



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

EFFECTO DE LA METILPREDNISOLONA SOBRE LA EXPRESIÓN
FUNCIONAL DE ACUAPORINA-4 Y LA PERMEABILIDAD DE LA
BARRERA HEMATO-ESPINAL COMO INDICADORES DE EDEMA
SECUNDARIO A LESIÓN MEDULAR AGUDA DE TIPO
TRAUMÁTICO EN UN MODELO MURINO.

TESIS

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

PRESENTA:
EIBAR ERNESTO CABRERA ALDANA

TUTOR PRINCIPAL:
ALEJANDRO REYES SÁNCHEZ
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2016



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.

TUTOR PRINCIPAL

VO. BO. DR. ALEJANDRO REYES SÁNCHEZ.

Jefe de División

Médico Adscrito al Departamento de Cirugía de Columna.

Instituto Nacional de Rehabilitación (INR).

Maestro en Ciencias Médicas.

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I.

alereyes@inr.gob.mx

COORDINADORA

**DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
DE LA UNAM Y RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA**

VO. BO. DRA. MARGARITA VALDÉS FLORES

Médico Adscrito al Departamento de Genética, INR.

Doctora en Ciencias Médicas.

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I.

mvaldes@inr.gob.mx

COLABORADORES

DR. LUIS B. TOVAR Y ROMO

Jefe del Laboratorio de Neuropatología Molecular
Instituto de Fisiología Celular de la UNAM
Investigador Asociado C
Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I.
ltovar@ifc.unam.mx

DR. GABRIEL GUIZAR SAHAGÚN

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas,
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.
Investigador Titular B
Sistema Nacional de Investigadores, Nivel III.
guizarg@gmail.com

AGRADECIMIENTOS

QUIM. CRISTINA ARANDA FRAUSTRO

Técnico Académico,
Instituto de Fisiología Celular de la UNAM

MVZ. ANGELINA MARTÍNEZ CRUZ

Modelo Experimental,
Fundación CAMINA

DRA. RUTH RINCÓN HEREDIA

Microscopía Confocal,
Instituto de Fisiología Celular de la UNAM

MIP. FERNANDO RAÚL RUEDAS PÉREZ

Facultad de Medicina,
Universidad Anáhuac

El protocolo de investigación de esta tesis fue elaborado por el autor como proyecto *ex profeso* a desarrollar durante su Maestría en Ciencias Médicas con sede en el Instituto Nacional de Rehabilitación, al estar inscrito como alumno del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud de la UNAM (PMDCMOS), Generación 2015-2, y no teniendo adscripción a tal Institución. Dicho protocolo fue evaluado por el comité científico del Instituto Nacional de Rehabilitación (38/15). El autor recibió el apoyo financiero para el desarrollo de este trabajo por la Academia de Investigación en Ortopedia A.C. y obtuvo la beca nacional CONACYT (No. de Becario 435070/577640). El proyecto fue desarrollado por el autor y su equipo de trabajo, en las instalaciones del Departamento de Neuropatología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y en el laboratorio de la Fundación CAMINA de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, de acuerdo al plan de actividades y cronograma estipulados y ajustados con su tutor y colaboradores durante cada semestre y siguiendo el reglamento del PMDCMOS para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Médicas por la UNAM.

DEDICATORIA

Dedico ésta tesis a todos nuestros queridos pacientes con lesión medular.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Lista de Abreviaturas, viii

Lista de Tablas, ix

Lista de Figuras, x

RESUMEN, 1

I. ANTECEDENTES, 3

II. JUSTIFICACIÓN, 4

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, 5

IV. HIPOTESIS, 6

V. OBJETIVO GENERAL

A. General, 7

B. Específicos, 7

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

A.1 Diseño del estudio, 8

A.2 Tamaño de la muestra, 8

A.3 Instalaciones, 8

A.4 Diseño experimental, 8

a) Descripción del modelo in vivo de contusión de la médula espinal en la rata, 10

b) Valoración neurológica 24 horas posteriores a la LM, 10

c) Determinación de la expresión de AQP4 por inmunofluorescencia en el modelo in vivo de contusión de la médula espinal en la rata, 10

d) Determinación de la permeabilidad vascular y su modulación por medio de MP en el modelo in vivo de contusión de la médula espinal en la rata, 11

B. Descripción de las variables de estudio, 11

C. Análisis estadístico, 11

VII. RESULTADOS, 16

A. Modelo in vivo de contusión de la médula espinal en la rata, 12

B. Valoración neurológica 24 horas posteriores a la LM, 12

C. Determinación de la expresión de AQP4 por en el modelo in vivo de contusión de la médula espinal en la rata, 13

D. Determinación de la permeabilidad vascular y su modulación por medio de MP en el modelo in vivo de contusión de la médula espinal en la rata, 13

VIII. DISCUSIÓN, 19
IX. CONCLUSIONES, 20
X. LIMITACIONES, 21
XI. PERSPECTIVAS, 22
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS, 27

ANEXOS

Anexo 1. Normatividad para el uso de animales de experimentación, 28
Anexo 2. Preparación de soluciones empleadas en los métodos, 30
Anexo 3. Escala de locomoción BBB, 31
Anexo 4. Técnicas de inmunohistoquímica empleadas, 32
Anexo 5. Recursos económicos para la realización del proyecto, 33

ABREVIATURAS

LM,	<i>lesión medular</i>
LMAT,	<i>lesión medular aguda traumática</i>
MP,	<i>metilprednisolona</i>
AQP,	acuaporina
AQP4,	<i>acuaporina-4</i>
VEGF,	del inglés, factor de crecimiento derivado de endotelio
PFG,	proteína fibrilar glial
g,	gramos
mg,	miligramos
Kg,	<i>kilogramos</i>
ml,	mililitros
i.p.,	<i>vía intraperitoneal</i>
T,	vértebra o nivel <i>torácico</i>
i.v.,	<i>vía intravenosa</i>
AE,	colorante azul de Evans
VH,	<i>vehículo</i>
NaCl,	cloruro de sodio
TBS,	del inglés, buffer Tris salino
TBS-T,	del inglés, buffer Tris salino con Tritón X-100
anti-AQP4,	anticuerpo anti-acuaporina-4
anti-PFG,	anticuerpo anti-proteína fibrilar glial
INR,	Instituto Nacional de Rehabilitación
IMSS,	Instituto Mexicano del Seguro Social
BBB,	<i>escala de locomoción de Basso, Beattie y Bresnahan</i>
CONACYT,	<i>Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología</i>

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Grupo A (ratas hembra, n=12), para la determinación de la expresión funcional de AQP4. (*Abreviaturas: AQP4, acuaporina-4; VH, vehículo (buffer fosfato); LM, lesión medular; MP, metilprednisolona; dd/mm/aa, día/mes/año; g, gramos; mg, miligramos; ml, mililitros*).

Tabla 2. Grupo B (ratas macho, n=12), para la evaluación de la permeabilidad de la barrera hemato-espinal. (*Abreviaturas: AE, colorante Azul de Evans; VH, vehículo (buffer fosfato); LM, lesión medular; MP, metilprednisolona; dd/mm/aa, día/mes/año; g, gramos; mg, miligramos; ml, mililitros*).

Tabla 3. Propuesta de grupo C con ratas macho para duplicar la muestra con un grupo del género opuesto para la determinación de la presencia de AQP4. (*Abreviaturas: AQP4, acuaporina-4; LM, lesión medular; MP, metilprednisolona; VH, Vehículo (buffer fosfato)*).

Tabla 4. Propuesta de grupo D con ratas macho para duplicar la muestra con un grupo del género opuesto para la evaluación de la permeabilidad de la barrera hemato-espinal. (*Abreviaturas: LM, lesión medular; MP, metilprednisolona; VH, Vehículo (buffer fosfato); AE, colorante azul de Evans*).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografías que demuestran la presencia de AQP4 (izquierda) y PFG (derecha) en el mismo nivel de corte a nivel de la sustancia blanca de los cordones anteriores en la médula espinal de la rata sin LM sin MP (superior) (n=3) y con MP (inferior) (n=3). *Imágenes representativas.* Aumento 40X. (**Abreviaturas:** LM, lesión medular; AQP4, acuaporina-4; PFG, proteína fibrilar glial; MP, metilprednisolona).

Figura 2. Microfotografías que demuestran la presencia de AQP4 (izquierda) y PFG (derecha) en el mismo nivel de corte a nivel de la sustancia blanca de los cordones anteriores en la médula espinal de la rata con LM sin MP (superior) (n=3) y con MP (inferior) (n=3). *Imágenes representativas.* Aumento 40X. (**Abreviaturas:** LM, lesión medular; AQP4, acuaporina-4; PFG, proteína fibrilar glial; MP, metilprednisolona).

Figura 3. Microfotografías que demuestran la presencia de AQP4 (izquierda), PFG (en medio) y Merge (derecha) en el mismo nivel de corte a nivel de la sustancia blanca de los cordones anteriores en la médula espinal de las ratas con LM (n=3) y sin LM (SCI) (n=3), con MP (n=3) y sin MP (n=3). En Merge (derecha) se aprecia en amarillo la co-localización de la AQP4 en los procesos de los astrocitos como el empalme de fluorescencia de AQP4 y PFG. *Imágenes representativas.* Aumento 63X. (**Abreviaturas:** SCI, del inglés, lesión medular; MP, metilprednisolona; AQP4, acuaporina-4; PFG, proteína fibrilar glial; Merge, canales empalmados de fluorescencia).

Figura 4. Fotografía macroscópica de los 12 fragmentos (3cm) de las médulas espinales extraídas del grupo B de ratas para la evaluación de la permeabilidad de barrera hematoespinal a través de la extravasación del colorante AE. (**Abreviaturas:** LM, lesión medular; AE, colorante Azul de Evans; MP, metilprednisolona; R, rata).

Figura 5. Gráfica de barras que demuestra la cantidad del colorante AE en ng/mg cuantificado en tres niveles de corte en la médula espinal contundida: cefálico (barras negras), medio o epicentro (barras gris claro) y caudal (barras gris oscuro), comparando al subgrupo LM(+) MP(+) (barra izquierda) contra el subgrupo de LM(+) MP (-) (barra derecha). (**Abreviaturas:** LM, lesión medular; AE, colorante Azul de Evans; MP, metilprednisolona). (*Media ± error estándar; P<0.5*)

Figura 6. Media y desviación estándar con los pesos de las ratas hembras del grupo A ya intervenido para ser tomados como referencia para la conformación del grupo C de ratas macho a intervenir, para la determinación de la presencia de AQP4. (**Abreviaturas:** AQP4, acuaporina-4).

Figura 7. Media y desviación estándar con los pesos de las ratas macho del grupo B ya intervenido para ser tomados como referencia para la conformación del grupo D de ratas hembra a intervenir, para la evaluación de la permeabilidad de la barrera hemato-espinal.

Resumen

Introducción: La lesión medular (LM) es una condición incapacitante que afecta la función motora, sensitiva y autonómica del individuo. La principal causa es la traumática y su incidencia es mayor en adultos jóvenes del género masculino. El único medicamento de uso global para la fase aguda de la LM ha sido la metilprednisolona (MP), sin embargo su efecto benéfico no ha sido comprobado y los resultados son muy controversiales. Actualmente no existe ningún otro tratamiento disponible y eficaz que mejore el pronóstico en estos pacientes. La atención se ha centrado en el estudio de la inflamación y los factores tróficos asociados a la permeabilidad vascular que generan el edema agudo en la médula, pero el progreso en el desarrollo de estrategias terapéuticas ha sido pobre y desalentador. Una molécula involucrada en la formación y eliminación del edema en el sistema nervioso (SN) es la acuaporina-4 (AQP4), el canal de agua más abundante en este sitio. Sin embargo, hasta ahora se desconoce si la modulación en la expresión funcional de esta molécula juega algún papel en la fisiopatología del edema agudo en la LM de tipo traumática y por tanto, sirva como nuevo blanco farmacológico.

Objetivo: Identificar los cambios en la expresión funcional de la AQP4 inducidos por la LM aguda traumática (LMAT) y modulados por la MP, así como la relación de tales cambios con la permeabilidad de la barrera hemato-espinal en un modelo murino experimental de LMAT.

Material y Métodos: Se realizó un estudio experimental de LMAT con ratas Long-Evans de 250 a 400 g, produciendo una lesión severa con el sistema de caída de peso de la Universidad de Nueva York, previa laminectomía T9-T10. Se realizó una valoración neurológica 24h posteriores a la generación de la LM. Se formaron 2 grupos (A y B). Se realizó inmunofluorescencia en el tejido de la médulas espinales para determinación de la presencia de AQP4 basal y posterior a la LMAT, con y sin MP (30mg/Kg i.p.), en el grupo A (hembras). Se administró el colorante azul de Evans (AE) (4mg/Kg, i.v.) en las ratas macho del grupo B, 30 min antes de su sacrificio, en las que se estudió la permeabilidad hemato-espinal basal y posterior a la LMAT, con y sin MP, mediante espectrofluorimetría de fluorescencia.

Resultados: Se operaron 24 ratas, 12 en el grupo A de hembras, para la determinación de la expresión de AQP4 y, 12 en el grupo B de machos, para la evaluación de la permeabilidad de la barrera hemato-espinal a través de la cantidad de colorante AE extravasado. Con este experimento se determinó que la administración de MP modula de manera diferencial la expresión funcional de AQP4 a partir de su expresión basal a nivel de los pies de los astrocitos que rodean a los capilares. La expresión basal de AQP4 en la médula espinal es baja y la LMAT no la modifica. La administración de MP disminuye la expresión basal de AQP4 y permite la acumulación de una mayor cantidad del colorante AE en el parénquima.

Conclusiones: La administración de altas dosis de MP en la LMAT disminuye la expresión funcional de AQP4, empeorando el edema vasogénico evidenciado por un aumento en la cantidad de AE extravasado.

I.- ANTECEDENTES

La principal causa de lesión incapacitante en adultos jóvenes es debida a traumatismos. De estos, la lesión medular (LM) es probablemente la más alarmante ya que puede generar severas limitaciones funcionales y en los casos más graves dejar al paciente con tetraplejia. La LM puede afectar la función motora, sensitiva y autonómica en un grado que depende del tipo, la severidad y el nivel del daño neurológico. El impacto psicológico y social es dramático, con importantes repercusiones económicas y una dependencia para los cuidados que en ocasiones llega a ser absoluta (**Jiménez-Ávila, 2012; Rahimi-Movaghar, 2013; Singh, 2014; Zárata-Kalfópulos, 2016**).

Actualmente no existe ningún tratamiento farmacológico disponible, con evidencia clase I o II que demuestre su eficacia (**Short, 2000**). Recientemente, el uso de dosis altas de metilprednisolona (MP) en la LM aguda de tipo traumática (LMAT) se ha puesto en controversia, ya que su efecto benéfico no se ha comprobado, no así sus efectos secundarios, que incluyen mayor riesgo de infección y sepsis, descontrol glicémico, sangrado de tubo digestivo, embolismo pulmonar, fallo respiratorio entre los más importantes (**Hurlbert, 2013; Chikuda, 2014; Andrés-Cano, 2015**). Por otro lado, aunque una intervención quirúrgica temprana para descomprimir a la médula espinal y estabilizar a la columna vertebral ha sido reportada de beneficio, tampoco existe evidencia clase I que indique el tiempo más apropiado para realizarla (**Lifshutz, 2004; Mattei, 2012**). Hasta ahora, ambos tratamientos (médico y quirúrgico) en la etapa aguda son polémicos con resultados contradictorios. Tampoco se dispone de evidencia científica respecto a sus efectos a largo plazo (**Hurlbert, 2013**).

La LMAT puede ser generada por diferentes mecanismos relacionados a la cinemática del trauma y limitados parcialmente por la biomecánica de la columna vertebral. Esto puede generar una sección medular, aunque más comúnmente produce una contusión en el parénquima de la médula espinal acompañado de hemorragia, tanto intraparenquimatosa como subaracnoidea (**Reyes-Alva, 2014**). Inmediatamente posterior al daño primario generado en el momento del traumatismo, la serie de eventos secundarios que sobrevienen conllevan a una mayor lesión en la médula espinal, lo que traduce en última instancia a un empeoramiento durante las siguientes horas de los déficits neurológicos generados inicialmente. Se sabe que, como consecuencia del daño primario son liberados factores, que promueven la inflamación y activación glial, lo que produce una mayor muerte neuronal y la desmielinización y pérdida progresiva de axones, provocando el llamado daño secundario y de manera crónica, la formación de una cicatriz glial o daño terciario (**Leal-Filho, 2011**). Existe además la formación de edema medular del tipo vasogénico desarrollado inmediatamente posterior al daño primario, al que se le sobrepone un edema de tipo citotóxico en los siguientes días. El edema vasogénico ocurre cuando hay un aumento de la permeabilidad capilar alrededor de la zona lesionada debido, entre otras causas, a alteraciones en la expresión de canales de agua conocidos como acuaporinas, y a la desregulación de la expresión de factores que modulan la permeabilidad vascular, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (**Benton, 2009; Fassbender, 2011**). La acuaporina-4 (AQP4) es el canal de agua más abundante a nivel del cerebro

(**Papadopoulos, 2004**) y la médula espinal y es exclusiva de los astrocitos (**Saandou, 2010**). La AQP4 se encuentra localizada específicamente en los pies de los astrocitos que rodean a los vasos sanguíneos (**Rash, 1998; Nesic, 2006; Saandou, 2008**). Interesantemente, ha sido descrito que la AQP4 posee una forma de presentación bifásica, permaneciendo prácticamente nula su expresión basal posterior a la LM durante los primeros días e incrementándose y manteniéndose elevada a partir del tercer día. Se cree que la imposibilidad de disponer de una expresión alta temprana origina una incapacidad de la médula para la movilización del agua en el edema agudo durante la LMAT (**Nesic, 2006**). Por su parte, el edema a su vez puede aumentar el daño tisular por el efecto compresivo del tejido, generando isquemia y contribuyendo a la cascada de factores que producen el daño secundario. El edema de la médula espinal constituye un importante problema clínico y debería considerarse una urgencia neurológica debido a que la médula espinal se encuentra contenida dentro de un espacio hermético e inexpansible constituido por la duramadre y el conducto vertebral.

Sin embargo, pese al avance en el entendimiento de algunos de estos procesos pro-inflamatorios y pro-apoptóticos que contribuyen al daño tisular, a la formación de edema y a la isquemia en la etapa aguda de la LM, así como de las fallas en la regeneración de las neuronas afectadas (**Benton, 2009; Giles-Dones, 2009; Moghieb, 2016**), el progreso en el desarrollo de estrategias terapéuticas para la LMAT ha sido muy pobre y desalentador (**Buss, 2007**).

No existe hasta ahora ningún tratamiento que haya demostrado su eficacia y seguridad en el manejo del edema espinal agudo que mejore el pronóstico de estos pacientes. La búsqueda de una estrategia eficaz de neuroprotección para prevenir la formación del edema que contribuye al daño tisular secundario en el escenario de una LMAT permanece como una prioridad para la ciencia médica.

En este estudio pretendemos identificar si existe alguna modulación en la expresión funcional de la AQP4 y por ende, en la formación y eliminación del edema medular, posterior al uso de MP en la LMAT en un modelo experimental murino.

II.- JUSTIFICACIÓN

La LM es una condición devastadora tanto para el individuo que la padece, como para su familia y la sociedad. Afecta a la población económicamente activa. La incidencia global se desconoce debido a la falta de estudios, pero la incidencia calculada en algunos países en desarrollo es de 25.5 casos por millón al año (**Rahimi-Movaghar, 2013**) y de lo doble, 54 casos por millón, en países desarrollados como EEUU, es decir, 17 000 casos nuevos cada año (www.nscisc.uab.edu). En México, se reporta que un 79.9% de los casos que ingresan a un hospital de referencia de LM, corresponden a casos con LMAT y de ellos el 82.7% son hombres con una media en la edad de 33.9 años (**Zárate-Kalfópulos, 2016**).

No existe hasta ahora ningún tratamiento eficaz para el manejo de la LMAT que mejore el pronóstico de estos pacientes (**Short, 2000**), en gran parte debido a la falta en el entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares en la fisiopatología de la formación del edema medular que ocurren como daño secundario (**Benton, 2009; Buss, 2007**). El único medicamento empleado, que no ha probado su eficacia pero si sus efectos adversos a dosis altas, es la MP (**Bracken 1984, 1990, 1997 y 2012; Hurlbert, 2013; Bydon, 2014, Andrés-Cano, 2015**). Se debe caracterizar el efecto de la MP sobre la expresión funcional de la AQP4 en la fase aguda de la LM, así como su relación con las alteraciones en la permeabilidad de la barrera hemato-espinal que permita racionalizar su uso o confirmar su desuso en los casos de LMAT y facilite la identificación de nuevos blancos terapéuticos en momentos críticos de la formación del edema medular.

III.- PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

Los avances más recientes en los mecanismos moleculares de la fisiopatología de la LM centran su atención en la neurobiología de la inflamación, apoptosis y en los factores tróficos asociados a la permeabilidad vascular que generan el edema medular (**Benton, 2009**). Sin embargo, se ha observado que los cambios en la expresión de canales de agua podría estar implicada de forma importante en dichos mecanismos. Particularmente los cambios en la expresión funcional de la AQP4 a nivel de los pies de los astrocitos ha sido un nuevo campo de estudio a nivel cerebral y un potencial blanco terapéutico para la movilización del edema en la etapa aguda de la LM.

La asociación entre la expresión funcional de la AQP4 en relación con la alteración de la permeabilidad de la barrera hemato-espinal tras la modulación de su expresión mediante el uso de MP en la fase aguda de la LM no se encuentra aún caracterizada, por lo que como primer paso en esta línea de investigación nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Existe relación entre el grado de expresión funcional de AQP4 modulada por MP y la permeabilidad de la barrera hemato-espinal en relación al edema generado en la LMAT?

IV.- HIPÓTESIS

La MP modifica la expresión funcional de la AQP4 y la permeabilidad de la barrera hemato-espinal secundarias a la LMAT.

V.- OBJETIVO GENERAL

Identificar los cambios en la expresión funcional de la AQP4 inducidos por la LMAT y modulados por la MP, así como la relación de tales cambios con la permeabilidad de la barrera hemato-espinal.

5.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la expresión funcional basal de AQP4 en la médula espinal de la rata.
- Determinar los cambios en la expresión funcional de AQP4 en la médula espinal de la rata atribuidos a la LMAT experimental.
- Determinar los cambios en la expresión funcional de AQP4 en la médula espinal de la rata con LMAT experimental inducida por MP.
- Determinar los cambios en la permeabilidad de la barrera hemato-espinal posterior a la LMAT y mediante el uso de MP en la rata.

VI.- MATERIAL Y MÉTODOS

A. Determinación de la expresión funcional de AQP4 y de la permeabilidad de la barrera hemato-espinal en modelo *in vivo* de LMAT en rata.

A.1. Diseño del estudio

Piloto experimental en ratas.

A.2. Tamaño de la muestra

24 ratas en dos grupos (A y B). Cada grupo con 12 ratas (tamaño de muestra basado en la *n* de los grupos del experimento de **Kimura, 2010**).

A.3. Instalaciones

El desarrollo experimental de este proyecto de investigación se llevó a cabo en el Departamento de Neuropatología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y en el laboratorio experimental de la Fundación CAMINA perteneciente a la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS.

A.4. Diseño experimental

a) *Descripción del modelo in vivo de contusión de la médula espinal en la rata.*

Todos los procedimientos quirúrgicos, cuidados pre- y post-quirúrgicos y manejo de las ratas empleadas para este estudio siguieron un estricto apego a los protocolos para la utilización y manejo de animales de laboratorio y los protocolos de bioseguridad del bioterio de acuerdo a la NORMA OFICIAL MEXICANA (NOM-062-ZOO-1999) en su TÍTULO SÉPTIMO (**ver anexo 1**).

En este estudio se emplearon ratas Long-Evans, hembras y machos, adultas, con peso entre 250 y 400 g. Las ratas fueron anestesiadas intraperitonealmente (i.p.) con pentobarbital 6.3g/100ml (50 mg/kg) y colocadas en decúbito prono en un aparato de estereotaxia. Previa tricotomía y antisepsia con isodine, se realizó una incisión en la línea media en la piel de la región dorsal. Posterior a realizar disección subperióstica de la musculatura paraespinal, se realizó una laminectomía en los segmentos T9 y T10 para exponer a la médula espinal. Se empleó el sistema de caída de peso de la Universidad de Nueva York para producir la LM por contusión como se describe en **Diaz-Ruiz, 2011**, para lo cual, previa fijación de la columna vertebral de la rata mediante sujetadores espinales en los procesos espinosos de las vértebras T8 y T11, se acomoda un transductor sobre la apófisis trasversa de T9 y se centra el rodillo de impacto por encima de éste. El rodillo se hace descender lentamente hasta que entra en contacto con la duramadre, lo que es determinado por una alarma que se escucha cuando el contacto del rodillo con la dura cierra un circuito. Una vez calibrado el sistema, la lesión medular es producida al soltar el rodillo de 10 g desde una distancia de 25 mm. Al finalizar el procedimiento, se procedió al cierre por planos. Las ratas se recuperaron de la anestesia y del procedimiento quirúrgico en una unidad de cuidados intensivos para especies pequeñas (*Schoer Manufacturing Co. Kansas City, MO*) y posteriormente se regresaron a sus cajas donde recibieron alimento y agua *ad libitum*, así como manejo analgésico con paracetamol.

Se formaron dos grupos de estudio:

- GRUPO A: Ratas hembras cuya médula espinal tuvo un procesamiento histológico para determinación por inmunohistoquímica de AQP4.
- GRUPO B: Ratas macho cuya médula espinal se extrajo sin fijación para la valoración de la permeabilidad de la barrera hemato-espinal.

Todas las ratas se sacrificaron 24 horas posteriores a la generación de la LM. Para el grupo B, 30 minutos previos al sacrificio de las ratas, se administró el colorante azul de Evans (AE) i.v., lo cual permite la evaluación ulterior de la permeabilidad hemato-espinal mediante espectrofluorimetría de fluorescencia.

Ya que parte del objetivo de este estudio era el determinar si la expresión de AQP4 se modificaba por el uso de la MP, se evaluó la expresión basal en ratas sanas, en ratas lesionadas, así como en ratas con y sin medicamento. La administración de MP se realizó entre los 10 minutos posteriores a la generación de la LM y antes de los 30 minutos, de acuerdo a lo descrito por **Yoon, 1999**. Se formaron en cada grupo dos subgrupos tratados con MP (subgrupos de estudio) y dos controles (sin MP). Se empleó succinato sódico de MP 500mg liofilizado (dosis única 30mg/kg i.p.) administrado 10 minutos posteriores a la lesión. En las ratas a las que no se les administró MP, se les administró como vehículo (VH) buffer fosfato por la misma vía y a la misma dosis, también 10 minutos posteriores a la lesión. De este modo se formaron los siguientes 2 grupos y 8 subgrupos de estudio, cada uno con 3 ratas:

Grupo A (hembras) n=12			
Para determinación de la presencia de AQP4			
<i>Subgrupos</i>	<i>LM</i>	<i>MP</i>	<i>VH</i>
<i>Control, n=3</i>	(-)	(-)	(+)
<i>Estudio, n=3</i>	(-)	(+)	(-)
<i>Control, n=3</i>	(+)	(-)	(+)
<i>Estudio, n=3</i>	(+)	(+)	(-)

Grupo B (machos) n=12				
Para la evaluación de la permeabilidad de la barrera hemato-espinal				
<i>Subgrupos</i>	<i>LM</i>	<i>MP</i>	<i>VH</i>	<i>AE</i>
<i>Control, n=3</i>	(-)	(-)	(+)	(+)
<i>Estudio, n=3</i>	(-)	(+)	(-)	(+)
<i>Control, n=3</i>	(+)	(-)	(+)	(+)
<i>Estudio, n=3</i>	(+)	(+)	(-)	(+)

Abreviaturas: LM, lesión medular; MP, metilprednisolona; VH, Vehículo (buffer Fosfato); AE, colorante azul de Evans.

Las ratas fueron sacrificadas durante un plano profundo inducido con pentobarbital i.p., posterior a lo cual se perfundieron con 70 ml de solución de NaCl al 0.9%.

Inmediatamente después, para el grupo A de ratas cuyas médulas se procesarían para la determinación de AQP4, éstas se perfundieron con 250ml de paraformaldehído al 4% para ser fijadas (**ver anexo 2**). Se procedió entonces a la extracción del segmento torácico de médula espinal fijada para su procesamiento histológico por lo que se re-intervino el sitio quirúrgico retirando los puntos de sutura, extendiendo la incisión en la línea media dorsal hacia cefálico y caudal, y se disecó la musculatura paraespinal con bisturí, para retirar apófisis espinosas con gubia y ampliar laminectomía con pinza fina para la extracción de un segmento medular que involucrara tanto el epicentro de la lesión, como 1.5cm hacia cefálico y 1.5cm hacia caudal. Para el grupo A, este segmento medular se colocó en paraformaldehído al 4% (**ver anexo 2**) a 4°C por 24 horas enferulado en papel para evitar su deformación para la realización de los cortes histológicos. Posterior a 24 horas de fijación, se recambió el paraformaldehído en el que se encontraban embebidos los segmentos medulares fijados, por sacarosa al 30% (**ver anexo 2**) y se conservaron a 4°C.

El segmento medular de las ratas del grupos B, se extrajo posterior a la inyección intravenosa (i.v.) del colorante azul de Evans (AE) con la rata viva (ver adelante) y a la perfusión solo con solución de NaCl al 0.9% en el momento de su sacrificio. Una vez extraída, se colocó directamente en solución de sacarosa al 30% sin haberse fijado antes con paraformaldehído. Todas las médulas de las ratas del grupo B, se colocaron a 4°C para la posterior realización de la espectrofluorometría de fluorescencia y cuantificación del colorante AE.

b) Valoración neurológica 24 horas posteriores a la LM.

Se utilizó la escala de valoración neurológica de *Basso, Beattie y Bresnahan* (escala BBB) (**Basso, 1996**) para corroborar la abolición completa de la función motora por debajo del nivel medular en donde se realizó la lesión (T9-T10) con el sistema calibrado de peso de la Universidad de Nueva York (**Diaz-Ruiz, 2011**) generando de este modo una paraplejía experimental en todas las ratas (**Ver anexo 3**).

c) Determinación de la expresión de AQP4 por inmunofluorescencia en el modelo in vivo de contusión de la médula espinal en la rata.

Se determinó la expresión de AQP4 a través de inmunohistoquímica en cortes de 30 micras hechos con criostato. Las determinaciones de la expresión funcional de estas proteínas se realizó mediante cuantificaciones de fluorescencia del anticuerpo anti-AQP4 con la utilización de microscopía confocal sobre los cortes histológicos. Se hicieron cortes al mismo nivel para la identificación, también mediante inmunohistoquímica, de la *proteína fibrilar glial* (PFG) para obtener la co-localización de la AQP4 y corroborar su ubicación a nivel de los pies de los astrocitos alrededor de los capilares

(Ver anexo 4). Se evitó el tejido macerado y necrosado del epicentro para hacer inmunoquímica, así como la sustancia blanca de los cordones posteriores y laterales correspondientes al sitio expuesto que recibió la contusión, ya que era el más dañado y no era útil para su visualización. Por dicho motivo, se eligieron los cordones anteriores y las regiones caudal y cefálica aledañas al epicentro. Se realizó además un análisis de la intensidad de fluorescencia de AQP4 por sectores externo (colindante a la superficie medular), medio (exclusivamente sustancia blanca) e interno (colindante con la sustancia gris) de la sustancia blanca de los cordones anteriores, para conocer si existía alguna diferencia en su expresión o era posible utilizar cualquier sector mediante la determinación de los valores promedio, valor máximo y el geométrico obtenidos con el microscopio confocal.

d) Determinación de la permeabilidad vascular y su modulación por medio de MP en el modelo in vivo de contusión de la médula espinal en la rata.

Realizamos ensayos de permeabilidad de la barrera hemato-espinal, a través de la medición del paso de sustancias a las que regularmente la barrera hemato-espinal es impermeable, como el AE (**ver anexo 2**), para lo cual administramos este compuesto i.v. tanto en ratas sanas como en aquellas sometidas a LMAT experimental, posterior a la cirugía y 30 minutos previos a su sacrificio (**Saunders, 2014**). Se formó, como se comentó, un grupo B de ratas integrado por 2 subgrupos uno con MP y otro que recibió como vehículo agua destilada. Evaluamos la cantidad de AE infiltrado al parénquima medular por medio de espectrofluorometría de fluorescencia determinando de este modo el grado alteración en la permeabilidad de la barrera hemato-espinal e indirectamente el edema medular.

B.- Descripción de las variables de estudio y sus escalas de medición

Variables dependientes e independientes:

- Dependientes: Expresión funcional proteica de AQP4 (cuantitativa-ordinal) y cuantificación de colorante AE infiltrado (cuantitativa-ordinal).
- Independiente: MP (30mg/Kg i.p.) en bolo y en dosis única (cuantitativa-continua).

C.- Análisis estadístico

Método de Kolmogorov-Smirnov para conocer la distribución de los pesos de las 12 ratas hembras y 12 machos. Prueba de Anova para la comparación de las variables dependientes con la independiente.

VII.- RESULTADOS

A) *Modelo in vivo de contusión de la médula espinal en la rata*

Se intervinieron 24 ratas Long-Evans, adultas, con peso entre 250 y 400 g. Doce ratas hembras con pesos entre 250 y 315g, (media 287.75g SD \pm 18.32) constituyeron al grupo A, destinadas para la determinación de la expresión funcional de AQP4. Doce ratas macho con pesos entre 338 y 398g (media 369.16g SD \pm 24.91) constituyeron al grupo B, destinadas para la evaluación de la permeabilidad de la barrera hemato-espinal. (**Tablas 1 y 2**).

#Rata	Peso (g)	Grupo	Cirugía ó VH (dd/mm/aa)	Dosis VH/MP 62.5mg/5ml
10	300	<i>Control:</i> LM(-); MP (-); VH (+)	03/11/2015	0.72
11	282		03/11/2015	0.67
12	283		03/11/2015	0.68
7	298	<i>Estudio:</i> LM(-); MP (+); VH (-)	02/11/2015	0.72
8	289		02/11/2015	0.69
9	280		03/11/2015	0.67
1	295	<i>Control:</i> LM (+); MP (-); VH (+)	26/10/2015	0.70
2	275			0.66
3	250			0.60
4	272	<i>Estudio:</i> LM(+); MP (+); VH (-)	02/11/2015	0.65
5	315			0.76
6	314			0.75

Abreviaturas: AQP4, acuaporina-4; VH, vehículo (buffer fosfato); LM, lesión medular; MP, metilprednisolona; dd/mm/aa, día/mes/año; g, gramos; mg, miligramos; ml, mililitros.

Número de rata	Peso (g)	Grupo	Cirugía/VH/MP (dd/mm/aa)	Dosis VH/MP 12.5mg/5ml	Azul Evans 4mg/Kg
22	384	<i>Control:</i> LM(-); MP (-);VH(+); AE (+)	14/12/2015	0.92	1.53
23	397			0.95	1.59
24	383			0.92	1.53
25	365	<i>Estudio:</i> LM(-); MP (+);VH (-); AE (+)	15/12/2015	0.88	1.46
26	347			0.83	1.39
27	398			0.95	1.59
13	338	<i>Control:</i> LM(+); MP (-);VH (+); AE (+)	3/12/2015	0.81	1.35
14	338			0.81	1.35
15	350			0.84	1.40
19	397	<i>Estudio:</i> LM(+); MP (+);VH (-); AE (+)	10/12/2015	0.95	1.59
20	391			0.94	1.56
21	342			0.82	1.37

Abreviaturas: AE, colorante Azul de Evans; VH, vehículo (buffer fosfato); LM, lesión medular; MP, metilprednisolona; dd/mm/aa, día/mes/año; g, gramos; mg, miligramos; ml, mililitros.

b) *Valoración neurológica 24 horas posteriores a la LM.*

Todas las ratas presentaron 0 puntos durante la evaluación de la función neurológica de sus cuartos traseros al ser colocadas en un campo abierto a las 24 horas de generada la contusión a nivel T9-T10 con el sistema de caída de peso de la Universidad de Nueva York (**Diaz-Ruiz, 2011**) utilizando la escala de 21 puntos de *Basso, Beattie y Bresnahan* (**Basso, 1996**).

c) Determinación de la expresión de AQP4 por inmunofluorescencia en el modelo in vivo de contusión de la médula espinal en la rata.

Siguiendo el procesamiento de las médulas espinales de ratas descrito en métodos, se realizaron los cortes histológicos de 30 micras para las muestras fijadas con paraformaldehído del grupo A, incubándose con los anticuerpo antiAQP-4 y anti-PFG para su co-localización a nivel de los pies de los astrocitos. En el análisis de intensidad de fluorescencia de la AQP4 determinada en los 3 sectores estudiados de los cordones anteriores no se encontró diferencias entre ellos desde el punto de vista de su valor geométrico, por lo que se procedió a emplear cualesquiera de los 3. Se obtuvieron de este modo fotografías mediante microscopía confocal colocando agua y con el objetivo 40X de dichas regiones perivasculares de todas las 12 ratas en preparaciones con estos 2 anticuerpos para su identificación (**Figuras 1 y 2**). Se procedió al empleo de Merge colocando aceite y el objetivo de 63X para la obtención del empalme de fluorescencias procedentes de los anticuerpos AQP4 y PFG, para la visualización de la co-localización de la expresión de la AQP4 a nivel de los astrocitos (**Figura 3**).

d) Determinación de la permeabilidad vascular y su modulación por medio de MP en el modelo in vivo de contusión de la médula espinal en la rata.

Con las muestras no fijadas del grupo B, se realizó la comparación macroscópica de la extravasación del AE (**Figura 4**), además de la determinación de la cantidad éste colorante mediante espectrofluorometría de fluorescencia comparando los subgrupos de LM (+) MP (-) con el de LM (+) y MP (+), debido a que no se encontró colorante en los dos primeros subgrupos los cuales no tenían LM (**Figuras 5**).

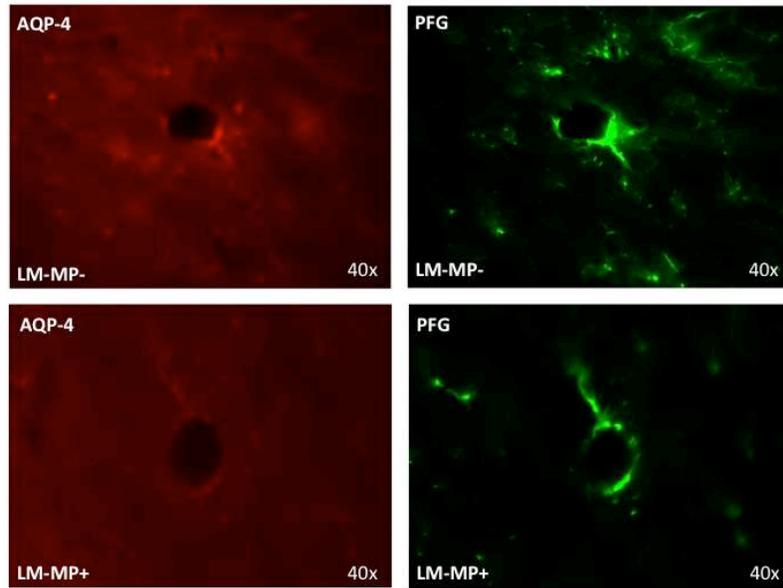


Figura 1. Microfotografías que demuestran la presencia de AQP4 (izquierda) y PFG (derecha) en el mismo nivel de corte a nivel de la sustancia blanca de los cordones anteriores en la médula espinal de la rata sin LM sin MP (superior) (n=3) y con MP (inferior) (n=3). *Imágenes representativas.* Aumento 40X. (**Abreviaturas:** LM, lesión medular; AQP4, acuaporina-4; PFG, proteína fibrilar glial; MP, metilprednisolona).

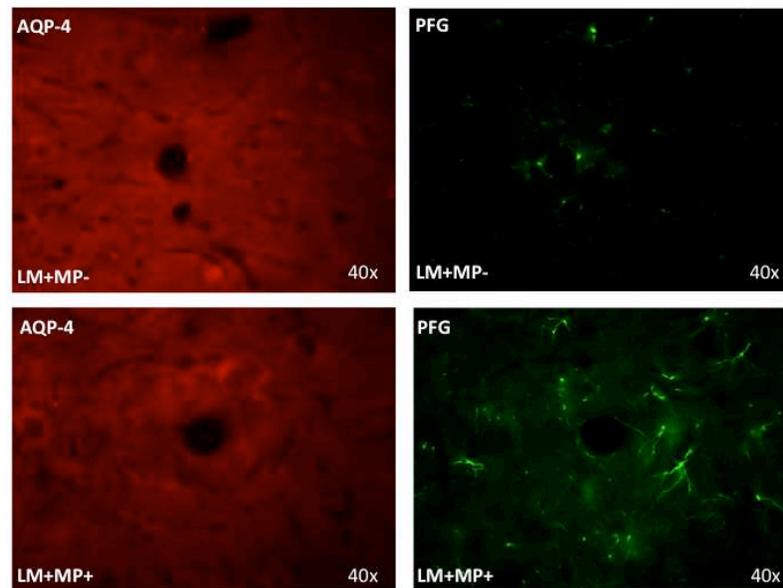


Figura 2. Microfotografías que demuestran la presencia de AQP4 (izquierda) y PFG (derecha) en el mismo nivel de corte a nivel de la sustancia blanca de los cordones anteriores en la médula espinal de la rata con LM sin MP (superior) (n=3) y con MP (inferior) (n=3). *Imágenes representativas.* Aumento 40X. (**Abreviaturas:** LM, lesión medular; AQP4, acuaporina-4; PFG, proteína fibrilar glial; MP, metilprednisolona).

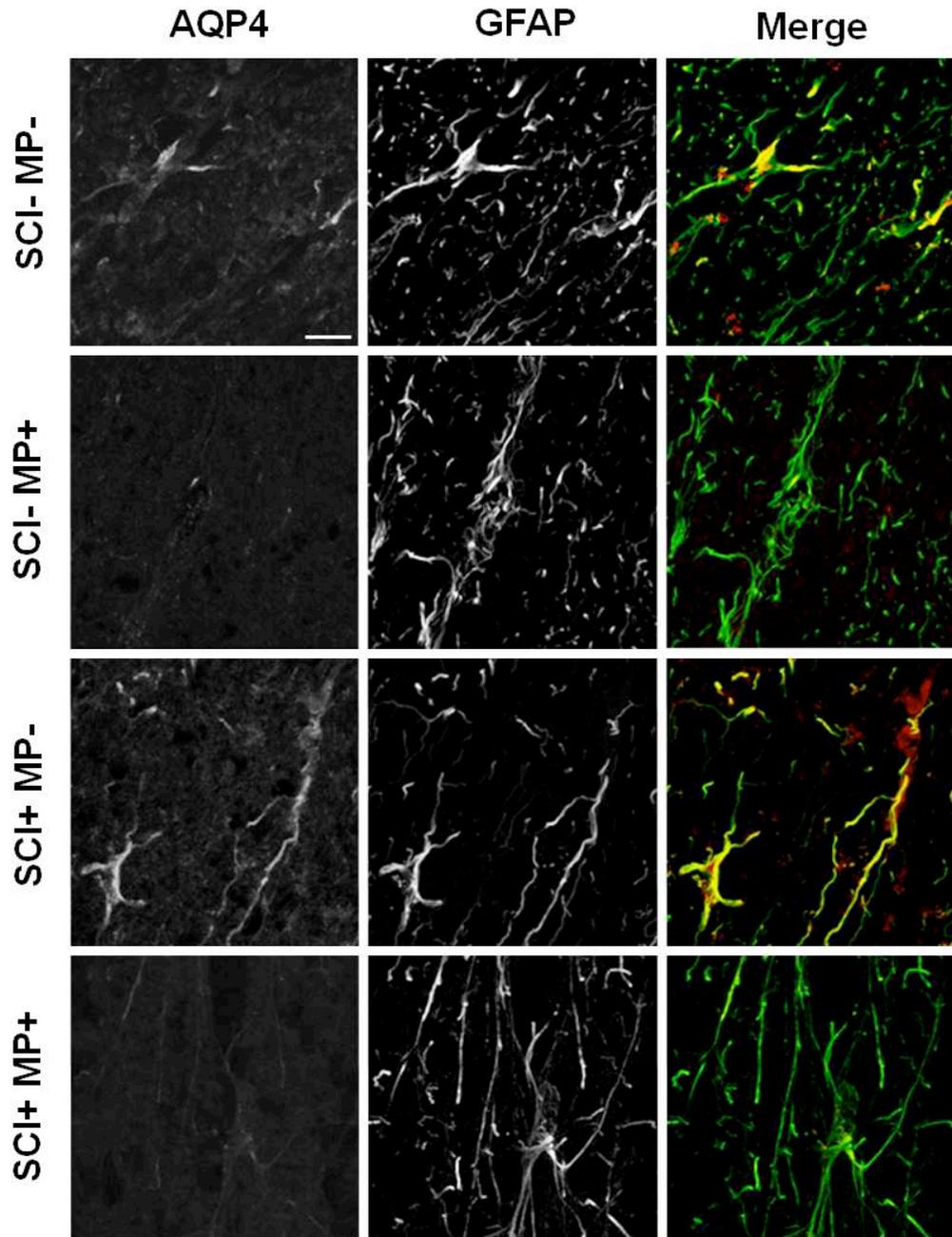


Figura 3. Microfotografías que demuestran la presencia de AQP4 (izquierda), PFG (en medio) y Merge (derecha) en el mismo nivel de corte a nivel de la sustancia blanca de los cordones anteriores en la médula espinal de las ratas con LM (n=3) y sin LM (SCI) (n=3), con MP (n=3) y sin MP (n=3). En Merge (derecha) se aprecia en amarillo la co-localización de la AQP4 en los procesos de los astrocitos como el empalme de fluorescencia de AQP4 y PFG. *Imágenes representativas.* Aumento 63X. (**Abreviaturas:** SCI, del inglés, lesión medular; MP, metilprednisolona; AQP4, acuaporina-4; PFG, proteína fibrilar glial; Merge, canales empalmados de fluorescencia.

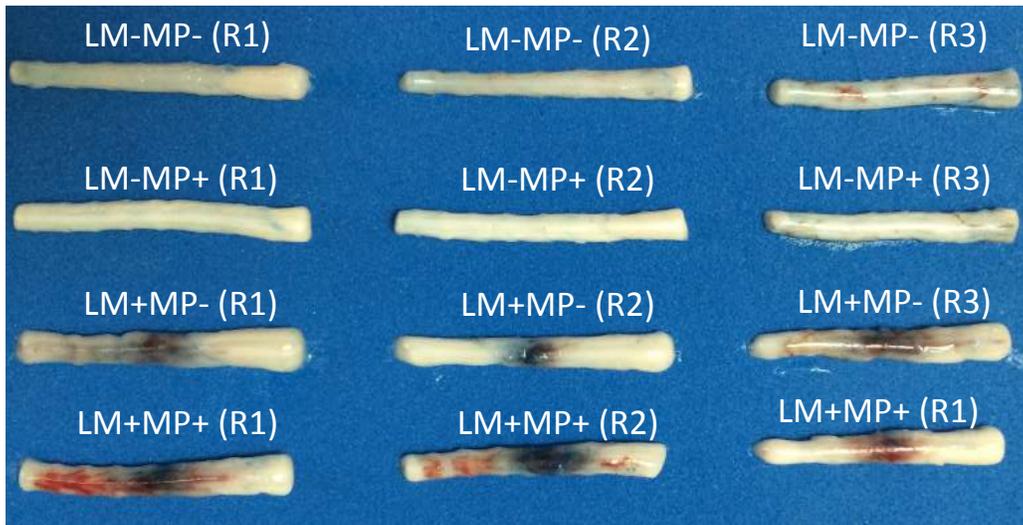


Figura 4. Fotografía macroscópica de los 12 fragmentos (3cm) de las médulas espinales extraídas del grupo B de ratas para la evaluación de la permeabilidad de barrera hemato-espinal a través de la extravasación del colorante AE. (**Abreviaturas:** LM, lesión medular; AE, colorante Azul de Evans; MP, metilprednisolona; R, rata).

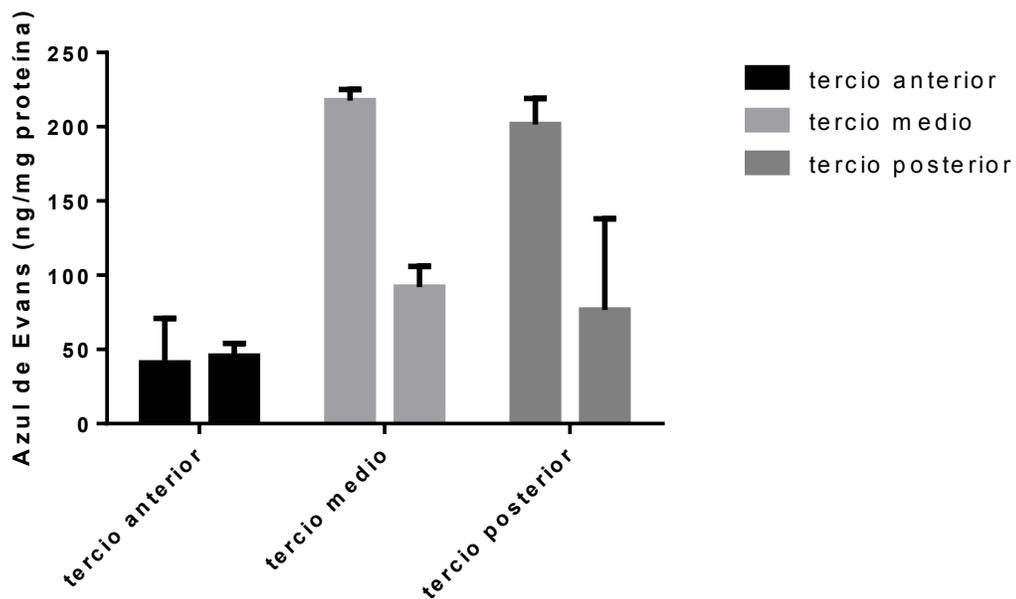


Figura 5. Gráfica de barras que demuestra la cantidad del colorante AE en ng/mg cuantificado en tres niveles de corte en la médula espinal contundida: cefálico (barras negras), medio o epicentro (barras gris claro) y caudal (barras gris oscuro), comparando al subgrupo LM(+) MP(+) (barra izquierda) contra el subgrupo de LM(+) MP (-) (barra derecha). (**Abreviaturas:** LM, lesión medular; AE, colorante Azul de Evans; MP, metilprednisolona). (Media \pm error estándar; $P < 0.5$)

VIII.- DISCUSIÓN

La lesión medular (LM) es una condición incapacitante que afecta la función motora, sensitiva y autonómica del individuo y puede llevar a una discapacidad neurológica permanente. Actualmente los accidentes automovilísticos son la principal causa (38%), seguidos por caídas (30.5%), actos de violencia (principalmente heridas por arma de fuego) (13.5%) y actividades deportivas y recreativas (9%) (www.nscisc.uab.edu). La incidencia es mayor en adultos jóvenes y es 3-4 veces más frecuente en el género masculino (**Devivo, 2012**). Aunado a la pérdida de la función motora, estos individuos pueden sufrir de dolor crónico, espasticidad, disautonomías, además de pérdida del control de los esfínteres vesical y fecal, y disfunción sexual.

Posterior al evento traumático en donde ocurre la destrucción mecánica del tejido en la médula espinal lesionada (daño primario), sobreviene una serie de cambios celulares y moleculares que acontecen en las siguientes horas a días y que generan un mayor daño (daño secundario). Estas serie de eventos secundarios incluyen: reactivación de astrocitos, infiltración de células del sistema inmune, una respuesta inflamatoria, disrupción de la barrera hemato-espinal, edema, apoptosis en neuronas y oligodendrocitos, y desmielinización. La presencia de cavidades y de cicatrización glial en el epicentro de la lesión constituyen el principal impedimento para la regeneración de los axones seccionados y la re-mielinización de los axones intactos del tejido circundante (**Elkabes, 2014**).

Múltiples agentes farmacológicos han sido evaluados en modelos animales, reportando algunos cierto efecto neuroprotector en la LM aguda, pero su dosis, duración y vía y momento de administración no han sido bien descritas (**Yoon, 1999**). Más aún, ninguno de ellos ha rebasado la fase experimental. La metilprednisolona (MP) ha sido el único medicamento que demostró su utilidad aparente y alcanzó la fase 3 en ensayos clínicos controlados en humanos, por lo que su uso se ha extendido por todo el mundo. El supuesto beneficio de este agente radica en inhibir la peroxidación lipídica y por tanto, mantener la integridad de las membranas celulares evitando el desencadenamiento de esta cascada en múltiples sitios. Actualmente el uso de MP constituye un tema de mucha controversia en medicina, debido a que su administración a altas dosis se encuentra justificada por el trabajo de investigación de las últimas dos décadas llevado a cabo por Bracken MB de la Universidad de Yale, publicado como el National Acute Spinal Cord Injury Studies (NASCIS I, II and III) en revistas de alto impacto y prestigio (**Bracken 1984, 1990, 1997**). Sin embargo, pese a la mejoría motora reportada por este autor, su efecto benéfico no ha sido reproducible por otros grupos de investigación, no así sus efectos adversos, que incluyen mayor riesgo de infección y sepsis, descontrol glicémico, sangrado de tubo digestivo, embolismo pulmonar, fallo respiratorio entre los más importantes (**Hurlbert, 2013; Chikuda, 2014**). Recientemente, la metodología de estos tres estudios ha sido extensamente criticada (**Andrés-Cano, 2015**) y en 2013, fue publicada una nueva Guía de Práctica Clínica para el manejo de la LMAT que no recomienda su uso y advierte sobre los posibles efectos secundarios. De hecho, la *Food and Drug Administration* de los EEUU, no tiene aprobado su uso para este fin. Por lo que, hasta ahora no existe evidencia clase I o II que soporte el beneficio clínico para el uso de MP en la LMAT y por el contrario,

si se dispone de evidencia clase I, II y III de que altas dosis de MP están asociadas a efectos deletéreos incluyendo la muerte (**Hurlbert, 2013**). Debido a que esta *mala praxis* con el uso de esteroides a altas dosis continúa alrededor del mundo, particularmente en los países poco desarrollados (**Andrés-Cano, 2015**), nosotros encontramos de gran interés y utilidad demostrar a través de un estudio experimental, si la MP produce un empeoramiento en el edema medular agudo secundario a traumatismo para justificar la erradicación de su uso.

Además de la respuesta inflamatoria que se inicia en las primeras horas, más importante es, desde el punto de vista del aumento del volumen, el edema en la médula espinal contundida. Al igual que el edema cerebral, el edema espinal representan una urgencia neurológica, debido a que ambas estructuras se encuentran contenidos en espacios herméticos e inexpandibles constituidos por la duramadre y tejido óseo, lo que conlleva a la generación de compresión, isquemia y muerte celular en las siguientes horas posterior al evento traumático. El edema vasogénico ocurre cuando hay un aumento de la permeabilidad capilar alrededor de la zona lesionada debido, entre otras causas, a alteraciones en la expresión de canales de agua conocidos como acuaporinas, y a la desregulación de la expresión de factores que modulan la permeabilidad vascular, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (**Benton, 2009; Fassbender, 2011**). Las acuaporinas constituyen una familia de por lo menos 11 proteínas y proveen la ruta principal para la movilización del agua en todos los tejidos. Consisten en pequeñas proteínas de membrana hidrofóbicas de unos 28kD que se ensamblan en homo-tetrámeros que facilitan el paso bidireccional del agua a través de las membranas en respuesta de gradientes osmóticos. La acuaporina-4 (AQP4) es el canal de agua más abundante en el sistema nervioso (SN) y se localiza predominantemente en los pies de los astrocitos (**Rash, 1998; Nesic, 2006; Saandou, 2008**) que rodean neuronas y capilares, así como en la glía limitante interna y externa, lo que sugiere su rol preponderante en el intercambio de agua entre la sangre y el líquido cefalorraquídeo y el tejido nervioso. El número de neuronas es sobrepasado por el de astrocitos y estos últimos pueden incrementar su tamaño hasta 5 veces al estar edematizados, por lo que el edema en el SN resulta prácticamente del edema glial o astrocítico. El edema en el SN se asocia a una alta morbilidad y mortalidad (**Nesic, 2006**). La AQP4 es actualmente la proteína más implicada en la formación y eliminación del edema en el cerebro y ha sido recientemente descrita en la fisiopatología del edema en la médula espinal (**Nesic, 2006**). Se sabe que el edema espinal puede aumentar el daño tisular secundario tan sólo por el efecto compresivo del tejido causando isquemia (**Wagner, 1981**). Es por eso, que la modulación de la expresión de la AQP4 en la medula espinal con edema, constituye uno de los blancos farmacológicos de mayor interés a tratar en las primeras horas después del traumatismo.

Como se mencionó, el edema vasogénico aparece primariamente ante una disrupción en la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica con la subsecuente acumulación de agua en el espacio extracelular. Por otro lado, en el edema citotóxico existe una acumulación del agua dentro de las células independiente de la integridad de la barrera hemato-encefálica. En modelos experimentales de bloqueo genético en la expresión de AQP4 se ha visto que, el edema citotóxico mejora, pero empeora el vasogénico (**Manley, 2000**). Lo anterior sugiere que la

remoción del exceso del agua del espacio extracelular requiere de la presencia de la AQP4, remarcando lo indispensable que es esta molécula para el egreso del agua desde el parénquima hacia el espacio intravascular (**Papadopoulos, 2004**). Sin embargo, aunque la distribución y un aumento en la expresión de la AQP4 en los pies de los astrocitos que forman las barreras hemato-encefálica y hemato-espinal, supondría por un lado, facilitar la remoción de agua en el edema vasogénico, por otro lado, la expresión de este mismo canal de agua parece contribuir más tardíamente a la acumulación del agua dentro de los astrocitos en el edema citotóxico o incluso semanas después, a la formación de cavidades siringomiélicas (**Hemley, 2013**). Estos conceptos de los mecanismos de una posible función paradójica de la AQP4 en relación al edema citotóxico versus el vasogénico en la médula espinal, esta todavía menos explorados que en el cerebro (**Nesic, 2006**). Los cambios en la expresión funcional de la AQP4 en la LM y la formación de edema, parece obedecer a una respuesta maladaptativa encontrada tanto en esta patología como en otras que afectan al SN. Sin embargo, hasta ahora parece claro que existe una respuesta temporal pobre en la expresión de la AQP4 en la etapa aguda de la LM a nivel de los pies de los astrocitos, que origina una lenta movilización del agua acumulada en el espacio extracelular dentro del parénquima de regreso hacia el espacio intravascular por estos canales de agua. Esto aunado a una persistente alteración en la permeabilidad de la barrera hemato-espinal desencadenada por factores como el VEGF generan la acumulación de agua por su extravasación.

Resulta interesante, que pese a que se ha estudiado la presencia de AQP4 a nivel de la médula espinal en la rata, así como los cambios en su expresión funcional cuando existe LM (**Nesic, 2006**), aún se desconocía si la MP, el fármaco más utilizado en el mundo, tiene algún efecto en la modulación de la expresión de estos canales de agua que explique cómo este fármaco contribuye a la formación/eliminación del edema.

Nuestro primer hallazgo, es que la expresión basal de AQP4 en la médula espinal sana, aunque presente, es escasa y su distribución al evaluar los 3 sectores (interno o en contacto a la sustancia gris; medio o en la sustancia blanca de los cordones; externo o cercano a la superficie de la médula espinal) fue semejante, por lo que la búsqueda de su presencia a nivel de los procesos astrocíticos, pudo hacerse de forma intencionada en cualesquiera de dichas regiones. Esta presencia y localización de estos canales de agua, predominantemente a nivel de los pies de los astrocitos rodeando los capilares coincide con lo reportado por otros investigadores (**Rash, 1998; Oshio, 2004; Vitellaro-Zucarello, 2005; Nesic, 2006**) y es consistente con el papel atribuido para la movilización de moléculas de agua del espacio extracelular al intravascular cuando existe edema. Si bien depende de la etiología, diversos grupos han reportados cambios en la expresión de AQP4 posterior a la generación del daño en el SN. Aunque ha sido reportada una ligera disminución en la expresión de la AQP4 posterior a la contusión de la médula espinal (**Nesic, 2006**), nosotros no notamos dichos cambios, observando el mismo nivel de expresión e intensidad de fluorescencia en las médulas con y sin LM. Al igual que lo encontrado por **Zhao, 2005** y **Nesic, 2006**, con respecto a la expresión de la PFG, nosotros tampoco encontramos cambios en las médulas de las ratas con y sin LM. Se sabe que estos cambios en la expresión de AQP4 y PFG

dependen del tiempo en el que se determinen, ya que durante las primeras 48 h se espera que la expresión de la PFG se mantenga, mientras la de la AQP4 disminuya (Nesic, 2006). Es probable que, dado que las muestras provienen de las ratas con LM de nuestro experimento al tener sólo 24h de evolución, no hayan tenido un tiempo suficiente para evidenciar dicho cambio en la expresión a la baja de la AQP4. Hechos importantes consisten en que la activación de los astrocitos posterior a la fase aguda de la LM pudiera estar asociado a cambios transcripcionales en la expresión de la AQP4 y en su fenotipo. Del mismo modo, cambios en la localización de las AQP4, distintas a los pies de los astrocitos constituyendo la barrera hemato-espinal, de la glía interna y externa, generan cambios en la función de estos canales.

Cuando evaluamos el efecto que tenía la MP sobre la expresión de la AQP4 en la médula de la rata tanto con lesión como sin ella, observamos un claro efecto modulador. El uso de MP, tanto en la rata sin LM como en el modelo experimental de LMAT, condicionó una regulación a la baja en la expresión de la AQP4, haciendo prácticamente nula su presencia, impidiendo aún más la movilización de agua y propiciando la formación de edema vasogénico en la médula lesionada. Esto está en relación con el efecto deletéreo del uso de la MP a altas dosis en los pacientes con LMAT en la clínica en todas partes del mundo.

Más aún, la mayor cantidad de edema vasogénico que ocurre por la alteración en la permeabilidad de la barrera hemato-espinal y que genera la entrada de agua del espacio intravascular al parénquima espinal, independientemente de las AQP4, quedó evidenciado por la mayor presencia del colorante azul de Evans (AE) en el epicentro de la lesión del parénquima medular de las ratas lesionadas. El hecho de que, se administrara MP en las ratas con LM, impidió la movilización del agua (colorante) de regreso al espacio intravascular. Lo anterior pudo evidenciarse, tanto macroscópicamente como con la cuantificación espectrofluoroscópica del AE.

Pese a ser un estudio descriptivo y de asociación, este trabajo aporta evidencia experimental de que el uso de altas dosis de MP para tratar a la LM traumática en la fase aguda, provoca un empeoramiento en la eliminación del edema de la médula espinal al reducir aún más la expresión de AQP4 en los pies de los astrocitos que rodean a los vasos sanguíneos y que forman la barrera hemato-espinal.

IX.- CONCLUSIONES

Con este modelo experimental de LMAT pudimos evaluar cómo la administración de altas dosis de MP modula de manera diferencial la expresión funcional de AQP4 a partir de su expresión basal. La primer conclusión que encontramos consiste en que la expresión basal de AQP4 en la médula espinal es baja. Nuestra segunda conclusión radica en que la LM no modifica la expresión basal de la AQP4. La tercer conclusión radica en que la administración de MP disminuye la expresión basal de AQP4. Por otra parte, la administración de MP permite la acumulación de una mayor cantidad del colorante AE en el parénquima. Todo ello esta en relación a que la MP en la LMAT disminuye la expresión funcional de AQP4 y aumenta la cantidad de AE extravasado.

X.- LIMITACIONES

Pese a que un modelo animal pueda diferir en su fisiología, bioquímica y anatomía a ser humano, los hallazgos de este experimento son consistentes con la falta de mejoría neurológica observada en el humano con LM tratado con altas dosis de MP, pese a su administración dentro del rango de 10 a 30 minutos posteriores a la generación de la LM, de acuerdo a lo descrito por **Yoon, 1999**, quien no observó ningún cambio histológico posterior a los 30 minutos de administración de MP i.p. a 30 mg/Kg como dosis única.

Por otro lado, la estandarización de la técnica para la generación de la LM mediante el sistema de caída de peso de la Universidad de Nueva York (**Diaz-Ruiz, 2011**) impide generalizar resultados debido a, que el traumatismo más comúnmente observado en el humano con LM incluye cierto mecanismo de rotación de la médula al tratarse de fracturas-luxaciones, cuestión que no es reproducible en ninguno de los modelos experimentales existentes.

Con respecto a la evaluación de la severidad de la LM en la rata, aunque podría hacerse empleo de un monitoreo neurofisiológico con potenciales somatosensoriales en el postoperatorio inmediato de las ratas para conocer con exactitud el grado de severidad de la LM generada, el seguimiento en el diseño de estudio de este proyecto culmina a las 24 horas y no pretende comparar una evaluación neurológica inicial con otra en otro momento, por lo que el empleo de la escala BBB (**Basso, 1996**) en donde observamos que todas las ratas presentaron paraplejia (0 puntos) a las 24 horas fue suficiente.

Tienen particular interés los estudios en modelos animales que han evidenciado una diferencia de género en el pronóstico funcional de la LM, con una notable recuperación motora en las ratas hembra. Estos estudios indican cierto papel neuroprotector de los estrógenos, particularmente del 17β -estradiol sobre sus receptores, al ejercer un efecto anti-inflamatorio y anti-apotótico, y disminuir la reactividad de los astrocitos, disminuyendo así el daño tisular secundario (**Elkabes, 2014**). En este sentido, sería de particular importancia duplicar la *n* del experimento haciendo grupos con géneros opuestos tanto para la determinación de la presencia de AQP4, como para la evaluación de la permeabilidad de la barrera hemato-espinal. Para ello, se emplearían métodos de estadística no paramétrica (*U de Mann-Whitney*) para determinar diferencias entre dos grupos de género opuesto, si sus pesos no siguieran la normalidad.

Con respecto a la determinación de la cantidad de agua en la médulas lesionadas en comparación a sus controles existen múltiples estudios en donde ésta es determinada empleando la diferencia entre su peso en fresco y el de las médulas deshidratadas con calor. Aunque en este trabajo consideramos asociar la expresión funcional de la AQP4 con un dato que nos indicara la cantidad de líquido extravasado al parénquima y por tanto, de la disrupción de la barrera hemato-espinal empleando el colorante AE, sería interesante correlacionar esta información con la diferencia en la cantidad de agua de las médulas lesionadas con las no lesionadas.

Finalmente, para la co-localización de AQP4 en la cercanía de los vasos sanguíneos, consideramos el uso de un marcador específico del endotelio.

XI. PERSPECTIVAS

Propuesta de conformación de grupos C y D con un mismo número de ratas (12 por grupo y 3 por subgrupo) para el análisis comparativo entre grupos de género opuesto (**Tablas 3 y 4**) con la finalidad de verificar la presencia o ausencia del efecto neuroprotector en los grupos de ratas hembra (A y D) comentado en el apartado de limitaciones de este estudio.

De igual forma, se calculó la media y desviación estándar de los pesos que deben tener los grupos C (machos) y D (hembras) para ser lo más homogéneo posibles (**Figuras 6 y 7**), excepto por el género a su contraparte, los grupos A y B. Al no contener diferencias significativas entre grupos estos podrán compararse (A con C y B con D).

Grupo C (machos) n=12			
Para determinación de la presencia de AQP4			
Subgrupos	LM	MP	VH
Control, n=3	(-)	(-)	(+)
Estudio, n=3	(-)	(+)	(-)
Control, n=3	(+)	(-)	(+)
Estudio, n=3	(+)	(+)	(-)

Tabla 3. Propuesta de grupo C con ratas macho para duplicar la muestra con un grupo del género opuesto para la determinación de la presencia de AQP4. (**Abreviaturas:** AQP4, acuaporina-4; LM, lesión medular; MP, metilprednisolona; VH, Vehículo (buffer fosfato)).

	Estadísticos descriptivos								
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Error típico
Ratas hembras grupo A	12	250,00	315,00	287,7500	18,32100	-,336	,637	,423	1,232
N válido (según lista)	12								

Figura 6. Media y desviación estándar con los pesos de las ratas hembras del grupo A ya intervenido para ser tomados como referencia para la conformación del grupo C de ratas macho a intervenir, para la determinación de la presencia de AQP4. (**Abreviaturas:** AQP4, acuaporina-4).

Grupo D (hembras) n=12				
Para la evaluación de la permeabilidad de la barrera hemato-espinal				
Subgrupos	LM	MP	VH	AE
Control, n=3	(-)	(-)	(+)	(+)
Estudio, n=3	(-)	(+)	(-)	(+)
Control, n=3	(+)	(-)	(+)	(+)
Estudio, n=3	(+)	(+)	(-)	(+)

Tabla 4. Propuesta de grupo D con ratas hembra para duplicar la muestra con un grupo del género opuesto para la evaluación de la permeabilidad de la barrera hemato-espinal. (**Abreviaturas:** LM, lesión medular; MP, metilprednisolona; VH, Vehículo (buffer fosfato); AE, colorante azul de Evans).

	Estadísticos descriptivos								
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Error típico
Ratas machos grupo B	12	338,00	398,00	369,1667	24,91014	-,107	,637	-1,982	1,232
N válido (según lista)	12								

Figura 7. Media y desviación estándar con los pesos de las ratas macho del grupo B ya intervenido para ser tomados como referencia para la conformación del grupo D de ratas hembra a intervenir, para la evaluación de la permeabilidad de la barrera hemato-espinal.

XII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrés-Cano P, Andrés-García JA, Álvarez-Galovich L. [Corticosteroid therapy for acute spinal cord injury: the NASCIS controversy]. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol.* 2015 Jan-Feb;59(1):69-70.
2. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol.* 1996 Jun;139(2):244-56.
3. Benton RL, Maddie MA, Gruenthal MJ, Hagg T, Whittemore SR. Neutralizing endogenous VEGF following traumatic spinal cord injury modulates microvascular plasticity but not tissue sparing or functional recovery. *Curr Neurovasc Res.* 2009 May; 6(2):124-31.
4. Bracken MB, Collins WF, Freeman DF, Shepard MJ, Wagner FW, Silten RM, Hellenbrand KG, Ransohoff J, Hunt WE, Perot PL Jr, et al. Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA.* 1984 Jan 6;251(1):45-52.
5. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon J, 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. *N Engl J Med.* 1990 May 17;322(20):1405-11.
6. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W: Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA* 277(20): 1597–1604, 1997.
7. Buss A, Pech K, Kakulas BA, Martin D, Schoenen J, Noth J, Brook GA. Growth-modulating molecules are associated with invading Schwann cells and not astrocytes in human traumatic spinal cord injury. *Brain.* 2007 Apr;130(Pt 4):940-53.
8. Bydon M, Lin J, Macki M, Gokaslan ZL, Bydon A. The Current Role of Steroids in Acute Spinal Cord Injury. *World Neurosurg.* 2014 Nov;82(5):848-854.
9. Bracken MB. Steroids for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Jan 18;1:CD001046.
10. Chikuda H, Yasunaga H, Takeshita K, Horiguchi H, Kawaguchi H, Ohe K, Fushimi K, Tanaka S. Mortality and morbidity after high-dose methylprednisolone treatment in patients with acute cervical

spinal cord injury: a propensity-matched analysis using a nationwide administrative database. *Emerg Med J.* 2014 Mar;31(3):201-6.

11. Devivo MJ. Epidemiology of traumatic spinal cord injury: trends and future implications. *Spinal Cord.* 2012 May;50(5):365-72.
12. Diaz-Ruiz A, Salgado-Ceballos H, Montes S, Guizar-Sahagún G, Gelista-Herrera N, Mendez-Armenta M, Diaz-Cintra S, Ríos C. Delayed administration of dapsona protects from tissue damage and improves recovery after spinal cord injury. *J Neurosci Res.* 2011 Mar;89(3):373-80.
13. Elkabes S, Nicot AB. Sex steroids and neuroprotection in spinal cord injury: a review of preclinical investigations. *Exp Neurol.* 2014 Sep;259:28-37.
14. Fassbender JM, Whittemore SR, Hagg T. Targeting microvasculature for neuroprotection after SCI. *Neurotherapeutics.* 2011 Apr;8(2):240-51.
15. Gil-Dones F, Alonso-Orgaz S, Avila G, Martin-Rojas T, Moral-Darde V, Barroso G, Vivanco F, Scott-Taylor J, Barderas MG. An optimal protocol to analyze the rat spinal cord proteome. *Biomark Insights.* 2009 Oct 28;4:135-64.
16. Hemley SJ, Bilston LE, Cheng S, Chan JN, Stoodley MA. Aquaporin-4 expression in post-traumatic syringomyelia. *J Neurotrauma.* 2013 Aug 15;30(16):1457-67.
17. Hurlbert RJ, Hadley MN, Walters BC, Aarabi B, Dhall SS, Gelb DE, Rozzelle CJ, Ryken TC, Theodore N. Pharmacological therapy for acute spinal cord injury. *Neurosurgery.* 2013 Mar;72 Suppl 2:93-105.
18. Jiménez-Ávila JM, Calderón-Granados A, Bitar-Alatorre WE. [Direct cost of spinal cord injuries]. *Cir Cir.* 2012 Sep-Oct;80(5):435-41.
19. Kimura A, Hsu M, Seldin M, Verkman AS, Scharfman HE, Binder DK. Protective role of aquaporin-4 water channels after contusion spinal cord injury. *Ann Neurol.* 2010 Jun;67(6):794-801.
20. Leal-Filho MB. Spinal cord injury: From inflammation to glial scar. *Surg Neurol Int.* 2011;2:112.
21. Lifshutz J, Colohan A. A brief history of therapy for traumatic spinal cord injury. *Neurosurg Focus.* 2004 Jan 15;16(1):E5.
22. Mattei TA. Surgical decompression after spinal cord injury: the earlier, the better! *World Neurosurg.* 2012 Nov;78(5):384-7.

23. Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med*. 2000 Feb;6(2):159-63.
24. Moghieb A, Bramlett HM, Das JH, Yang Z, Selig T, Yost RA, Wang MS, Dietrich WD, Wang KK. Differential Neuroproteomic and Systems Biology Analysis of Spinal Cord Injury. *Mol Cell Proteomics*. 2016 Jul;15(7):2379-95.
25. Nesic O, Lee J, Ye Z, Unabia GC, Rafati D, Hulsebosch CE, Perez-Polo JR. Acute and chronic changes in aquaporin 4 expression after spinal cord injury. *Neuroscience*. 2006 Dec;143(3):779-92.
26. Oshio K, Binder DK, Yang B, Schechter S, Verkman AS, Manley GT. Expression of aquaporin water channels in mouse spinal cord. *Neuroscience*. 2004;127(3):685-93.
27. Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J*. 2004 Aug;18(11):1291-3. Epub 2004 Jun 18.
28. Rahimi-Movaghar V, Sayyah MK, Akbari H, Khorramirouz R, Rasouli MR, Moradi-Lakeh M, Shokraneh F, Vaccaro AR. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in developing countries: a systematic review. *Neuroepidemiology*. 2013;41(2):65-85.
29. Reyes-Alva HJ, Franco-Bourland RE, Martinez-Cruz A, Grijalva I, Madrazo I, Guizar-Sahagun G. Characterization of spinal subarachnoid bleeding associated to graded traumatic spinal cord injury in the rat. *Spinal Cord*. 2014 Aug;52 Suppl 2:S14-7.
30. Saadoun S, Bell BA, Verkman AS, Papadopoulos MC. Greatly improved neurological outcome after spinal cord compression injury in AQP4-deficient mice. *Brain*. 2008 Apr;131(Pt 4):1087-98.
31. Saadoun S, Papadopoulos MC. Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *Neuroscience*. 2010 Jul 28;168(4):1036-46.
32. Saunders NR, Dreifuss JJ, Dziegielewska KM, Johansson PA, Habgood MD, Møllgård K, Bauer HC. The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. *Front Neurosci*. 2014 Dec 16;8:404.
33. Singh A, Tetreault L, Kalsi-Ryan S, Nouri A, Fehlings MG. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clin Epidemiol*. 2014 Sep 23;6:309-31.
34. Short DJ, El Masry WS, Jones PW. High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury - a systematic review from a clinical perspective. *Spinal Cord*. 2000 May;38(5):273-86.

35. Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 29;95(20):11981-6.
36. Vitellaro-Zuccarello L, Mazzetti S, Bosisio P, Monti C, De Biasi S. Distribution of Aquaporin 4 in rodent spinal cord: relationship with astrocyte markers and chondroitin sulfate proteoglycans. *Glia*. 2005 Aug 1;51(2):148-59.
37. Wagner FC Jr, Stewart WB. Effect of trauma dose on spinal cord edema. *JNeurosurg*. 1981 Jun;54(6):802-6.
38. Yoon DH, Kim YS, Young W. Therapeutic time window for methylprednisolone in spinal cord injured rat. *Yonsei Med J*. 1999 Aug;40(4):313-20.
39. Zárate-Kalfópulos B, Jiménez-González A, Reyes-Sánchez A, Robles-Ortiz R, Cabrera Aldana EE, Rosales-Olivarez LM. Demographic and clinical characteristics of patients with spinal cord injury: a single hospital-based study. *Spinal Cord*. 2016 Apr 12. [Epub ahead of print].
40. www.nscisc.uab.edu.

ANEXOS

ANEXO 1. NORMATIVIDAD PARA EL USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se siguieron los protocolos para uso y manejo de animales de laboratorio y los protocolos de bioseguridad del bioterio de producción de la Fundación CAMINA perteneciente a la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, así como los protocolos para la utilización de animales de experimentación de acuerdo a la NORMA OFICIAL MEXICANA (NOM-062-ZOO-1999) en su TÍTULO SÉPTIMO.

ANEXO 2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES EMPLEADAS EN LOS MÉTODOS.

Solución salina fisiológica

- Material:
 - 9 g de NaCl
- 1000 ml de agua destilada

Preparación:

1. Se pesan 9g de Na Cl en una balanza semianalítica.
2. Se vierten en un matraz de 1l.
3. Se afora agua destilada a 1l en el matraz para disolver la sal.
4. Se deja en agitación la solución 30 min con mosca magnética.
5. Se trasfiere a un frasco limpio y seco debidamente etiquetado.

Buffer fosfato (PB 0.2M, pH 7.4)

- 5.2 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado
- 23 g de fosfato de sodio dibásico anhidro.
- 1l de agua destilada

1l de agua destilada

1. Preparación:

Se vierten sales en un vaso de precipitados y se disuelven en agitación y calentamiento.

2. Se pasan a un matraz de un 1l y se afora con agua destilada.

3. Se trasfiere a un frasco limpio y seco debidamente etiquetado.

NOTA: De la solución PB 0.2M se toman 250ml y se lleva a 500ml con agua destilada para obtener PB 0.1M, pH7.4.

Paraformaldehído al 4% en PB

Material:

- 2 g de paraformaldehído (PFA)
- agua destilada
- 1g hidróxido de sodio o sosa cáustica (NaOH)

Preparación:

1-. Pesar 2 g de polvo de PFA en un tubo Falcon de 50 ml

2-. Poner a calentar agua en el microondas 2 min aproximadamente a una temperatura alrededor de los 60 °C.

3-. Verter 25 ml de esta agua en el que contiene el PFA (realizar esto en la campana de extracción)

4-. Agregar un 1/4 de parte de lenteja de NaOH.

5-. Agitar el vortex y si es necesario agregar un poco de sosa en solución para disolver completamente.

6-. Una vez que la solución se encuentre clara y traslúcida agregar PB 0.2 M hasta completar los 50 ml y de esta manera obtener el PFA en PB 0.1 M

7-. Verificar que el pH se encuentre entre 7 y 8 (≈ 7.4) por medio de tiras indicadoras de pH

8-. Mantener la solución a 4°C.

NOTA: El PFA deberá prepararse y utilizarse por máximo en los 2 días subsiguientes.

Sacarosa al 30% en PB 0.1 M

Material:

- 30 g de sacarosa
- 100 ml de solución de PB 0.1M

Preparación

1. Se toman 50 ml de PB 0.1M y se agregan 30 g de sacarosa y se deja 30 min en agitación con mosca magnética y calentamiento.
2. Una vez disuelta completamente. Se trasvasa la solución a un matraz aforado de 100 ml.
3. Se lleva a la marca de aforo (100 ml) con PB 0.1M.
4. Mantener la solución a 4°C.

Colorante azul de Evans al 2%

Material:

- 2 g de colorante azul de Evans
- 100 ml de solución de NaCl 0.9%

Preparación

1. Se prepara solución NaCl al 0.9% con 1000 ml de agua destilada y 9gr de NaCl. Se afora la solución en probeta y se mezcla.
2. Se toman 100 ml de la solución de NaCl 0.9% y se agregan 2 g de azul de Evans y se deja 30min en agitación con mosca magnética.
3. Permanece en refrigeración a 4°C.

Metilprednisolona

Material

- 1 ampula de 500 mg de succinato de metilprednisolona (MP)
- 8 ml de agua destilada como vehículo

Preparación

1. Se inyectan y mezclan 8ml de agua destilada al ampula con 500mg de succinato de MP (500mg/8ml= 62.5mg/ml)
2. Se extrae 1ml de MP preparada y se afora con 4 ml más de agua destilada, esto causa una dilución de la MP de 62.5mg/ml a 12.5mg/ml, esto con la finalidad de llenar una jeringa de 5 ml.
3. Dado que la MP se administra en la rata a 30mg/Kg i.p. en bolo y en una dosis única, se pesan a las ratas y se emplea la siguiente fórmula para su dosificación:

$$\text{Dosis MP (ml)} = (\text{Peso (g)} \times 30 \text{ (mg/Kg)} / 1000) / 12.5 \text{ mg/ml}$$

ANEXO 3. ESCALA DE LOCOMOCIÓN BBB .

(Tomado de: Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol.* 1996 Jun;139(2):244-56.)

Chart 1. BBB protocol scores.

Score	Characteristics	Remarks
0	No rear limb (RL) movements are observed	
1	Light movements of 1 or 2 rear limb joints	Light – Below 50% of the joint capacity
2	Extensive movement of 1 joint and possible slight movement of other joint in the rear limb	Extensive – Above or equal to 50% of joint capacity
3	Extensive movement of 2 rear limb joints	Two joints = hip and knee, usually
4	Light movements of all 3 joints	Three joints = hip, knee and ankle
5	Light movements of 2 joints, extensive movement of the 3 rd joint of the rear limb	
6	Extensive movements of 2 joints and delicate movement of the 3 rd joint of the rear limb	3 rd joint = ankle
7	Extensive movements of the 3 joints	
8	Light movements, without bearing the body weight or the foot resting without bearing the body weight	Rhythmic extension of 3 joints of the rear limb, the trunk is sideways
9	Arch support with bearing of body weight while immobile or occasional, frequent or consistent bearing of body weight with dorsal support	Weight bearing = contraction of muscle. Extension of the rear limb during arch support of the foot or raising of the immobile pelvis
10	Step bearing the body weight occasionally, without coordination between the fore and rear limbs	Occasionally > 5" and below or equal to 50%. Steps – arch contact with weight bearing, the rear limb advances to reestablish arch contact. Coordination – simultaneous movements between the rear limb and the fore limb, alternating between the sides.
11	From frequent to consistent: strides with weight bearing without coordination between the rear and fore limbs	Frequency – 51 to 94% of the time Consistent – 95 to 100% of the time
12	From frequent to consistent: strides with bearing of body weight and occasional coordination between the fore limbs and rear limbs	60 to 50% of coordinated locomotion
13	From frequent to consistent: strides with weight bearing and frequent coordination between the rear limb and the fore limb	51 to 95% of coordinated locomotion
14	Consistent coordination of the stride with arch support and predominant position of the foot and of rotation in initial contact and in raising, frequent plantar strides, consistent coordination between the fore limb and occasionally with dorsal support	Rotation => internal and external rotation of the rear foot when it is supported and raised
16	Consistent coordination of stride with arch support, predominant parallel position of the foot in initial contact and when raised	Frequent freedom of the 1st toe ≥ More than half of the strides are taken without hearing the scratching sounds
17	Consistent coordination of stride with arch support, predominant parallel position of the foot in initial contact and when raised	
18	Consistent coordination in stride with arch support and consistent release of the 1 st toe. Parallel position of the foot in initial contact and when raised	Consistent scratching of four toes for a period of 4 minutes
19	Consistent coordination of stride with arch support, consistent release of the 1 st toe. Parallel position of foot in initial contact and when raised, and the tail is down most of the time	Tail down => tail touches the ground during the steps
20	Consistent coordination of stride with arch support, consistent release of the 1st toe. Parallel position of foot in initial contact and when raised, the tail consistently raised and instability of trunk.	Raised tail => does not touch the ground. Instability of trunk => lateralization of trunk when turning quickly (loss of balance)
21	Consistently coordinated in gait, consistent movement of the 1st toe. Parallel position of the foot in support and when raised. Tail up Consistent stability of trunk	Consistent stability of trunk without wobbling or falling; movement of pelvis and tail coordinated with locomotion

ANEXO 4. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA EMPLEADAS.

Los cortes fueron bloqueados con albúmina sérica bovina al 5% en buffer Tris salino (TBS) con 0.1% de Triton X-100 (TBS-T) e incubados con los anticuerpos anti-AQP4 (1:100; Genentex) y anti-PFG (1:2000; Sigma) por 24 horas.

Los cortes fueron lavados 3 veces con TBS seguidos de 2 horas de incubación a temperatura ambiental con TBS-T conteniendo el anticuerpo conjugado anti-ratón Alexa Fluor 488 y el anticuerpo conjugado anti-conejo Alexa 546 (1:2000 cada uno; Invitrogen).

Las imágenes de la inmunofluorescencia fueron obtenidas con el microscopio confocal (Leica TCS SP5) empleando un objetivo de 40X (usando agua) y 63X (usando aceite). Fueron obtenidos un promedio de 24 cortes ópticos por cada micra por Z-stack.

ANEXO 5. RECURSOS ECONÓMICOS PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO.

A. DONACIONES:

Tantos las ratas Long-Evans como el equipo para la realización de la LM (aparato de extereotaxia con sistema de caída de peso de la Universidad de Nueva York) y la unidad de cuidados intensivos para especies pequeñas (*Schoer Manufacturing Co. Kansas City, MO*) fueron proporcionados por el Laboratorio de la Fundación CAMINA perteneciente a la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS.

El medicamento (succinato sódico de metilprednisolona y paracetamol), agua destilada, agujas, jeringas, equipo de venoclisis, gasas, solución de NaCl al 0.9% y suturas fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Rehabilitación.

Los medios para conservación y fijación de las muestras (paraformaldehído y solución de sacarosa al 30%) fueron preparados *ex profeso* el día de su utilización y donados por el Departamento de Neuropatología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

B. FINANCIAMIENTO:

Para la adquisición de los reactivos se contó con el Fondo de la Academia de Investigación en Ortopedia A.C. y la beca nacional CONACYT (No. de Becario 435070/577640).

C. COTIZACIONES DE REACTIVOS:

Se muestra la cotización del material, consumibles y equipo de laboratorio que se utilizó por anticuerpo:

Aproximado cotización por anticuerpo (precios sujeto al cambio del dolar):

- | | |
|---|--------------|
| • Anticuerpo | 9,000.00 MXN |
| • Anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo | 5,000.00 MXN |
| • Laminillas | 5,000.00 MNX |
| • Cubreobjetos | 2,000.00 MXN |
| • Medio de montaje | 5,000.00 MXN |
| • Navajas para criostato | 2,000.00 MXN |

Total aproximado por anticuerpo: \$ 28 000 MNX