



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL FILM SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS
GENES ANTIAPOPTÓTICOS BIRC-2, BIRC-3, BCL-XL Y BCL-2 EN RATAS
CON LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL.”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:
FLORES LUNA MARÍA FERNANDA**

ASESOR:

Dr. Silva García Raúl

CO-ASESORES:

M. en C. Vázquez Martínez Ana Laura

Dra. Rico Rosillo Guadalupe

MÉXICO, D.F. 2014



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.

Agradecimientos, y por tanto, dedicatorias:

A mis padres. Porque confiaron en mí siempre. Por su esfuerzo, por su amor, por sus consejos, porque todo ello forjó mi carácter.

A mis hermanitos que amo mucho; por sus risas, sus abrazos, su cariño, porque soy muy afortunada de que sean mis hermanos.

A Izar. ¡Lo logramos! Nunca podría agradecerte lo suficiente, aún en los momentos más difíciles que pasamos seguiste siendo mi roca.

A toda mi familia porque siempre sentí sus bendiciones conmigo a pesar de la distancia y de una u otra forma su apoyo moral me incentivó a seguir adelante.

A todos ustedes les quiero decir que es una bendición que hayan estado a mi lado durante la realización de este sueño. Jamás encontraré la forma de expresarles cuán importante ha sido su apoyo y su entera confianza en mí para lograrlo. Mis triunfos son suyos también e inspirados en ustedes, mi fortaleza y mi orgullo. Los amo con todo el corazón.

Chacalitos de mi vida, como se dice usualmente; encontrar a personas con la misma clase de desorden mental que el tuyo, ¡no tiene precio! Ranita, Perrito, Incómodo, Zetosito, Tragucho Chan, Avenger, Guada y Lupis, Sarita, Pekeña, Güero, Mau; ustedes hicieron de la universidad la etapa más divertida y especial de todas. En especial a Gaby y mi gato, que saben cuán difícil fue esto y gracias a ustedes pude continuar.

Al Dr. Raúl Silva, por permitirme ser parte de este proyecto, por apoyarme siempre, por transmitirme sus conocimientos y por su amistad.

A mis amigos de Centro Médico, a Lil y a Pau porque tuvieron la paciencia necesaria para enseñarme las técnicas, a la Maestra en Ciencias Wendy por explicarme hasta lo más básico, a Adrián, mi asesor privado por tener la dedicación y tiempo para leer mi tesis y darme sus consejos, al niño Filio, a Vero, Gaby, Shary, y a mi alumnito Agus, porque a pesar de lo frustrante que a veces resulta hacer una tesis, siempre podíamos sonreír y divertirnos con tantas locuras al final del día.

A Abraham Manguin porque me presentó a su mejor amigo y es el mejor regalo que alguien puede tener, ¡¡GRACIAS!!.

A la gloriosa casa de estudios, mi amada UNAM. Amé sus aulas llenas de conocimientos y de sueños desde que pude pertenecer al CCH.

Y finalmente y más importante, a Dios, verdadera fuente amor y sabiduría. Gracias por cumplir los anhelos de mi corazón y por guardarme siempre en el hueco de tu mano. *“El señor es mi fuerza, mi roca y mi escudo, el pelea por mí porque donde mis fuerzas acaban empiezan las de Él.”*

Hagas lo que hagas en la vida será insignificante, pero es muy importante que lo hagas, porque nadie más lo hará por ti. "Mahatma Gandhi"

Si supiese qué es lo que estoy haciendo, no le llamaría investigación, ¿verdad? "Albert Einstein"

Son innumerables las contribuciones al desarrollo de las ciencias, que han sido logradas mediante el uso de los animales de laboratorio. Y a pesar de tantos avances, somos aún incapaces de prescindir de estos seres para nuestros fines. Por lo tanto, estamos obligados a mantener la firme voluntad de reducir hasta el límite estrictamente necesario la utilización de animales en la docencia, a la adopción de técnicas sustitutorias de investigación y a la acumulación de observaciones en una misma experiencia. Tristemente, adoptar todos estos principios jamás será suficiente para satisfacer la deuda contraída por la especie humana hacia estas nobles criaturas, a las que en este trabajo de investigación di el trato más digno que es posible brindar en este ámbito. Anhele que estas contribuciones sean importantes y que si bien no se justifica el sacrificio de seres vivos en pos de un conocimiento vacío, represente un paso más hacia la ciencia aplicada en beneficio del hombre.

Hasta que no cesemos de dañar a otros seres vivos, somos aún salvajes. "Thomas Edison"

Una de las glorias de la civilización sería haber mejorado la suerte de los animales. "Théophile Gautier"

ABREVIATURAS

Ag: Antígeno

Ac: Anticuerpo

AHA: Absceso Hepático Amebiano

ATP: Adenosin Trifosfato

BCL-2: Células B de Linfoma 2 (del inglés B-Cell Lymphoma 2)

BCL-XL: Células B de Linfoma extra largo (del inglés B-Cell Lymphoma-extra large)

BIRC-2: Baculovirus con 2 Repeticiones IAP (del inglés Baculoviral Containing 2 IAP Repeat)

BIRC-3: Baculovirus con 3 Repeticiones IAP (del inglés Baculoviral Containing 3 IAP Repeat)

CAD: Caspasa Activadora de DNasa

DNA: Ácido Desoxirribonucleico (del inglés Deoxyribonucleic acid)

DNCB: Dinitroclorobenceno

EDTA: Ácido Etilendiamintetracético (del inglés Ethylenediaminetetraacetic Acid)

ePMN: Eosinófilos Polimorfonucleares

FADD: Dominio de muerte Asociado a FAS (del inglés FAS Associated Death Domain)

FILM : Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos

GFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial (del inglés Glial fibrillary Acidic Protein)

GIAP 1: Proteína de Adherencia Inhibidora de Galactosamina (del inglés Galactose-Inhibitable Adherence Protein)

HPRT: Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase

ICAD: Inhibidor de DNasa activada por Caspasas (del inglés Inhibitor of Caspase-Activated DNase)

IL-1: Interleucina 1

IL-2: Interleucina 2

INF: Interferón

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

LTME: Lesión Traumática de Médula Espinal

MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad (del inglés Major Histocompatibility Complex)

MIP: Proteína Inflamatoria de Macrófagos (del inglés Macrophage Inflammatory Protein)

MP: Fagocitos Mononucleares (del inglés Mononuclear Phagocytes)

MP: Metilprednisolona

NCBI: Centro Nacional para la Información de Biotecnología (del inglés National Center for Biotechnology Information)

NMDA: Ácido N-metil-D-aspartico (del inglés N-metil-D-aspartic acid)

NO: Óxido Nítrico (del inglés Nitric Oxide)

nPMN : Neutrófilos Polimorfonucleares

PARP: Poly ADP Ribosa Polimerasa

PBS: Buffer Salino de Fosfatos (del inglés Phosphate Buffer Saline)

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (del inglés Platelet-Derived Growth Factor)

PF4: Factor Plaquetario 4 (del inglés Platelet factor 4)

PMN: Células Polimorfonucleares

RNA: Ácido Ribonucleico (del inglés Ribonucleic acid)

RNI: Intermediarios Reactivos del Nitrógeno (del inglés Reactive Nitrogen intermediates)

ROI: Especies Reactivas del Oxígeno (del inglés Reactive Oxygen Species)

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa (del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

SN: Sistema nervioso

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

TAE: Tris acetato EDTA

TGF- β : Crecimiento transformante β (del inglés Transforming growth factor β)

Th1: Célula T cooperadora 1 (del inglés T helper 1)

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral α (Tumoral Necrosis Factor α)

Tpo: Trombopoyetina

TRADD: Receptor del Factor de Necrosis Tumoral tipo 1 Asociada a la Proteína de Dominio de muerte (del inglés Tumor Necrosis Factor Receptor type 1-Associated to DEATH domain protein)

VCAM: Molécula de Adhesión Celular Vascular (del inglés Vascular Cell Adhesion Molecule)

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (Vascular Endotelial Growth Factor)

VLA-4: Antígeno Tardío 4 (del inglés Very Late Antigen 4)

ÍNDICE

1	
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2	
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1. SISTEMA NERVIOSO	12
2.1.1. ÓRGANOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	13
2.1.1.1. EL CEREBRO	13
2.1.1.2. LA MÉDULA ESPINAL	13
2.1.1.3. MENINGES	14
2.1.2. CÉLULAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	14
2.1.2.1. NEURONAS.....	14
2.1.2.2. NEUROGLÍA	15
2.1.2.2.1. ASTROCITOS	16
2.1.2.2.2. OLIGODENDROCITOS	16
2.1.2.2.3. MICROGLÍA	17
2.1.2.2.4. CÉLULAS DEL EPÉNDIMO.....	17
2.2. CICATRIZACIÓN, HEMOSTASIA E INFLAMACIÓN.....	17
2.2.1. HEMOSTASIA	18
2.2.2. GENERALIDADES SOBRE LA INFLAMACIÓN.....	18
2.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL	19
2.3.1. CAMBIOS VASCULARES	20
2.3.2. EXCITOTOXICIDAD.....	21
2.3.3. RADICALES LIBRES Y LIPOPEROXIDACIÓN	21
2.3.4. APOPTOSIS	22
2.3.4.1. VÍAS DE ACTIVACIÓN DE LA APOPTOSIS	23
2.3.4.1.1. APOPTOSIS VÍA EXTRÍNSECA	24
2.3.4.1.2. APOPTOSIS VÍA INTRÍNSECA.....	25
2.3.4.2. INHIBIDORES DE LAS CASPASAS	26
2.3.4.3. CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LA APOPTOSIS	27
2.4. FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCIÓN DE MONOCITOS	28
3	
3.HIPÓTESIS.....	30
4	
4. OBJETIVO GENERAL	30
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
5	
5. MATERIAL Y MÉTODO	31
5.1. LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL	31
5.2. FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCIÓN DE MONOCITOS (FILM).....	31
5.3. ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTO.....	32
5.4. CUIDADOS POS-OPERATORIOS.....	32
5.5. OBTENCIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL	32
5.6. OBTENCIÓN DE RNA TOTAL (RNA _t)	32
5.7. CUANTIFICACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA _t	33

5.8. SÍNTESIS DE cDNA	33
5.9. GENERACIÓN DE INICIADORES PARA LOS GENES EN ESTUDIO	34
5.10. PCR TIEMPO REAL	34
<hr/>	
6	
6. ANÁLISIS DE PERFIL DE EXPRESIÓN	36
<hr/>	
7	
7. DESCRIPCIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES	36
<hr/>	
8	
8. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	37
<hr/>	
9	
9. DIAGRAMA DE FLUJO.....	39
<hr/>	
10	
10. RESULTADOS.....	40
10.1. LAMINECTOMÍA Y LTME.....	40
10.2. OBTENCIÓN DE RNA ^t	40
10.3. AMPLIFICACIÓN OBTENIDA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL	41
10.3.1. AMPLIFICACIÓN DEL GEN BIRC-2	42
10.3.2. AMPLIFICACIÓN DEL GEN BIRC-3	43
10.3.3. AMPLIFICACIÓN DEL GEN BCL-XL	44
10.3.4. AMPLIFICACIÓN DEL GEN BCL-2	46
10.4. IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR	47
10.5. GRÁFICOS DE EXPRESIÓN	48
<hr/>	
11	
11. DISCUSIÓN.....	51
<hr/>	
12	
12. CONCLUSIONES.....	54
<hr/>	
13	
13. PERSPECTIVAS.....	54
<hr/>	
14	
14. BIBLIOGRAFÍA.....	55

1. INTRODUCCIÓN

La fisiopatología de la lesión traumática de médula espinal (LTME), se caracteriza por una lesión medular mecánica primaria seguida de una serie de mecanismos autodegenerativos (lesión secundaria) que producen la destrucción del parénquima, inducida por cambios bioquímicos, moleculares y celulares, que finalmente determina un proceso neurodegenerativo crónico (26, 52) en el que se observa una intensa respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y células cebadas, así como una gran invasión de macrófagos al sitio de la lesión. Todos estos fenómenos tienen relación con la degeneración gradual vascular y del tejido neural, destruyendo el sustrato anatómico necesario para la recuperación neurológica (33).

Para tratar estas lesiones se cuenta con diversas estrategias terapéuticas, entre las más usadas están los trasplantes al Sistema nervioso central (SNC), sobre todo con fines de regeneración y plasticidad neural (2, 31). El uso de drogas como Metilprednisolona (MP), que dentro de las primeras 8 h posteriores a la LTME y a dosis altas por 24h, mejora la recuperación motora, aunque también puede exacerbar la necrosis neuronal postisquémica e inhibir el crecimiento axonal (9). Y la administración de agonistas adrenérgicos como el clenbuterol, el cual revierte la atrofia muscular, eleva la expresión de Proteína ácida fibrilar Glial (GFAP) y tiene un efecto sinérgico neuroprotector al ser usado con otros fármacos como la memantina (14).

Sin embargo, ninguna de estas estrategias terapéuticas es efectiva para restablecer la función neurológica normal, debida a la complejidad para regular los mecanismos de daño que producen la lesión secundaria (15). De acuerdo a esta información resulta imperativo centrarse en la manipulación de la respuesta inflamatoria como blanco terapéutico, ya que si se regula la intensidad y tiempos en que interviene el sistema inmunológico, se obtendrá una respuesta protectora, en lugar de resultar en un daño específico del tejido (35).

Actualmente se estudian diversas moléculas, factores, terapias, y fármacos que puedan modificar los mecanismos de neurodegeneración, entre ellos péptidos inmunomoduladores o inmunoprotectores como el Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM), un pentapéptido cuya secuencia es Met-Gln-Cis-Asn-Ser y con un PM de 583Da que presenta características biológicas anti-inflamatorias demostradas *in vitro* e *in vivo* sobre diversas estirpes celulares (38).

1. MARCO TEÓRICO

2.1 SISTEMA NERVIOSO

El estudio de la anatomía del sistema nervioso (SN) inicio desde hace varios siglos; existen textos Hipocráticos del siglo V donde se sugería el papel fundamental del cerebro como director de las funciones corporales y mentales (55).

La figura. 1, representa la médula espinal cuya funcione principal son la recepción de los estímulos de los medios externo e interno, la transmisión de los impulsos nerviosos a los órganos efectores, y el mantenimiento de las funciones glandulares (5).

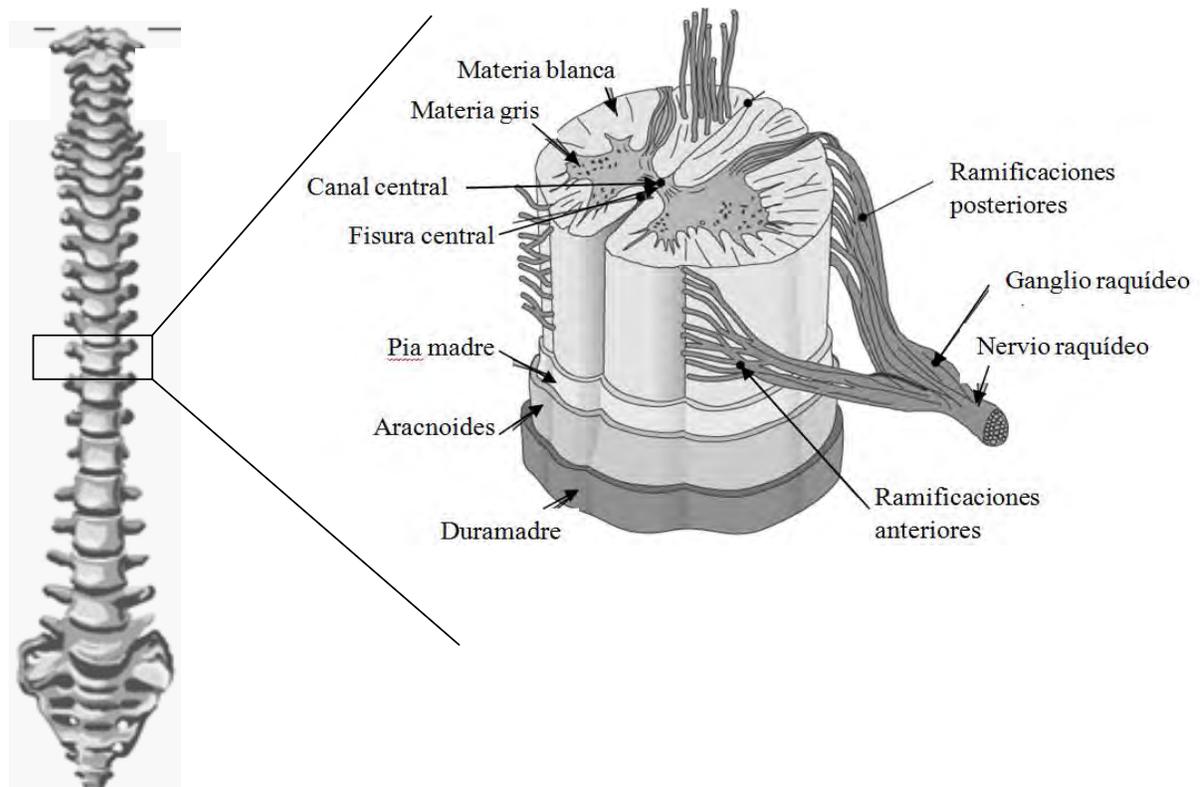


Fig. 1. Médula espinal. Izquierda: médula espinal protegida por las vértebras. Derecha: corte transversal de las estructuras que la conforman, recubren y conectan con el SNC y los órganos y tejidos involucrados (Modificado de biología.org.mx).

De acuerdo con su localización, el SN se divide en dos grandes partes: SNC y Sistema Nervioso Periférico (SNP). El SNC comprende las estructuras u órganos nerviosos que se encuentran dentro del cráneo y el conducto raquídeo (cerebro y médula espinal), mientras que el SNP está formado

por los troncos nerviosos que se desprenden del SNC. Fundamentalmente estos son 12 pares de nervios craneales, que se desprenden de los órganos encefálicos, y los 31 pares de nervios raquídeos, que se desprenden de la médula espinal (64).

2.1.1 ÓRGANOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

2.1.1.1 EL CEREBRO

El cerebro es el órgano principal del SNC, pesa unos 1.200gr, se encuentra en la cavidad craneal y está formado por sustancia gris, formada por neuronas y glía (encargada de recibir y almacenar impulsos) y sustancia blanca, formada por fibras nerviosas (encargada de llevar los impulsos hacia y desde la materia gris).

Su superficie tiene salientes llamadas circunvoluciones y surcos a los que se les denomina cisuras de Silvio y de Rolando, que dividen al cerebro en dos hemisferios divididos a su vez en cuatro lóbulos (frontal, temporal, parietal y occipital). Su principal función es controlar y regular el funcionamiento de los demás centros nerviosos (48).

Consta de tronco encefálico o bulbo raquídeo, cerebelo, y diencefalo; este último incluye el tálamo y el hipotálamo. Otras estructuras son el mesencefalo y el puente (19).

2.1.1.2 LA MÉDULA ESPINAL

La médula espinal es la parte alargada del SNC que conecta el cerebro a todos los músculos del cuerpo. Es un cordón largo y cilíndrico protegido por las vértebras y ligeramente aplanado dorsoventralmente. Mide alrededor de 43 cm de largo en las mujeres adultas y 45 cm de largo en los hombres adultos y pesa unos 35 a 40gr. Está rodeada y protegida por la columna vertebral (42).

La médula se compone de 31 pares de nervios espinales que se prolongan desde la médula espinal y atraviesan los músculos vertebrales transmitiendo la información sensorial del órgano blanco al SNC, y envían comandos motores del SNC hacia los músculos y órganos. Están distribuidos a lo largo de la médula en 8 pares de nervios raquídeos cervicales (C1-C8), 12 pares de nervios raquídeos torácicos (T1-T12), 5 pares de nervios raquídeos lumbares (L1-L5), 5 pares de nervios raquídeos sacros (S1-S5) y de 1 hasta 3 pares de nervios raquídeos coccígeos (75).

2.1.1.3. MENINGES

Las meninges son membranas conjuntivas que se encuentran en el interior de la cavidad craneana y del conducto raquídeo, que protegen las cubiertas exteriores del neuroeje. Se describen tres meninges que de la superficie a la profundidad son; duramadre, aracnoides y piamadre (63).

La dura madre es una capa fibrosa y densa que envuelve desde la bóveda del cráneo hasta el conducto sacro y está conformada a su vez por dos capas de tejido conectivo; la cara superficial está en contacto con las paredes óseas pero no unido a ellas, sino que existe un pequeño espacio entre ambas conocido como espacio epidural. La aracnoides es una capa de tejido laxo unido a la cara profunda de la duramadre, entre ambas también existe un espacio por donde circula líquido seroso, este espacio se conoce como espacio subdural. La aracnoides envía prolongaciones llamadas trabéculas aracnoideas que se fusionan con la capa más profunda, la piamadre. La piamadre es una membrana delgada unida firmemente a la superficie de la médula espinal. Entre la piamadre y la aracnoides existe un espacio donde circula el líquido cefalorraquídeo (LCR), conocido como espacio subaracnoideo (64).

2.1.2 CÉLULAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El SNC se forma al comienzo de la tercera semana del desarrollo. Los tipos celulares que componen al SN son las neuronas, células neurogliales y células de la microglía (65).

2.1.2.1 NEURONAS

Las neuronas son las células principales del SN. Se calcula que un cerebro humano tiene alrededor de 100,000 millones de neuronas y cada una de ellas recibe un millar de conexiones. Su función es conducir, recibir y transmitir los impulsos electroquímicos nerviosos. Una neurona típica tiene como principales compartimentos morfofuncionales; dendritas, cuerpo celular o soma, axón y terminales sinápticas (40) que podemos ver esquematizadas en la figura 2.

El axón es una fibra larga y delgada que transmite impulsos desde el soma neuronal hacia otra neurona o tejido. Cada una de estas prolongaciones está rodeada por células de Schwann ubicadas una a continuación de la otra formando una vaina de mielina que sirve como aislante, y entre cada vaina existen hendiduras conocidas como nodos de Ranvier, que es por donde se desplaza el

potencial de acción generado, hacia las terminales sinápticas, situadas en el extremo de cada axón (76, 6).

Una neurona suele tener muchas dendritas, estructuras cortas con extensiones ramificadas encargadas de la recepción de señales. Tienen adaptaciones en su membrana que generan señales eléctricas como respuesta a neurotransmisores y estas señales convergen en el soma, que actúa como centro de integración generando un potencial eléctrico (10, 6).

Según su disposición axonal, las neuronas pueden ser multipolares, bipolares y neuronas unipolares; las neuronas multipolares tienen dendritas que se proyectan desde el cuerpo celular. Este tipo de neuronas constituye la mayor parte de células del SNC (neuronas intercalares, integradoras y motoras). Las neuronas bipolares tienen una única dendrita; y las neuronas unipolares tienen una sola dendrita que procede de un tronco común con su único axón. Durante el desarrollo embrionario existen como neuronas bipolares, y se convierten en unipolares conforme sus prolongaciones migran alrededor del soma neuronal, son neuronas sensitivas para gusto, vista, equilibrio y audición; son abundantes en la médula espinal.

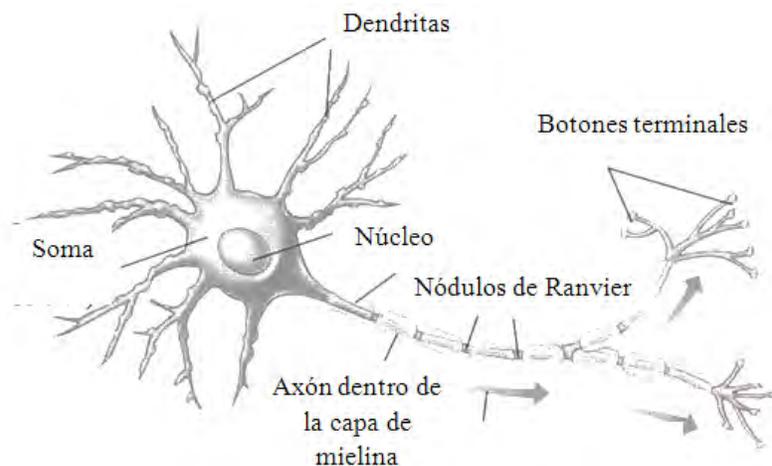


Fig. 2. Estructura típica de una neurona con sus principales estructuras funcionales (Modificado de Bases biológicas del comportamiento: <http://psicodm.com/temas/4-bases-biologicas-del-comportamiento/>).

2.1.2.2. NEUROGLIA

La neuroglía (glía o células gliales) funcionan como pegamento neural y sostén del SNC. La mayoría de estas células derivan del ectodermo, excepto la microglía, cuyo origen es el

mesodermo. Estas células son hasta 10 veces más abundantes que las neuronas y se ha demostrado por medio de cultivos celulares que son fundamentales en el desarrollo de la neurona. Algunas de sus funciones son regular, separar y aislar grupos neuronales entre sí, así como participar en procesos de reparación del sistema nervioso. Los cuatro tipos de células gliales son: astrocitos, oligodendrocitos, microglíocitos y ependimocitos (63).

2.1.2.2.1. ASTROCITOS

Los astrocitos son las células gliales más numerosas de la sustancia gris, poseen prolongaciones muy ramificadas que ocupan la mayor parte de los espacios interneuronales y son las encargadas de proveer sostén físico y metabólico para las neuronas. Además colaboran en la mantención del equilibrio iónico y en la eliminación o reciclaje de neurotransmisores de la hendidura sináptica.

Morfológicamente se han identificado dos clases de astrocitos; los protoplasmáticos que prevalecen en la sustancia gris y tienen abundantes prolongaciones; y los fibrosos; que son comunes en la sustancia blanca y tienen prolongaciones rectas. Ambos contienen haces de filamentos intermedios compuestos por la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). En procesos patológicos los astrocitos aumentan su actividad, esto les confiere la capacidad de eliminar una mayor cantidad de sustancias dañinas y de encapsularlas a través de la expresión de proteínas estructurales en sus prolongaciones (3).

2.1.2.2.2. OLIGODENDROCITOS

Los oligodendrocitos son las células encargadas de producir la mielina que recubre los axones de las neuronas. Están alineados en hileras y cada uno emite prolongaciones que llegan a los axones, donde se forman capas concéntricas de membrana plasmática oligodendrocítica formando segmentos llamados vainas de mielina. La mielina tiene la función de aislar los axones, haciendo eficiente el paso de los impulsos eléctricos. Un solo oligodendrocito puede ser responsable de la mielinización de hasta cincuenta fibras nerviosas (63).

2.1.2.2.3. MICROGLÍA

Está constituida por células pequeñas y escasas conocidas como microgliocitos o células de Río Hortega, que constituyen alrededor del 5% de toda la neuroglía. Estas células son el equivalente al sistema inmunológico dentro del SNC.

Los microgliocitos derivan de células precursoras monocíticas medulares óseas que migran hacia el parénquima del SNC desde los vasos sanguíneos durante la embriogénesis, permaneciendo en estado inactivo hasta que existe algún perjuicio. Cuando esto ocurre, dichas células se diferencian a células fagocíticas, con capacidad para secretar citocinas y factores quimiotácticos (63, 76).

2.1.2.2.4 CÉLULAS DEL EPÉNDIMO

Son células cuboides o cilíndricas conocidas como epindemocitos que forman el epitelio que tapiza el interior de los ventrículos del cerebro y del canal central de la médula espinal. Tienen abundantes cilios a través de los cuales movilizan el líquido cefalorraquídeo, haciendo posible un intercambio de líquido entre el tejido encefálico y la luz ventricular (76).

1.2 CICATRIZACIÓN, HEMOSTASIA E INFLAMACIÓN

La cicatrización es el mecanismo que poseen todos los organismos para reparar y regenerar los tejidos. En los vertebrados la reparación se realiza mediante reconstrucción del tejido conectivo, de su vasculatura y del epitelio que lo cubre (53). La fisiología de la cicatrización de la herida se describe generalmente como un proceso de tres fases: inflamación, proliferación y maduración. Sin embargo, estas tres fases no constituyen episodios aislados, sino que son secuenciales y simultáneas (71).

La cicatrización empieza cuando se forma una herida o lesión que consiste en laceración de tejidos con el daño de los tejidos subyacentes. La lesión puede ocurrir por cualquier tipo de fuerzas mecánicas o térmicas que rompen la piel y dañan el tejido conjuntivo y los vasos. Sigue una hemorragia con exposición del colágeno, el endotelio y las proteínas intra y extravasculares, lo que propicia la aparición de uno de los primeros eventos, la hemostasia.

2.2.1. HEMOSTASIA

La resolución de la lesión comienza con la hemostasia. Consiste en la vasoconstricción y la coagulación para detener la hemorragia, durante la cual se producen diferentes vasoconstrictores; el endotelio de los vasos dañados produce la endotelina, los demás mediadores de la vasoconstricción derivan de las catecolaminas circulantes (adrenalina), el sistema nervioso (noradrenalina) y las prostaglandinas liberadas por las células dañadas.

En cuanto a la coagulación, se efectúa por las vías extrínseca e intrínseca, que convergen produciendo trombina, la cual cataliza la conversión del fibrinógeno en fibrina para la producción del trombo, y la activación plaquetaria, que consiste en la degranulación de las plaquetas que liberan numerosas citocinas, factores de crecimiento y proteínas de la matriz como bradicinina, fibrinopéptidos, serotonina y tromboxano A₂. Estas sustancias fomentan una serie de mecanismos celulares y extracelulares importantes para la hemostasia, así como para otras etapas de la cicatrización de la herida (64, 71).

2.2.2. GENERALIDADES SOBRE LA INFLAMACIÓN

El establecimiento de la vasoconstricción para la hemostasia dura sólo unos minutos, antes de que diversos factores estimulen la respuesta contraria de vasodilatación, que se refleja con eritema, calor, edema y dolor. La inflamación representa un aumento de la permeabilidad en los vasos, y el reclutamiento de los leucocitos hacia el foco de lesión mediado por la presencia de histamina, prostaglandinas y leucotrienos.

Los neutrófilos son el primer subgrupo de leucocitos que se infiltra. Aparecen pasadas 24 a 48 horas por el estímulo de prostaglandinas, complemento, IL-1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor plaquetario 4 (PF4) y productos bacterianos. Su función principal es actuar contra microorganismos liberando enzimas proteolíticas y mediante la producción de especies reactivas del oxígeno, además de eliminar detritus tisulares.

Entre 48 y 96 horas después de que se produce la lesión predominan los macrófagos, que permanecen en el sitio de la lesión hasta que termina la cicatrización.

2.3 FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL

Las lesiones traumáticas de médula espinal (LTME) son traumatismos en la columna que afectan la capacidad de la médula de enviar mensajes desde el cerebro hacia los sistemas corporales que controlan la función sensorial, motora y autónoma y viceversa por debajo del nivel de la lesión. Las principales causas de estas lesiones son accidentes automovilísticos (47%), seguido por accidentes relacionados con el deporte (24%), el resto está conformado por caídas, heridas con cuchillo o arma de fuego, afecciones congénitas, etc, etc (29).

De forma general se identifican tres fases después de una LTME: la fase aguda, fase secundaria y el proceso crónico.

La fase aguda, inicia en el momento de la lesión y se extiende por algunos días. Durante este período el trauma destruye la barrera hematoencefálica y los vasos sanguíneos locales, ocasionando una alteración de la microvasculatura de la sustancia gris, induciendo hemorragias. Las células sanguíneas y las proteínas del suero invaden el área lesionada. La destrucción de los capilares causa isquemia, anoxia e hipoglucemia. La necrosis y la degeneración de la mielina de los axones dañados continúan por 8 a 24 horas. Después de 48 horas los fagocitos sanguíneos se acumulan localmente para eliminar la mielina degenerada y otros residuos celulares.

Los cambios en el flujo sanguíneo afectan la sustancia gris e inducen la muerte neuronal primaria. La formación de edema comprime el tejido y produce una variación anormal de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , que perturban la excitabilidad y la transmisión sináptica. La concentración de calcio aumenta en los segmentos medulares dañados y tiene un efecto nocivo sobre la función de las neuronas al activar las fosfolipasas dependientes de calcio, como la fosfolipasa C y A2, dando lugar a la producción de araquidonato, cuyo metabolismo produce tromboxanos, leucotrienos y radicales libres que promueven el daño tisular e inflamación además de contribuir a disminuir el flujo microcirculatorio (29, 11).

En la fase secundaria, que dura varias semanas, continúan los cambios electrolíticos y la muerte celular por isquemia. Dentro de los primeros 15 minutos después de la lesión, las concentraciones extracelulares de glutamato y otros aminoácidos excitatorios alcanzan concentraciones citotóxicas (seis a ocho veces la concentración basal) como resultado de la lisis celular.

Hay dos momentos en esta fase en los que ocurre infiltración de células inflamatorias. En el primero (durante las primeras horas) se infiltran granulocitos polimorfonucleares; los neutrófilos

aparecen en la pared de las venas y permanecen de 8 a 24 horas. Su concentración depende de la hemorragia en el sitio de la lesión, porque los productos de la hemoglobina son fuertemente quimioattractantes.

En cuanto a la infiltración de las células de linaje monocito-macrófago-microglial, se reactivan y adquieren morfología ameboide, expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y II y alcanzan un pico máximo de los 5 a los 7 días poslesión, estos cambios marcan la activación de la microglía y su transformación en células fagocíticas (11).

La fase crónica se produce durante un transcurso de días o años en que el proceso degenerativo de la médula continúa y se extiende a lo largo del sitio de la lesión. Una variedad de receptores y canales iónicos están alterados en los niveles de expresión y estado de activación. Ya que las neuronas muertas no son reemplazadas, los axones lesionados no se regeneran y los trastornos funcionales son permanentes. En muchos casos (aproximadamente en 25% de todos las LTME) se produce una lesión o cavidad llamada quiste. Los quistes están formados por glía reactiva; ésta involucra a la microglía y la astrogía, así como a poblaciones de células periféricas en el área de la lesión, a esta condición también se le conoce como siringomielia, que al agrandarse resulta en síndromes de dolor crónico (29,11).

2.3.1 CAMBIOS VASCULARES

El ambiente medular se vuelve predominantemente anaeróbico las primeras 4 horas tras el trauma con posibles cambios locales y sistémicos.

Inmediatamente después de la lesión se produce un aumento de la presión arterial sistémica seguido de hipotensión, que aunado a la trombosis de las venas y capilares empeora la isquemia. La interrupción vascular puede causar hemorragia principalmente en la sustancia gris de la médula espinal. El desplazamiento y los fragmentos de la fractura pueden comprimir también los vasos medulares espinales. Todo este daño vascular produce la pérdida de sustratos vasculares. La disfunción mitocondrial es un fenómeno frecuente en la lesión celular tanto isquémica como mecánica. La anoxia provoca la acumulación de calcio intracelular provoca la liberación de citocromo C de la mitocondria, activando la apoptosis. El daño a la mitocondria provoca una depleción de la producción de moléculas de ATP que son necesarias para el correcto funcionamiento de la bomba de sodio/potasio, causando finalmente la muerte celular (11).

2.3.2 EXCITOTOXICIDAD

El término excitotoxicidad fue introducido en 1978 para describir los procesos que resultan de la activación excesiva de receptores de glutamato y que conducen a lesión neuronal. La elevación de calcio intracelular en la LTME es lo que estimula la liberación de aminoácidos excitatorios como el glutamato, cuya concentración extracelular máxima ocurre pocos minutos después del trauma. Estos son altamente tóxicos para las células no dañadas. La activación del receptor de glutamato produce la acumulación rápida de sodio intracelular con el subsiguiente edema citotóxico y acidosis intracelular (34).

La neurotoxicidad del glutamato también está mediada por la generación de radicales libres de oxígeno y nitrógeno. La excitotoxicidad, particularmente mediada por el receptor NMDA, inicia una compleja cascada de eventos que por último lleva a la generación de radicales libres que contribuyen a la muerte neuronal a través de una variedad de mecanismos que incluyen la peroxidación lipídica, la inhibición de la ATPasa de sodio y potasio y la inactivación de los canales de sodio, entre otros (18).

2.3.3 RADICALES LIBRES Y LIPOPEROXIDACIÓN

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas debido a la presencia de un electrón libre. Son producidos normalmente por procesos celulares derivados del transporte de electrones en la mitocondria y eliminados a través de la unión a moléculas de bajo peso molecular como lo es el ácido ascórbico, la vitamina E y la glutatión peroxidasa (28).

El origen de los radicales después de una lesión de la médula espinal se debe a la actividad de los macrófagos que atraviesan la barrera hematoencefálica. Se ha identificado su pronta producción luego de una LTME, ya que se observa descenso de antioxidantes y alta concentración de productos derivados de la oxidación del colesterol y de ácidos grasos.

Las lesiones provocadas por radicales libres se deben a reacciones anormales de los radicales con componentes celulares principalmente de la membrana celular como los fosfolípidos de los ácidos poli-insaturados. El proceso da comienzo cuando el radical libre quita un átomo de hidrógeno de uno de los átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada para originar un radical libre lipídico. Puesto que los ácidos grasos poliinsaturados contienen grupos metilo separados por dobles enlaces que debilitan el enlace metileno C-H. El radical libre lipídico, para estabilizarse, sufre un reajuste molecular que produce un dieno conjugado. El dieno conjugado reacciona con el oxígeno molecular y se forma un radical peroxilo que puede dar lugar a endoperóxidos o bien tomar un átomo de hidrogeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente y formar de nuevo

un radical libre lipídico y un hidroperóxido lipídico (4). Esta reacción se conoce como lipoperoxidación, y tiene efectos negativos en la actividad de enzimas y moléculas importantes que mantienen el potencial de membrana, tal es el caso del ATP en la bomba de sodio y potasio. La lipoperoxidación es acelerada por algunos catalizadores que pueden estar presentes después de una lesión medular, algunos de estos catalizadores son componentes sanguíneos como el hierro y el cobre, así como la hematina que es producto de degradación de la hemoglobina (34). Los productos finales de la peroxidación, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y alteran la permeabilidad vascular, la respuesta inflamatoria o la quimiotaxis (70).

2.3.4. APOPTOSIS

En 1972, Jhon Kerr, Andrew Wyllie y Alistar Currie, publicaron en el “British Journal of Cancer” un artículo pionero en el que describieron el fallecimiento de células mediante la muerte celular programada, y una secuencia de cambios morfológicos a los que denominaron apoptosis (12), palabra griega que significa “declive”. Los autores hablaban sobre una forma de suicidio celular distinto del proceso necrótico, características que sugerían un proceso controlado (56). Actualmente la apoptosis es uno de los tópicos más estudiados en inmunología y en otras ciencias.

La apoptosis es un proceso fisiológico distinto de la necrosis y posee características diferentes (tabla 1); una de las más importantes es que implica síntesis proteica. En un organismo sano cumple distintas funciones; durante la edad embrionaria y la edad adulta son eliminadas por día hasta 10 mil millones de células anormales o que han cumplido su ciclo de vida, manteniéndose así su número y composición normal (36). El sistema inmunológico tiene un papel regulador al ser responsable de la eliminación de timocitos y linfocitos pro-B incapaces de reconocer antígenos, o que poseen capacidad autoreactiva. Además, regula la destrucción de las células que ya han cumplido su función como productoras de anticuerpos o citocinas, las cuales seguirían siendo generadas de no ser destruidas dichas células (62).

Tabla 1: Diferencias entre apoptosis y necrosis

CARACTERÍSTICA	NECROSIS	APOPTOSIS
Tamaño celular	Aumentado (edema)	Reducido (contracción)
Núcleo	Picnosis	Fragmentación en partes del tamaño del nucleosoma
Membrana plasmática	Rota	Intacta: estructura alterada, en especial la orientación de los lípidos
Contenido celular	Digestión enzimática: puede salir de la célula	Intacto: puede liberarse en cuerpos apoptóticos
Inflamación adyacente	Frecuente	No
Papel fisiológico o patológico	Patológico siempre (culminación de lesión celular irreversible)	A menudo fisiológico. Puede ser patológico tras alguna forma de lesión celular.

La apoptosis es inducida por células NK y CD8, y es controlada por más de 200 genes y 20 moléculas diferentes (46). Su principal característica es la ausencia de inflamación, ya que las enzimas y moléculas intracelulares se desactivan antes de la desintegración celular, la cual ocurre por medio de procesos proteolíticos intracelulares que conducen a la fragmentación del genoma, desarreglo metabólico y desintegración del citoesqueleto.

2.3.4.1. Vías de activación de la apoptosis

Se distinguen en general dos vías de activación; intrínseca o mitocondrial, asociada a cambios en la permeabilidad mitocondrial, y extrínseca o dependiente de receptor, que requiere de señales originadas en los receptores de muerte celular localizados en la membrana plasmática. Ambas vías se encuentran esquematizadas en la Fig. 3, y se puede observar que convergen para dar lugar a la activación de las caspasas, que son las proteínas efectoras de la vía apoptótica. Estas enzimas apoptóticas permanecen en las células normales como proenzimas inactivas hasta ser activadas por alguna de las vías. Actúan por medio de proteólisis consecutivas generándose una activación en cascada. Contienen un residuo de cisteína clave en el sitio catalítico y cortan selectivamente proteínas en los sitios inmediatos en dirección C-terminal a los residuos aspartato (44).

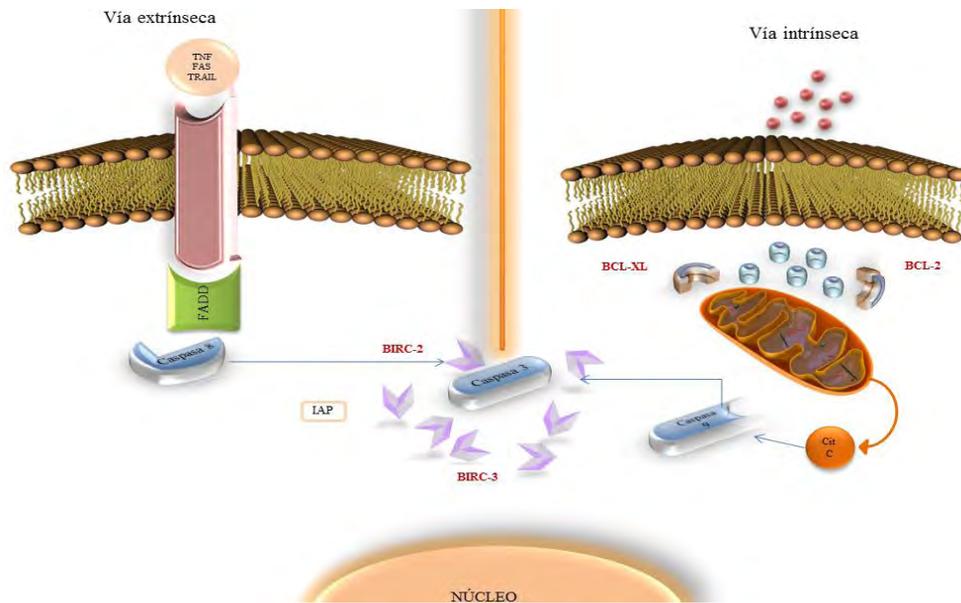


Fig. 3. Esquema en el que se representa la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis: La vía extrínseca es activada vía receptores de muerte que se unen a su ligando, mientras que la vía intrínseca obedece a ausencia de factores de supervivencia y crecimiento, al incremento de radicales libres, entre otras. Ambas vías convergen en la activación de las caspasas.

2.3.4.1.1. Apoptosis vía extrínseca

La apoptosis dependiente de receptor se activa por señales extracelulares. Los iniciadores más importantes de esta vía son una familia de proteínas transmembrana que pertenece a la superfamilia del receptor del TNF, conocidas como “Death Receptors” (DR). Uno de los más estudiados es el denominado sistema FAS/FASL. El FAS Ligando se encuentra en células NK y T citotóxicas almacenado en los lisosomas, hasta que son activados, y en consecuencia el FasL se trasloca a la superficie celular, y se expresa como proteína transmembranal. También se expresa en neuronas y astrocitos. En cuanto al receptor, prácticamente se expresa en todos los tipos celulares de forma constitutiva en su membrana (20). Una célula T es activada por el contacto con un péptido viral que presenta el MHC, se produce la unión FAS/FASL. Esta unión induce la trimerización de FAS. La región citoplasmática de cada Fas, a través de un dominio de muerte, recluta a la molécula adaptadora de dominio de muerte asociada a FAS (FADD), la cual presenta también un dominio efector de muerte en su extremo N-terminal, imprescindible para reclutar las procaspasas iniciales de la cascada, como la procaspasa 8 y poner en marcha la apoptosis (74).

Otro desencadenante importante es el TNF- α que actúa por medio de la proteína receptora del Factor de Necrosis Tumoral tipo 1 Asociada a la Proteína de Dominio de muerte (TRADD) induciendo apoptosis en defensa contra tumores, empleando un mecanismo similar al descrito para FasL (36).

2.3.4.1.2. Apoptosis vía intrínseca

La vía independiente de receptor involucra la activación directa de las caspasas por autoproteólisis inducida por tres proteínas; la proteína adaptadora APAF-1 y la procaspasa 9, que se encuentran en el citosol, y el citocromo C, que se encuentra dentro de la mitocondria y cuya salida hacia el citosol está mediada por proteínas que actúan regulando la integridad membranal de ésta. Una de las familias reguladoras más importantes es la familia Bcl-2, que consta de miembros antiapoptóticos y proapoptóticos. Todos ellos son proteínas transmembranales que pueden participar en interacciones oligoméricas y de cuyas diferencias en la expresión depende la supervivencia de la célula (44,30). Una característica estructural común de los miembros de esta familia es la presencia de regiones homólogas a Bcl-2 denominadas BH. Los dominios BH están implicados en procesos de asociación de cadenas polipeptídicas, formando homo y heterodímeros. De acuerdo a la presencia de estos dominios se agrupan en tres familias: la familia de las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-Xl, Mcl-1 y otras); la familia de proteínas proapoptóticas de tipo "multidominio" (Bax y Bak) y las proteínas proapoptóticas de tipo "BH3-only" (Bid, Bim, Bad y otras). BCL-2 y BCL-XL son las dos proteínas antiapoptóticas predominantes responsables de la reducción de la permeabilidad en la membrana mitocondrial al bloquear mediante su unión a proteínas multidominio, las proteínas proapoptóticas. Por otra parte, las proteínas tipo BH3-only, o la ausencia de señales externas de supervivencia inducen cambios conformacionales en moléculas proapoptóticas como Bax, Bad y Bak, que forman oligómeros que se insertan en la membrana mitocondrial y crean canales de permeabilidad, liberando el citocromo C (43). El efecto ejercido sobre el proceso de apoptosis parece no correlacionarse con el número y tipo de heterodímeros que forman los miembros de esta familia, sino con los niveles libres de Bcl-2 y Bax (50). El citocromo C liberado se une al factor activador de proteasas apoptóticas (Apaf-1). En Apaf-1 está formado por tres dominios: dominio CARD o de reclutamiento de caspasas, dominio de unión a dATP y dominio Y de repeticiones WD-40, que es el sitio de unión al citocromo C. Apaf-1 oligomeriza, lo cual va acompañado por un reclutamiento de procaspasa 9 al motivo CARD para formar un complejo multimérico llamado apoptosoma que activa la caspasa 9, y posteriormente la caspasa 3.

Una vez activadas, las caspasas iniciadoras activan caspasas efectoras, éstas escinden proteínas implicadas en la transcripción, replicación y reparación de DNA; cuyas dianas intracelulares específicas incluyen proteínas de la lámina nuclear y del citoesqueleto (36). Por ejemplo, la caspasa 1 inactiva la enzima topoisomerasa II, esencial en la replicación de DNA, además libera la enzima CAD, DNAsa citoplasmática que en condiciones normales se encuentra acoplada a una molécula inhibidora (ICAD) (12). La caspasa escinde sobre ICAD liberando las endonucleasas responsables de la fragmentación característica del DNA en la apoptosis, en donde el DNA se condensa y se produce un clivaje de éste en fragmentos oligonucleosómicos múltiples de 180-200pb (criterio bioquímico que se utiliza para la detección de apoptosis). Otra caspasa de gran importancia es la caspasa 3; ésta inactiva la enzima poli ADP-ribosa (PARP), primera proteína en ser identificada como sustrato de las caspasas, que actúa catalizando la síntesis de poli ADP-ribosa que se une en las cadenas dañadas de DNA reparándolo (13).

2.3.4.2. INHIBIDORES DE LAS CASPASAS

Existen dos mecanismos importantes de regulación de la apoptosis, uno de ellos consiste en la regulación a nivel de la membrana mitocondrial, fundamentada en la expresión de genes de la familia Bcl-2; Ya se mencionó que los miembros antiapoptóticos de esta familia limitan el reclutamiento de los componentes del apoptosoma, inhibiendo por tanto la apoptosis a nivel mitocondrial. Sin embargo existen otras moléculas que regulan la apoptosis inhibiendo directamente la acción de las caspasas, entre las cuales se encuentran las proteínas inactivadoras de la apoptosis (IAP).

Las IAP's fueron identificadas como proteínas víricas que inhiben la muerte celular. Se caracterizan por poseer uno o más dominios de 70aa que contienen motivos dedos de zinc, denominados repeticiones baculovíricas (BIR) esenciales para la actividad antiapoptótica y que a su vez pueden ser bloqueados por la proteína Smac/Diablo (13). Estas proteínas se unen de manera específica a las caspasas iniciadoras o efectoras, inhibiendo la apoptosis; la caspasa iniciadora 9, así como las efectoras 3, 6 y 7 son inhibidas por BIRC-2, BIRC-3 y BIRC-4 (47).

2.3.4.3. CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LA APOPTOSIS

Como se observa en la Fig. 4, durante la apoptosis se genera una secuencia de cambios morfológicos que desensamblan ordenadamente la célula. Las primeras descripciones de este mecanismo, se realizaron por microscopía, en donde se observaron los cambios morfológicos en membranas. Posteriormente se utilizó microscopía electrónica, técnica con la que es posible visualizar las alteraciones a nivel ultraestructural, el hinchamiento celular, la formación de vesículas en la membrana celular, los cambios en el tamaño de las mitocondrias, e incluso el estado de la cromatina (43).

Uno de los primeros eventos es la disminución de la adhesión celular y los contactos intercelulares, posteriormente se pierde la integridad en la membrana plasmática y ocurre un cambio en la distribución de los fosfolípidos (57). El volumen celular y el núcleo se reducen, el citoplasma se condensa y la cromatina se compacta, adquiriendo una distribución marginal alrededor de la envoltura nuclear, las proteínas del citoesqueleto se desensamblan y la función mitocondrial se reduce. Finalmente la célula colapsa, produciéndose una escisión en múltiples estructuras, denominadas cuerpos apoptóticos, constituidos por partes del citoplasma y organelos rodeados de membrana plasmática.

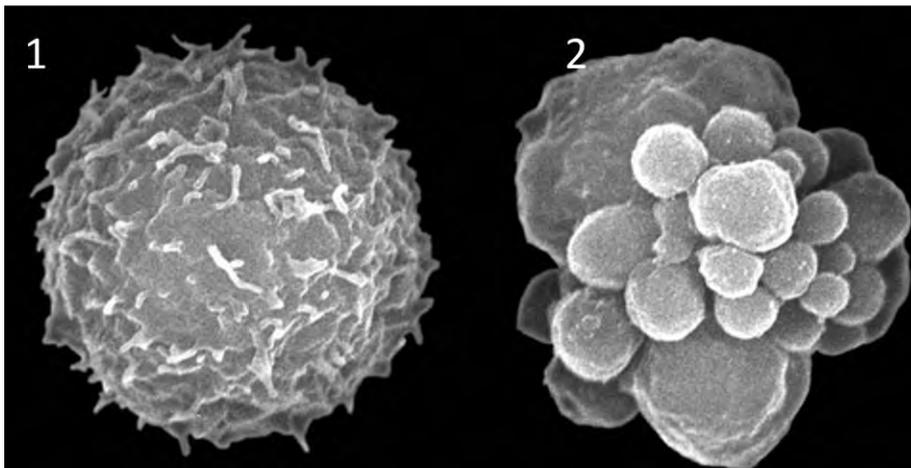


Fig. 4. Microfotografía en donde se compara la morfología normal celular (1) y la morfología de una célula en estado de apoptosis (2), en la que ya se han formado la mayoría de las vesículas apoptóticas listas para ser fagocitadas por los macrófagos. Estas vesículas son retiradas del espacio extracelular mediante un mecanismo que permite el reclutamiento de células fagocíticas; como ya se mencionó, ocurre un cambio en la bicapa lipídica, que deriva en la externalización de la fosfatidilserina, un fosfolípido que en condiciones normales se expresa en la cara interna de la membrana, y que al exponerse en la superficie es reconocida por un receptor especializado del macrófago, lo que explica la ausencia de una respuesta inflamatoria al impedir la liberación de los contenidos celulares al espacio extracelular (45).

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

Actualmente se ha incrementado el uso de péptidos como agentes inmuno-diagnóstico y terapéuticos debido a sus numerosas ventajas, como lo son su alta especificidad y actividad, baja toxicidad y escasos efectos secundarios, además de una mínima probabilidad de acumularse en el organismo debido a su vida media relativamente corta. En la actualidad se están usando péptidos en diferentes líneas de investigación y tratamiento ya sea como antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, en enfermedades cardiovasculares, cáncer, desórdenes neurales y anti-inflamatorios (1, 32), en este contexto es posible mencionar el FILM; un pentapéptido termoestable. El FILM proviene posiblemente de un péptido mayor o una proteína que se escinde por la acción de una proteasa tipo tripsina/serina (60, 68). Fue aislado por ultrafiltración a partir del sobrenadante en cultivos axénicos de *E. histolytica* y cromatografía líquida de fase reversa (HPLC). A continuación se sometió a espectrometría de masas y finalmente se secuenció por la técnica de degradación de Edman, con la se obtuvo la estructura primaria del factor: Met-Gln-Cis-Asn-Ser de 583 Da (MQCNS) (37). Posteriormente se generó un péptido sintético con la misma secuencia del FILM, un análogo que difería solo en la posición dos pero que conservaba el segmento en estudio, y un tercero con los mismos aminoácidos pero en diferente posición, “scrambled”. El primero y segundo, reprodujeron los efectos biológicos del FILM nativo, mientras que el scrambled carecía de ellos. Con ello se corroboró el segmento ---Cis-Asn-Ser--- observado en la figura 6, como el grupo farmacóforo en la secuencia del FILM, el cual es relevante e imprescindible con respecto a la actividad anti-inflamatoria del mismo (69, 49).

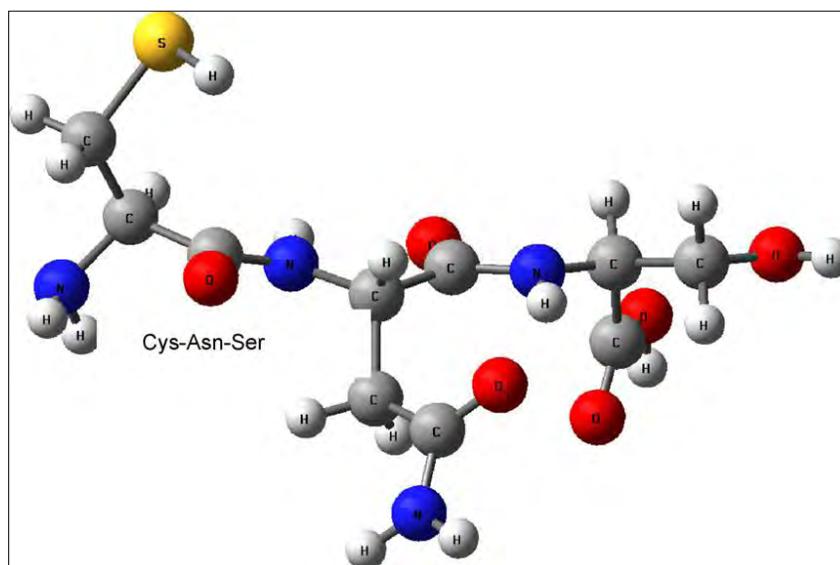


Fig. 6. Estructura geométrica del tripéptido Cys-Asn-Ser, región identificada como grupo farmacóforo del FILM.

In vitro el FILM inhibe la locomoción de monocitos humanos (MP) (de ahí su nombre), sin afectar la locomoción de neutrófilos polimorfonucleares (nPMN) y eosinófilos (ePMN), cancela virtualmente la producción de intermediarios reactivos del oxígeno [ROI (H_2O_2 , O_2-OH)] y la síntesis inducida de óxido nítrico [RNI (ON)] (en MP y nPMN sin afectar a ePMN) (61, 59), induce un aumento importante de microtúbulos asociados al centriolo y la concentración del cAMP mientras que disminuye el cGMP (23, 58).

In vivo el FILM retarda el arribo de mononucleares en ventanas de Rebuck en piel humana e inhibe la hipersensibilidad retardada cutánea al dinitroclorobenceno (DNCB) en cobayos (24, 38), abate la expresión de moléculas de adhesión VLA-4 y VCAM-1 en endotelio vascular pos-capilar de gerbos y disminuye la formación de adherencias pericárdicas en ratas al aplicar el FILM directamente en el sitio de lesión posterior a una intervención quirúrgica (21, 25), mientras que la inmunización con un tetramero derivado del pentapéptido protege a gerbos del absceso hepático amebiano experimental (22). Estudios recientes demostraron que el FILM tiene capacidad neuroprotectora en lesiones de médula espinal mediante la disminución de la producción de óxido nítrico, lipoperoxidación y la modificación en la expresión de genes como iNOS, IL-10 y TGF- β favoreciendo la supervivencia neuronal (8).

Estudios de análisis de microarreglos, citometría de flujo, PCR tiempo real y determinación de proteínas por el método inmuno-enzimático (ELISA), en diferentes líneas celulares (premonocítica U-937 y de fibroblastos MRC-5) y en células CD4+, han mostrado que el FILM tiene un importante papel en el equilibrio celular Th1-Th2 favoreciendo éste último ya que inhibe la producción de interleucinas pro-inflamatorias (IL-10, IL-6, IL-12, INF- γ) y favorece la producción de citocinas anti-inflamatorias (IL-10 e IL-1r), haciendo evidente que el balance homeostático entre estas citocinas sea crítico en la modulación de la respuesta inflamatoria (66, 72).

El pentapéptido tiene efecto sobre la expresión de genes involucrados en el ámbito inflamatorio, proliferación, quimiotaxis, angiogénesis, producción de metabolitos del oxígeno, síntesis/degradación de matriz extracelular, homeostasis, vasculogénesis y guía axonal, modificando la expresión de genes que intervienen con estos procesos, tales como: factores de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), trombopoyetina (Tpo), neuropilina, follistatina, ephrinas, factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores neurotróficos (BDNF), y disminuye la expresión de quimiocinas (MIP-1, MIP-3 y MIG) entre otras (66, 67). Los resultados anteriores sugieren que el FILM actúa principalmente mediante dos vías de señalización: NF- κ B y MAPK cinasas, vías que participan activamente en una respuesta inmunológica (66, 72, 73) lo cual lo hace

objeto de este estudio. Todos estos resultados sugieren la posible aplicación del oligopéptido con efectos anti-inflamatorios selectivos en la clínica.

2. HIPÓTESIS

En base a los efectos que tiene el FILM sobre la expresión de genes, éste modificará la expresión de genes antiapoptóticos en un modelo animal de lesión moderada de la médula espinal.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos del FILM sobre la expresión de los genes antiapoptóticos BIRC-2, BIRC-3, BCL-XL, BCL-2 y, a diferentes intervalos de tiempo en ratas Sprague Dawley hembras con lesión moderada de la médula espinal.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Estandarizar:
 - Procedimiento quirúrgico de laminectomía
 - Lesión moderada de la médula espinal
 - Extracción de RNA y síntesis de cDNA
 - Técnica de PCR Tiempo real
 - Electroforesis

- ✓ Amplificar los genes BIRC-2, BIRC-3, BCL-XL, y BCL-2

- ✓ Realizar el análisis de la expresión relativa de los genes antes mencionados, en los grupos de FILM y PBS con respecto a la expresión basal de los mismos en el grupo control.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Población objetivo: Ratas Sprague Dawley

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

Tamaño de la muestra: Se utilizaron 15 ratas por cada grupo, en 4 tiempos diferentes (3hrs, 3, 7, 14 y 21 días). Los experimentos se realizaron por duplicado.

Grupo 1. Ratas con LTME + administración de PBS

Grupo 2. Ratas con LTME + administración de FILM

Grupo 3. Ratas control con laminectomía, sin lesión ni tratamiento (grupo SHAM)

5.1. Lesión traumática de la médula espinal (LTME)

Las ratas fueron anestesiadas mediante una inyección intramuscular de una mezcla de clorhidrato de xilazina (10mg/kg) y ketamina (50 mg/kg) 1:1. Treinta minutos después de dicha inyección y previa asepsia de la región toraco-lumbar, se realizó un corte longitudinal y se realizó una laminectomía a nivel de la 9^a vértebra torácica hasta exponer la médula espinal. Posteriormente se realizó la LTME mediante una contusión. Para la contusión, se dejó caer un cilindro de 10 g de una altura de 25 mm sobre el sitio expuesto, utilizando el impactador (Universidad de Nueva York NYU, USA), un aparato que ha demostrado infligir una lesión por contusión en la médula espinal bien calibrada (7).

5.2. Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM)

El FILM (Met-Gln-Cis-Asn-Ser) se obtuvo de American Peptide Company Co., Sunnyvale, CA, USA. (>95% de pureza) y se disolvió a una concentración de 4µg/µl en amortiguador salino de fosfatos pH 7.4 (PBS). Las soluciones de trabajo se probaron para demostrar que estuvieran libres de endotoxina (LPS <0.3 pg.) usando el ensayo de *Limulus* (Amoebocyte Lysate Endosafe KTA Charles River Endosafe INC, Charleston, SC, USA) y se guardaron a -70 °C, hasta su uso.

5.3. Administración del tratamiento

Posterior a la lesión, se aplicó 50µl de la solución de FILM (200 µg) o 50µl de PBS, según sea el grupo experimental, directamente en el sitio donde el impactador produjo la lesión. El sitio quirúrgico fue suturado y a los animales se les proporcionó el cuidado requerido.

5.4. Cuidados pos-operatorios

Las ratas lesionadas se colocaron sobre aserrín estéril y se les administró agua filtrada, ambos se cambiaron diariamente. La vejiga fue evacuada con ayuda de un masaje en el abdomen 2-3 veces al día hasta que se logró la función normal de la micción. Todas las ratas fueron monitoreadas cuidadosamente para detectar y evitar infección en el tracto urinario u otro signo de enfermedad sistémica. Durante los primeros diez días posteriores a la lesión y cuando se presentó hematuria, los animales recibieron un tratamiento de enrofloxacin (PARFARM, México, D.F., México) en el agua con una dosis de 64 mg/ Kg/ día.

5.5. Obtención de la médula espinal

Después del tiempo establecido (3 hrs, 3, 7,14 y 21 días), la rata se colocó en posición dorsal para hacer un corte en la piel para dejar expuesta el área del sitio de la contusión. Se cortó el músculo a los lados del sitio de lesión, y las apófisis espinosas de las vértebras, para liberar poco a poco y exponer mediante laminectomía 1 cm de la médula espinal (0.5 cm caudales y 0.5 cm craneales al sitio de lesión) y poder retirarla del canal vertebral, para después colocarla en 5 ml de solución de reactivo de trizol (Invitrogen, Rife Technologies, Carlsbad, California, USA).

5.6 Obtención de RNA total (RNAt).

La muestra anterior se homogenizó y se centrifugó a 10,000 rpm/10 min/4°C y se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregaron 12.5 µl de glicógeno (20 mg/ml) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) se homogenizó ligeramente con vortex y se colocó en hielo por 5 min, posteriormente se agregaron 220 µl de cloroformo, se homogenizó y colocó en hielo durante 5 min, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm/15 min/4°C y se obtuvo la parte superior a la cual se le agregaron 550 µl de isopropanol, se homogenizó y se colocó en hielo por 15 min, se centrifugó a 10,000 rpm /15 min/ 4°C y se eliminó el isopropanol, al paquete obtenido se le adicionó 1000 µl de etanol al 80%, se homogenizó y centrifugo a 6000rpm / 5 min/4°C, se eliminó el etanol y las

muestras se colocaron en un baño María a 3 min /45°C y se dejaron secar a temperatura ambiente 10-15 min y se resuspendió en 22-50 µl de agua inyectable estéril precalentada a 45°C, las muestras de RNA total (RNAt) se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

5.7. Cuantificación y verificación de la integridad del RNAt

Se mezclaron 2 µl de las muestras de RNAt obtenidas con 98 µl de agua inyectable y se cuantificó la concentración de RNA a 260 nm y la pureza a 260/280 nm (Gen Quant Pro-spectrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), la integridad del RNA se verificó en un gel de agarosa al 1.8% (Promega, Madison. WI, USA).

5.8. Síntesis de cDNA.

Una vez que se determinó la concentración e integridad del RNAt de cada una de las muestras, se llevó a cabo la síntesis de cDNA de cada una de ellas utilizando un estuche comercial. (Thermo Script™ RT-PCR System; Invitrogen®, USA). Se programó el equipo de acuerdo al inserto (Tabla 2) utilizando el equipo de PCR convencional (PTC-100 Programable Thermal Controller Invitrogen®, Corporation foster City, California; Peltier-effect cycling, MJ research, Inc. USA).

Tabla2: Programa utilizado para la RT-PCR de RNA obtenido de médula espinal de los grupos experimentales FILM, PBS y control.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	
1	65	5	*Colocar mezcla de reacción 1
2	4	1	*Colocar mezcla de reacción 2
3	55	50	
4	4	1	Colocar 1µL de Thermo Script
5	85	5	
6	37	20	
7	4	10	

*Mezcla de reacción 1: 1µL Oligo DT 0.1M, 1µl DNTP mix 10mM, 2µg RNAt; llevar a un volumen final de 13µL con agua grado PCR.

*Mezcla de reacción 2: 4µL de buffer cDNA 5X, 1µL DTT 0.1M, 1µL RNAsa out (40U/µL)

5.1.9. Generación de iniciadores para los genes en estudio.

Las secuencias específicas de DNA complementario (cDNA) se obtuvieron de la base de datos del “GenBank” del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI), los iniciadores utilizados para la amplificación (Tabla 3.) fueron diseñados con el programa *Custom Primers-Oligo Perfet™ Designer* y el software *Oligo™*, la concentración usada fue de 10pmol. Se utilizó el gen hipoxantin fosforibosil transferasa (HPRT, por sus siglas en Ingles) como gen constitutivo.

Tabla 3: Iniciadores generados para la amplificación de los genes BIRC-2, BIRC-3, BCL-2 y BCL-XL.

GEN	INICIADOR DERECHO	INICIADOR REVERSO	GENE BANK ID
BIRC-2	AGC TTG CAA GTG CTG GAT TT	CTC CTG ACC CTT CAT CCG TA	NM_021752.2
BIRC-3	CCC CAG GAC TTT GTA CCT CA	ACA GAC CTG GTT CGT GCT CT	NM_023987.3
BCL-XL	GCA GGC CAC TCT ATC TCC AG	TTC CCT CAG ACC CTG TGA AC	NM_001033672.1
BCL-2	GGC TGG CAA TTG ATG GAT TT	ATC ATG ACC GTT CAT GCG TA	NM_001033670.1
HPRT	GCA GAC TTT GCT TTC CTT GG	CGG CTG TCT TTT AGG CTT TG	NM_012583.2

5.1.10. PCR Tiempo Real

El PCR Tiempo-Real (LightCycler® FastStar DNA Master Plus SYBR GREEN I) Roche Applied Science, Mannheim, Germany) se realizó en un capilar para el equipo de Light Cyler en un volumen de 10 µl conteniendo: 1 µl, 5mM MgCl₂, 0.3-0.5 µM de cada uno de los iniciadores, 2 µl de la mezcla de reacción LightCycler SYBR GREEN I y 0.2 µl de la mezcla de enzima PCR (Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

El protocolo consistió de cuatro programas: 1) Pre-incubación, 2) Amplificación, 3) Curva de fusión, 4) Enfriamiento. Para cada programa se estandarizaron los tiempos y las temperaturas de reacción dependiendo de los iniciadores generados y del tamaño del amplificado (Tabla 4).

Las curvas de amplificación se analizaron usando el software proporcionado por el fabricante (Software de LightCycler, versión 3.5, Roche Molecular Biochemicals). La identificación de los productos de PCR se confirmó por el análisis de las curvas de disociación. Las reacciones de cada muestra se realizaron por duplicado, se usó un control negativo sin RNA como templado. Las concentraciones relativas se calcularon por el método Ct (número de ciclos en el que se inicia la amplificación exponencial del templado) y se obtuvo un promedio de los valores de cada muestra, así como un promedio de expresión de los genes seleccionados el cual se comparó con la expresión del gen constitutivo HPRT normalizando la expresión de los genes BIRC-2, BIRC-3, BCL-XL y BCL-2.

Tabla 4: Condiciones para llevar a cabo la amplificación de los genes BIRC-2, BIRC-3, BCL-XL y BCL-2.

	Ciclos	Segmento	Temperatura °C	Tiempo	Modo de adquisición	Modo de Análisis
Preincubación	1		95	10seg	Ninguno	Ninguno
		Desnaturalización	95	10seg	Ninguno	
Amplificación	45	Alineación	*X	10seg	Ninguno	Análisis cuantitativo
		Extensión	72	*T	Simple	
		Desnaturalización	95		Ninguno	
Fusión	1	Alineación	65	1min	Ninguno	Curvas de fusión
		Fusión	95		Continuo	
Enfriamiento	1		40	30seg	Ninguno	Ninguno

*X: La temperatura de alineación es de 60° para los genes BIRC-2, y BIRC-3, y HPRT, y de 62° para los genes BCL-2 y BCL-XL.

*T: El tiempo de alineación es de 8seg para los genes BIRC-2 y BIRC-3, de 9seg para el gen BCL-XL, de 8seg para el gen HPRT y de 7seg para el gen BCL-2.

6. ANÁLISIS DE PERFIL DE EXPRESIÓN

El análisis de expresión relativa se realizó con el método conocido como doble derivada, sugerido por el proveedor, (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) para el análisis de expresión de genes en PCR tiempo real. Para el análisis se obtienen los Ct's de cada grupo experimental (Cycle Threshold, o Cp que significa punto de cruce), cifra que indica el ciclo umbral en el que es detectada la amplificación exponencial del templado. Se realiza un análisis comparativo dato a dato de los Ct's para cada grupo de estudio, con respecto a los Ct's del gen constitutivo HPRT. Donde Delta 1 ($\Delta 1$) corresponde a la expresión del gen problema menos la expresión del gen constitutivo HPRT, y Delta 2 ($\Delta 2$) resulta de la restar a $\Delta 1$ de las ratas con tratamientos, el valor $\Delta 1$ de las ratas Sham, el cual corresponde a la expresión basal del gen problema en ratas sanas.

Relación de expresión bajo la fórmula:

$$\frac{\text{Cp del gen problema (tratado FILM o PBS)/Cp del gen constitutivo (tratado FILM o PBS)}}{\text{Cp del gen problema (sin tratar, ratas SHAM)/Cp gen constitutivo (grupo SHAM)}}$$

Finalmente cada $\Delta 2$ se coloca como la potencia negativa de 2. Al graficar estos resultados puede observarse la expresión relativa del gen problema en ratas con y sin tratamiento con respecto a la expresión relativa del gen en ratas Sham, a través de los diferentes tiempos de evaluación.

7. DESCRIPCIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES

- a) Administración del FILM después de una LTME, y en el mismo sitio, se administró, por difusión, 50 μ l (4 μ g/ μ l) de una solución de FILM a una concentración final de 200 μ g. Al finalizar se suturó la zona de la cirugía.

- b) Administración del PBS después de una LTME, y en el sitio se administró por difusión, 50µl de una solución de PBS pH 7.4. Al final se suturó la zona de la cirugía.

VARIABLES DEPENDIENTES

- a) LTME. Daño en la médula espinal causado por el impacto con un cilindro de acero de 10g de peso que se deja caer de una altura de 25 mm. El daño origina inflamación y destrucción del tejido de la médula espinal, así como pérdida parcial de la actividad motora en las extremidades posteriores del 100% de los animales.
- b) Perfil de expresión de genes en los grupos experimentales de ratas con LTME: ratas con LTME tratadas pos-lesión con PBS y ratas con LTME tratadas pos-lesión con FILM.
- c) Perfil de expresión de genes en ratas SHAM.
- d) Cuantificación de la expresión de genes por Tiempo Real.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

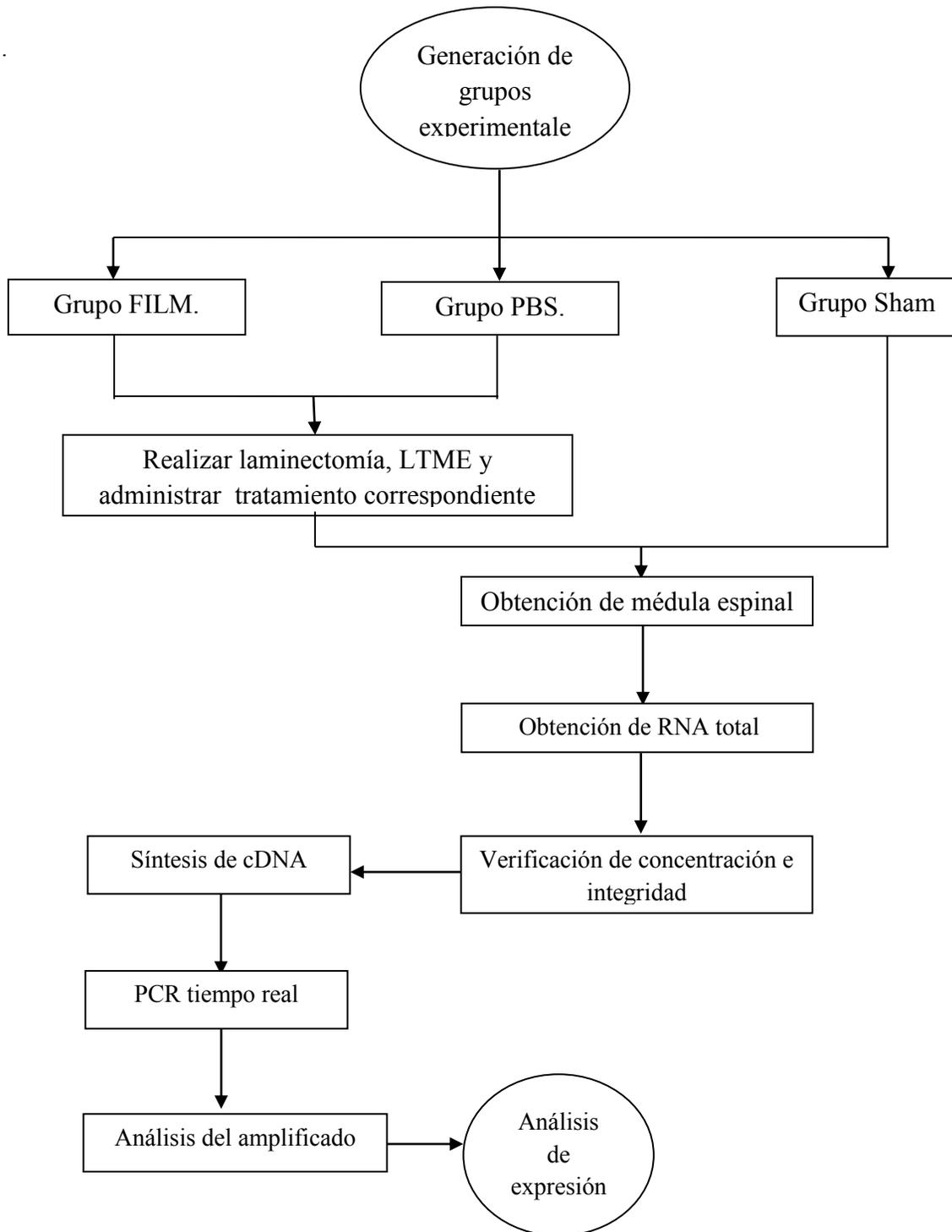
Para la realización del presente proyecto, se tomaron en cuenta los lineamientos establecidos por el reglamento de la Ley general de salud en materia de investigación para la salud (Título séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación) (41), la Norma Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NOM-062-Z00-1999) apartado 5.1 para roedores (51) y la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (27).

Se utilizaron ratas Sprague Dawley, hembras de 12 a 15 semanas de edad, con un peso aproximado entre 200- 250 g, las cuales se alojaron en cajas de policarbonato de piso sólido, se les proporcionó alimento esterilizado, con 18% de proteína cruda, 6% de grasa y 3% de minerales. El agua de beber fue potable y se esterilizó en autoclave. La administración de agua y alimento fue de libre acceso. Se les dieron los cuidados y atención necesarios.

- a) Se mantuvieron en el bioterio del Proyecto Camina que cuenta con todos los requisitos específicos establecidos.

- b) La salud, manipulación y alimentación de los animales se realizó por personal especializado del bioterio.
- c) Los procesos de cirugía, analgesia, anestesia y recuperación, estuvieron a cargo de Médicos Veterinarios Zootecnistas (colaboradores del protocolo) que además finalizaran con el proceso de eutanasia cuando el protocolo lo requirió.

9. DIAGRAMA DE FLUJO



10. RESULTADOS

10.1. Laminectomía y LTME

Se llevó a cabo la laminectomía en los grupos experimentales de animales tratados con FILM o PBS. Como se observa en la Fig. 7, la médula queda expuesta, lo que hace posible la LTME con el impactador. Después de hacer la lesión se aplicó el tratamiento correspondiente, se suturó cada animal y se realizaron cuidados postoperatorios pertinentes.

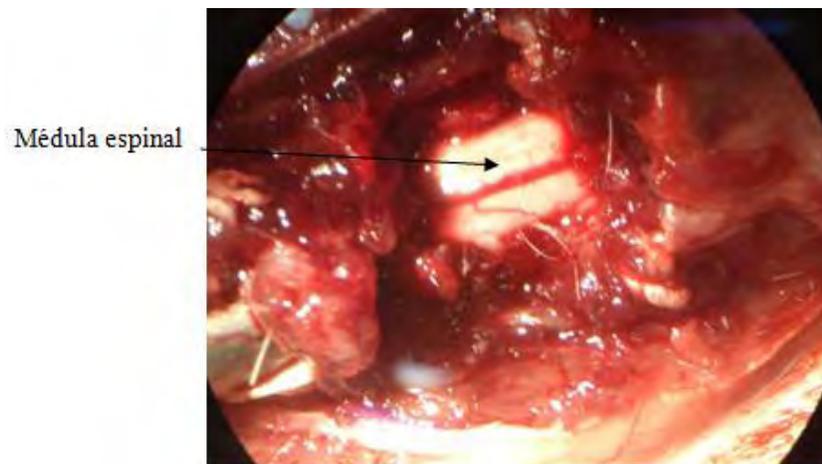


Figura 7. Fotografía de médula espinal expuesta por laminectomía (Microscopio estereoscópico 4X).

10.2. Obtención de RNAt

Se confirmó la integridad del RNAt (Fig. 8) obtenido a partir de la médula espinal de los grupos experimentales, en un gel de agarosa 1.8% donde se observaron las bandas características correspondientes a las fracciones de RNA ribosomal 28S y 18S de cada grupo experimental (FILM, PBS y Sham).

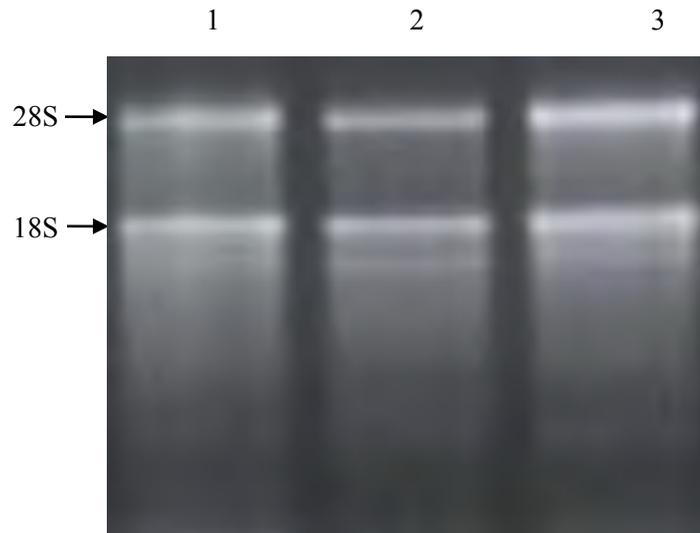


Figura 8. Integridad del RNAt obtenido por el método de extracción con trizol de los diferentes grupos experimentales. 1) LTEM + PBS, 2) LTME + FILM, 3) SHAM

10.3. Amplificación obtenida mediante PCR en tiempo real

Se llevó a cabo la amplificación de los genes BIRC-2, BIRC-3, BCL-2, BCL-XL y HPRT. En los conjuntos de gráficos siguientes, se observa la señal que emite el amplicón de cada gen durante los distintos tiempos de evaluación. En el eje X se representa el ciclo de amplificación o C_p , el cual corresponde al número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base. En cuanto al eje Y, corresponde a la cuantificación del producto obtenido (en cualquier momento de la amplificación) expresado como logaritmo, el cual representa la fase exponencial de amplificación.

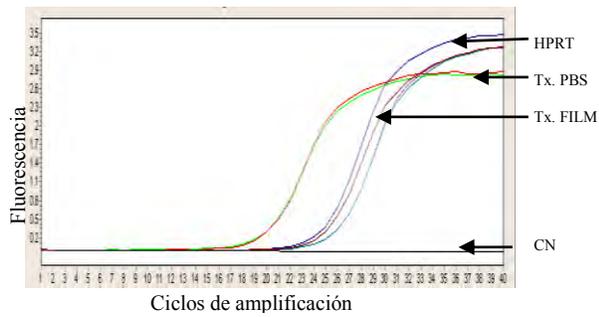
De acuerdo a los grupos en material y métodos:

Las curva azules representan al grupo tratado con PBS, las curvas rojas al grupo tratado con FILM, y en color gris se observa expresión del gen constitutivo y en negro el control negativo. Finalmente los gráficos corresponden al grupo: A) 3 hrs, B) 3 días, C) 7 días, D) 14 días y, E) 21 días.

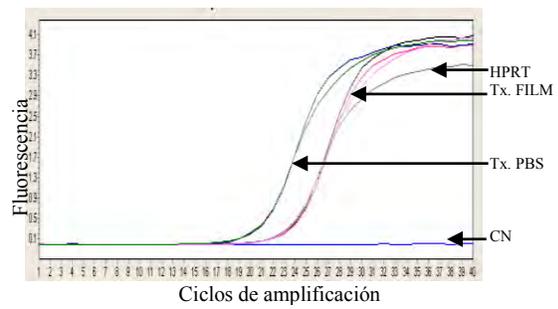
10.3.1. Amplificación del gen BIRC-2

En los siguientes gráficos (A-E) se observa el comportamiento del gen BIRC-2, en el cual, la detección de las muestras correspondientes al grupo FILM ocurre antes que aquellas pertenecientes al grupo PBS, tendencia que continua hasta el final de la evaluación a los 21 días.

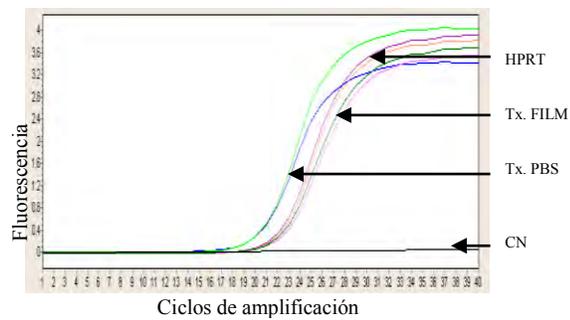
A)



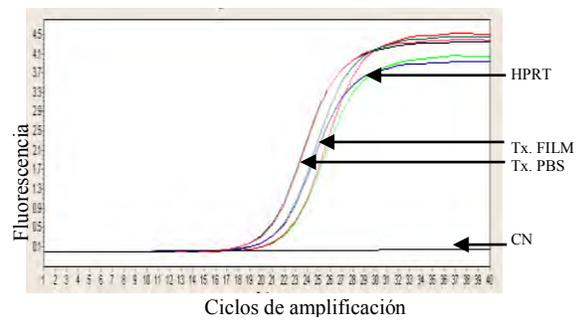
B)



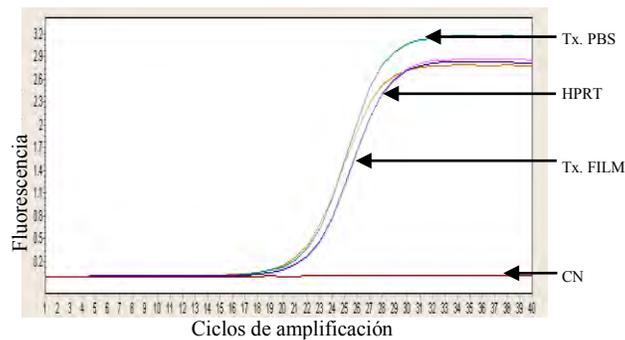
C)



D)



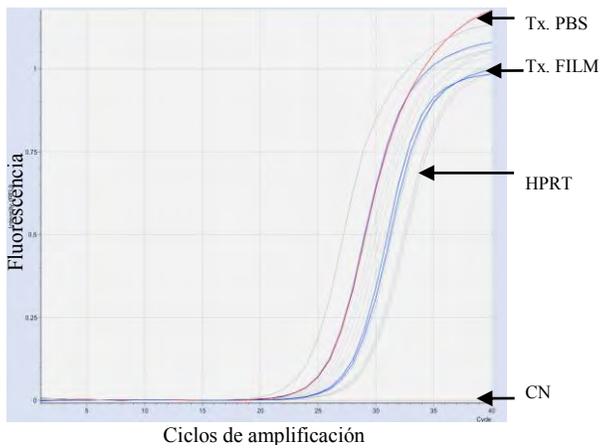
E)



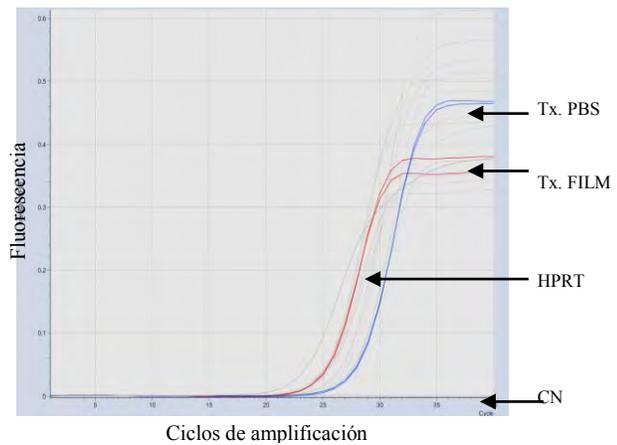
10.3.1. Amplificación del gen BIRC-3

En los siguientes gráficos (F-J) se observa el comportamiento del gen BIRC-3. Las muestras correspondientes al grupo FILM son detectadas con un menor número de ciclos de amplificación que aquellas pertenecientes al grupo PBS en todos los tiempos de evaluación.

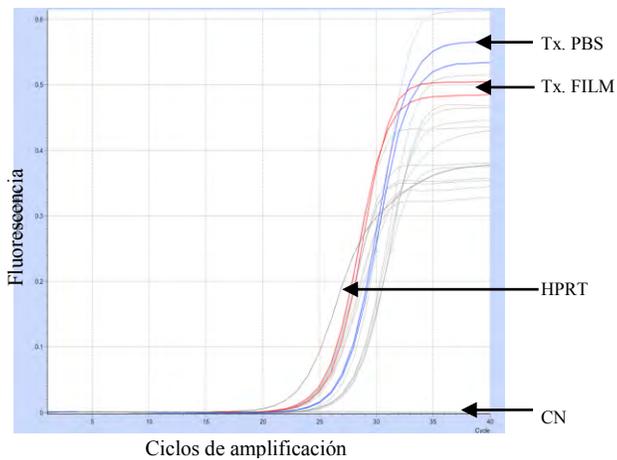
F)



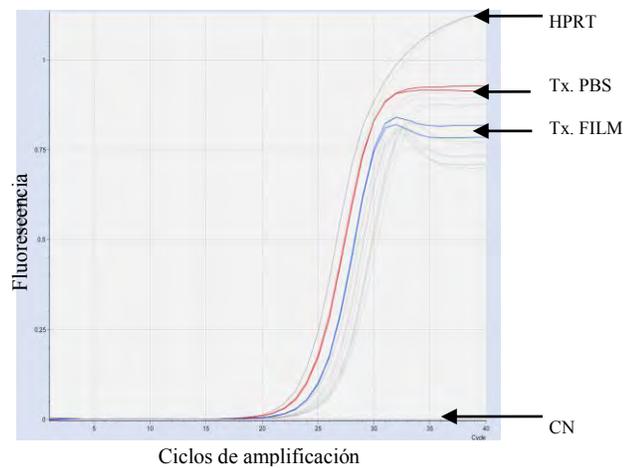
G)



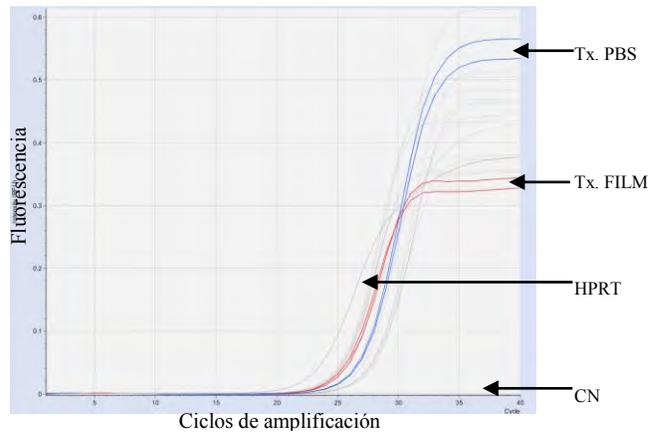
H)



I)



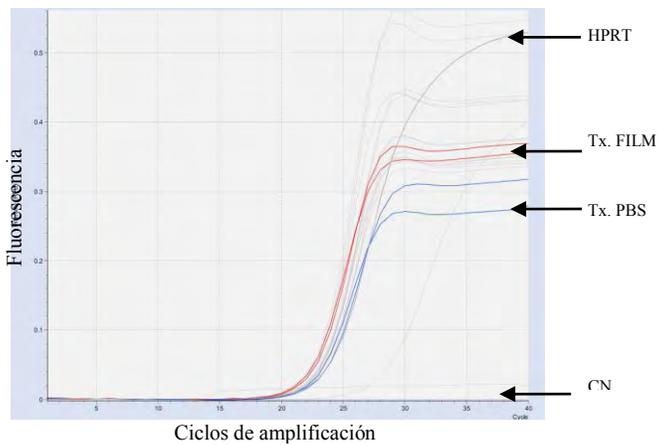
J)



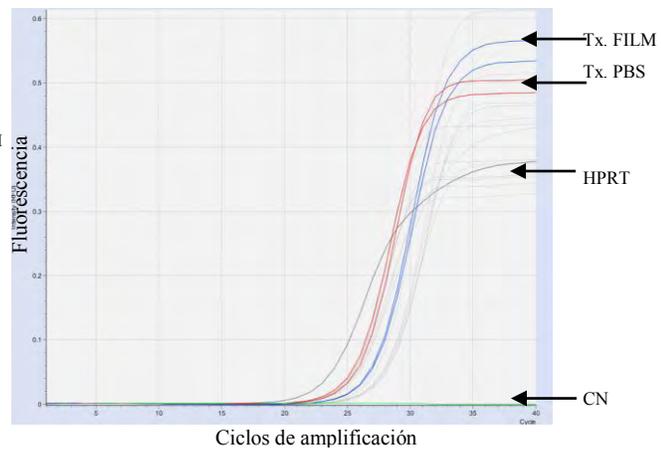
10.3.3. Amplificación del gen BCL-XL

En los siguientes gráficos (K-O) se observa el comportamiento del gen BCL-XL, en el cual, la detección de las muestras correspondientes al grupo FILM ocurre antes que aquellas pertenecientes al grupo PBS en todos los tiempos de evaluación. Esta diferencia entre una y otra expresión disminuye a su vez a medida que el tiempo de evaluación aumenta. De manera que para la evaluación a los 21 días, el valor del Cp del grupo FILM es similar a la del grupo PBS.

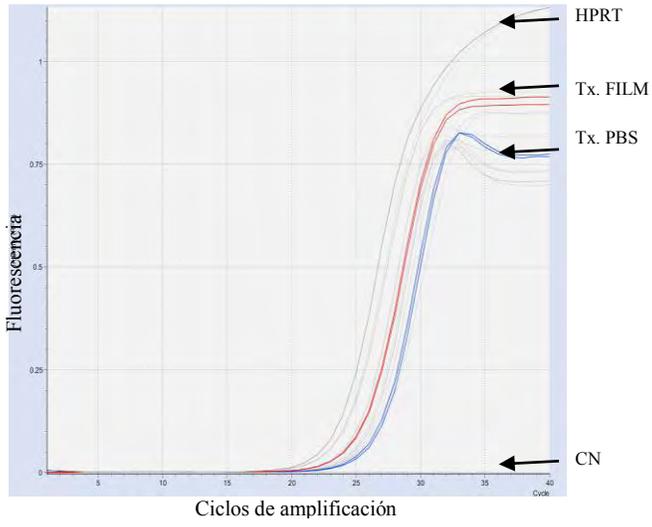
K)



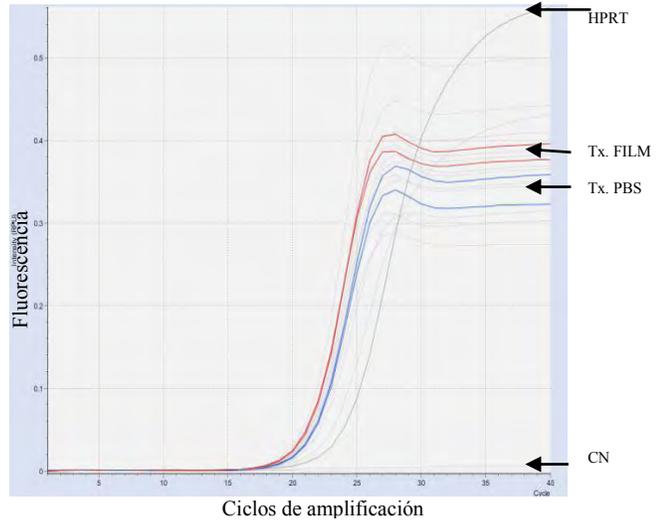
L)



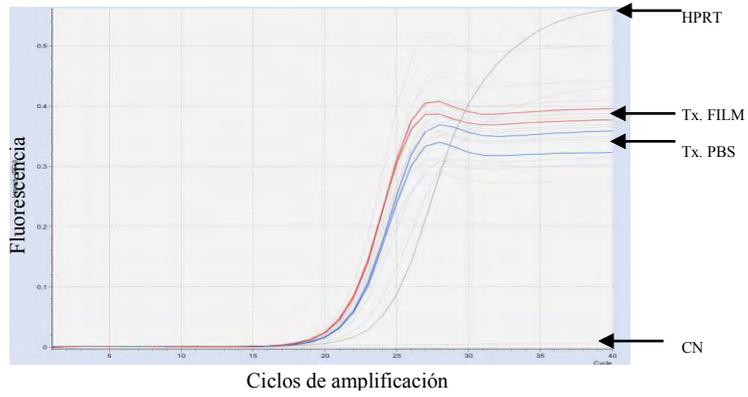
M)



N)



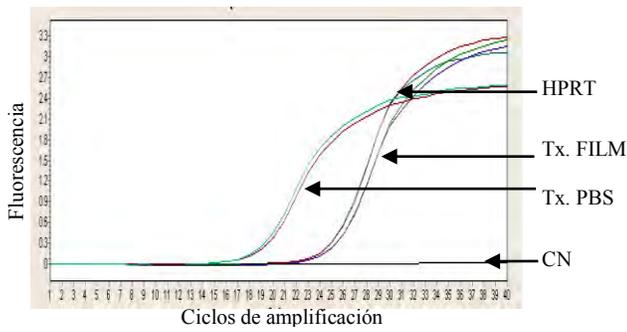
O)



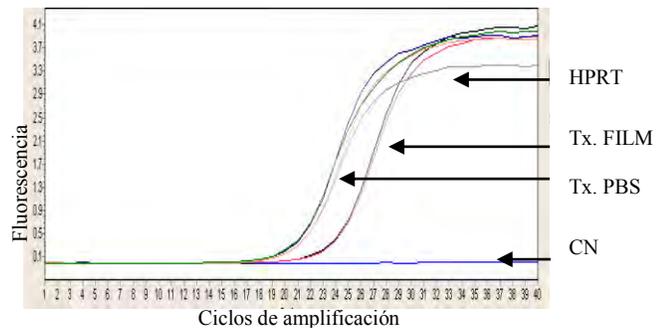
10.3.4. Amplificación del gen BCL-2

En los siguientes gráficos (P-T) se observa el comportamiento del gen BCL-2. Como en los casos anteriores, es posible observar que las muestras correspondientes al grupo FILM son detectadas con un menor número de ciclos de amplificación que aquellas pertenecientes al grupo PBS en todos los tiempos de evaluación.

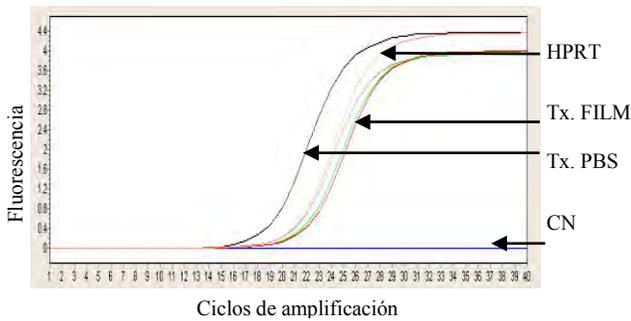
P)



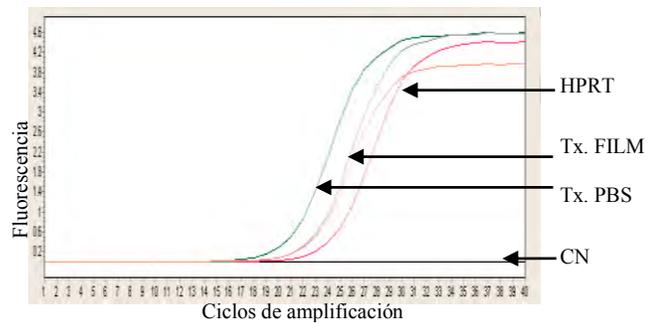
Q)



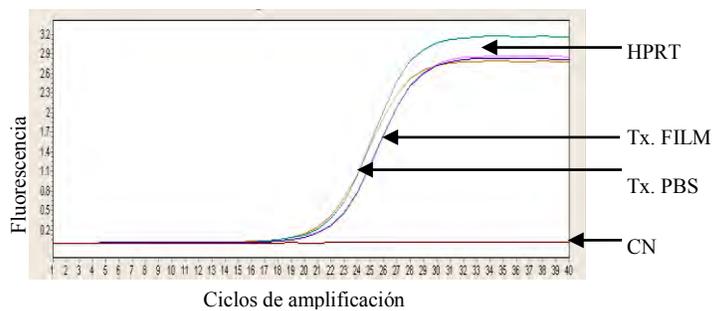
R)



S)



T)



10.4. Identificación de productos de PCR.

La caracterización de los productos de PCR obtenidos al amplificar cada gen se confirmó por el análisis de su respectiva temperatura de fusión o T_m , parámetro que es específico para un fragmento amplificado, haciendo posible su identificación. A continuación se muestra uno de los gráficos (Gráfico 1) obtenidos en el que se distinguen los picos concretos tanto para el gen en estudio como para el gen constitutivo.

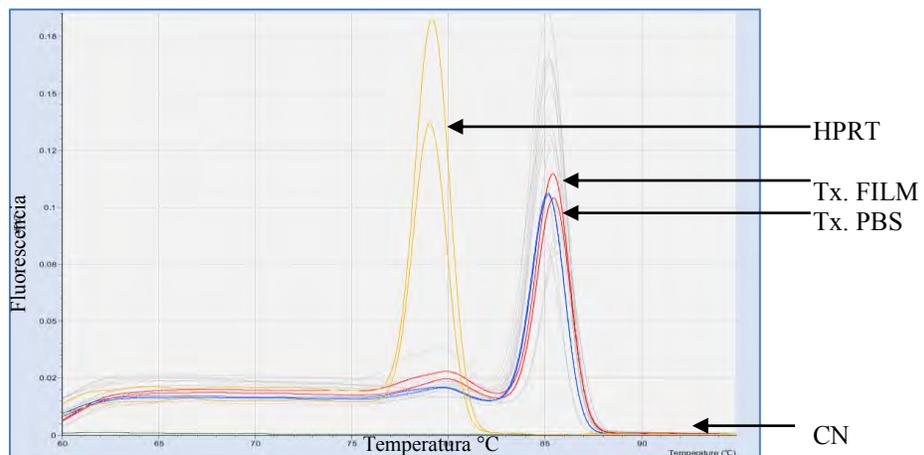


Gráfico 1: Identificación de los productos de PCR para el gen BIRC-3. El pico en las muestras de FILM (rojo) y PBS (azul) es el mismo (T_m aproximada de 85°C), mientras que el gen HPRT (naranja) tiene un pico diferente (T_m aproximada de 78°C). Esta identificación se realizó en cada uno de los genes y tiempos de evaluación realizados.

Posteriormente se realizó su identificación por medio de una electroforesis en gel de agarosa (Figura 10.) en la que se observaron las bandas de amplificación específicas de cada gen.

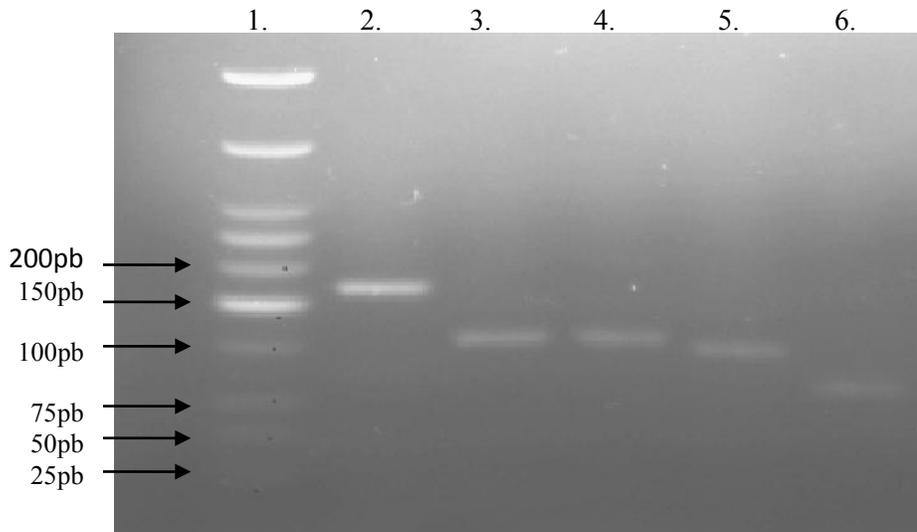
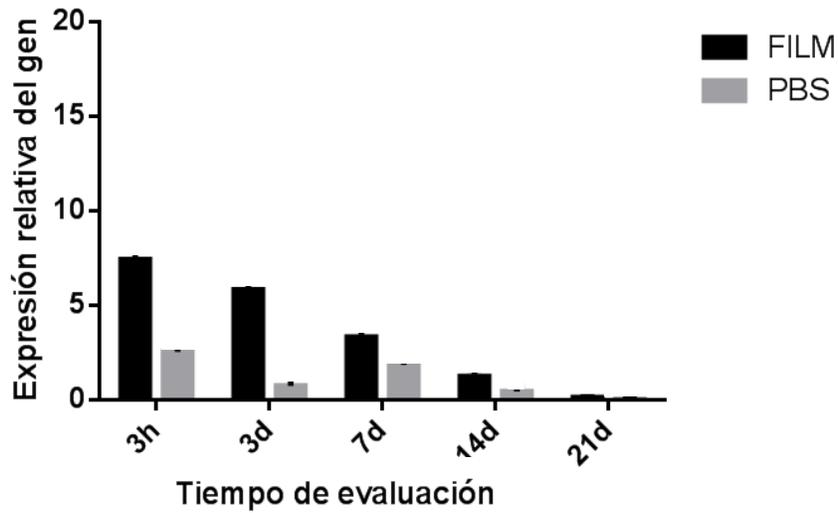


Fig. 10. Los iniciadores generados para los genes BIRC2, BIRC-3, BCL-2 y BCL-XI mostraron especificidad, al observarse una única banda de amplificación para cada uno de ellos; 1. Marcador 100pb, 2.Gen constitutivo HPRT, 3.Gen BIRC-2, 4.Gen BIRC-3, 5.Gen BCL-2, 6.Gen BCL-XL.

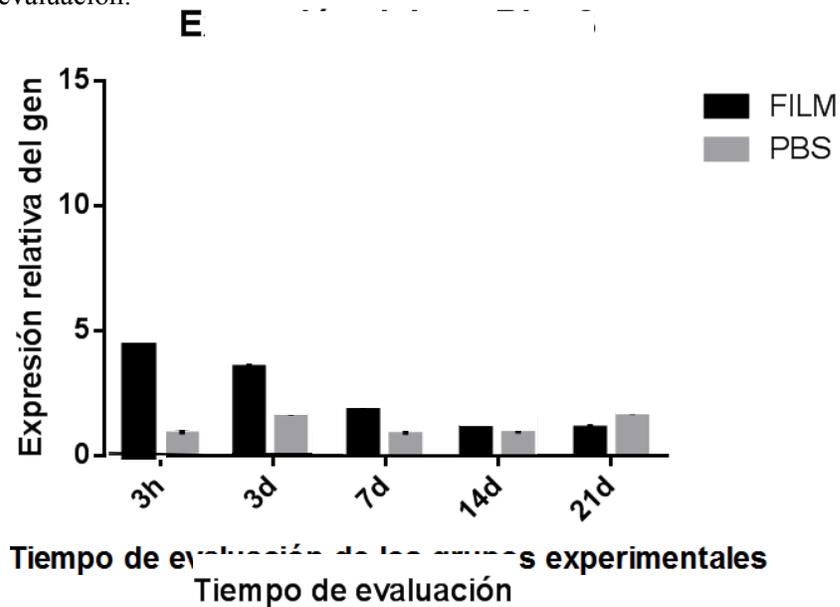
10.4. Gráficos de expresión

En la gráfica 22, correspondiente al gen BIRC-2, se observa que durante las primeras tres horas posteriores a la lesión este gen se encuentra más elevado en el grupo tratado con FILM con respecto al grupo tratado con PBS. La expresión elevada del gen en los grupos tratados con FILM se mantiene también en las evaluaciones de 3, 7 y 14 días, mientras que a 21 días, la expresión del gen en ambos tratamientos prácticamente ha regresado a niveles basales.



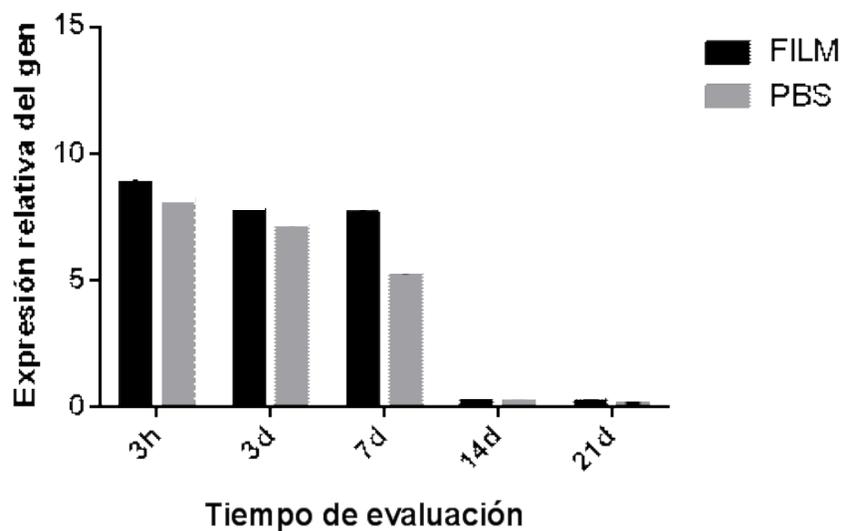
Gráfica 22. Expresión relativa del gen BIRC-2 con respecto al tiempo de evaluación. Expresión del gen BIRC-2, con dos tratamientos; las barras en negro corresponden al grupo FILM, y las barras grises al grupo PBS.

En la gráfica 23 se observa que la expresión del gen BIRC-3, forma en los grupos tratados con FILM una curva descendente en la que la expresión del gen disminuye a lo largo de los diferentes tiempos de evaluación. A diferencia del gen BIRC-2, el gen BIRC-3 se mantiene por encima del nivel basal hasta los 21 días. Los valores de expresión relativa del gen en los grupos tratados con PBS son fluctuantes y no es posible describir una tendencia sin embargo su expresión fue mayor hasta los siete días de evaluación.



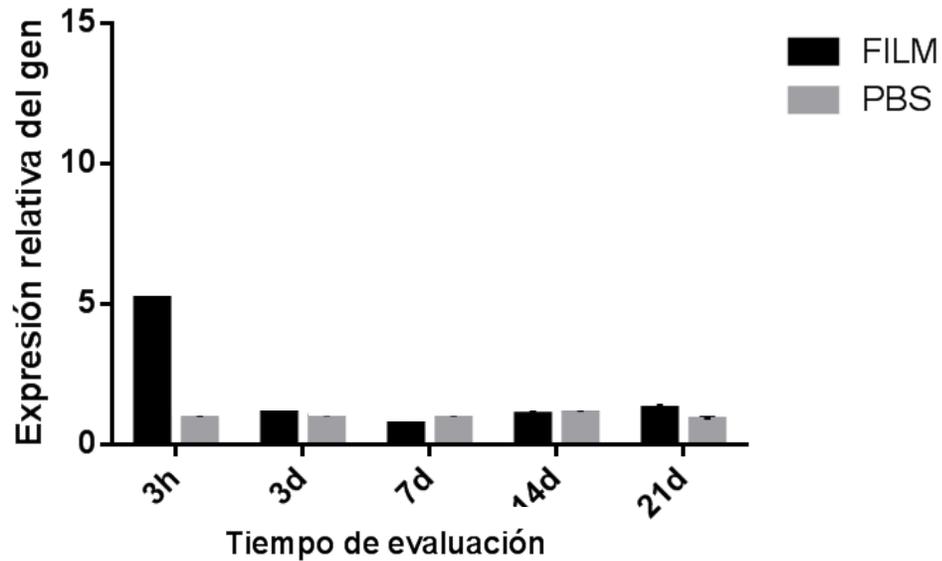
Gráfica 23. Expresión relativa del gen BIRC-3 con respecto al tiempo de evaluación, con dos tratamientos; las barras en negro corresponden al grupo FILM, y las barras grises al grupo PBS.

En la gráfica 24, correspondiente al gen BCL-XL, se observa que la expresión relativa del gen a los tiempos de evaluación de 3hrs, 3 y 7 días, es elevada en ambos grupos de estudio (FILM y PBS). No obstante la expresión en los grupos tratados con el pentapéptido siempre es mayor. En cuanto a las evaluaciones de 14 y 21 días, la expresión del gen ha disminuido prácticamente a niveles basales.



Gráfica 24. Expresión relativa del gen BCL-XL con respecto al tiempo de evaluación con dos tratamientos; las barras en negro corresponden al grupo FILM, y las barras grises al grupo PBS.

La gráfica 25 corresponde al gen BCL-2. En donde es posible observar la gran diferencia en el valor relativo de expresión entre el grupo tratado con FILM y el grupo tratado con PBS durante el primer tiempo de evaluación (3hrs). Posteriormente los niveles de expresión disminuyen permaneciendo ligeramente por encima del nivel basal hasta el final del ensayo a los 21 días.



Gráfica 25. Expresión relativa del gen BCL-2 con respecto al tiempo de evaluación con dos tratamientos; las barras en negro corresponden al grupo FILM, y las barras grises al grupo PBS.

11. DISCUSIÓN:

Luego de una LTME, se produce una respuesta inflamatoria intensa mediada principalmente por neutrófilos y macrófagos, primeras células en migrar al sitio de lesión, que junto con plaquetas, células endoteliales y microglía, producen $O_2^{\bullet -}$ y ON, generando daño elevado debido a la baja capacidad antioxidante en el SN. Las lesiones posteriores generan una neurodegeneración progresiva, destruyendo el sustrato anatómico necesario para la recuperación neurológica, y progresando hacia un estado de inflamación crónica. Las estrategias neuroprotectoras utilizadas hasta ahora no han sido capaces de proporcionar resultados clínicos satisfactorios, sin embargo en base a sus deficiencias se concluye que el elemento fundamental para que exista una recuperación adecuada, consiste en la preservación del tejido neuronal por medio de un control eficiente de la inflamación, evitando la lesión secundaria que ésta produce y permitiendo la sinapsis a lo largo del canal medular, aumentando por tanto las posibilidades de recuperar la capacidad motriz. Debido a ello, continúa la búsqueda de mecanismos terapéuticos y neuroprotectores alternativos para modular esta respuesta inflamatoria perjudicial.

En el presente estudio, fue posible demostrar que el FILM posee un efecto neuroprotector al ser capaz de elevar algunos de los genes antiapoptóticos evaluados, los cuales aumentarían por consiguiente la supervivencia neuronal después de una LTME al evitar la apoptosis. En los gráficos de expresión relativa de los genes BIRC-2 y BIRC- 3, que son inhibidores directos de las caspasas (13), se observa una tendencia de curva descendente, como una curva dosis respuesta. Este tipo de comportamiento, en el que la expresión relativa del gen es inversamente proporcional al tiempo de evaluación del tratamiento, nos lleva a pensar en una curva dosis-efecto. Por lo que es posible proponer que el efecto neuroprotector del FILM podría estar relacionada con la presencia del mismo en el organismo, haciendo de gran interés, la posterior evaluación de dicho gen aplicando no solo una dosis de FILM, si no administrándolo de forma continua, determinando de esta forma si es posible sostener la sobreexpresión del gen durante todo el tiempo de evaluación.

Por otra parte, se evaluaron también genes moduladores de la permeabilidad membranal, BCL-2 BCL-x1, (36), en los que no se observa un comportamiento determinado. No obstante, la expresión en los grupos de interés, es decir los tratados con el pentapéptido, es mayor en todos los casos.

En los 4 genes determinados, los grupos evaluados a un tiempo de 3 horas son los que más discrepan entre sí, esto puede deberse a que todos los fenómenos relacionados con la inflamación ocurren durante la fase aguda, que consiste en las primeras horas posteriores al trauma y durante las cuales la expresión de que genes, cantidad y tipo de células presentes, concentraciones de citocinas, y todos los elementos presentes en la inflamación cambian de un momento a otro, haciendo difícil el momento de evaluación precisa (54). Este argumento se ve soportado en trabajos anteriores, en los que se ha demostrado que la aplicación del FILM inmediatamente después de una lesión, favorece un aumento en la expresión de genes neuroprotectores como IL-10 (que también es un gen típicamente anti-inflamatorio) y TGF- β , además de disminuir la expresión de iNOS, gen que participa en el proceso de la lipoperoxidación, todo ello específicamente dentro de las tres primeras horas postlesión, lo refuerza la necesidad de un esquema de dosis múltiples actualmente en proceso.

No obstante, es posible enunciar que el FILM muestra un efecto positivo en el incremento de los genes antiapoptóticos BIRC-2 y BIRC- 3, que inhiben la acción de las caspasas (otro enfoque más a estudiar) regulando la salida del citocromo C a través de la membrana, lo que podría correlacionarse con un estudio reciente en el que se ha demostrado la sobrevida de neuronas

rubroespinales, un tipo de células relacionadas con la coordinación motriz, ya que activa las motoneuronas de los músculos flexores, sobre todo de la extremidad superior, e inhibe las de los músculos extensores; Silva y col. realizaron un ensayo en el que se trataron animales experimentales con FILM después de una LTME, y mediante observaciones cualitativas y cuantitativas y determinan la supervivencia de neuronas rubroespinales. Encontraron que los grupos tratados con FILM, mostraron una mayor supervivencia, en comparación con los grupos tratados con PBS.

En este mismo estudio, Silva y col. observaron que animales experimentales que recibieron el FILM como tratamiento, presentaron una mejor recuperación motora que aquellos tratados con PBS, obteniendo un grado más alto en la escala BBB, escala desarrollada específicamente para este modelo de investigación, que permite asignar un puntaje a cada animal de acuerdo a su capacidad motriz (7); Así en ambos experimentos se comprueba la capacidad neuroprotectora del FILM.

En un contexto similar, los mismos autores, observaron que en el FILM favoreció la prevalencia de neuronas rubroespinales o de núcleo rojo, efecto que podría estar soportado por nuestros resultados, es decir, que el FILM aumento en la expresión de genes antiapoptóticos, lo cual explicaría la mejora clínica de los animales al ser evaluados mediante la prueba BBB, pues al preservarse las células que fungen como sustrato anatómico es posible mantener la comunicación neuronal. Esta importante función antiapoptótica ocurre a la par que otros efectos comprobados, entre los que se encuentran la respuesta adaptativa ante el estrés, la proliferación y diferenciación celular, la señalización y la respuesta inmune, etc. (16). Por ejemplo; se ha demostrado que el FILM aumenta la expresión del gen de la IL-10 y TGF- β (8), lo cual resulta de gran interés ya que ambas moléculas son importantes en el contexto de la inflamación y la reparación; El TGF- β es una citocina antiinflamatoria que estimula la producción de colágeno, fibronectina y proteoglicanos, inhibe la degradación del colágeno, e inhibe la proliferación de linfocitos), mientras que la IL-10 inhibe citocinas que participan en procesos inflamatorios, como IL-6, IL-8, IL-12, IFN y MIP α (39).

Actualmente, autores como Duckett y Salvesen, ya han demostrado las ventajas de la manipulación de genes de la familia IAP, como terapia, puede proteger o retrasar la muerte celular ante estímulos apoptóticos (17). Este fue el efecto que se consiguió al utilizar FILM; se obtuvo la sobreexpresión de genes como BIRC-2 y BIRC-3 que pertenecen a dicha familia. El conjunto de efectos ejercidos por el FILM lo convierten en una posible estrategia farmacológica para utilizar en la práctica clínica, con el fin de evitar el daño que genera la inflamación luego de un trauma.

12. CONCLUSIONES

En este trabajo se comprobó que mediante el tratamiento con FILM en una lesión medular es posible obtener sobreexpresión de los genes antiapoptóticos BIRC-2 y BIRC-3, BCL-2 y BCL-XL, con lo cual se puede evitar la muerte celular ante estímulos apoptóticos, favoreciendo una neuroprotección y mejorando el pronóstico clínico posterior a una LTME.

13. PERSPECTIVAS

- ➔ Realizar estudios de cuantificación de proteínas para determinar la correlación de la expresión con producción.
- ➔ Generar un esquema de multidosis de FILM para comprobar si el efecto sobre genes anti-apoptóticos se observa en tiempos posteriores a tres horas.
- ➔ Analizar el efecto del FILM sobre posibles vías de señalización, particularmente las relacionadas con el proceso de apoptosis,

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Adessi C, Soto C. Converting a peptide into a drug: Strategies to improve stability and bioavailability. *Curr Med Chem*. 1990; 9:963-966.
2. Aguayo A, Bray G, Rasminsky M, et al. Synaptic connections made by axons regenerating in the central nervous system of adult mammals. *J Exp Biol*. 1990; 153:199-224.
3. Aige G. Anatomía Descriptiva y Anatomía Clínica del Sistema Nervioso y Resonancia Magnética. Biofísica e Interpretación en la Patología del Sistema Nervioso Central en Veterinaria. UAB. 2010; 284.
4. Alavian KN, Li H, Collis L, et al. Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. *Nat Cell Biol*. 1992; 13(10):1224-1233.
5. Alcaraz V. Estructura y función del sistema nervioso: recepción sensorial y estados del organismo. 2ª UNAM, 2001; 235.
6. Audesirk T, Audesirk G, Byers B. Biología: la vida en la Tierra. 6ª Pearson Educación. 2003; 889.
7. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995; 12:1-21.
8. Bermeo G, Ibarra A, García E, et al. Monocyte Locomotion Inhibitory Factor Produced by *E. histolytica* Improves Motor Recovery and Develops Neuroprotection after Traumatic Injury to the Spinal Cord. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:10.
9. Bracken M, Shepard MJ, Collins WF, et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Med*. 1990; 322(20):1405-1411.
10. Bustamante E. El Sistema Nervioso: desde las neuronas hasta el cerebro humano. Universidad de Antioquia. 2007; 313.
11. Caballero S, Nieto M. Fisiopatología de la lesión medular. *Vet Mex*. 2005; 36(1):75-86.
12. Calderón R. La apoptosis en biología y patología. *Rev Per Card*. 2005; 21(2):119-128.
13. Cascales M. Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real Acad. Nal. Farm*. 2003; 69:1-64.
14. Culmsee C, Junker V, Kremers W, et al. Combination Therapy in Ischemic Stroke: Synergistic Neuroprotective Effects of Memantine and Clenbuterol. *J Amer Heart Assoc* 2004; 35:1197-1202.
15. Díaz A, Guízar G, Ríos C. Estrategias neuroprotectoras después de una lesión traumática de la médula espinal. *Rev Med IMSS*. 2002; 40(5):437-455.

16. Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J. IAPs. More than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle*. 2008; 7(8):1036-1046.
17. Duckett CS, Salvasen GS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(6)401-410.
18. Farroqui A, Wei-Yi O, Horrocks L. *Neurochemical Aspects of Excitotoxicity*. Springer. 2007; 308.
19. Fields HL. Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. *Prog Brain Res*. 2000; 122: 245-253.
20. Geffner J, Fainboim L. *Introducción a la Inmunología Humana*. 5ª, Médica Panamericana. 2005; 484.
21. Giménez SJ, Arenas E, Diaz L, et al. Effect of the Monocyte Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) Produced by *Entamoeba histolytica* on the Expression of Cell Adhesion Molecules (CAMs) in the Skin of Guinea Pigs. *Arch Med Res*. 2000; 31:92-93.
22. Giménez SJ, Cárdenas G, López M, et al. Immunization with a tetramer derived of an anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica* protects gerbils (*Meriones unguiculatus*) against experimental amoebic abscess of the liver. *Parasite Immunology*. Vol. 26, p.343-349, 2004.
23. Giménez SJ, Pacheco MG, Cruz L, et al. Ultrastructural changes associated with the inhibition of monocyte chemotaxis caused by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Lab Invest*. 1987; 57:45-51.
24. Giménez SJ, Rico G, Fernandez J, et al. Inhibition of contact cutaneous delayed hypersensitivity reactions to DNCB in guinea pigs by the Monocyte Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) produced by axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res*. 1997; 28:237-238.
25. Giménez SJ, Riera C, Silva R, et al. Inhibition of experimental pericardial adhesions by the amoebian anti-inflammatory pentapeptide (MLIF). *Federation of clinical immunology societies, 5th annual meeting*, 2005.
26. Goodkin R, Cambell JB. Sequential pathologic changes in spinal cord injury. *Arch Neurol*. 1979; 30:197-201.
27. *Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio*. Ed. Academia Nacional de Medicina, México, 1999.
28. Hall J. *Tratado de fisiología médica*. 12ª Elsevier, 2011; 1112.
29. Hulsebosch C. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv Physiol Educ*. 2002; 26:238-255.

30. Jacobson M, Burne J, King M, et al. BCL-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*. 1993; 361:365-369.
31. Jakeman L, Reier P, Eng L. Reactive astrocyte and axonal outgrowth in the injured CNS: Is glycolysis really an impediment to regeneration? *Frontiers of Clinical Neuroscience*. 1987; 6:183-210.
32. Jenssen H, Hamill P, Hancock R. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 13:491–511.
33. Jones T, McDaniel E, Popovich P. Inflammatory-Mediated Injury and Repair in the Traumatically Injured Spinal Cord. *Current Pharmaceutical Design*. 2005; 11(10):1223-1236.
34. Kim V, et al. *Patología humana*. 9ª, Elsevier. 2013; 292.
35. Kipnis J, Yoles E, Schori H, et al. Neuronal Survival after CNS Insult Is Determined by a Genetically Encoded Autoimmune Response. *Journal of Neuroscience*. 2001; 21(13):4564-4571.
36. Koolman J, Röhm KH. *Bioquímica: texto y atlas*. 3a ed. Médica Panamericana. 2005; 488,
37. Kretschmer R, Rico G, Giménez J. A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. 2001; 112(2):201-209.
38. Kretschmer R, Collado ML, Pacheco M, et al. Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunology*. 1985;7(5):527-543.
39. Kumar V, Cotran R, Robins S. *Patología Humana*. 9ª Elsevier 2013; 928.
40. Lerma J. *Cómo se comunican las neuronas*. 14ª, CSIC Press. 2010; 80.
41. Ley General de Salud. Título Séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. Editorial Porrúa, 6ª de México, D.F. 1990.
42. Lieberman J, Friedlaender G. Bone regeneration and repair: Biology and clinical applications. Human press. 2005; 1-19.
43. Lizarbe M. R, *Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. El suicidio y la muerte celular*. 2007; 101(2):1-33.
44. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, et al. *Biología Celular y Molecular*. 5ª, Médica Panamericana. 2005; 973.
45. Miret C. Alteraciones de la apoptosis como mecanismo patogénico en el lupus eritematoso sistémico. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. 2003.
46. Mitchell R. *Compendio de Robbins y Cotran : patología estructural y funcional*. 78ª, Elsevier. 2012; 784.
47. Monfort J, Quintero M, Mitrovic D. Osteoartrosis; *Biología, fopatología, clínica y tratamiento*. Médica Panamericana. 2009; 413.
48. Moore K. et al. *Anatomía con orientación clínica*. 5ª Médica Panamericana. 2007; 1205.

49. Morales ME, Silva R, Soriano C, et al. The Cys-Asn-Ser carboxyl-terminal end group is the pharmacophore of the amebic anti-inflammatory monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF). *Mol Biochem Parasitol.* 2008; 158:46-51.
50. Motyl T, Grzelkowska K, Zimowska W, et al. Expression of bcl-2 and bax in TGF-beta 1-induced apoptosis of L1210 leukemic cells. *European journal of cell biology,* 1999; 75:367-374.
51. Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. NOM. 062-Z00-1999
52. Park E, Velumian A, Fehlings M. The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J Neurotrauma.* 2004; 21(6):754-774.
53. Patiño J. *Metabolismo, Nutrición y Shock.* 4ª, Médica Panamericana, 2000:779.
54. Pedreira P, García E, Albaiceta G, et al. Respuesta inflamatoria y apoptosis en la lesión pulmonar aguda. *Medicina Intensiva.* 2006; 30(6):268-275.
55. Puelles L, Martínez S, Martínez M, et al. *Neuroanatomía.* Médica Panamericana. 2008; 418.
56. Rabinovich G. *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina: un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica.* Médica Panamericana. 2004;614.
57. Ravichandran K, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nature.* 2007; 7:964-974.
58. Rico G, Díaz G, Kretschmer R. Cyclic nucleotide changes induced in human leukocytes by a product of axenically grown *Entamoeba histolytica* that inhibits human monocyte locomotion. *Parasite Res.*1995; 81(2):158-162.
59. Rico G, Leandro E, Rojas S, et al. The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitol Res.* 2003; 90(4):264-267.
60. Rico G, Ximenez C, Ramos F, et al. Production of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) by axenically grown *Entamoeba histolytica*: Synthesis or degradation?. *Arch Med Res.* 1997;28:235-236.
61. Rico, G Díaz G, Giménez J, et al. Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (FILM) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leucocytes. *Arch Med Res.* 1992; 23: 157-159.
62. Rojas, W. *Inmunología.* 13a Corporación para Investigaciones Biológicas, 2004; 473.
63. Ross, M, Wojciech P. *Histología.* 5ª, Médica Panamericana, 2007; 974.
64. Ruiz J. *Anatomía Topográfica.* 5ª UACJ. 2002; 138.

65. Sadler T, Langman Jan. Embriología médica con orientación clínica. 10ª Médica Panamericana. 2007; 386.
66. Silva R, Estrada I, Ramos R, et al. The effect of anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica* on gene expression in the U-937 monocytic line. *Journal of Inflammation Research*. 2008; 1.57:145-150.
67. Silva R, Morales E, Blanco F, et al. The monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* alters the expression of genes related to the wound-healing process.. *Int J Pept Res Ther*. 2012; 18(4):391-401.
68. Silva R, Rico G. Anti-inflammatory defense mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *Inflamm Res*. 2011; 60(2):111-117.
69. Soriano C, Sánchez J, Rico G, et al. Electronic structure and physicochemical properties of the anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica*: A theoretical study. *J Mol Structure: THEOCHEM*. 2006; 769:91-95.
70. Stites D. *Basic and Clinical Immunology*. 7ª Appleton & Lange. 1991; 870.
71. Teller P, White T. The physiology of wound healing: Injury through maturation. *Surg Clin North Am*. 2010; 89:599-610.
72. Utrera D, Vélazquez JR, Enciso A, et al. An anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica* down-regulates the expression of pro-inflammatory chemokines. *Parasite Immunol*. 2003; 25(10):475-482.
73. Velázquez JR, Utrera D, Zentella A, et al. The amebic anti-inflammatory monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) modifies the NF-kB nuclear translocation in human monocytes. *Eur Cytokine Netw*. 2003; 14:64-67.
74. Voet D, Voet J. *Bioquímica*. 3ª, Médica Panamericana. 2006; 1700.
75. Watson C, Paxingos g, Kayalioglu G. *The spinal cord: a Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas*. Elsevier. 2009; 408.
76. Welsh U, Sobotta, J. *Histología*. 2ª, Médica Panamericana, 2009; 688.