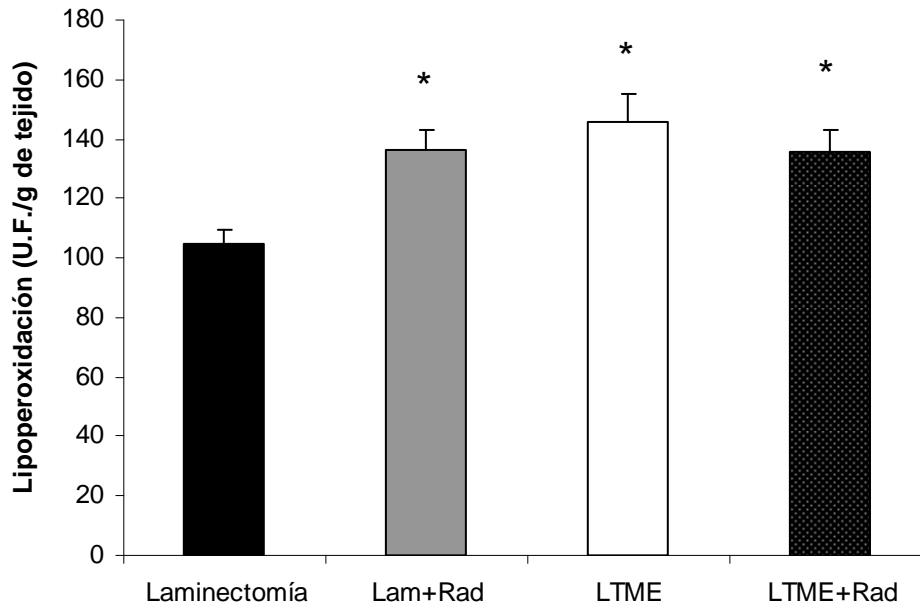


Figura 13. Valores promedio \pm error estándar de la lipoperoxidación de 6 a 11 animales por grupo. Lam+Rad: laminectomía más radiación ionizante, LTME: lesión traumática de médula espinal sin radiación y LTME+Rad: lesión traumática de la médula espinal más radiación ionizante en dosis única de 2 Gy. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$.

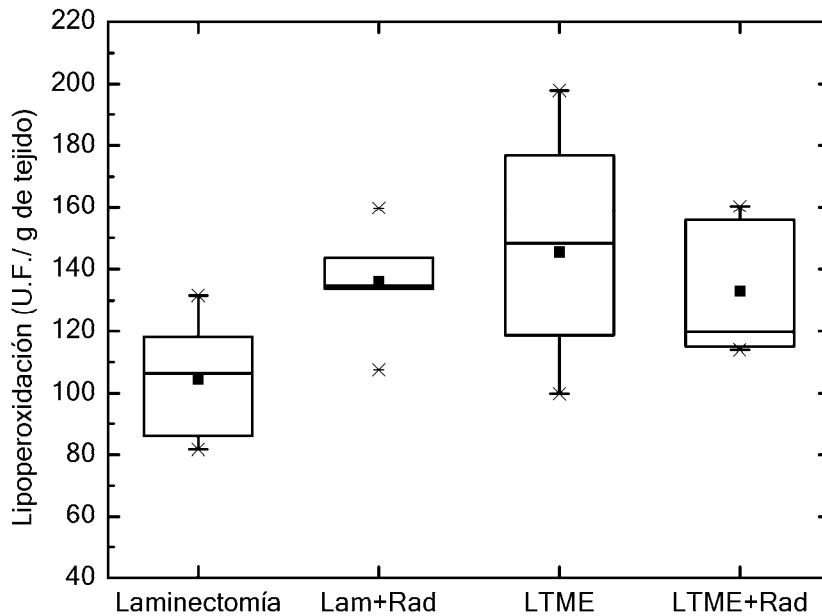


Figura 14. Box-plot de la lipoperoxidación para cada grupo.

8.2 *Resultados del ensayo de la mieloperoxidasa*

Los resultados de la actividad de la mieloperoxidasa se muestran en la figura 15. La mieloperoxidasa fue evaluada a las 24 horas después del procedimiento quirúrgico o de la lesión en animales que recibieron o no radiación ionizante en dosis única de 2 Gy dos horas después del daño o de la laminectomía. Los resultados están expresados en unidades por miligramo de proteína por minuto y son el valor promedio \pm error estándar de 7 a 9 animales por grupo. Como se puede observar, existe un valor promedio de actividad basal de 0.1124 ± 0.033 en el grupo con laminectomía sin tratamiento; en los animales con laminectomía y con radiación el valor fue de 0.3386 ± 0.116 y en el grupo de lesión sin radiación pudimos observar un incremento de dicha actividad por efecto del daño (1.0946 ± 0.102) que al ser comparado con el grupo de laminectomía fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Asimismo, la actividad de la mieloperoxidasa del grupo con lesión y con radiación mostró un incremento del 52% (1.082 ± 0.171) con respecto al valor del grupo con laminectomía y sin radiación. Cabe mencionar que este incremento fue menor que el observado en el grupo lesionado sin tratamiento.

En la figura 16 se muestran los mismos resultados de la medición de la mieloperoxidasa resumidos gráficamente en un box-plot. Se puede observar que las medianas de los grupos con solo laminectomía menores que las ratas con LTME. Se puede ver también que los grupos de ratas con LTME y LTME+ radiación presentaron valores promedio y distribuciones similares.

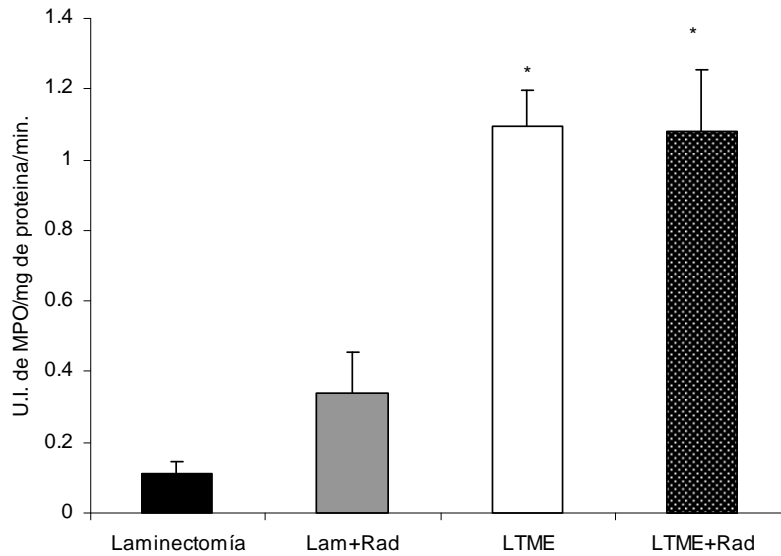


Figura 15. Gráfica en la que se muestran los resultados obtenidos de la actividad de la mieloperoxidasa y que son los valores promedio \pm error estándar de 7 a 9 animales por grupo. Lam+Rad: laminectomía más radiación ionizante, LTME: lesión traumática de médula espinal sin radiación y LTME+Rad: lesión traumática de la médula espinal más radiación ionizante en dosis única de 2 Gy. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$.

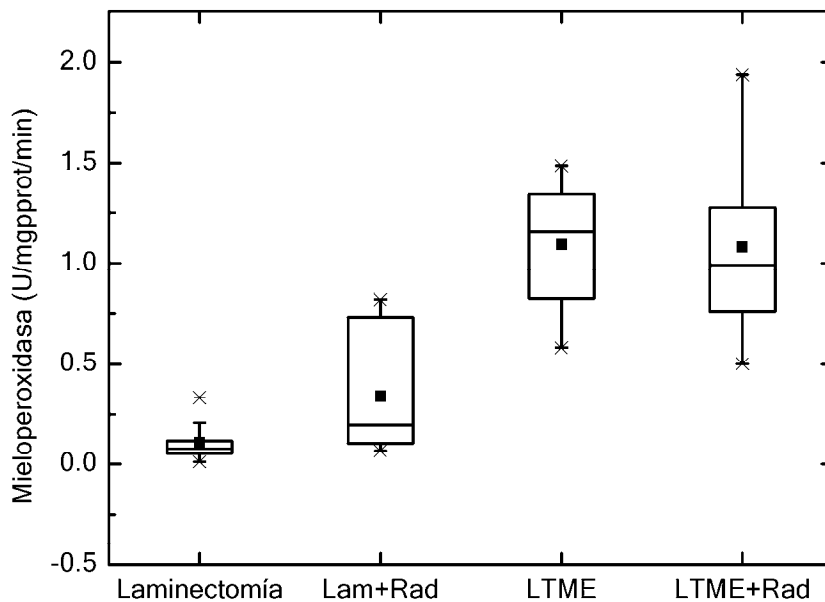


Figura 16. Box-plot de la medición de la mieloperoxidasa en los cuatro grupos de ratas.

8.3 Resultados del ensayo de la actividad de la sintasa de óxido nítrico inducible

En la figura 17 se observan los resultados de la determinación de la actividad de la SONi evaluada 72 horas después del procedimiento quirúrgico o de la lesión en animales que recibieron o no radiación ionizante en dosis única de 2 Gy dos horas después del daño o de la laminectomía. Los resultados están expresados en nanomoles de L-citrulina por 500 microgramos de proteína por minuto del grupo con laminectomía y sin radiación. Es importante mencionar que corresponden al valor promedio \pm error estándar de 7 a 9 animales por grupo. Como se puede apreciar, existe un valor basal de la actividad de 0.145 ± 0.033 en el grupo con laminectomía sin tratamiento similar a la observada en los animales con laminectomía y con radiación (0.146 ± 0.032). Con respecto al grupo de lesión sin radiación se observó un incremento de dicha actividad por efecto del daño (0.27 ± 0.06) que al ser comparado con los grupos de laminectomía con y sin radiación fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Asimismo, la actividad de la SONi en el grupo con lesión y con radiación mostró un incremento del 48.7% (0.22 ± 0.03) con respecto al valor este incremento fue menor que el observado en el grupo lesionado sin tratamiento.

Estos resultados también se muestran gráficamente en el box-plot de la figura 18. Los grupos de laminectomía y laminectomía con radiación muestran esencialmente la misma distribución de la actividad de la SONi. El valor promedio del grupo con LTME+radiación es ligeramente inferior que el de LTME sin radiación, los valores para el LTME sin radiación están más dispersos entorno a la mediana que el grupo de LTME+radiación, aunque ambos presentan un valor de la mediana similar.

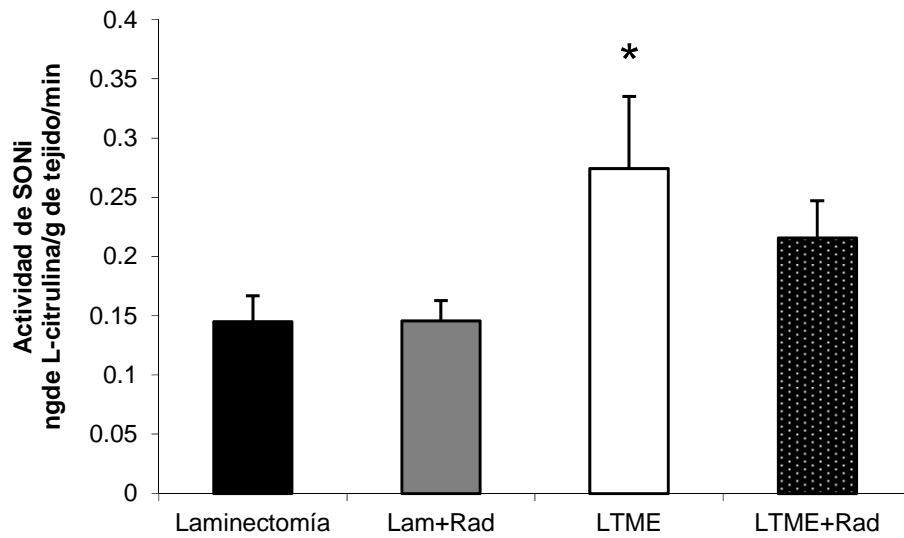


Figura 17. Gráfica en la que se muestran los valores obtenidos de la actividad de la SONi y son los valores promedio \pm error estándar de 7 a 9 animales por grupo. Lam+Rad: laminectomía más radiación ionizante, LTME: lesión traumática de médula espinal sin radiación y LTME+Rad: lesión traumática de la médula espinal más radiación ionizante en dosis única de 2 Gy. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. * $p < 0.05$.

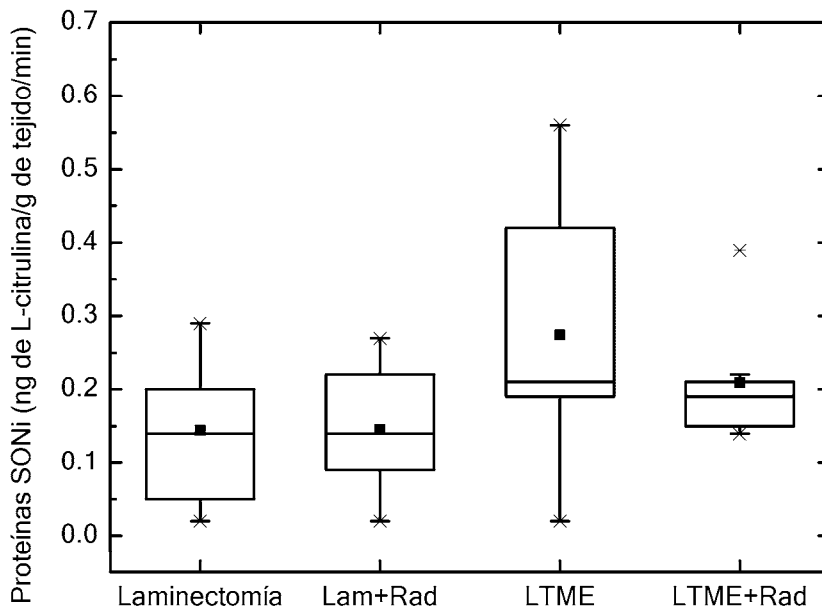


Figura 18. Box-plot para los niveles de la sintasa de óxido nítrico inducible de los cuatro grupos de ratas.

Los resultados demostraron que existe un incremento de la LP en los animales lesionados que no recibieron tratamiento, alcanzando niveles semejantes a los reportados en un modelo de LTME en ratas por Díaz-Ruiz y colaboradores [1999 y 2000]. Asimismo, pudimos observar un incremento en la LP en el tejido no dañado y tratado con RI, lo que demuestra que dicho tratamiento favorece la producción de radicales libres en el tejido sano. Estos hallazgos concuerdan con los reportes de Bucci y cols. [2006] quienes refieren que la RI induce estrés oxidativo y promueve la generación de especies reactivas de oxígeno. En ese estudio los autores sometieron una línea celular de astrocitoma a RI, observando que la exposición a una dosis fraccionada induce apoptosis y la liberación de especies reactivas de oxígeno. Además, Kyung y cols. [2007] observaron que la RI a dosis de 2.5 Gy induce la formación de microtúbulos nucleares mediados por especies reactivas de oxígeno producidos en la mitocondria, por lo que con estos estudios se confirma que la RI es capaz de promover la generación de especies reactivas de oxígeno sin la existencia de un daño previo. También pudimos observar que en los animales con lesión medular tratados con RI, los valores de LP no se incrementan más allá de los observados por el grupo lesionado sin tratamiento o solamente radiado, mostrando una disminución de la LP en comparación con el grupo lesionado. Es decir, no existe una potenciación o suma de efectos, tal vez debido a que se activan diversos mecanismos antioxidantes como el incremento en la actividad de la SOD, la catalasa y la glutatión peroxidasa, como lo describieron Avti y cols. [2005] en ratones expuestos a dosis bajas de RI en tejido hepático y pulmonar.

Esos reportes son semejantes a lo descrito por Todorovic y cols. [2006], quienes expusieron a dosis de 3 Gy durante 4 días el tejido nervioso de distintas regiones del cerebro, observando que la actividad de la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) se eleva en la corteza cerebral a los 60 min y a las 24 h de haber recibido la RI, mientras que a nivel del hipocampo disminuye la actividad de

la MnSOD a la hora después de la exposición. En ese trabajo, se observó que a nivel del hipocampo a las 24 h de la RI, la actividad de la MnSOD regresó a niveles semejantes a los controles; la actividad de la catalasa permaneció estable 1 y 24 h después de la RI, lo que demuestra que la RI tiene efecto sobre la regulación de la actividad de dichas enzimas. Los autores describen que esta respuesta en las distintas regiones del cerebro está dada por varios factores como: la variabilidad de los genes afectados, la habilidad y respuesta al daño y los niveles de tolerancia del DNA resultantes del daño. Sin embargo, el mecanismo específico no se conoce aún. Por otro lado, desde 1994 fue reportado este mismo efecto por Marklund y cols. [1994] quienes describen la presencia de la SOD como una enzima protectora contra la RI. En ese estudio se utilizó un esquema de administración menor a 5 Gy para radiar 7 líneas celulares de distintos tejidos, los resultados demostraron un incremento de la actividad de la enzima en todas las líneas celulares. Esto mismo podría estar sucediendo en el tejido nervioso tanto sano como lesionado de la médula espinal, ya que como se mencionó previamente, a pesar de que se observa un incremento de la LP en el grupo con laminectomía y en el grupo lesionado con radiación, los valores promedio no son diferentes estadísticamente.

Por otra parte, se ha reportado que la RI regula la expresión de la metalotioneína (MT) que es una proteína con capacidad para atrapar el radical hidroxilo, un radical libre altamente reactivo [West Adrian K. 2008]. Cai L y cols. [2000] reportan el efecto neuroprotector de la MT ante la RI; estudiaron este efecto en cultivos de células del sistema nervioso central expuestos a dosis de 30 y 60 Gy. Los resultados mostraron un aumento de la proteína de la MT a las 12 h posteriores a la exposición de RI con una dosis de 30 Gy mientras que con 60 Gy no hubo significancia. Los niveles de MT II mRNA se incrementaron a las 3 y 6 h después de una dosis de 30 Gy, con su máxima expresión a los 12-24 h. La MT III mRNA no se vio afectada con ninguna de las dos dosis. Los autores utilizaron el marcador de lactato deshidrogenasa (LDH) para medir citotoxicidad, resultando que este marcador se incrementó con una dosis de 60 Gy, efecto no observado con la dosis de 30 Gy. Cuando a las células se les administró Cd o Zn se observó una reducción significativa del LDH, lo que demuestra que la inducción de la MT por efecto de los metales tiene un efecto neuroprotector después de un tratamiento con RI, aun cuando ésta se administre en altas dosis.

Recientemente el grupo del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía encabezado por de Arellano- Ruiz y colaboradores demostró que la administración de la MT-II de manera exógena tiene efecto neuroprotector después de una LTME en ratas [Arellano-Ruiz Susana y cols., 2012]. Esto podría ser una evidencia de los posibles mecanismos anti-oxidantes de la RI. A pesar de estos resultados no es muy claro el efecto de la RI sobre la regulación de actividad de dichas enzimas ya que recientemente Caceresa y cols. [2010] reportan que las dosis de 5 Gy depositadas en el hipocampo no promueven cambios en la actividad de la catalasa y la SOD. Además, no existen reportes en la literatura sobre los mecanismos de la regulación de la actividad después de una lesión. Se requieren nuevos estudios que proporcionen información al respecto.

Por otra parte, en este trabajo se evaluó la actividad de la enzima mieloperoxidasa como marcador de inflamación. Los resultados demostraron un incremento de la actividad en el grupo tratado con RI, semejante a lo observado en el grupo lesionado no tratado. El incremento en la actividad de dicha enzima fue reportado por Díaz-Ruiz y cols. [2011] en un modelo de isquemia y reperfusión como en la LTME en ratas. En ese estudio los autores reportaron un incremento en la actividad 24 h después de la isquemia y el trauma. Asimismo, Toklu y cols., [2009] realizaron un estudio en ratas tratadas con RI en la corteza de la *punica granatum* con dosis únicas generalizadas de 8 Gy. Los autores de ese trabajo evaluaron los niveles séricos y el íleo de las ratas a los 10 días post RI, observando que la radiación causó una disminución del glutatión y la capacidad antioxidante, acompañada de un aumento en la actividad de la mieloperoxidasa y en los niveles de malondialdehído. De igual forma, Demirel y cols. [2011] demostraron que la RI favorece el incremento de la actividad de MPO en el intestino de ratas. Con base en estos reportes podemos decir que el tratamiento con RI aumenta la actividad de la mieloperoxidasa. Sin embargo, en este estudio no se observó dicho efecto en el tejido sano de la médula espinal, ni en el tejido lesionado. Los resultados obtenidos en ambos grupos con lesión muestran valores promedio semejantes y tomando en consideración estos hallazgos, sería pertinente realizar un estudio curso temporal para caracterizar dicho fenómeno. De acuerdo con lo reportado por Carlson y cols. [1998] los neutrófilos y macrófagos que expresan MPO y que inician la fagocitosis de los detritus son eventos que se observan también en etapas tardías en el trauma.

Finalmente, se estudió el efecto de la RI sobre la actividad del óxido nítrico, de manera específica la isomorfa SONi como marcador antiinflamatorio. El óxido nítrico es generado a partir de la L-arginina por dos diferentes sintetas del óxido nítrico constitutivas: La SON de células endoteliales (SONe) y la neuronal (SON) cuya actividad es estimulada por la presencia de concentraciones de calcio intracelular. La isoforma inducible independiente de calcio (SONi), se expresa después de señales de estrés. Se ha reportado que el óxido nítrico tiene efectos de neuroprotección mediante los mecanismos siguientes: 1) inhibiendo al superóxido y al peroxinitrito (los cuáles inducen a la lipoperoxidación), 2) regulando la actividad de la ciclooxigenasa, lipooxigenasa y al citocromo P₄₅₀, 3) regulando de manera indirecta la señalización asociada con la lipoperoxidación, y 4) como antiapoptótico por la unión directa con residuos de algunas cisternas contenidas en las caspasas proapoptóticas inhibiendo su acción, como lo reportó [Gisone y cols. 2004].

En este estudio se vio que la terapia con RI no incrementa la actividad de la SONi en el tejido de la médula espinal sin lesión en comparación con el grupo control (lamiectomía sin RI). Esta observación sugiere que en el tejido sano la RI no activa mecanismos de inflamación asociados a la expresión y activación de la SONi. Estos resultados están en acuerdo con lo reportado por Schae D. y cols. [2005], quienes en su modelo de inflamación en ratones irradiados a dosis bajas, proponen que la RI modula a las células inflamatorias y atenúa la expresión de la SONi. En el presente trabajo también se observó en los animales con LTME un incremento de la actividad de la SONi de forma semejante a lo reportado por Díaz-Ruiz y cols., [2002] y por Yang JY y cols. [2007] quienes describieron que la SONi aumenta después de una LTME en ratas, mientras que en los animales lesionado y tratados el tratamiento disminuye la actividad de la SONi en 21.6% comparado con el grupo lesionado sin tratamiento, sin alcanzar una significancia estadística. McKinney y cols., [2000] demostraron que la RI a dosis bajas (1-5 Gy) no incrementa la actividad de la SONi. Esta actividad se puede inducir por la presencia del interferón gamma y/o liposacáridos aunado a la RI en líneas celulares de macrófagos de ratones. Por lo que se puede concluir que el efecto neuroprotector de la radiación ionizante no está asociado con la participación de la SONi ya que observamos una tendencia de la disminución de la actividad de la SONi en los animales lesionados y tratados con RI que no fue estadísticamente

significativa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Abramson y cols. [2001] quienes usaron un modelo de granulomatosis en ratones, utilizando un esquema de radiación de 2 Gy administrados durante 2 días (fase aguda de la inflamación) y 6 días (fase crónica). Otro esquema utilizado consistió en impartir RI durante 5 días a una dosis de 0.5 Gy y se realizaron las evaluaciones bioquímicas en el día 7 después de la inducción del granuloma. Los resultados demostraron una disminución, tanto en la expresión como en la presencia, de la SONi en el tejido del granuloma durante la fase aguda de la inflamación. Pero en contraste, la expresión de la HO-1 se incrementó en todos los grupos irradiados [Hildebrandt y cols. 1998, Schaeue y cols. 2005]. Schaeue y cols. [2005] propusieron que la disminución de la expresión de la SONi seguida de la RI a dosis bajas sea mediada posiblemente por la falta de TNF- α y de IL- β o a consecuencia del incremento en el TGF β -1, el cual se sabe que altera la vía de la SONi a distintos niveles incluyendo su transcripción, la estabilidad del mRNA, la traducción, la estabilización proteica y la activación enzimática. Estos resultados indican que la RI no participa en la regulación de la actividad de la SONi durante la etapa aguda de la LTME, tomando en cuenta estos resultados se comprueba nuevamente que el posible efecto neuroprotector de la RI este dado por la activación de mecanismos antioxidantes ya que, se sabe de la HO-1 favorece la neuroprotección después de una LTME [Diaz-Ruiz y cols., 2013] muy probablemente por efecto de la biliverdina y la bilirrubina (producidas durante la degradación del grupo hemo) que son moléculas anti-oxidantes. El análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio indica que es necesario seguir explorando otros marcadores y blancos terapéuticos en los que incide la RI, ya que estos pueden ser en eventos más tardíos del daño. En el trabajo de Dilmanian y cols. [2007] irradiaron transaxialmente la médula espinal de ratas, con un haz único microplanar con 270 micras de espesor con 750 Gy, para calcular la distribución de la dosis en el tejido. Los resultados mostraron una pérdida de oligodendrocitos, astrocitos y de la mielina en 2 semanas, pero a los 3 meses se observó una repoblación y remielinización de la mayoría del tejido. Con base en estos hallazgos los autores concluyen que es muy probable que se estén activando procesos de reparación que podrían haber tenido efectos benéficos que están dirigidos a la reparación del tejido, muy probablemente a través de la liberación de factores de crecimiento, citocinas anti-inflamatorias con la iniciación de cascadas de señalización celular promoviendo la angiogénesis para reemplazar los vasos sanguíneos y capilares

dañados, iniciando la proliferación, la migración, y diferenciación de células gliales. Basados en esta información, es muy probable que el efecto neuroprotector y promotor de la recuperación funcional que hemos observado en los animales que recibieron radiación ionizante, sean por mecanismos similares dirigidos de manera más tardía a la reparación y regeneración.

Los resultados de este estudio indican que la RI disminuye la LP generada por el daño de manera parcial, refleja una tendencia importante de la regulación de la actividad de la SONi y es incapaz de generar cambios en la actividad de la MPO después de una LTME en ratas. Por esta razón resulta importante caracterizar cuáles son las moléculas blanco neuroprotectoras de la RI después del trauma ya que de acuerdo con estudios previos realizados por el grupo del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía encabezado por González y Díaz Ruiz [2008], se demostró que la RI promueve la mejoría funcional y la preservación del tejido nervioso en el epicentro de la lesión. Este trabajo propone un acercamiento al estudio bioquímico y molecular para tratar de explicar esa mejoría motora que se observó previamente.

9.1 Sesgos y limitaciones del estudio

Este trabajo es un estudio que se trató de hacer lo más controlado posible en sus instrumentos de medición y de tratamiento. En cuanto a las especies animales, los animales fueron proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional Neurología y Neurocirugía. Las ratas Wistar se encuentran bajo un control permanentemente y estricto de crecimiento, peso, sanidad y alimentación en el bioterio; esta especie animal es la más utilizada para la investigación básica del Instituto. Las ratas Wistar que se utilizaron se mantuvieron en un lugar especial dentro del laboratorio de Neuroquímica, donde se llevó a cabo todo el cuidado y seguimiento de las ratas hasta el término de los ensayos. En este lugar siempre estuvieron a una temperatura controlada.

El día de la realización del procedimiento quirúrgico, las ratas fueron pesadas siempre con la misma báscula. Se les administró una cantidad del anestésico (con una fórmula previamente probada) calculada dependiendo del peso de cada rata. La cirugía se llevó a cabo únicamente por tres personas altamente capacitadas en el

procedimiento de laminectomía. Posteriormente, las ratas seleccionadas de manera aleatoria, fueron contundidas con el New York Impactor (equipo validado), procedimiento que fue realizado solo por una persona.

En todos los casos, el sacrificio de las ratas lo realizó una misma persona, quien recibió un entrenamiento quirúrgico y de toma de tejido medular. La toma de la muestra de la médula contundida y/o radiada también fue realizada por una misma persona, con el mismo instrumental y quien pesó el tejido medular en la misma báscula de alta precisión.

El tratamiento de radiocirugía para el grupo de ratas al que le correspondía dicho tratamiento fue de la siguiente manera: a) la obtención de imágenes se realizó en un mismo tomógrafo (descrito en material y métodos), con un protocolo de imágenes previamente establecido para radiocirugía de ratas. Este protocolo lo realizó el grupo de físicos de la Unidad de Radioneurocirugía del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. El sistema de fijación fue un equipo de fijación estereotáctica especial para ratas Wistar, validado por Galván y cols. en el 2010. La planeación del tratamiento la realizó un físico con una plantilla previamente diseñada y probada para este tipo de especie animal. El equipo con el cuál se impartió la RI es un equipo al que se le realizan diariamente los controles de calidad para radiocirugía y que cuenta con las licencias de operación correspondientes. Este equipo fue manejado por dos físicos capacitados en este tipo de tratamientos con ratas Wistar.

En lo referente a los reactivos y a las pruebas en el laboratorio, en cada ensayo siempre se utilizaron reactivos nuevos, no caducos, realizando al principio del ensayo pruebas piloto con el fin de garantizar resultados reproducibles. Las pruebas de los ensayos fueron realizadas por personas expertas en cada uno de ellos.

Una de las limitaciones del estudio fue el tiempo. El estudio se diseñó de tal forma que el tiempo transcurrido entre la contusión hasta el momento en que la rata recibió el tratamiento con radiocirugía fuera de 2 h. Este tiempo fue en promedio de $2\text{ h} \pm 15\text{ min}$. Las ratas que se salían del tiempo establecido por más de 15 min fueron eliminadas. Es importante mencionar que la cirugía y la contusión medular de las ratas se realizaron en una unidad externa (Proyecto CAMINA, IMSS) para

después regresar a la Unidad de Radiocirugía del Instituto donde se realizó el tratamiento con RI. Aunque esto complicó la logística, se realizaron los experimentos a tiempo para cada grupo.

Los resultados de este trabajo indican que la radiación ionizante tiene un efecto parcialmente antioxidante y antiinflamatorio después de la lesión medular moderada sin alcanzar la significancia estadística. Se observó que la RI mantiene los niveles de LP, SONi y MPO discretamente por debajo de los observados en el grupo solamente lesionado, a pesar de que se conoce que la radiación, por sí sola en el tejido medular sano, es una fuente de generación de radicales libres.

Es necesario explorar otros mecanismos que expliquen los efectos neuroprotectores de la radiación ionizante en una lesión traumática de la médula espinal.

10.1 Estudios futuros

Este trabajo constituye un buen acercamiento para entender el efecto neuroprotector de la radiación ionizante en el trauma medular. Sin embargo, es necesario e importante continuar con esta línea de investigación explorando otras posibles vías metabólicas, bioquímicas y/o moleculares que expliquen el mecanismo neuroprotector de la radiación ionizante en el trauma medular. Se sugiere para estudios futuros el estudio de las proteínas relacionadas con los mecanismos involucrados con la inflamación como las cinasas, proteasas y por la vía de la lipoxigenasa y ciclooxigenasa. También es importante investigar en estudios a futuro la vía de la apoptosis y la determinación de proteínas asociadas a la regeneración del sistema nervioso central, como la GAP-43.

11 REFERENCIAS

- Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Repo* 2001; 3: 535 – 541.
- Acarin L, Gonzalez B, Castellano B. Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 3505-3520.
- Agrawal SK, Fehlings MG. Role of NMDA and Non-NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury. *J Neurosci* 1997; 17: 1055-1063.
- Appleton I, Tomlinson A, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Temporal and spatial immuno-localization of cytokines in murine chronic granulomatous tissue. Implications for their role in tissue development and repair processes. *Lab Invest* 1993; 69: 405– 414.
- Arellano-Ruiz S, Ríos C, Salgado-Ceballos H, Méndez-Armenta M, Del Valle-Mondragón L, Nava-Ruiz C, Altagracia-Martínez M, Díaz-Ruiz A. Metallothionein-II improves motor function recovery and increases spared tissue after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett* 2012; 514: 102-5
- Aschner M, Cherian GM, Klaassen CD, Palmitier DR, Erickson JC, Bus AI. Metallothionein in brain- The role in physiology and pathology. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 142: 229-242.
- Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Rad Biol Med* 1985; 1: 3-25.
- Avti PK, Pathak CM, Kumar S, Kaushik G, Kaushik T, Farooque A, Khanduja KL, Sharma SC. Low dose gamma-irradiation differentially modulates antioxidant defense in liver and lungs of Balb/c mice. *Int J Radiat Biol* 2005; 81:901-10.

- Barone FC, Hillegass LM, Price RF, Lee EV, Feuerstein GZ, Sarau HM, Clark RK, Griswold. Polymorphonuclear leukocyte infiltration into cerebral focal ischemic tissue: Myeloperoxidase activity assay and histologic verification. *J Neurosci Res* 1991; 29: 336-345.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol* 1996; 139: 244-256.
- Betti OO, Derechinsky VE: Hyperselective encephalic irradiation with a linear Accelerator. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1984; 33: 385-390.
- Blumer CE, Quine S. Prevalence of spinal cord injury: an international comparison. *Neuroepidemiology* 1995; 14:258-68.
- Bolaños JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB, Heales JR. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanism and implication for neurodegenerative diseases. *J. Neurochem* 1997; 68: 2227-2240.
- Bradbury E J, McMahon S B. Spinal cord repair strategies: why do they work?. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 644-653.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 206-209.
- Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthase a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682-685.
- Bucci B, Misiti S, Cannizzaro A, Marchese R, Raza GH, Miceli R, Stigliano A, Amendola D, Monti O, Biancolella M, Amati F, Novelli G, Vecchione A, Brunetti E, De Paula U. Fractionated ionizing radiation exposure induces apoptosis through caspase-3 activation and reactive oxygen species generation. *Anticancer Res* 2006; 26:4549-57.

- Caceresa LG, Bertolinob LA, Saracenob GE, Zorrilla- Zubiletea MA, Soledad Urana L, Capanib F, Guelmana LR. Hippocampal-related memory deficits and histological damage induced by neonatal ionizing radiation exposure. Role of oxidative status. *Brain Res* 2010; 1312, 67-78.
- Cai L, Cherian MG, Iskander S, Leblanc M, Hammond RR. Metallothionein induction in human CNS in vitro: neuroprotection from ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 2000; 76:1009-17.
- Cao Q, He Q, Wang Y, Cheng X, Howard RM, Zhang Y, DeVries WH, Shields CB, Magnuson DS, Xu X, Kim DH, Whittemore SR. Transplantation of CNTF-expressing adult oligodendrocyte precursor cell promotes remyelination and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* 2010; 30:2989-3001.
- Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dossett L. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol* 1998; 151: 77-88.
- Choit DW. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol* 1992; 23: 1261-1276.
- Coderre TJ, Kumar N, Lefebv CD, Yu JS. A comparison of the glutamate release inhibition and anti-allodynic effects of gabapentin, lamotigine and riluzole in a model of neurophatic pain. *J Neurochem* 2007; 100: 1289-1299.
- Demirel U, Harputluoglu MM, Us SB, Kaya E, Sahin N, Aydin NE, Gursoy S, Bilgic Y, Demirel M, Bulut T, Selcuk EB, Aladag M. The effects of Teucrium polium on ionizing radiation-induced intestinal damage in rats. *Acta Gastroenterol Belg* 2011; 74:491-6.
- Díaz-Ruiz A, Ríos C, Duarte I, Correa D, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Ibarra A. Cyclosporin-A inhibits lipids peroxidation after spinal cord injury in rats, *Neurosci Lett* 1999; 266: 61-64.
- Díaz-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.
- Díaz-Ruiz A, Salgado-Ceballos H, Montes S, Guizar-Sahagún G, Gelista-Herrera N, Mendez-Armenta M, Diaz-Cintra S, Ríos C. Delayed administration of dapsone

- protects from tissue damage and improves recovery after spinal cord injury. *J Neurosci Res* 2011; 89: 373-80.
- Diaz-Ruiz A, Maldonado P, Mendez-Armenta M, Jiménez-García K, Salgado-Ceballos H, Santander I, Ríos C. Activation of heme oxygenase recovers motor function after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett* 2013; S0304-3940(13)800-8.
- Dilmanian FA, Qu Y, Feinendegen LE, Peña LA, Bacarian T, Henn FA, Kalef-Ezra J, Liu S, Zhong Z, McDonald JW. Tissue-sparing effect of x-ray microplanar beams particularly in the CNS: is a bystander effect involved? *Exp Hematol* 2007; 35: 69-77.
- DISCAPACINET.[http://www.ediscapacinet.gov.mx/inicio/buscartrauma medular/lesión medular](http://www.ediscapacinet.gov.mx/inicio/buscartrauma%20medular/lesi%C3%B3n%20medular). febrero 2012.
- Dryden DM, Saunders LD, Rowe BH, May LA, Yiannakoulis N, Svenson LW, Schopflocher DP, Voaklander DC. The epidemiology of traumatic spinal cord injury in Alberta, Canada. *Can. J Neurol Sci* 2003; 30: 113-121.
- Dykens J.A. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^{+} : Implication for neurodegeneration. *J Neurochem* 1994; 63: 584-591.
- Ebadi M, Hiramatsu M, Shiraga H, Rojas- Castañeda P. Zinc metallothionein isoforms in free radicals-mediated striatal damage in Parkinson's disease. *Free Radicals in Brain Physiology and Disorders*. Academic. Pree, Inc. 1996.
- Estrada-Mondacar S, Carreón-Rodríguez A, Parra-Cid M C, León CI, Velasquillo-Martínez C, Vacanti CA, Belkind-Gerson J. Spinal cord injury and regenerative medicine. *Salud publica Mex* 2007; 49:437-44.
- Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM. Free radicals as mediator of neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 6: 667-682.
- Faden AI, Simon RP. A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol* 1988; 23: 623-626.
- Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE, Silver J. Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro

- analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *J Neurosci* 1999; 19: 8182-98.
- Galván EE, Lárraga-Gutiérrez JM, Celis MA, Moreno-Jiménez S, Díaz-Ruiz A, Ríos C. A novel stereotactic device for spinal irradiation in rats designed for a linear accelerator. *Stereotact Funct Neurosurg* 2010; 88: 115-120.
- Ghirnikar RS, Lee YL, Eng LF. Chemokine antagonist infusion attenuates cellular infiltration following spinal cord contusion injury in rat. *J Neurosci Res* 2000; 159: 63-73.
- Gisone P, Dubner D, Pérez MR, Michelin S, Puntarulo S. The role of nitric oxide in the radiation – induced effects in the developing brain. *In vivo* 2004; 18: 281-292.
- González-Valdez CK, Diaz-Ruiz A, Lárraga-Gutierrez JM, Célis MA, Moreno-Jiménez S, Ríos C. Efecto neuroprotector de la radiación ionizante a dosis bajas en un modelo de lesión traumática de médula espinal en ratas. En Prensa.
- Hallenbeck JM, Jacobs TP, Feden AI. Combined PGI₂, indomethacin, and heparin improve neurological recovery after spinal trauma in cats. *J Neurosurg* 1983; 58: 749-754.
- Hamada Y, Ikata T, Katoh S, 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.
- Hausmann ON. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord* 2003; 41: 369-378.
- Hildebrandt G, Seed MP, Freemantle CN, Alam CA, Colville-Nash PR, Trott KR. Effects of low dose ionizing radiation on murine chronic granulomatous tissue. *Strahlenther Onkol* 1998; 174: 580– 588.
- Hildebrandt G, Jahns J, Hindemith M, Spranger S, Sack U, Kinne RW, Madajsterba P, Wolf U, Kamprad F. Effects of low dose radiation therapy on adjuvant induced arthritis in rats. *Int J Radiat Biol* 2000; 76: 1143–1153.
- Hildebrandt G, Loppnow G, Jahns J, Hindemith M, Anderegg U, Saalbach A, Kamprad F. Inhibition of the iNOS pathway in inflammatory macrophages by

- low-dose X-irradiation in vitro. Is there a time dependence? *Strahlenther Onkol* 2003; 179: 158–66.
- Hulsebosch CE. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv Physiol Educ* 2002; 26: 238-255.
- Juurink BH, Paterson PG. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *J Spinal Cord Med* 1998; 21: 309-334.
- Kalderon N, Alfieri AA, Fuks Z. Beneficial effects of x-irradiation on recovery of lesioned mammalian central nervous tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 10058-10062.
- Kalderon N, Fuks Z. Structural recovery in lesioned adult mammalian spinal cord by x-irradiation of the lesion site. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996a; 93:10079-10084.
- Kalderon N, Fuks Z. Severed corticospinal axons recover electrophysiologic control of muscle activity after x-ray therapy in lesioned adult spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996b; 93:10085-10090.
- Kalderon N, Xu S, Koutcher JA, Fuks Z. Fractionated radiation facilitates repair and functional motor recovery after spinal cord transection in rat. *Brain Res*. 2001; 904: 199-207.
- Keilholz L, Seegenschmiedt MH, Kutzki D, Sauer R. Periarthritis humeroscapularis (PHS). Indications, technique and outcome of radiotherapy. *Strahlentherapie Onkologie* 1995; 171: 379–384.
- Kitzman PH. Effectiveness of riluzole in suppressing spasticity in the spinal cord injured rat. *Neurosci Lett* 2009; 455: 150-153.
- Klapka N, Hermanns S, Straten G, Masannek C, Duis S, Hamers FP, Müller D, Zuschratter W, Müller HW. Suppression of fibrous scarring in spinal cord injury of rat promotes long-distance regeneration of corticospinal tract axons, rescue of primary motoneurons in somatosensory cortex and significant functional recovery. *Eur J Neurosci* 2005; 22: 3047–3058.

- Kondziolka D, Lunsford LD, Loeffler JS, Friedman WA, Radiosurgery and radiotherapy: observations and clarifications, *J Neurosur* 2004; 101: 585-9.
- Kwon BK, Okon EB, Plunet W, Baptiste D, Fouad K, Hillyer J, Weaver LC, Fehlings MG, Tetzlaff W. A systematic review of Directly Applied Biologic Therapies for Acute Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* 2011; 28: 1589-1610.
- Larsson B, Leksell L, B R, Sourander P, Mair W, Andersson B. The high energy proton beam as a neurosurgical tool. *Nature* 1958; 18: 1222-1223.
- Liebmann A, Hindemith M, Jahns J, Madaj-Sterba P, Weisheit S, Kamprad F, Hildebrandt G. Low-dose X-irradiation of adjuvant-induced arthritis in rats. Efficacy of different fractionation schedules. *Strahlenther Onkol* 2004; 180:165–172.
- Mabon PJ, Weaver LC, Dekaban GA. Inhibition of monocyte/macrophage migration to a spinal cord injury site by an antibody to the integrin α D: a potential new anti-inflammatory treatment. *Exp Neurol* 2000; 166: 52-64.
- Marchand F, Tsantoulas C, Singh D, Grist J, Clark AK, Bradbury EJ. Effects of etanercept and minocycline in a rat model of spinal cord injury. *Eur J Pain* 2009; 13: 673-681.
- Marklund SL, Westman NG, Roos G, Carlsson J. Radiation resistance and CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities of seven human cell lines. *Radiat Res* 1994; 100:115-123.
- McKinney LC, Aquilla EM, Coffin D, Wink DA, Vodovotz Y. Ionizing radiation potentiates the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma and/or lipopolysaccharide in murine macrophage cell line. Role of tumor necrosis factor- α . *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 61-8.
- Micke O, Seegenschmiedt MH. Consensus guidelines for radiation therapy of benign diseases: a multicenter approach in Germany. *Int J Radiat Biol* 2002; 52: 496–513.
- Mohanakumar KP, Kochupurackal P, Thomas B, Sharma SM, Muralikrishnan D, Chowdhury R, Chiueh CC. Nitric Oxide: An Antioxidant and neuroprotector. *Ann N Y Acad Sciences* 2002; 962: 389-401.

- Mohanakumar KP, Muralikrishnan D, Tomas B. Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *Brain Res* 2000; 2: 281-290.
- Naruo S., Okajima K., Taoka Y., Uchiba M., Nakamura T., Okabe H., Takagi K. Prostaglandin E1 reduces compression trauma-induced spinal cord injury in rats mainly by inhibiting neutrophil activation. *J Neurotrauma* 2003; 20: 221-228.
- NSCISC, <http://www.nscisc.uab.edu/reports.Annualstatisticalreports,feb> 2011.
- O'Connor P. Incidence and patterns of spinal cord injury in Australia. *Accid Anal Prev* 2002; 34: 405-415.
- Padh H. Vitamin C, newer insights into its biochemical functions. *Nutr Rev* 1991; 49: 65-70.
- Pagliacci MC, Celani MG, Zampolini M, Spizzichino L, Franceschini M, Baratta S, Finali G, Gatta G, Perdon L. Gruppo Italiano Studio Epidemiologico Mielolesioni study. An Italian survey of traumatic spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2003; 84: 1266-75.
- Pardini CM. Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal. Tesis de Doctorado de la Secretaría de Salubridad y Asistencia 1998.
- Podgorsak EB. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering. Radiation Physics for Medical Physicists. Springer; 1a edition, 2005: 2-20.
- Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J Comp Neurol* 1997; 1: 88-104.
- Quian H, Liu D. The time course of malondialdehyde production following impact injury to rat spinal cord as measure microdialysis and high pressure liquid chromatography. *Neurochem Res* 1997; 22: 1231-1236.
- Ray SK, Hogan EL, Banik NL. Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Res Rev* 2003; 42: 169-185.

- Rabchevsky AG, Patel SP, Springer JE. Pharmacological interventions for spinal cord injury: Where do we stand? How might we step forward? *Pharmacol Ther* 2011; 132: 15-29.
- Reynolds IJ, Hastings H. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J Neurosci* 1995; 15: 3318-3327.
- Ridet JL, Pencalet P, Belcram M, Giraudeau B, Chastang C, Philippon J. Effects of spinal cord x-irradiation on the recovery of paraplegic rats. *Exp Neurol* 2000; 161: 1-14.
- Rodicio MC, Barreiro- Iglesias A. Las lampreas como modelo animal en estudios de regeneración tras lesión medular. *Rev Neurol* 2012; 55:157-166.
- Rödel F, Keilholz L, Herrmann M, Sauer R, Hildebrandt G. Radiobiological mechanisms in inflammatory diseases of low-dose radiation therapy. *Int J Radiat Biol* 2007; 83: 357-366.
- Rosenberger WF, Lachin JM. Randomization in clinical trials theory and practice. Editorial Wiley-Interscience. Edg Balding, Bloomfield P, Cressie NA, 2002; 27-28
- Schaue D, Marples B, Trott KR. The effects of low-dose irradiation on the oxidative burst in stimulated macrophages. *Int J Radiat Biol* 2002; 78: 567–576.
- Schaue D, Jahns J, Hildebrandt G, Trott KR. Radiation treatment of acute inflammation in mice. *Int J Radiat Biol* 2005; 81: 657–667.
- Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 3648-3658.
- Seegenschmiedt MH, Keilholz L, Katalinic A, Stecken A, Sauer R. Heel spur: Radiation therapy for refractory pain – results with three treatment concepts. *Radiology* 1996; 200: 271–276.
- Seegenschmiedt MH, Keilholz L, Martus P, Goldmann A, Wolfel R, Henning F, Sauer R. Prevention of heterotopic ossification about the hip: Final results of two

- randomized trials in 410 patients using either preoperative or postoperative radiation therapy. *Int J Radiat Biol* 1997; 39: 16–171.
- Seegenschmiedt MH, Keilholz L. Epicondylopathia humeri (EPH) and peritendinitis humeroscapularis (PHS): evaluation of radiation therapy long-term results and literature review. *Radiother Oncol* 1998; 47: 17– 28.
- Shrieve D C, Basic Principles of Radiobiology Applied to Radiotherapy of Benign Intracranial Tumors. *Neurosurg Clin N Am* 2006; 17:67-78.
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. Basic neurochemistry molecular, cellular and medical aspects. 6^a edition, Lippincott-Raven; New York 2006; 267-290.
- Taoka Y, Okajima K, Murakami K, Johno M, Naruo M. Role of neutrophil elastase in compression-induced spinal cord injury in rats. *Brain Res* 2011; 23: 1408-98.
- Título séptimo: de la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación, Ley General de Salud. 6^a edición Editorial, Porrúa, México, D.F. 1990; 430-431.
- Tjoa T, Strausbaugh J, Maida N, Dazin PF, Rosen SD, Noble-Haeusslein LJ. The use of flow cytometry to neutrophil infiltration in the injured murine spinal cord. *J Neurosci Methods* 2003; 129: 49-59.
- Todorovic S, Pejic J, Kasapovic V, Stojiljkovic SB, Pajovic DT, Kanazir. Regional differences in antioxidative response of rat brain after cranial irradiation. *Acta Physiol Hung* 2006, 93: 341-346.
- Tonai T, Shiba K, Taketani Y, Ohmoto Y, Murata K. Muraguchi M, Ohsaki H, Takeda E, Nishisho T. A neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) reduces neurologic damage after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 2001; 78: 1064-72.
- Toklu HZ, Sehirli O, Ozyurt H, Mayadağlı AA, Ekşioğlu-Demiralp E, Cetinel S, Sahin H, Yeğen BC, Ulusoylu- Dumlu M, Gökmen V, Sener G. Punica granatum peel extract protects against ionizing radiation-induced enteritis and leukocyte apoptosis in rats. *J Radiat Res* 2009; 50: 345-53.

- Triggs WJ, Willmore LJ. In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *Neurochem* 1984; 42: 976-80.
- Trott K.R. Therapeutic effects of low radiation doses. *Strahlenther Onkol* 1994; 170: 1-12.
- Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2046-2050.
- Vitellaro-Zuccarello L, Mazzetti S, Madaschi L, Bosisio P, Gorio A, De Baisi S. Erythropoietin-mediated preservation of the white matter in rat spinal cord injury. *Neuroscience* 2007; 1444: 865-877.
- Wang X, Feuerstein GZ. Role of immune and inflammatory mediators in CNS injury. *Drug News Perspect*. 2000; 13: 133-140.
- West AK, Hidalgo J, Eddins D, Levin ED, Aschner M. Metallothionein in the central nervous system: roles in protection, regeneration and cognition *Neurotoxicology*. 2008; 29: 488-502.
- Witte JS, Elson RC, Cardon LR. On the relative sample size required for multiple comparisons, *Statist Med* 2000; 19: 369-372.
- Won YJ, Yoo JY, Lee JH, Hwang SJ, Kim D, Hong HN. Erythropoietin is neuroprotective on GABAergic neurons against kainic acid-excitotoxicity in the rat spinal cell cultures. *Brain Res* 2007; 1154: 31-39.
- Woodruff BA, Baron RC. A description of nonfatal spinal cord injury using a hospital-based registry. *Am J Prev Med* 1994; 10: 10-14.
- Xu M, Ng YK, Leong SK, Neuroprotective and neurodestructive function of nitric oxide after spinal cord hemisection. *Exp Neurol* 2000; 161: 472-480.
- Yang JY, Kim HS, Lee JK, Changes in nitric oxide synthase expression in young and adult rats after spinal cord injury. *Spinal Cord* 2007; 45: 731-8.
- Yazihan N, Uzuner K, Salman B, Vural M, Koken T, Arslantas A. Erythropoietin improves oxidative stress following spinal cord trauma in rats. *Injury* 2008; 39: 1408-1413.

Zeman RJ, Feng Y, Peng H, Visintainer PF, Moorthy CR, Couldwell WT. X-irradiation of the contusion site improves locomotor and histological outcomes in spinal cord-injured rats. *Exp Neurol* 2001; 172: 228-34.

Zeman RJ, Wen X, Ouyang N, Rocchio R, Shih L, Alfieri A, Moorthy C, Etlinger JD. Stereotactic radiosurgery improves locomotor recovery after spinal cord injury in rats. *Neurosurgery* 2008; 63: 981-7.