Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LINEA DE INVESTIGACIÓN:
INVESTIGACIÓN BIOFARMACÉUTICA

"EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA METALOTIONEÍNA II Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ISOFORMAS I, II Y III DURANTE LA ETAPA AGUDA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL EN RATA".

COMUNICACIÓN IDONEA DE RESULTADOS
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS
PRESENTA:

QFB. SUSANA ARELLANO RUIZ
MATRÍCULA 209180671

COMITÉ TUTORIAL:

DRA. MARÍA DE LOS ANGELES ARACELI DÍAZ RUIZ
DR. LUÍS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA
DR. JAIME KRAVZOV JINICH

JULIO, 2011

EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA METALOTIONEÍNA II Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ISOFORMAS I, II Y III DURANTE LA ETAPA AGUDA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL EN RATA

COMITÉ TUTORAL

TUTOR

Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz Vo.Bo. _____

ASESORES

Dr. Luís Camilo Ríos Castañeda Vo.Bo. _____

Dr. Jaime Kravzov Jinich Vo.Bo. _____

ALUMNA	**MATRÍCULA**	
QFB. Susana Arellano Ruiz	209180671	Vo.Bo. _____

EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA METALOTIONEÍNA II Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ISOFORMAS I, II Y III DURANTE LA ETAPA AGUDA DE LA LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL EN RATA

JURADO DEL EXÁMEN DE GRADO

PRESIDENTE

Dra. Hermelinda Salgado Ceballos Vo.Bo. _____

VOCAL

Dr. Gabriel Guízar Sahagún Vo.Bo. _____

SECRETARIO

Dr. Luís Camilo Ríos Castañeda Vo.Bo. _____

RESUMEN

Después de una lesión traumática de la médula espinal (LTME) el daño se incrementa por la acción de una serie de mecanismos autodestructivos. Para inhibir o disminuir estos fenómenos, se han utilizado diversos tratamientos neuroprotectores, sin embargo, su eficacia no ha sido satisfactoria. Por tal motivo se siguen desarrollando otras estrategias neuroprotectoras a nivel experimental y clínico. En este trabajo, se propone el uso de la metalotioneína II (MT II) una proteína antioxidante con capacidad para atrapar radicales hidroxilo y superóxido, como tratamiento neuroprotector después de una LTME, y la caracterización de las isoformas I, II y III de la proteína por Electroforesis Capilar de Zona (ECZ), con la finalidad de elucidar el papel específico de cada isoforma en el organismo. Para este estudio se realizó la evaluación de la recuperación funcional de las patas traseras de animales sometidos a LTME, utilizando para ello la escala BBB que evalúa la calidad de la marcha, para lo cual se utilizaron ratas Wistar hembras de 200 a 250gr, que fueron divididas en cuatro grupos (grupo control sin tratamiento y tres grupos experimentales), los cuales fueron tratados con 3 diferentes dosis de MT (3.2,10.0 y 100.0μg) por vía i.p. a las 2 y 8 horas después de la lesión de acuerdo a los niveles mínimos presentes en el sitio del daño. Al término del estudio los animales fueron perfundidos con formol al 10% para obtener muestras de tejido medular y posteriormente se utilizó la técnica histológica de Klüver Barrera para poder realizar la cuantificación del tejido preservado. Por otra parte, para la determinación de las isoformas de la MT, los animales fueron divididos en cinco grupos: grupo control (animales sacrificados después de 2hrs de la laminectomía); y animales sometidos a LTME y sacrificados 2, 4, 12 y 24 hrs después de la lesión. En cuanto a los resultados de la evaluación de la recuperación funcional de los animales y la cuantificación del tejido preservado, se demostró una mayor recuperación en los animales que recibieron tratamiento con MT con dosis de 10 y 100μg, al ser comparados con el grupo control (lesionado sin tratamiento). También se caracterizaron y cuantificaron las isoformas de la MT I, MT II y MT III. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que la MT es un tratamiento neuroprotector efectivo después de una LTME por contusión en ratas.

UN SINCERO Y CORDIAL AGRADECIMIENTO A:

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA.
MANUEL VELASCO SUÁREZ.

LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA.
Dr. Luís Camilo Ríos Castañeda
Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz

LABORATORIO DE NEUROPATOLOGÍA
Dra. Marisela Méndez Armenta

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA.
IGNACIO CHÁVEZ.

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
Dr. Gustavo Pastelín Hernández
QFB. Leonardo del Valle Mondragón

CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL PROYECTO CAMINA
Dra. Hermelinda Salgado Ceballos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
Dr. Jaime Kravzov Jinich

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
Por la beca académica otorgada durante la realización del presente trabajo.
No. Registro 298090
Por el apoyo económico brindado para la realización del presente trabajo.
No. Registro 70064

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme concluir una etapa más, por regalarme el amor y guía de mí madre, la fortaleza y bondad de mi padre, la alegría y fuente de inspiración de mí hermana, quien con su sola presencia me llenó de vida.
Delfina Ruiz, Francisco Arellano y Ariana Arellano gracias por enseñarme que el mundo se mejora al ser mejores cada uno y que si estamos juntos no habrá barreras, gracias por estar siempre conmigo, los amo.

Omar Valencia y Erik Espino gracias por el invaluable cariño que me han brindado, por ayudarme a buscar soluciones, por cada palabra y por cada momento compartido.
Concepción Ramírez, Katiuska González y Karla Jiménez gracias por mostrarme su afecto, por el apoyo y comprensión que me ofrecieron.

Gracias a mi familia, a todos mis amigos y seres queridos, quienes estuvieron a mi lado en cada paso. Es difícil mencionar a cada uno de ustedes, pero en mi mente y en mi corazón estarán siempre presentes e inevitablemente formarán parte importante de mí, porque cada pensamiento, sentimiento y experiencia que compartí con ustedes llenó mi vida de alegrías y aprendizajes. Cada preciado segundo quedará atesorado eternamente en mi corazón.

Detrás de un gran logro hay siempre valiosas personas dispuestas a compartir su tiempo y sus conocimientos Dra.Araceli Díaz, Dr.Camilo Ríos, Dr.Jaime Kravzov, QFB.Leonardo del Valle, Dra.Marisela Méndez, Dra.Concepción Nava y Dra. Mireya Alcaraz gracias por enseñarme que la crítica y el cuestionamiento riguroso son claves para generar conocimiento de calidad. Gracias por ayudarme a entender que la paciencia y la perseverancia son claves para lograr las metas. Agradezco además su apoyo y motivación no solo académicamente, sino a nivel personal, ya que con cada palabra me ayudaron a crecer como persona.

Que Dios bendiga a cada una de las personas que compartió conmigo esta experiencia y sin cuyo apoyo no habría podido concluir esta tesis.

GRACIAS.

“En tiempos de cambio, quienes estén abiertos al aprendizaje se adueñarán del futuro, mientras que aquellos que creen saberlo todo estarán bien equipados para un mundo que ya no existe”

Eric Hoffer.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN — 1
ANTECEDENTES — 2
MARCO TEÓRICO — 5
- Sistema Nervioso Central (SNC) — 5
  - Encéfalo — 5
  - Médula Espinal — 6
  - Estructura interna de la médula espinal — 8
  - Membranas meníngeas — 10
  - Células nerviosas del SNC — 12
  - Señales nerviosas — 14
- Fisiopatología de la lesión traumática de la médula espinal (LTME) — 17
  - Lesión primaria — 18
  - Lesión secundaria — 18
  - Respuesta inflamatoria sistémica — 20
  - Estrés oxidativo asociado al trauma medular — 21
- Neuroprotección — 22
- Metalotioneína (MT) — 23
  - Estructura y función — 23
- Electroforesis — 27
  - Electroforesis capilar — 28

PLANTEAMINETO DEL PROBLEMA — 32
HIPÓTESIS — 32
OBJETIVOS — 33
- Objetivo general — 33
- Objetivos específicos — 33

MATERIALES Y MÉTODOS — 34
- Evaluación del efecto neuroprotector de la MT II administrada a diferentes dosis, con base en la recuperación motora en un modelo de LTME por contusión en rata. — 34
  - Modelo de lesión — 34
  - Tratamiento — 37
- Evaluación del efecto neuroprotector de la MT II administrada a diferentes dosis, con base en la cantidad de tejido preservado en un modelo de LTME por contusión en la rata. — 40
- Determinación de las isoformas de las Metalotioneínas I, II y III, utilizando Electroforesis Capilar (ECZ), en un modelo de LTME por contusión en rata. — 42
  - Modelo de lesión — 42
  - Diseño experimental — 42
  - Tratamiento de las muestras — 44

Equipo utilizado y condiciones de separación — 44
Estadística — 47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN — 48
Resultados de la evaluación del efecto neuroprotector de la MT II administrada a diferentes dosis, con base en la recuperación motora en un modelo de LTME por contusión en rata. — 48
Resultados de evaluación del efecto neuroprotector de la MT II administrada a diferentes dosis, con base en la cantidad de tejido preservado, en un modelo de LTME por contusión en la rata. — 53
Resultados de la determinación de las isoformas de las MT I,II y III, utilizando Electroforesis Capilar de Zona (ECZ), en un modelo de LTME por contusión en rata. — 56
Discusión de resultados — 64
CONCLUSIONES — 70
REFERENCIAS — 71
ANEXOS — 78

INTRODUCCIÓN

La lesión traumática de la médula espinal (LTME), es un problema de salud pública que puede afectar sobre todo a la población en edad laboral. Las repercusiones de una LTME rebasan el ámbito familiar y las consecuencias físicas y emocionales de dicha lesión pueden llegar a ser devastadoras (Chinnoc y cols., 2008), por lo que la búsqueda de tratamientos que ayuden a recuperar la función motora y que mejoren la calidad de vida después una lesión, se ha incrementado.

De acuerdo a la Asociación Nacional de Lesión de Médula Espinal, las lesiones son ocasionadas en un 42% por accidentes vehiculares, incidentes violentos 28%, caídas 22% y deportes 8% (Edward, 2009).

Se calcula que la incidencia anual de LTME en México es de 18.1 nuevos casos por millón de habitantes y ocurre con más frecuencia en hombres en edad productiva (16 a 35 años de edad), mientras que en Estados Unidos (EU),cada año, alrededor de 11 000 individuos sufren LTME. Es probable que dichos datos estén subestimados, ya que no se registran los casos en los cuales la víctima muere inmediatamente después de la lesión o en los que existen otras anomalías neurológicas. Se considera, además, que en EU aproximadamente 20 víctimas por cada millón de habitantes (4 860 por año) mueren antes de llegar al hospital y que el costo anual del tratamiento de los pacientes que sobreviven se aproxima a los 11 mil millones de dólares (Sandino, 2007).

ANTECEDENTES

La lesión de la médula espinal se caracteriza por alteraciones funcionales y sensitivas en diferentes niveles y grados de extensión, así como por disfunción vesical, intestinal y sexual. El principal objetivo en el tratamiento inicial del paciente con lesión medular es conseguir su supervivencia y prevenir toda pérdida adicional de la función neurológica (Barnés y cols., 2002).

Las referencias a las lesiones de la médula espinal y la búsqueda de opciones de tratamiento se remontan a la antigüedad. De acuerdo a el médico griego Hipócrates (460-377a.C.), no existían opciones de tratamiento para las lesiones de la médula espinal que causaban parálisis, sin embargo, sí utilizó formas rudimentarias de tracción para tratar las fracturas de la columna que no resultaban en parálisis. La Escalera Hipocrática, era un dispositivo en el que el paciente era atado, amarrado de cabeza a unos escalones y era sacudido vigorosamente para reducir la curvatura vertebral (figura 1).

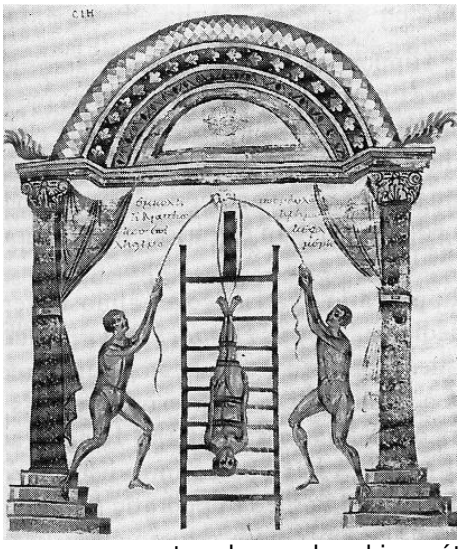

Figura 1. Imagen en la que se muestran la escalera hipocrática, un dispositivo antiguo que se utilizaba para corregir deformidades de la columna (National Institutes of Health.2005).

En su texto de anatomía publicado en 1543, el médico y profesor renacentista Vesalius describió e ilustró la médula espinal y todos sus componentes; así los términos utilizados para identificar los segmentos de la columna: *cervical*, *dorsal*, *lumbar*, *sacra* y *coccígea*, provienen directamente de Vesalius (National Institutes of Health, 2005).
A partir de entonces, se intentaron diferentes tipos de tratamiento para la LTME, como el uso de esteroides, antagonistas de receptores a glutamato, la inhibición de la sintasa de oxido nítrico, o la modulación de la respuesta inflamatoria (Kwon y Wolfram, 2001).

Posteriormente, en la década de los 80s y 90s, el empleo de la metilprednisolona como una opción de tratamiento (Bracken y cols., 1990) y el posterior descubrimiento de que esta podría reducir el daño a las células nerviosas si se administraba en las primeras horas después de una lesión, les dio a los médicos una opción adicional de tratamiento además de la quirúrgica (Bracken y cols.,1997).

La metilprednisolona es un tratamiento que ayuda a reducir el daño causado por la inflamación y debe utilizarse en dosis altas, pero es necesario tomar en cuenta que el uso de altas dosis, así como el uso prolongado de dicho glucocorticoide puede derivar en reacciones secundarias graves como insuficiencia cardiaca o el aumento de la presión intracraneal, entre otras (Hurlbert y cols., 2008).

Debido a las consecuencias devastadoras de la LTME, los intentos por ayudar a mejorar la sensibilidad y la movilidad de los pacientes han incluido el uso de una gran variedad de alternativas que pudieran llevar a un tratamiento efectivo. Entre estas alternativas encontramos el uso de gangliósidos, que son compuestos que se encuentran naturalmente en las membranas celulares y que se han utilizado en ensayos clínicos, aunque todavía no ha surgido evidencia que indique que el tratamiento con gangliósidos mejore la función neurológica o la calidad de vida de los pacientes (Chinnoc y cols., 2008).

Otra alternativa, es el tratamiento quirúrgico que representa una opción clásica para pacientes con lesiones óseas severas e inestabilidad. El objetivo del tratamiento quirúrgico de las lesiones vertebrales es restaurar la estabilidad de la columna para preservar o mejorar la función neurológica, manteniendo el máximo de segmentos móviles y favorecer la rápida movilización de los pacientes. Para ello, los implantes utilizados precisan ser estables por sí mismos en flexión y rotación, para que permitan restaurar el alineamiento de la columna en sus diferentes segmentos (Benlloch,1993). Sin embargo, existe controversia en cuanto a las indicaciones quirúrgicas debido a que es un procedimiento invasivo.

MARCO TEÓRICO

Sistema Nervioso Central

Anatómicamente, el sistema nervioso central (SNC) está formado por el encéfalo dentro del cráneo y la médula espinal que se extiende por el conducto vertebral, hasta aproximadamente la primera y segunda vértebras lumbares (Chusid,1987).

Encéfalo

El encéfalo es la principal área integradora del sistema nervioso y es el órgano más protegido del cuerpo, encerrado en un cráneo resistente y delgado, flotando en un baño de líquido cefalorraquídeo (LCR), que contiene el espacio subaracnoideo. Recibe continuamente aproximadamente un 20% del flujo sanguíneo del corazón y está protegido por la barrera hematoencefálica. Contiene una serie de cavidades interconectadas, llamadas ventrículos, llenas de LCR. El LCR se produce en un tejido especial, con un riego sanguíneo especialmente abundante, llamado plexo coroideo (Carlson, 2006).

El encéfalo se divide en 6 partes: cerebro (telencéfalo), diencéfalo, mesencéfalo, cerebelo, protuberancia y bulbo raquídeo o bulbo.

El cerebro (telencéfalo), está compuesto por dos grandes masas bilaterales, los hemisferios cerebrales, que están conectados entre sí por medio de varios haces de fibras nerviosas, en cuya parte externa se identifica la corteza cerebral y en la parte interna el sistema límbico y los ganglios basales. El cerebro está dividido en cuatro lóbulos mayores y un quinto menor. Los lóbulos mayores son: lóbulo frontal, lóbulo parietal, lóbulo occipital y lóbulo temporal, (figura 2); el lóbulo menor es la ínsula (Carlson, 2006).

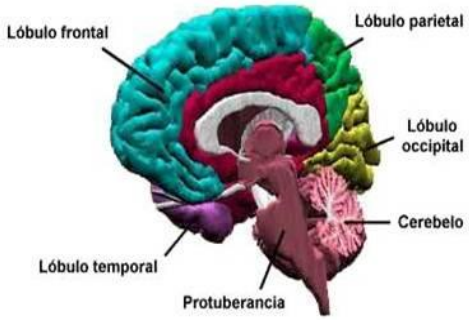

Figura 2. Vista sagital de parte del encéfalo en la que se pueden observar los cuatro lóbulos mayores del cerebro.

Médula Espinal

La médula espinal es una masa cilíndrica de tejido nervioso situada dentro del canal vertebral. Desempeña dos funciones muy importantes: en primer lugar sirve como conducto para muchas vías nerviosas que van y vienen del encéfalo. En segundo lugar, sirve como área integradora para muchas actividades nerviosas subconscientes, como el reflejo de retiro de una parte del cuerpo ante un estímulo doloroso, la rigidez refleja de las piernas cuando una persona se para sobre sus pies e incluso los movimientos reflejos crudos de la locomoción (Guyton, 1999). Está protegida por la columna vertebral (figura 3), que está compuesta por 33 vértebras unidas por ligamentos y cartílagos. Las 24 superiores están separadas una de la otra y son móviles, las nueve inferiores son fijas, cinco de ellas se fusionan formando el sacro y las últimas cuatro el cóccix (Chusid, 1987).

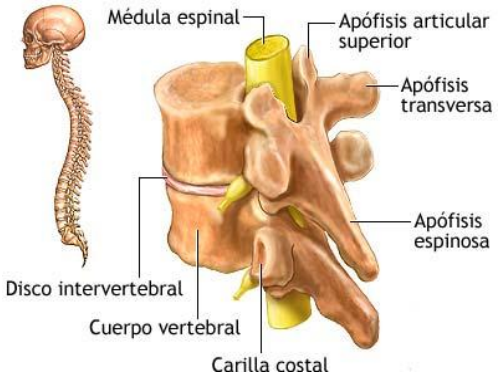

Figura 3. Imagen en la que se puede observar la médula espinal protegida por la columna vertebral.

La columna vertebral se extiende desde la base del cráneo hasta el cóccix y su longitud es variable según el grado de sus curvaturas y la talla de la persona (70 cm en hombres y 60 cm en mujeres, aproximadamente).

Cada vértebra presenta un canal vertebral, por donde transcurre la médula, dos apófisis transversas y una espinosa. Entre los cuerpos vertebrales de las cervicales, dorsales y lumbares, existe una almohadilla fibrosa que en su centro contiene tejido hialino, llamado disco intervertebral (Guyton, 1999).

Las vértebras se reparten en 5 regiones: cervical, torácica (dorsal), lumbar, sacra y coccígea, como se puede observar en la figura 4. De acuerdo a lo anterior, cada vértebra lleva el nombre de la región a la que pertenecen:

- 7 vértebras cervicales (C1 a C7)
- 12 vértebras torácicas (T1 a T12)
- 5 vértebras lumbares (L1 a L5)
- 5 vértebras sacras (S1 a S5)
- 4 vértebras coccígeas (Co1 a Co5)

Las vértebras sacras y coccígeas están fusionadas y forman respectivamente el sacro y el cóccix (Snell, 2003).

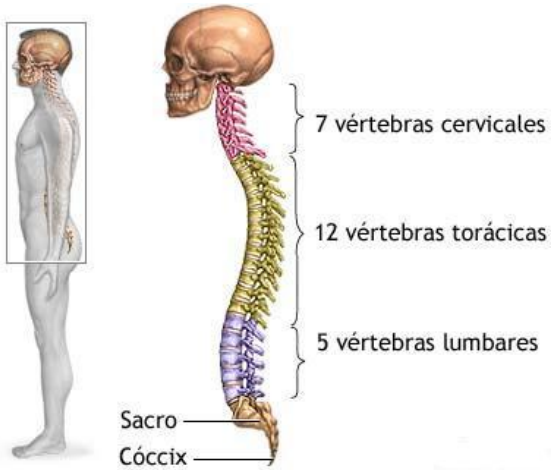

Figura 4. Imagen en la que se muestran las regiones de la columna vertebral.

La médula espinal en el hombre adulto mide aproximadamente 45cm, siendo menor en la mujer. Termina aproximadamente en el extremo inferior de la segunda vértebra lumbar, porque durante el crecimiento del feto y el niño no sigue creciendo cuando la columna vertebral se alarga. A pesar de ello, aún existen los segmentos lumbares inferiores y sacros de la médula espinal, y los nervios espinales lumbares y sacros nacen en la médula, pero surgen más altos en el canal vertebral porque los niveles de los segmentos medulares ya no corresponden a los de las vértebras. Entonces, los nervios discurren hacía abajo y atraviesan el canal inferior formando un haz grande denominado cola de caballo; cada uno de ellos finalmente surge a través del agujero intervertebral, lumbar o sacro apropiado (Guyton, 1999).

Estructura interna de la médula espinal

La médula espinal está compuesta por la sustancia gris y la sustancia blanca, esta última se encuentra sobre la superficie mientras que la sustancia gris es profunda (figura 5).

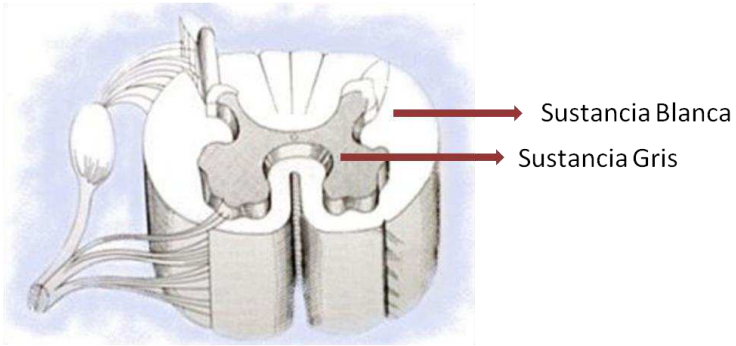

Figura 5. Imagen de la médula espinal en donde se pueden ver expuestas el área de sustancia gris (con forma de H) y el área de sustancia blanca.

Los cuerpos de las células nerviosas se encuentran en la sustancia gris donde también se localizan muchas fibras nerviosas cortas, mientras que en la sustancia blanca sólo existen tractos de fibras (la mayoría de ellas mielínicas) y glía. Las astas de sustancia gris a cada lado de la médula se denominan respectivamente: 1) asta gris ventral o asta gris anterior, 2) asta gris dorsal o asta gris posterior y 3) asta gris lateral (Carpenter, 1994).

En el asta ventral se ubican las motoneuronas anteriores, es decir, los cuerpos de las células nerviosas que envían fibras a través de los nervios espinales a los músculos para producir la contracción muscular. En el asta gris dorsal se encuentran los cuerpos de las células nerviosas que reciben señales sensitivas de los nervios espinales (figura 6). Mientras que en el asta gris lateral, las células nerviosas dan origen a las fibras del sistema nervioso autónomo que controla los órganos internos (Guyton, 1999).

Figura 6. Imagen de la médula espinal en la que se pueden observar el asta gris ventral o asta gris anterior y el asta gris dorsal o asta gris posterior.

En el centro de la substancia gris se localiza el canal central de la médula (canal ependimario), vestigio de la luz del tubo neural del embrión (Snell, 2003).

Cada nervio espinal se conecta con la médula a través de dos raíces denominadas dorsal y ventral (también llamadas raíz posterior y raíz anterior). A su vez cada una de estas raíces ingresa o abandona la médula por medio de 7 a 10 pequeños filamentos radiculares. La raíz dorsal también se denomina raíz sensitiva, porque lleva casi exclusivamente fibras sensitivas, y la raíz anterior se denomina raíz motora, porque lleva casi en su totalidad fibras motoras a los músculos, para provocar la contracción o al sistema nervioso autónomo para controlar la actividad de los órganos internos. Las fibras nerviosas de la raíz ventral se originan en neuronas de las astas grises ventral y lateral, y parten de la médula por su margen anterolateral en los filamentos radiculares ventrales (Guyton,1999).

La sustancia gris de la médula, desempeña dos funciones. En primer lugar, a través de su sinapsis transmite señales entre la periferia y el encéfalo en ambas direcciones. El relevo de las señales provenientes de las raíces sensitivas de los nervios espinales se realiza principalmente en las astas dorsales, después se dirigen hacia arriba, por la sustancia blanca medular, a las distintas áreas sensitivas del encéfalo. El relevo de las señales motoras provenientes de los tractos nerviosos que descienden del encéfalo hacía las raíces motoras de los nervios espinales se realiza en especial, en las astas ventrales y laterales (Guyton,1999). En segundo lugar la sustancia gris medular sirve para integrar algunas actividades motoras. Por ejemplo, cuando se somete la mano a un estímulo doloroso, las señales sensitivas que ingresan a la médula producen una reacción inmediata en la sustancia gris de la región medular correspondiente a la mano. En una fracción de segundo ello conduce a señales motoras que provocan el retiro de la mano del estímulo doloroso, lo que se denomina reflejo flexor, reflejo de retirada o reflejo doloroso.

La sustancia blanca medular está dividida en las siguientes columnas: 1) dos columnas blancas dorsales o posteriores, 2) dos columnas blancas laterales, una ubicada a cada lado de la médula por fuera de la sustancia gris, y 3) dos columnas blancas ventrales o anteriores, que se ubican entre las astas grises ventrales y por delante de ellas. Todas estas columnas contienen tractos de fibras que discurren a lo largo de toda la médula (Guyton,1999).

Membranas meníngeas

Entre el tejido nervioso y las cavidades óseas que lo contienen, se desarrollan unas membranas de tejido conectivo denominadas meninges. Éstas comprenden tres capas yuxtapuestas al tejido nervioso que rodean la médula espinal y son: piamadre, aracnoides y duramadre (figura 7).

La piamadre es una membrana de tejido conectivo muy delicada y está en contacto directo con la superficie del encéfalo y la médula espinal. La piamadre es la única capa meníngea que se introduce en el tejido nervioso y lo hace como la

vaina de tejido conectivo perivascular de los vasos sanguíneos encefálicos y medulares (Carpenter M, 1994).

La aracnoides limita con la superficie interna de la duramadre y envía delicadas trabéculas aracnoideas hacia la piamadre en la superficie del encéfalo y de la médula espinal. Estas trabéculas, compuestas por tejido conectivo laxo, tienen aspecto de telaraña y de ahí, el nombre de esta membrana. El espacio que cruzan las trabéculas es el espacio subaracnoideo, el cual contiene el LCR.

En la cavidad craneal, la duramadre, que es una lámina relativamente gruesa de tejido conectivo denso, está en continuidad con el periostio de los huesos craneanos. Dentro de la duramadre hay espacios revestidos por endotelio que sirven como conductos principales para la sangre que retorna del encéfalo. Estos senos venosos reciben sangre de las principales venas cerebrales y la llevan a las venas yugulares internas. En el conducto vertebral, el periostio que recubre a las vértebras está separado por tejido adiposo de la duramadre, la cual forma un tubo separado que rodea la médula espinal (Carpenter, 1994).

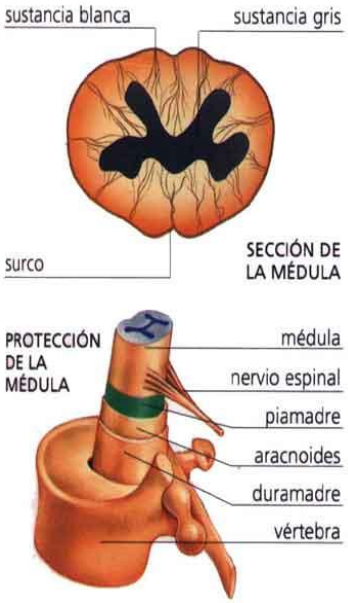

Figura 7. Imagen en la que se puede apreciar las membranas meníngeas que protegen a la médula espinal.

Células nerviosas del SNC

Existen dos clases principales de células en el SNC: las células nerviosas (neuronas) y las células gliales (glía).

Las células gliales son las más numerosas en todas las regiones del SNC de los vertebrados, estas células rodean los cuerpos celulares, los axones y las dendritas de las neuronas (Regan, 1998). Son células de sostén (Carlson, 2006), ya que sostienen a las neuronas, dando estructura al encéfalo. También separan grupos neuronales y conexiones sinápticas entre sí. Algunas células gliales son fagocitos y tras una lesión impiden la muerte de las neuronas, parte de la glía capta también transmisores químicos liberados por las neuronas durante la transmisión sináptica. A lo largo del desarrollo cerebral, algunas clases de células de la glía (glía radial), dirigen a las neuronas que emigran y el crecimiento de los axones (Kandel, 2000).

La glía se divide en dos tipos principales: microglia y macroglia. La microglia está constituida por fagocitos que se movilizan después de una lesión, infección ó enfermedad. No se sabe mucho sobre la actividad de las células de la microglia en reposo pero se ha documentado que se activan y son reclutadas ante eventos traumáticos o perjudiciales. La célula activada es capaz de expresar una gama de antígenos, lo que sugiere que puede actuar como la principal célula presentadora de antígenos del SNC (Kolb,1990).

Hay tres tipos de células de macroglia: oligodendrocitos, células de Schwann y astrocitos. Los oligodendrocitos y las células de Schuwann son células pequeñas provistas de un número relativamente escaso de apéndices. Ambos tipos de células desempeñan la importante tarea de aislar los axones, formando una vaina de mielina, tras enrollar alrededor del axón una apretada espiral con sus prolongaciones membranosas. Los oligodendrocitos se encuentran en el SNC, mientras que las células de Schuwann se localizan en el sistema nervioso periférico (SNP). La mielina producida por estas células difiere en su composición química (Kandel, 2000).

Los astrocitos, las células gliales más numerosas, deben su nombre a sus cuerpos celulares irregulares (en forma de estrellas). Los astrocitos ayudan a mantener la concentración correcta de iones de potasio en el espacio extracelular entre las neuronas. Cuando una neurona se descarga, se produce un flujo de iones de potasio al exterior de la célula. La descarga repetida puede provocar un exceso de potasio extracelular que podría interferir en la transmisión de señales entre las células próximas. Debido a que los astrocitos son muy permeables al potasio, pueden captar el exceso de éste y así proteger las neuronas vecinas. Además los astrocitos captan neurotransmisores de las zonas sinápticas después de su liberación y de este modo ayudan a regular la actividad sináptica eliminando transmisores (Kolb, 1990) de la hendidura sináptica.

Las neuronas (figura 8) son las principales unidades de señalización del SNC. Una neurona típica tiene cuatro regiones definidas morfológicamente: el cuerpo celular, las dendritas, el axón y las terminales presinápticas. Cada una de estas regiones desempeña una función diferenciada en la generación de señales y la comunicación de las mismas entre las neuronas. El cuerpo celular (soma) es el centro metabólico de la célula. Contiene el núcleo, que almacena los genes de la célula, así como el retículo endoplásmico, una extensión del núcleo donde se sintetizan las proteínas de la célula. El cuerpo celular es el origen de dos clases de prolongaciones: varias dendritas cortas y un único axón largo, tubular. Las dendritas se ramifican como un árbol y son el aparato principal de recepción de señales procedentes de otras neuronas. El axón sale del cuerpo celular y es la principal unidad de conducción de señales a otras neuronas. El axón es capaz de transmitir señales eléctricas, denominadas potenciales de acción que se inician en el montículo del axón, a partir del cual son conducidos a lo largo del axón, sin interrupciones ni distorsiones. La amplitud de un potencial de acción que recorre el axón permanece constante porque el potencial de acción es un impulso que se regenera con intervalos regulares a lo largo del axón. Los potenciales de acción constituyen las señales mediante las cuales el cerebro recibe, analiza y transmite información (Kandel, 2000).

Cerca de su terminación, el axón tubular se divide en finas ramas que forman los sitios de comunicación con otras neuronas. El punto en que se comunican dos neuronas se conoce como sinapsis. La neurona que transmite una señal se denomina célula presináptica, mientras que la que recibe la señal se conoce como célula postsináptica. La célula presináptica no tiene contacto anatómico con la postsináptica, ya que ambas células están separadas por la hendidura sináptica (Kandel, 2000).

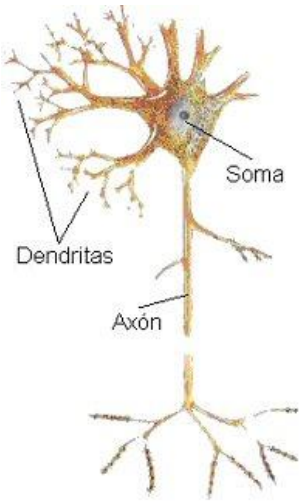

Figura 8. Estructura de una neurona.

Las neuronas se clasifican en tres grupos funcionales principales: sensitivas, motoras e interneuronas o neuronas intercalares. Las neuronas sensitivas transmiten información desde la periferia del cuerpo al sistema nervioso llevando información de percepción y de coordinación motora, mientras que las neuronas motoras lo hacen en sentido inverso transmitiendo órdenes a los músculos y a las glándulas. Las interneuronas son todas aquellas que no son específicamente ni sensitivas ni motoras.

Señales nerviosas

Como ya se comentó anteriormente, el punto en que se comunica una neurona con otra recibe el nombre de sinapsis. Las dos formas básicas de transmisión sináptica que existen son la química y la eléctrica. La transmisión sináptica química depende de la liberación de un neurotransmisor por la neurona

presináptica. Un neurotransmisor es una sustancia química que se une a receptores específicos de la membrana de la célula postsináptica, la liberación del neurotransmisor se produce en las terminales presinápticas, que son unos engrosamientos especializados del axón. Las terminales presinápticas contienen grupos de vesículas sinápticas individuales, cada una de las cuales está ocupada por varios miles de moléculas de un transmisor específico. Durante la descarga de un potencial de acción presináptico, el Ca^{2+} entra en la terminal presináptica a través de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje en la zona activa. El aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} hace que las vesículas se fusionen con la membrana presináptica y liberen su neurotransmisor en la hendidura sináptica mediante un proceso denominado exocitosis (Siegelbaum, 2000).

Por otra parte, la sinapsis eléctrica proporciona una transmisión instantánea de la señal. En esta, la corriente que despolariza la célula postsináptica es generada directamente por los canales iónicos sensibles al voltaje de la célula presináptica (Siegelbaum, 2000).

En reposo, todas las células, incluidas las neuronas, mantienen una diferencia de potencial eléctrico a ambos lados de la membrana plasmática. Ésta se conoce como potencial de reposo de la membrana. La diferencia de potencial es resultado de la distribución desigual en ambos lados de la membrana de los iones dotados de carga eléctrica, en concreto los iones de Na+ y K+ de carga positiva y los aminoácidos y proteínas de carga negativa, y la permeabilidad selectiva de la membrana al K+ (Kandel, 2000).

La distribución desigual de iones de carga positiva a ambos lados de la membrana celular se mantiene por una proteína de membrana que bombea Na+ al exterior de la célula y K+ a su interior, esta bomba mantiene una concentración baja de Na+ en el interior de la célula y una alta concentración de K+.

Las células excitables como las células musculares y nerviosas, difieren de otras células en que su potencial de membrana se puede modificar rápidamente; esta variación puede servir como mecanismo de señalización. La reducción del

potencial de membrana hace que la membrana sea mucho más permeable al Na+ que al K+. Este flujo de iones de Na+ de carga positiva hacia el interior tiende a neutralizar la carga negativa del interior de la célula y tiene como consecuencia una reducción aún mayor del potencial, el potencial de acción (impulsos nerviosos rápidos). El potencial de acción se conduce a lo largo del axón de la célula a las terminales axónicas que terminan sobre otras células, donde el potencial de acción inicia la comunicación con células adyacentes (Koester y cols., 2000).

La transmisión de señales nerviosas es la función básica del sistema nervioso, estas señales son transmitidas por potenciales de acción (el término potencial hace referencia a una fuente de energía almacenada). Para conducir una señal nerviosa el potencial de acción se mueve a lo largo de la fibra hasta que llega al extremo de ésta (Guyton, 1999).

Las etapas sucesivas del potencial de acción son las siguientes:

1) Periodo de reposo: es el potencial de membrana en reposo antes de que produzca el potencial. Durante este periodo se dice que la membrana esta polarizada, por el potencial de membrana muy intenso presente.

2) Periodo de despolarización: en este punto, la membrana se torna muy permeable a los iones sodio, lo que permite que grandes cantidades de éstos fluyan hacía el interior del axón. Se pierde el estado polarizado y el potencial se eleva rápido en dirección positiva. Esto se denomina despolarización.

3) Periodo de repolarización: después de que la membrana se tornó sumamente permeable a los iones Na+, los canales de Na+ comienzan a abrirse más de lo normal. Luego la rápida difusión de los iones K+ hacia el exterior restablece el potencial de membrana en reposo negativo normal, lo cual se denomina repolarización de membrana (Guyton,1999).

En las neuronas motoras, cada potencial de acción libera suficiente acetilcolina como para despolarizar la membrana postsináptica de la fibra muscular hasta su

umbral de potencial de acción. La acetilcolina liberada de las terminales presinápticas es rápidamente hidrolizada por la acetilcolinesterasa y la fibra muscular queda preparada para responder de nuevo al siguiente potencial de acción. Todas las fibras musculares inervadas por la misma neurona motora responden de forma sincrónica a cada potencial de membrana. El axón de cada neurona motora sale de la médula espinal por una raíz ventral y atraviesa ramas de nervios periféricos progresivamente más finas hasta penetrar en el sitio de control (músculo) (Rowland, 2000).

Estudios experimentales han mostrado que enfermedades o lesiones que producen desmielinización hacen más lenta la velocidad de conducción, y a medida que la desmielinización se hace más intensa, la conducción se bloquea. Este bloqueo puede ser intermitente, sólo con altas frecuencias de descarga nerviosa, o completo. En 1876, el neurólogo alemán Wilhelm Erb, estudió nervios humanos lesionados con métodos eléctricos y concluyó que la lesión bloquea los impulsos de origen central, incluso aunque el segmento de nervio distal a la lesión siga siendo funcional (Rowland, 2000).

Fisiopatología de la Lesión Traumática de la Médula Espinal .

La fisiopatología de la lesión traumática de la médula espinal (LTME) involucra una compleja cascada de eventos que comprometen la funcionalidad nerviosa por debajo del sitio de lesión. Esto se debe a la muerte neuronal y falla axonal como resultado del daño provocado (Mocchetti y cols., 1995).

El nivel o sitio de lesión es el punto por debajo del cual existe una disminución o ausencia de sensación (nivel sensitivo) y/o movimiento (nivel motor). Por ejemplo, una lesión a nivel torácico 9 (T-9) significa que la persona tiene una disminución o pérdida de sensación y movimiento por debajo del noveno segmento dorsal de la médula espinal.

El daño que se presenta después de una LTME se divide en dos eventos cronológicos: la lesión primaria y la lesión secundaria.

Lesión primaria

La lesión primaria involucra la destrucción focal del tejido nervioso debido al impacto mecánico sobre la médula espinal. La fuerza mecánica aplicada sobre el sitio de lesión primaria lastima a las membranas de células neuronales y endoteliales, lo que provoca una zona hemorrágica de necrosis que se localiza predominantemente en la materia gris debido a la consistencia suave y a la naturaleza vascular de esta región (Profyris y cols., 2004).

Así, la lesión primaria provoca destrucción mecánica de estructuras nerviosas, lesión vascular directa y hemorragia, e incluso sección medular completa. En estos casos el daño suele producirse por fragmentos óseos y/o desplazamientos anormales de los elementos vertebrales. Los desplazamientos óseos dentro del canal medular, como productos del impacto traumático, generan edema y hemorragias. A los pocos minutos se suceden micro hemorragias por ruptura de las vénulas o de las arteriolas, y se extienden axial y radialmente. El aumento de la presión intersticial disminuye aún más el flujo sanguíneo medular, generando hipoxia y creando una zona de penumbra (Barranco y cols., 1999).

Lesión secundaria

La lesión primaria trae como consecuencia una ola progresiva de daño que se denomina lesión secundaria, en la cual se activan mecanismos nocivos de ataque que agravan la lesión.

Los signos más tempranos de agravamiento de la lesión son visibles 2 horas después del traumatismo, cuando aú se puede observar la expansión del sitio hemorrágico. Después de 24 hrs la hemorragia sigue creciendo y la materia gris y blanca que se encuentra próxima al sitio de lesión pierde su definición y se perciben como un tejido blando e hinchado, debido al incremento del edema. La evidencia de hemorragia sigue siendo muy notoria incluso después de 3 días, y desaparece totalmente hasta los 8 días después de la lesión. Las regiones dañadas son posteriormente cubiertas con tejido cicatrizante (Profyris y cols., 2004).

La activación de diversos eventos que llevan a la célula a la muerte, caracterizan la lesión secundaria.

En las etapas tempranas después de ocurrida la LTME se observa un proceso isquémico debido al daño ocasionado a la micro-circulación, generando una falla energética que se traduce en la perdida de la regulación iónica, este evento involucra la movilización de cationes monovalentes y divalentes K+, Na+ y Ca^2+. Se incrementan las concentraciones de iones Na+ y Ca^{2+} intracelulares y disminución de los iones K+ (Hulsebosch, 2002).

Dentro de los primeros 15 minutos después de la lesión, se observa un incremento en las concentraciones de glutamato y otros aminoácidos excitadores (Diaz-Ruiz y cols., 2007), como consecuencia del incremento en las concentraciones de Ca2+ intracelular por la despolarización de la membrana plasmática (Agrawal y cols., 1997). Esta excesiva liberación de glutamato, principal neurotransmisor excitatorio en el SNC, ha sido asociado con la presencia de excitotoxicidad en la materia gris y blanca (Li y cols., 2000). Normalmente el glutamato es depurado del espacio extracelular por los astrocitos y en menor grado por la microglía (Matute y cols., 2006.), pero después de la lesión el metabolismo de este neurotransmisor por los astrocitos se encuentra alterado. Asimismo, la microglía y los macrófagos activados pueden facilitar la acumulación de glutamato en la hendidura sináptica (Piani & Fontana, 1994).

Durante este proceso también se incrementa el Ca^{2+} intracelular y diversas enzimas dependientes de Ca^{2+} son activadas como son: la sintasa del óxido nítrico constitutiva (Diaz-Ruiz y cols., 2002), la fosfolipasa C, la fosfolipasa A2, diversas cinasas y fosfatasas, entre otras., iniciándose así la señalización de segundos mensajeros y la generación de radicales libres (RL) que llevan a la célula a un estado de estrés oxidativo, estado donde se pierde el balance entre la generación de RL y la capacidad de las defensas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, etc.) para contrarrestarlos (Diaz-Ruiz y cols., 2000). Así mismo se activan proteasas como la calpaína que destruyen la mielina,

favoreciendo un proceso desmielinizante (Ray y cols., 2003), por medio de estos eventos se promueven la muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis.

Otro evento que juega un papel muy importante en las etapas tempranas de la lesión es la respuesta inflamatoria, ya que desencadena diversas cascadas que llevan a la producción de RL y daño celular por la infiltración de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, leucocitos y la activación de la microglía (Tjoa y cols., 2003).

Respuesta inflamatoria sistémica

Ante una agresión de cualquier etiología, se desencadena un proceso inflamatorio mediado por factores humorales y celulares que intenta limitar y reparar la lesión producida. Estas reacciones se inician en el lugar de la agresión aunque determinan, mediante mediadores, una respuesta generalizada. En esta respuesta, los macrófagos y monocitos son activados por la agregación plaquetaria y sus mediadores quimiotácticos, o directamente por los productos bacterianos (endotoxinas) o los subproductos de la agresión (opsoninas). Las citocinas son los mediadores más importantes en el inicio de esta respuesta, especialmente el TNFα considerado un determinante fisiopatológico de la sepsis y shock séptico (García, 2000).

Los macrófagos activados producen un amplio espectro de mediadores y las citocinas iniciales, IL-1 y TNF, son clave en el inicio de la respuesta. La propia agresión, junto al TNFα, inducen una intensa respuesta celular con liberación de nuevos mediadores: otras citoquinas (IL-6, IL-8), factor activador de las plaquetas, óxido nítrico, etc. Se liberan también citocinas antiinflamatorias (IL-4 e IL-10) que disminuyen la producción de TNFα en los monocitos como respuesta a la agresión. En el endotelio, estas citocinas favorecen la expresión de moléculas de adhesión (integrinas, selectinas y adherinas) para los monocitos y neutrófilos, permitiendo su posterior migración tisular. La liberación de radicales libres y la producción de óxido nítrico por las células endoteliales, junto con los derivados del ácido araquidónico (tromboxanos, prostaglandinas y leucotrienos), generan una

reactividad vascular anómala con vasodilatación y extravasación características del fenómeno inflamatorio (García, 2000).

Estrés oxidativo

Los RL son definidos como aquellas especies químicas que contiene un número impar de electrones y como consecuencia tiene un electrón no apareado en uno de sus orbitales, por lo que son muy reactivos (McMurry, 2004).

En la mitocondria se lleva a cabo la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa, en este proceso, el oxígeno (O_2) es reducido hasta agua (H_2O). El O_2 acepta electrones uno a la vez, en un evento secuencial, generando anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$), y H_2O. En condiciones normales la formación de RL es probablemente menor al 5%, sin embargo esta producción puede incrementarse, cuando la concentración de Ca^{2+} o Na+ aumentan súbitamente como respuesta a el proceso excitotóxico. A pH fisiológico el O_2 tiende a dismutarse formando H_2O_2 y oxígeno, a través de las diversas isoformas de la enzima superóxido dismutasa (SOD); el H_2O_2, a su vez es destoxificado, por la catalasa, enzima que se encuentra localizada principalmente en los peroxisomas, proceso que también es catalizado por la glutatión peroxidasa (Dykens, 1994).

El H_2O_2 no es un radical libre pero puede fácilmente difundirse a través de las membranas biológicas con un diámetro semejante al O_2, así estos pueden generar un daño citotóxico en sitios distantes de su generación, proceso por el cual se favorece la producción del radical $OH^{\cdot}$, altamente reactivo. Cuando el H_2O_2 se encuentra en presencia de metales de transición como el fierro y el cobre, se generan altas concentraciones de $OH^{\cdot}$, por medio de la reacción de Fenton (Dykens, 1994).

El radical $OH^{\cdot}$, es considerado el mas potente oxidante en los sistemas biológicos, por su alta reactividad. Existen algunas defensas antioxidantes que tiene la capacidad de atrapar este radical como la MT, una proteína intracelular de bajo

peso molecular que consta de 61 a 62 residuos de aminoácidos no aromáticos (Aschner,1996).

Bajo condiciones patológicas leucocitos activados y macrófagos generan cantidades masivas de O_2^- y otros RL, así, después de una lesión, la generación de RL se ve incrementada, lo que induce muerte celular vía apoptosis a través de la oxidación irreversible de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Liu y cols., 2002). La susceptibilidad del tejido nervioso, incluyendo la medula espinal, al daño generado por el estrés oxidativo puede ser explicado por la abundancia de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son especialmente susceptibles a la peroxidación por los RL (Profyris, 2004).

Por otra parte, se sabe que el óxido nítrico (NO) tiene una importante participación en la etapa aguda de la lesión durante la generación del estrés oxidativo. El NO es sintetizado por tres isoformas de la sintasa del óxido nítrico (SON) de las cuales dos son constitutivas y dependientes de calcio y una es inducible e independiente de calcio (SONn, SONe, SONi respectivamente). En un trabajo realizado por Diaz-Ruiz y cols. (2000) se demostró que existe un incremento del 138% (comparado con el grupo control no lesionado) en la actividad de la SON constitutiva 4 hrs después de la lesión y un incremento del 103% en la actividad de la SON inducible cuando fue evaluada 72 hrs después del daño. La actividad de las isoformas SONn, SONi, SONe, se mantuvo en neuronas, microglía y células endoteliales, respectivamente, en todos los estadíos después de la lesión.

Se ha determinado que el intervalo óptimo para intentar detener y revertir esta cascada de acontecimientos es de 4 hrs, e idealmente de 2, ya que la inhibición del transporte axoplásmico comienza en este periodo, es marcada a las 4 hrs y completa a las 6 horas del traumatismo (Díaz-Ruiz y cols., 2000)

Neuroprotección

El termino neuroprotección puede ser usado para definir las estrategias empleadas para detener el daño ocasionado al SNC y preservar así su funcionalidad, la cual podría verse comprometida ante la presencia de

enfermedades neurodegenerativas o traumatismos (Hill, 2006). Para fines del presente trabajo el objetivo de la neuroprotección, es entonces, contener y disminuir el daño después del evento traumático y mantener la mayor integridad posible de las interacciones celulares del sistema nervioso.

Metalotioneína

La metalotioneína (MT), descubierta en 1957 por Margoshe y Vallee, se caracteriza por presentar un bajo peso molecular (6-7 kD) y una secuencia de 61 a 68 aminoácidos, con una elevada proporción de cisteína, que representa entre un 20 y 30 % de los residuos de aminoácidos totales (un total de 20 cisteínas), carece de aminoácidos aromáticos, es termoestable y soluble en agua (Aschner, 1996). En base a su estructura, las MTs se han dividido en diversas familias (Binz y cols., 1999). En ratón están compuestas por un solo miembro (MT-I, MT-II, etc.). En humanos los genes que codifican para MT están localizados en el cromosoma 16, y conforman una familia de al menos 12 genes, algunos de los cuales no son funcionales (Samson y cols., 1998). La MT es inducible en respuesta a metales pesados y a una gran variedad de metabolitos como: glucocorticoides, glucagón, interleucinas (IL), catecolaminas, progesterona, estrógeno e interferon, entre otros.

En mamíferos se han identificado cuatro isoformas de la proteína, denominadas MT-I, MT-II, MT-III y MT-IV, de las cuales MT I y MT II son las mejor caracterizadas en cerebro donde la principal fuente de MT I y II son los astrocitos y aunque la expresión de estas proteínas en neuronas es inconsistente, se ha observado que poseen un efecto protector directo sobre las neuronas (Pentkowa, 2006).

Estructura y función

La unión metal-tiolato (S_{cis}-M-S_{cis}) forma dos dominios globulares separados, el dominio α y el dominio β, los cuales están unidos por una pequeña región rica en lisina. El dominio α contiene 11 cisteínas, mientras que el dominio β contiene 9 (figura 9). La MT había sido considerada como una proteína estrictamente intracelular, pero en años recientes se descubrió que la proteína se distribuye

tanto intracelular como extracelularmente. Intracelularmente la MT se distribuye en el citoplasma y en organelos como lisosomas y mitocondrias, dependiendo de la fase del ciclo celular, diferenciación o del nivel de toxicidad, la MT es rápidamente movilizada al núcleo, como se ha observado que ocurre durante el estrés oxidativo. Una posible explicación es que debido a su tamaño pequeño la MT puede difundir a través de los poros nucleares (Pentkowa, 2006).

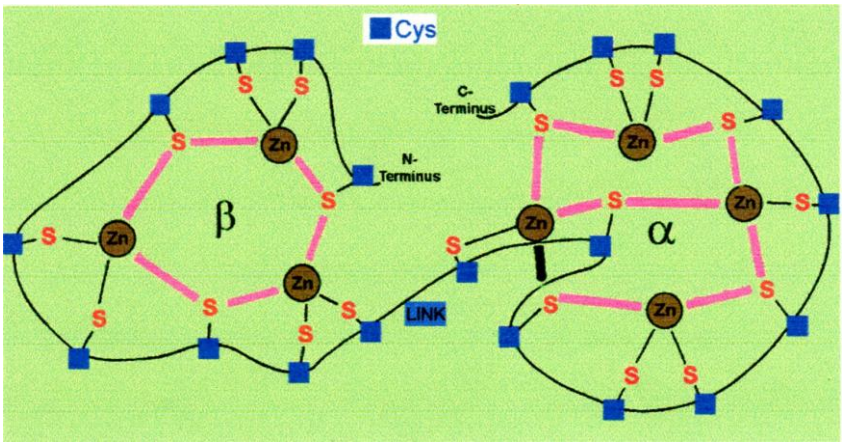

Figura 9. Imagen en la que se muestra la estructura química de la Metalotioneína.

Aunque el consenso general es que las MT I y II se expresan por todo el SNC y mayormente en los astrocitos (Acarin y cols., 1999), las neuronas expresan estas proteínas en menor medida, mientras que en condiciones normales la microglía y los oligodendrocitos no parecen expresarlas (van Lookeren y cols., 1999).

A diferencia de las MT-I y II que se localizan tanto en el cerebro como en tejidos periféricos (Vela y cols., 1997), la MT-III es una isoforma que se expresa fundamentalmente en el SNC (Uchida y cols., 1991). Finalmente la MT-IV se ha identificado únicamente en células epiteliales escamosas (Vela y cols., 1997).

En la médula espinal se ha reportado que la MT se localiza en las motoneuronas del asta anterior cervical y lumbar, además se ha observado en astrocitos, células endoteliales y ependimales así como en la aracnoides y en la piamadre (Kiningham y cols., 1995).

El contenido metálico puede variar según el tejido, la situación fisiológica y las condiciones ambientales. Es frecuente que la MT-I y la MT-II contengan 7 equivalentes de metal divalente y bajo ciertas circunstancias se puede incrementar el contenido de metales. La unión a los metales es reversible de manera que bajo determinadas condiciones, como un descenso del pH o variaciones en el estado redox, se pueden desplazar los átomos metálicos de la molécula de MT obteniendo así la apoproteína. Normalmente las MT-I y -II, al ser aisladas de tejidos biológicos contienen 7 átomos de Zn por molécula, aunque también pueden poseer ciertas cantidades de cobre (Cu). Las MT-III aisladas de cerebro bovino y equino han demostrado contener 4 átomos de Cu y 3 de Zn por molécula, a diferencia de las MT-I y -II cerebrales que sólo contienen Zn (Carrasco y cols., 2000).

La MT es una proteína antioxidante con capacidad para atrapar radicales $OH^{\cdot}$ y O_2^- por lo que puede representar una estrategia antioxidante para favorecer los procesos de neuroprotección después de una LTME (Pentkowa y cols., 2000).

Presumiblemente las funciones biológicas de las MT pueden correlacionarse con sus propiedades químicas y estructurales (Vasák y cols., 1994).

Las MTs son capaces de responder a determinados estímulos. Estos estímulos, son denominamos inductores y la lista de inductores es extensa y los hay de muy diversa naturaleza. Entre ellos encontramos los metales pesados, hormonas, segundos mensajeros, factores de crecimiento, agentes inflamatorios, vitaminas, antibióticos, agentes citotóxicos, y condiciones estresantes. Además existe una serie de circunstancias que modulan su expresión, como el desarrollo, la regeneración tisular, y la edad. También presentan niveles alterados durante procesos patológicos como el cáncer, enfermedades degenerativas o lesiones tisulares (Riordan y cols., 1991).

Al parecer la dopamina, actúa como inhibidor de las MT-I y -II en condición basal; puesto que la administración de antagonistas para la dopamina incrementan los niveles basales de estas proteínas en algunas áreas cerebrales (Gasull y cols., 1994).

La inducción de MT, en hígado de rata, ha demostrado disminuir la lipoperoxidación y parece ser un mecanismo protector de primera línea, bajo condiciones que favorecen la formación de RL. Este hecho está respaldado por la inducción de MT en presencia de IL-1 e interferon γ, los cuales son potentes activadores del estallido respiratorio en neutrófilos y macrófagos. La producción de estos radicales por neutrófilos y macrófagos, forma parte de la respuesta inflamatoria destinada a destruir células infectadas por bacterias y virus. Sin embargo estos radicales pueden afectar el DNA y las membranas celulares a menos que antioxidantes como la glutatión peroxidasa actúen en contra de dichos radicales y la MT se ha considerado como un potente antioxidante en contra de los radicales $OH^{\cdot}$ y ha demostrado ser incluso más efectiva que la glutatión para prevenir el daño al DNA por radicales $OH^{\cdot}$ (Pentkowa, 2006).

La síntesis de MT puede ser inducida por factores fisiológicos y nutricionales, incluyendo inanición y estrés físico e inflamatorio; esto implica que la proteína podría participar en la respuesta de la fase aguda y la regulación de la diferenciación celular entre otras actividades. La reducción en la ingesta de comida incrementa la concentración de MT en hígado y es probable que esto se deba a la influencia del glucagón y a otros factores de estrés que favorecen la síntesis de MT. Cabe mencionar, que aunque la MT es inducida por una gran variedad de metales y además es capaz de unirse a ellos, el Cu y el Zn son los únicos con importancia nutricional (Riordan y cols., 1991).

Durante el proceso inflamatorio en el SNC los principales factores que regulan la expresión de la MT son IL-6, IL-3, TNF-α (factor de necrosis tumoral), interferon y macrófagos (Pentkowa, 2006).

A la metalotioneína se le han asignado diferentes funciones: almacenamiento y distribución de iones metálicos tales como el Cu, y el Zn; regulación de la biosíntesis y actividad de las metaloenzimas, citoprotección contra el daño producido por RL y metales pesados, compartamentalización del Zn, detoxificación de los metales pesados del líquido cefalorraquídeo, del espacio extracelular por medio del epitelio coroideo y astrocitos (Aschner, 1996).

Actualmente no existen reportes en la literatura del posible efecto neuroprotector de la MT después de una LTME, sin embargo se ha investigado su participación en la esclerosis lateral amiotrófica, en la que se demostró que la MT puede tener un efecto neuroprotector al disminuir la toxicidad oxidativa desencadenada durante la evolución de la enfermedad (Nagano y cols.,2001). También se demostró el efecto neuroprotector de la MT-I y –II en un modelo experimental de encefalomielitis autoinmune (EAE) y de esclerosis múltiple.

Se sabe que durante el proceso de desarrollo de la EAE existe un incremento en la activación de los macrófagos y un incremento en la infiltración de los linfocitos T, así como astrogliosis en la médula espinal. En este trabajo se demostró que la administración de la Zn-MT-II por vía i.p. en ratas con EAE reduce la severidad de los síntomas así como la mortalidad de una manera tiempo y dosis dependiente (Penkowa e Hidalgo, 2000).

Como se ha visto, las MTs son proteínas con diferentes funciones, pero el papel individual de las isoformas de la MT en cada una de estas actividades se desconoce. En este punto la electroforesis capilar representa un poderoso método de análisis útil para la separación de las isoformas, ya que solo requiere una cantidad muy pequeña de analito y posee una alta sensibilidad así como una gran resolución, razón por la cual ha despertado un gran interés en diferentes campos, tal como lo demuestra el incremento de publicaciones realizadas en el área de bioquímica y biotecnología, industria farmacéutica y análisis clínicos (Daniel, 2003).

Electroforesis

La electroforesis es un método de separación que se basa en la velocidad de migración diferencial de especies cargadas en un campo eléctrico de corriente directa aplicada (Skoog, 2001). La electroforesis *per se*, es una técnica de separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido (electroforesis en papel o acetato de celulosa), o bien a través de una matriz

porosa (electroforesis en gel), o en disolución (electroforesis libre). Dependiendo de la técnica que se use, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa (Jouyban, 2001).

La separación electroforética en un medio plano estabilizado, como papel o un gel poroso semisólido, es una técnica que resulta muy lenta y tediosa, teniendo aplicaciones en el análisis de biomoléculas pequeñas, como ácidos grasos y aminoácido primordialmente. En cambio, empleando geles de agarosa y poliacrilamida en placas de distinto espesor, el proceso electroforético se hace rápido y versátil, siendo así, la técnica más utilizada en el campo de la investigación bioquímica para el análisis de diversas biomoléculas como las proteínas (Western blot) y el ácido ribonucleico (Northern blot). Aunque más recientemente, a finales del siglo pasado, la electroforesis capilar, ha comenzado a desplazar a los immunoblottings (Kuhn, 1993).

Electroforesis capilar

La electroforesis capilar es considerada una técnica analítica útil y prometedora para la separación, identificación y determinación de compuestos químicos así como de proteínas y ADN, debido a que solo se necesita una pequeña cantidad de muestra, además de brindar una alta sensibilidad y resolución (Shunsuke, 2004).

A principios de los ochenta, los científicos empezaron a explorar la posibilidad de realizar las separaciones con microcantidades de muestra, en tubos capilares con gel de sílice fundida. Sus resultados fueron promisorios en términos de resolución, velocidad y posibilidad de automatización. Como consecuencia, la electroforesis capilar (CE) se convirtió en una herramienta para una gran variedad de problemas de separaciones analíticas.

La separación se lleva a cabo en un tubo hueco de diámetro muy pequeño, de ahí que reciba el nombre de capilar (Jouyban, 2001).

Los instrumentos para la electroforesis capilar son sencillos. Una fuente de poder de alto voltaje, que va de 1 a 30 kV, un capilar de sílice fundida de 10 a 100 µm de

diámetro interno y una longitud entre 40 a 100 cm. El cual, a efecto de permitir la detección, cuenta con una ventana permeable al tipo de radiación que permite la detección (radiación visible, ultravioleta, laser, etc.). Posee un sistema de refrigeración, por flujo recirculante de etilenglicol al 75%, que evita el sobrecalentamiento del capilar y permite el control de la temperatura durante el proceso. Además de un sistema de detección y muestreador automatizado (Skoog, 2001). Los electrodos de platino están conectados en la fuente de poder y se encuentran en contacto directo con los amortiguadores que permiten la separación a través del capilar. El carrusel que contiene los amortiguadores y las muestras, con un movimiento de ascenso y descenso, puede enviar cada una de las soluciones empleadas en la corrida, al capilar o a los recipientes electródicos, bajo presión hidrodinámica, para lavar y acondicionar al capilar, pero sobre todo, para efecto de la separación.

Los capilares de sílice dejan pasar la luz ultravioleta visible a distintas longitudes de onda, generando por medio de un detector, los electroferogramas respectivos que permiten la identificación de los compuestos separados por electroforesis capilar. Mediante el empleo de un software, se puede controlar, la presión del sistema, el voltaje de separación y la temperatura de corrida, así como el monitoreo de la corriente, la cual es importante en el proceso, ya que de ella depende la separación de moléculas. Siendo el equivalente a la presión del sistema en la cromatografía de líquidos de alta resolución. Las moléculas que son separadas por la fuerza del campo eléctrico aplicado, son monitoreadas por el detector. Los picos del electroferograma son similares a los de la HPLC, y se generan como consecuencia de la concentración de los analitos y de su velocidad de migración (figura 10) (Castagnino, 1999).

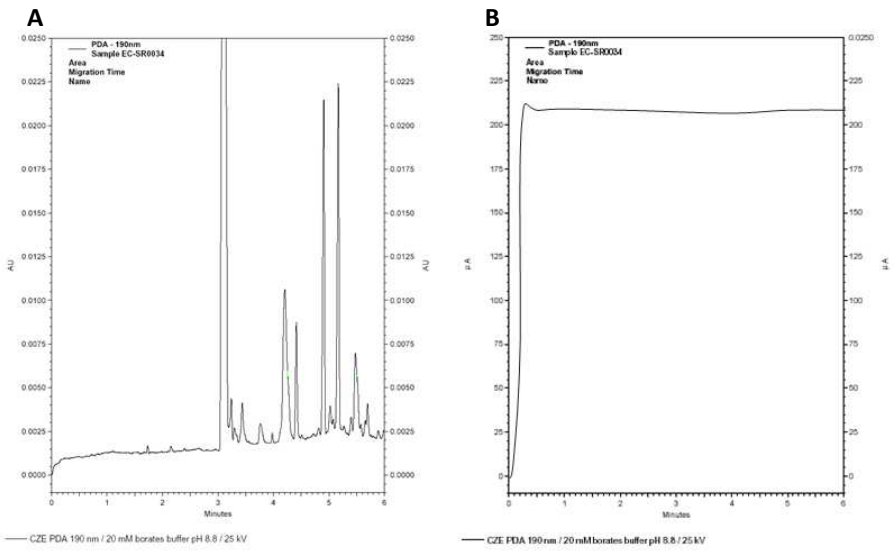

Figura 10. Imagen obtenida por electroforesis capilar, donde se pueden observar los tiempos de migración representados por picos (panel A) para diversos analitos de una muestra problema y el registro de la corriente a través del capilar (panel B).

Durante la inyección de la muestra, el capilar está sumergido en la misma y se aplica presión hidrodinámica para “cargar” el capilar, el cual se encuentra lleno del amortiguador de corrida. La corriente que puede fluir del ánodo al cátodo o viceversa, que va de 1 a 30 kV, con un rampeo de 0.17 kV/s, es la que lleva a cabo la separación en el proceso, en donde los iones de la muestra, migran dentro del capilar en relación a sus movilidades electroforéticas (Castagnino, 1999).

La electroforesis capilar de zona (ECZ), electroforesis capilar micelar (ECM) y la electroforesis capilar por gradiente (ECG) son variantes de la electroforesis capilar (EC).

La ECZ es la modalidad más utilizada a causa de su simplicidad y versatilidad. El intervalo de aplicaciones de la ECZ es diverso y las áreas de aplicación pueden ir desde problemas relacionados con la separación de especies pequeñas hasta la separación de especies de gran tamaño molecular. Esto junto con el hecho que se requieren pequeños volúmenes de muestra, ha despertado una gran expectación en diferentes campos (Holland y cols. 1997). Para esta variante el capilar y los viales se llenan con un electrolito con capacidad amortiguadora. La muestra que

está formada por un conjunto de aniones y cationes, se introduce dentro de este sistema ocupando una única zona. Al someter este sistema a la influencia de un campo eléctrico, las especies iónicas del electrolito y de la muestra migran hacía el electrodo correspondiente, es decir, se establece un movimiento de los iones que forman parte del sistema. Después de transcurrido cierto tiempo desde el inicio de la aplicación del campo eléctrico, los componentes de la muestra migran cada uno a su velocidad y se separan en diferentes zonas o gradientes, según la movilidad de cada analito (Jandik, 1993).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente la LTME es un problema de salud pública, que requiere de tratamientos efectivos para ayudar a la población afectada a recuperar la función motora de las extremidades inferiores. Aunque diferentes estudios han demostrado que la utilización de fármacos y otras sustancias químicas pueden disminuir el grado de daño al tejido nervioso, en la aplicación clínica no se han obtenido resultados contundentes. La metilprednisolona (MP) es el tratamiento más utilizado en pacientes con LTME, sin embargo no ha demostrado ser eficaz, y debido a que su administración trae consigo una gran cantidad de efectos adversos es mayor el riesgo que el beneficio. Por tal motivo, se siguen desarrollado otras estrategias neuroprotectoras a nivel experimental y clínico, que brinden resultados más efectivos (Bracken y cols., 1990). Por lo anterior, en el presente trabajo se propone evaluar el efecto neuroprotector de la MT II, así como caracterizar la participación de las isoformas I, II y III en un modelo de LTME

HIPÓTESIS

Si la metalotioneína tiene efecto neuroprotector después de una lesión traumática de la médula espinal, entonces se observará un menor daño al tejido nervioso y esto se traducirá en una mejor función nerviosa motora de la rata.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto neuroprotector de la metalotioneína II y caracterizar la participación de las isoformas I, II y III de dicha proteína en un modelo de lesión traumática de la médula espinal por contusión moderada en ratas.

Objetivos específicos

1) Evaluar el efecto neuroprotector de la MT II administrada a diferentes dosis con base en la recuperación motora de las extremidades posteriores de los animales experimentales, utilizando la escala Basso, Bettie y Bresnaham, en un modelo de LTME por contusión en la rata.

2) Evaluar el efecto neuroprotector de la metalotioneína II administrada a diferentes dosis con base en la cantidad de tejido preservado.

3) Caracterizar la participación de las isoformas de las Metalotioneínas I, II y III durante la etapa aguda del daño en un modelo de LTME por contusión en la rata.

4) Determinar la concentración de metalotioneína después de una lesión traumática de la médula espinal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación del efecto neuroprotector de la MT II administrada a diferentes dosis, con base en la recuperación motora en un modelo de LTME por contusión en rata.

Para este estudio se utilizaron 36 ratas Wistar hembras sanas de 200 a 250g de peso, las cuales fueron divididas en 4 grupos de manera aleatoria, como se muestra en la figura 11.

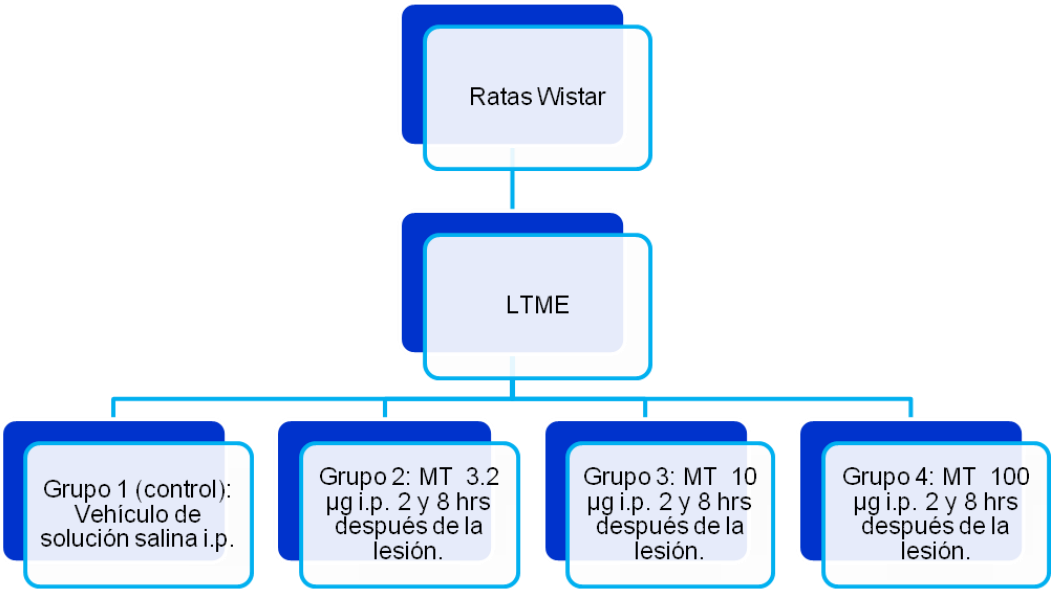

Figura 11. Diseño experimental en el que se muestra la distribución de los animales y la dosis de Metalotioneína II administrada 2 y 8 hrs después del daño.

Los grupos de estudio 1, 2 y 4 estuvieron formados por 9 ratas, mientras que el grupo 3 se formó con 8 ratas debido al deceso de un animal por razones ajenas al tratamiento. Todos los animales tuvieron libre acceso a agua y alimento.

Modelo de Lesión

Previo a la cirugía, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico vía i.p. (2.1 mg/100g de peso).

La laminectomía se realizó en condiciones de asepsia y antisepsia, a nivel de T9, con la finalidad de exponer la médula espinal para posteriormente producir una lesión por contusión, empleando el NYU impactor (Figuras 12 y 13).

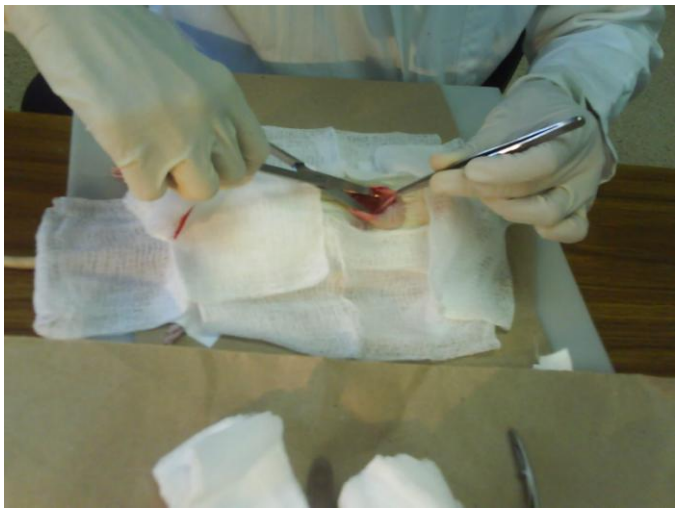

Figura 12. Imagen en la que se muestra el procedimiento quirúrgico de laminectomía para exponer la médula espinal.

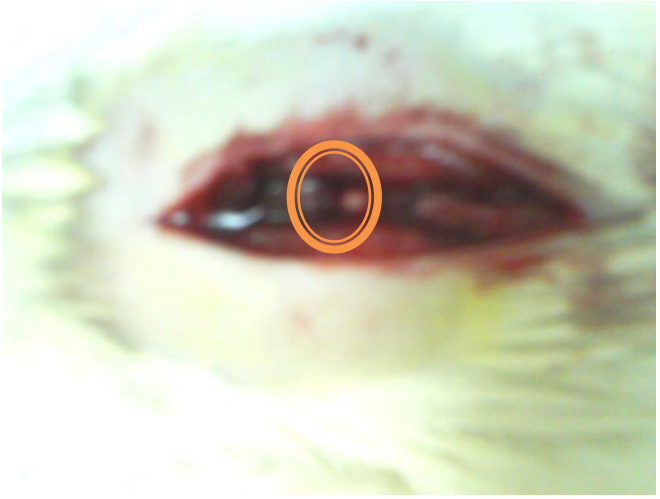

Figura 13. Imagen en la que se muestra la médula espinal expuesta, después del procedimiento quirúrgico de laminectomía a nivel de T9.

Los cuatro grupos de animales fueron lesionados con el aparato NYU Spinal Cord Impactor (Proyecto CAMINA), a través del cual se dejó caer un cilindro metálico de 10g a una altura de 25mm para ocasionar una lesión por contusión (figura 14), que afecta la función motora de las patas traseras de los animales de experimentación.

Figura 14. Imagen en la que se puede observar el cilindro metálico de 10g utilizado para lesionar la médula espinal a una altura de 25mm, a nivel de la novena vértebra torácica (T9) utilizando el equipo N.Y. Spinal Cord Impactor.

Este modelo experimental de lesión, fue desarrollado en la Universidad de Nueva York por Basso y cols., (1996). El equipo cuenta con un software que tiene la capacidad de analizar la lesión siguiendo diversos parámetros, como: grado de compresión del tejido medular, velocidad, tiempo y altura con que el cilindro metálico impacta al tejido nervioso (figura 15). Posterior al trauma los animales fueron suturados, aseados y colocados en cajas de acrílico con aserrín estéril. El intestino y vejiga fueron vaciados por compresión manual una vez al día durante 15 días.

Figura 15. Imagen en la que se observa el método de lesión por contusión a nivel de la novena vértebra torácica (T9), utilizando un equipo que genera una lesión altamente reproducible (NYU Spinal Cord Impactor).

Tratamiento

El grupo control recibió solución salina (vehículo) y a los tres grupos restantes se les administró MT II en tres dosis diferentes, tomando en cuenta lo descrito por Hidalgo y Pentowa (2001), que reportan la dosis de 100 µg como eficaz en el tratamiento de encefalomielitis autoinmune (EAE).

La MT fue administrada vía i.p. a las 2 y 8 horas después de la lesión de acuerdo a los niveles mínimos presentes en el sitio del daño, estos resultados fueron reportados previamente por Diaz-Ruiz y colaboradores, (2009).

Posteriormente los animales fueron evaluados 24 hrs después de la lesión para corroborar la ausencia de movimiento y subsecuentemente cada semana durante dos meses, para obtener el promedio de la función de ambas patas traseras, utilizando para ello la escala BBB (Basso, Bettie y Bresnaham), que evalúa las características de la locomoción a través de 22 grados, en donde 0 significa ausencia de movimiento y 21 marcha coordinada y tronco estable (tabla 1).

Tabla 1. Escala de evaluación motora BBB, que evalúa la marcha a través de 22 grados de recuperación.

Grado	Descripción
Grado 0:	No se observan movimientos en patas traseras (PT).
Grado 1:	Movimiento limitado (arco<50%) de una o dos articulaciones, usualmente cadera y/o rodilla.
Grado 2:	Movimiento amplio (arco<50%) de una articulación con o sin movimiento limitado de la otra.
Grado 3:	Movimiento amplio de dos articulaciones.
Grado 4:	Movimiento limitado de las tres articulaciones de la PT (cadera, rodilla y tobillo).
Grado 5:	Movimiento limitado de dos articulaciones y amplio de la tercera.
Grado 6:	Movimiento amplio de dos articulaciones y limitado de la tercera.
Grado 7:	Movimiento amplio de las tres articulaciones de la PT (Cadera rodilla y tobillo).
Grado 8:	Movimientos rítmicos (coordinados) de ambas patas PT sin soporte del peso o colocación de la planta pero sin soportar peso.
Grado 9:	Colocación plantar con soporte de peso cuando no está caminando o pasos ocasionales (<= 50%), frecuentes (51% al 94%) o constantes (95% al 100%) con soporte de peso dorsal, sin apoyo plantar.
Grado 10:	Pasos ocasionales con soporte plantar, sin coordinación entre patas delanteras (PD) y PT.
Grado 11:	Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar, sin coordinación entre PD y PT.
Grado 12:	Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar, y coordinación ocasional entre PD y PT.
Grado 13:	Pasos frecuentes o constantes con soporte de peso plantar, y coordinación frecuente entre PD y PT.
Grado 14:	Constantemente da pasos con soporte de peso plantar, coordinación constante entre PD y PT, y hay rotación interna o externa de patas, principalmente al hacer contacto con el piso o al despegar. También pasos plantares frecuentes, coordinación constante entre PD y PT, y pasos dorsales ocasionales.
Grado 15:	Pasos plantares y coordinados entre PD y PT constantes. No separa los dedos o solo ocasionalmente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo.
Grado 16:	Pasos plantares y coordinados entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre frecuentemente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero, la rota al levantarla.
Grado 17:	Pasos plantares y coordinados entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre frecuentemente cuando avanza la pata hacia delante. Al hacer contacto con el piso predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero, al levantar la pata la mantiene alineada (sin rotar).
Grado 18:	La separación de los dedos es constante durante la marcha. Al hacer contacto con el piso predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo, pero, la rota al levantarla.
Grado 19:	Pasos plantares y coordinados entre PD y PT constantes durante la marcha. La separación de los dedos ocurre constantemente durante la marcha. Al hacer contacto con el piso y levantar, predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo. Arrastra la cola parte o todo el tiempo.
Grado 20:	Pasos plantares, marcha coordinada y separación de dedos constante. Al hacer contacto con el piso y levantar, predominio de la alineación paralela de la pata al cuerpo, la cola levantada constantemente e inestabilidad del tronco.
Grado 21:	Igual al anterior, pero, tronco constantemente estable.

En la figura 16, se esquematiza la metodología utilizada en este trabajo para el modelo de LTME, tratamiento y evaluación de la recuperación funcional motora de las patas traseras de los animales.

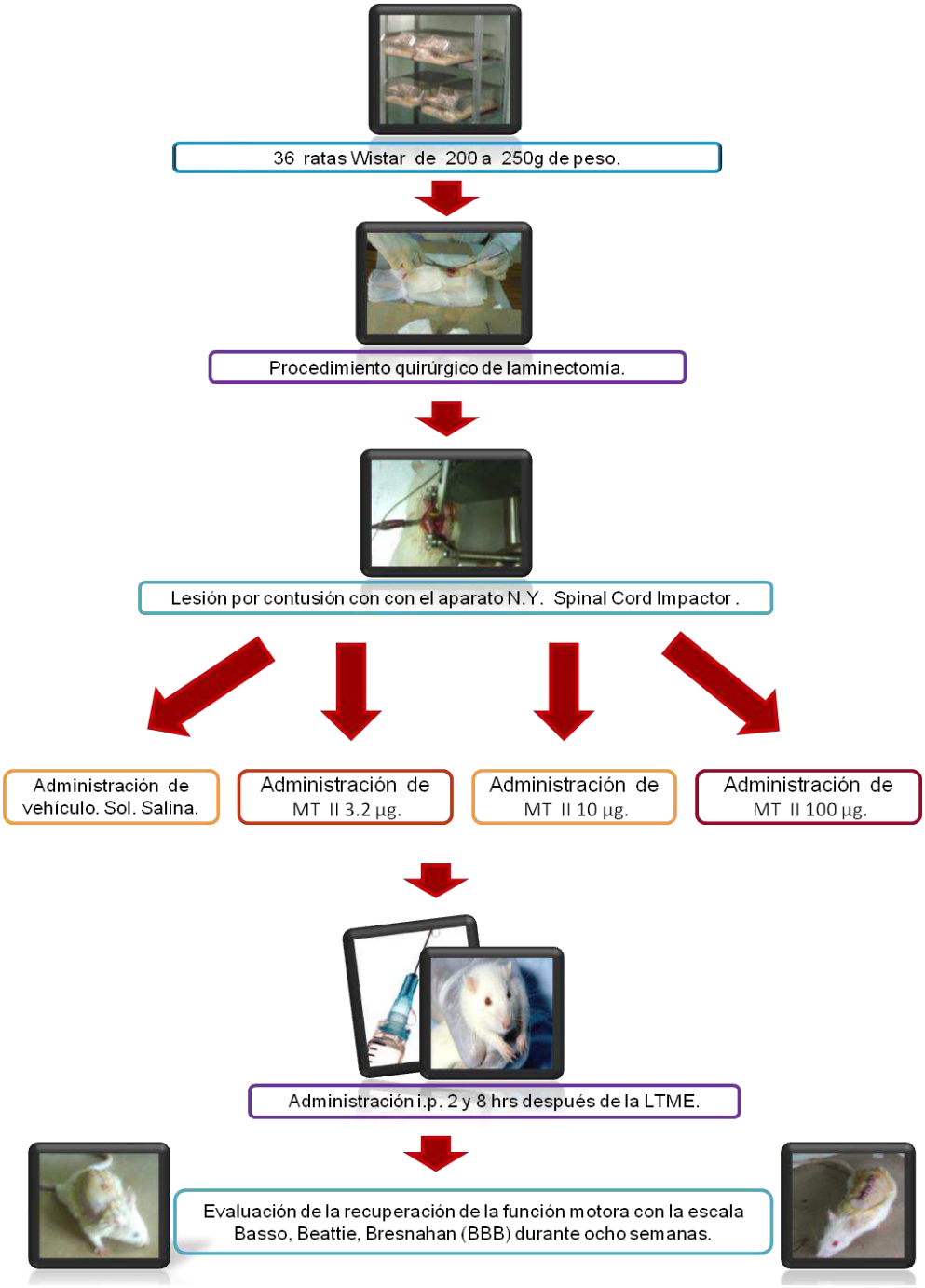

Figura 16. Imagen en la que se muestra la metodología empleada para el modelo de LTME, tratamiento y evaluación de la recuperación funcional motora.

Evaluación del efecto neuroprotector de la MT II administrada a diferentes dosis, con base en la cantidad de tejido preservado, en un modelo de LTME por contusión en la rata.

Los 35 animales utilizados en el modelo de LTME fueron sacrificados al término del estudio, dos meses después de la lesión. Previo al sacrificio, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico y posteriormente perfundidas con formol al 10%, como se muestra en la figura 17.

Figura 17. Imágenes en las que se muestra el procedimiento de perfusión, en el que se fijan los órganos pasando una solución de formol al 10% a través del ventrículo inferior izquierdo.

Se obtuvo el tejido nervioso tomando como centro el sitio de la lesión, posteriormente las muestras fueron incluidas en parafina y se realizaron cortes longitudinales de 10 μm hasta llegar al canal ependimario, esto para tener certeza de que los cortes se realizaran al mismo nivel y las evaluaciones fueran comparables entre los grupos. Al finalizar este proceso los cortes fueron teñidos con la técnica de Klüver Barrera (figura 18); el violeta de cresilo muestra los somas neuronales en violeta mientras que la mielina se observa en un color más claro (Escarabajal y cols. 2005).

Figura 18. Imágenes en las que se ilustra la tinción de azul – luxol en un baño a 56 °C, durante 24 horas y posteriormente se realiza una tinción con el colorante violeta de cresilo.

Se analizó un corte por rata y las imágenes fueron capturadas con un equipo Leika, con software IM 500, para calcular la cantidad de tejido preservado. Las unidades utilizadas para medir el área fueron mm^2.

En la figura 19 se muestra el diseño experimental de la evaluación del efecto neuroprotector de la MT II, con base en la cantidad de tejido preservado.

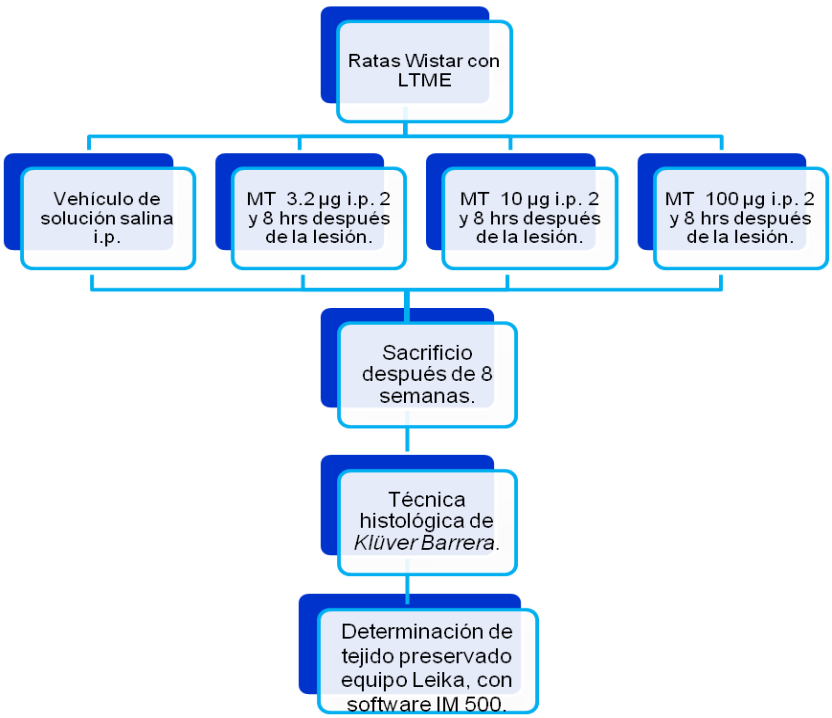

Figura 19. Diseño experimental para la evaluación del efecto neuroprotector de la MT II, con base en la cantidad de tejido preservado.

Determinación de las isoformas de las Metalotioneínas I, II y III, utilizando Electroforesis Capilar (ECZ), en un modelo de LTME por contusión en rata.

Para la determinación de las isoformas de la MT I, II y III, se utilizaron 30 ratas Wistar hembras sanas de 200 a 250g de peso, las cuales fueron divididas en 5 grupos de manera aleatoria.

Modelo de Lesión

Los animales de cada grupo fueron sometidos al mismo modelo de LTME, utilizado para la evaluación del efecto neuroprotector de la MT II. Al igual que en el estudio mencionado anteriormente, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico. La laminectomía se realizó en condiciones de asepsia, a nivel de T9, con la finalidad de exponer la médula espinal.

Diseño experimental

Los animales de los grupos 1 fueron sometidos únicamente al procedimiento de laminectomía (grupo control), mientras que los grupos 2, 3, 4 y 5 fueron lesionados con el equipo Spinal Cord Impactor (IH-0400, Precision Systems and Instrumentation, Urbana IL, USA / Proyecto CAMINA, A.C.). Posterior a la lesión, los animales de cada grupo fueron sacrificados por decapitación a diferentes tiempos: 2, 4, 12 y 24 horas (figura 20), siguiendo el modelo de estudio de Díaz-Ruiz y colaboradores (2009). Los animales del grupo control fueron sacrificados 2 horas después del procedimiento de laminectomía.

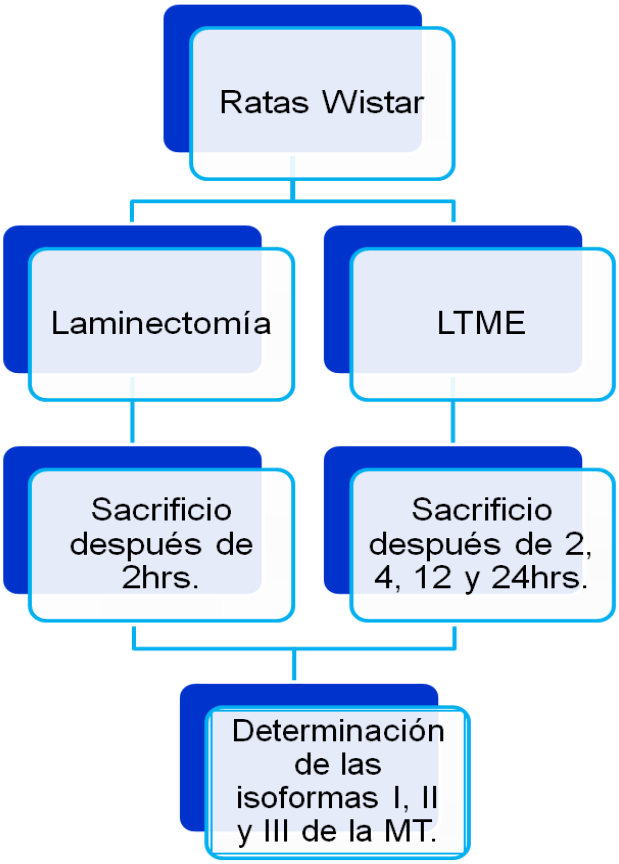

Figura 20. Diseño experimental en el que se muestra la distribución de los animales y el tiempo de sacrificio, por decapitación, después de la lesión.

Los animales fueron sacrificados con el propósito de obtener muestras de tejido de la médula espinal lesionada y sin lesión, para poder cuantificar las isoformas de la MT I, II y III presentes en el tejido lesionado, de tal manera que se pudiera comparar la concentración de cada isoforma presente en un tejido sin lesión *vs* con lesión y, a su vez, comparar la cantidad de MT presente a los diferentes tiempos de sacrificio.

Después del sacrificio de los animales de cada grupo a los tiempos establecidos previamente, las muestras fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y preservadas a -70 ºC, para ser analizadas posteriormente por ECZ en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, de la Secretaría de Salud.

Tratamiento de las muestras

Previo al análisis de las muestras por ECZ, éstas fueron homogeneizadas durante 1min con 1 mL de CH_3OH frío grado HPLC (Homogeneizador DeWalt SR60, Huller Co., Victoria, Australia), para lo cual se utilizó un tubo de vidrio de borosilicato de alta resistencia y un homogeneizador de pistilo con teflón. Posteriormente el homogenado fue vortexeado durante 1min (Vortex ES22, Fisher Scientific, Urbana, IL, USA), las muestras se mantuvieron en hielo y posteriormente fueron introducidas en un baño maría a 80 ºC durante 1 min, con agitación constante para colocarse una vez más en hielo. Frías las muestras, se vortexearon durante 1 min y después se centrifugaron a 16´000*g* por espacio de 16 min (microcentrífuga Spectrafuge, Labnet, Palo Alto, TX, USA). El sobrenadante fue separado y utilizado en el estudio.

Equipo utilizado y condiciones de separación

Los homogeneizados de médula espinal de rata, fueron analizados por electroforesis capilar, para evaluar las isoformas presentes de MT I, II y III. Para ello, se utilizó el equipo de electroforesis capilar P/ACE^{TM} MDQ (Beckman Coulter, Urbana, IL, USA) completamente automatizado y controlado por el software "32 KARAT" (Beckman Coulter, Urbana, IL, USA) (figura 21). El análisis se realizó bajo radiación UV con detección por arreglo de diodos de alta sensibilidad, según la metodología de Beattie (1998). El homogenado obtenido previamente, se diluyó en proporción 1:20 con amortiguador de boratos 100 mM, se centrifugó a 16'000*g* durante 15 minutos y se filtró con filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm y se analizó directamente. Para tal efecto, el capilar del sistema de electroforesis capilar, se preacondicionó inicialmente con una solución 1.0 M de NaOH durante 2 min, posteriormente agua destilada por espacio de 2 min y finalmente el amortiguador de corrida ($Na_2B_4O_7$ 100mM + SDS 75mM a pH 8.4) durante 2 min. Las muestras fueron inyectadas bajo presión hidrodinámica a 0.5 psi/10s. La separación se realizó a 20 kV durante 20 min a 234 nm. Entre corrida y corrida, el capilar fue lavado durante 4 min con NaOH 0.1 M. La concentración de las

isoformas de MT I, II y III, se determinó mediante curvas estándar. La concentración se reportó en μg de proteína por mg de tejido.

Figura 21. Imagen en la que se muestra el aparato de electroforesis capilar P/ACE™ MDQ de Beckman Coulter.

En la tabla 2 se muestra la información particular de los estándares utilizados para la realización de las curvas estándar de las isoformas de las MT I, II y III.

Tabla 2. Información particular de los estándares utilizados para la realización de las curvas estándar.

LABORATORIO	ESTÁNDAR
ALEXIS BIOCHEMICALS	MT I – Rabbit liver
SIGMA	MT II – Rabbit liver
ALEXIS BIOCHEMICALS	MT III - Human

En la figura 22**,** se esquematiza la metodología utilizada en este trabajo para la obtención de las muestras de tejido de médula espinal después del sacrificio de los animales, así como el posterior tratamiento de las muestras para su posterior análisis por ECZ.

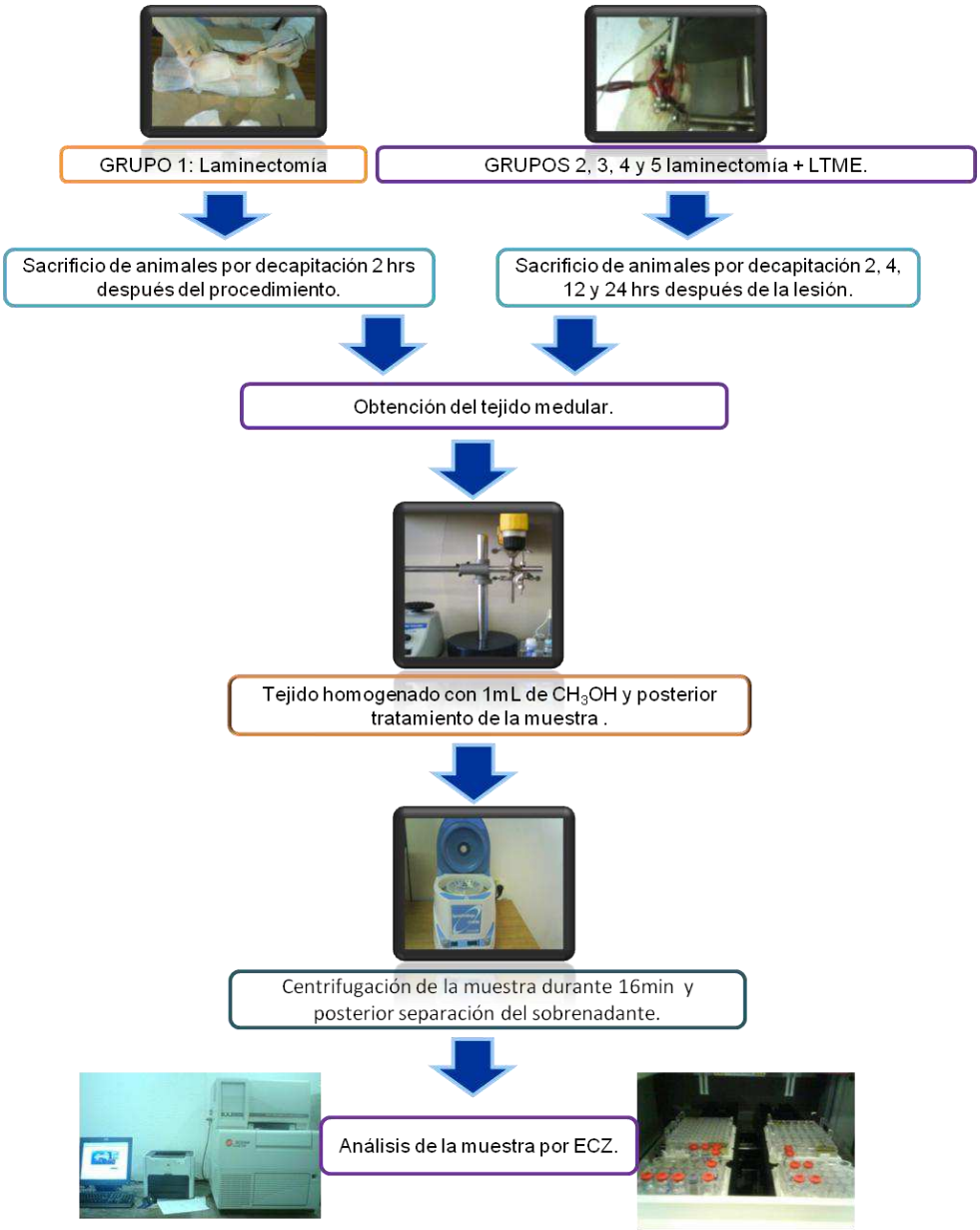

Figura 22. Imagen en la que se esquematiza la metodología utilizada para la obtención del tejido y el tratamiento del mismo para su posterior análisis por ECZ.

Estadística

Los valores obtenidos de la evaluación motora fueron analizados con una prueba estadística paramétrica, ANOVA de medidas repetidas, seguida de la prueba de Dunnett. Las diferencias entre los grupos fueron consideradas significativas con una $p < 0.05$.

Los resultados del área bajo la curva (ABC) fueron ajustados por regresión no lineal, utilizando la ecuación de Hill: Area = (E x Dosis) / (K + Dosis), donde E es el efecto máximo y K es la dosis efectiva media.

Los valores obtenidos del análisis histológico fueron analizados con una prueba estadística paramétrica, ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett. Las diferencias entre los grupos fueron consideradas significativas con una $p < 0.05$.

Los resultados obtenidos de la determinación de las isoformas de la MT fueron analizados con una prueba estadística no paramétrica, prueba de Kruskal – Wallis.

El análisis estadístico para todos los casos (evaluación motora, ajuste con la ecuación de Hill, análisis histológico y determinación de las isoformas), se realizó por medio del programa de cómputo SPSS versión 17.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de la evaluación del efecto neuroprotector de la MT II administrada a diferentes dosis, con base en la recuperación motora en un modelo de LTME por contusión en rata.

Los resultados obtenidos del análisis de la recuperación de la función motora, evaluada con la escala de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB), durante ocho semanas de los animales sometidos a una LTME y tratados con diferentes dosis de MT II (3.2, 10 y 100 μg), administradas a las 2 y 8 h después del daño, muestran que MT II tiene un efecto neuroprotector, ya que al comparar el grupo control, sin tratamiento, con los grupos de animales que recibieron MT II como tratamiento, se encontró una diferencia significativa entre los resultados obtenidos de la evaluación de la recuperación de la función motora de las patas traseras de los animales (ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett , $p < 0.05$).

En el tabla 3, se muestran los valores promedio obtenidos de la evaluación de la función motora de los cuatro grupos de animales estudiados (grupo 1: vehículo; grupo 2: MT 3.2 μg; grupo 3: MT 10 μg; grupo 4: MT 100 μg), durante un periodo de ocho semanas.

Tabla 3. Resultados promedio obtenidos de la evaluación de la respuesta funcional evaluada con la escala de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) durante ocho semanas, de animales sometidos a una LTME y tratados con diferentes dosis de MT (3.2, 10 y 100 μg).

SEMANA	TRATAMIENTO			
	LTME	**LTME/MT3.2μg**	**LTME/MT10μg**	**LTME/MT100μg**
1	0.277 ± 0.12	1.000 ± 0.18	0.750 ± 0.21	1.166 ± 0.40
2	0.611 ± 0.21	2.277 ± 0.37	3.000 ± 0.46	2.833 ± 0.66
3	1.611 ± 0.23	3.666 ± 0.53	4.750 ± 0.70	4.722 ±0.79
4	2.166 ± 0.40	4.444 ± 0.59	5.875 ± 0.92	6.111 ±0.90
5	3.111 ± 0.67	4.833 ± 0.68	7.375 ± 1.19	7.444 ±1.08
6	4.500 ± 0.88	6.166 ± 0.89	10.500 ± 1.60	8.777 ±1.63
7	6.388 ± 1.03	7.500 ± 1.04	10.500 ± 1.6	9.722 ±1.80
8	7.888 ± 1.28	9.944 ± 1.47	12.625 ± 2.07	10.888 ±1.90

Promedio ± EE. n=8-9

Al hacer una comparación entre las medias de los tratamientos por la prueba de Dunnett, se encontró una diferencia significativa entre el grupo control y los grupos tratados con dosis de 10 y 100 µg de MT II ($p < 0.05$), como se muestra en el tabla 4. Este resultado corrobora el efecto neuroprotector de la MT II.

Tabla 4. Resultados obtenidos al realizar una comparación entre las medias de los tratamientos (ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Dunnett).

Tratamiento		Diferencia de medias	p
LTME+ MT 3.2 μg	**LTME+Vehículo**	1.6597 ± 1.21	0.202
LTME+ MT 10 μg	**LTME+Vehículo**	3.4306 ±1.25	0.014*
LTME+ MT 100 μg	**LTME+Vehículo**	3.1389 ±1.21	0.020*

***Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, p< 0.05.**

En la figura 23, se presenta la curva dosis respuesta obtenida a partir de los resultados de la evaluación motora de las ratas administradas con MT en la última semana de evaluación (octava semana).

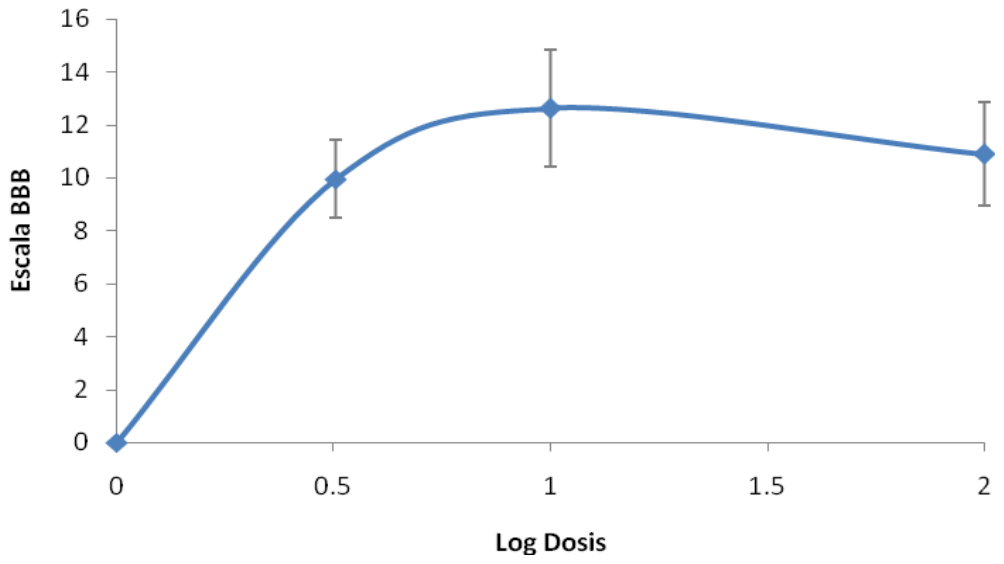

Figura 23. Curva dosis-respuesta en la que se muestran los resultados de la recuperación funcional evaluada con la escala de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) durante la octava semana de evaluación de los animales tratados con diferentes dosis de MT (3.2, 1 0 y 100 μg), administradas a las 2 y 8 h después de la lesión.

La representación gráfica de la recuperación de la función motora, durante las ocho semanas de seguimiento, se presenta en la figura 24, en donde se puede observar que el efecto en la recuperación es gradual, ya que hay un incremento en la respuesta de las últimas evaluaciones en comparación con los resultados de las primeras evaluaciones.

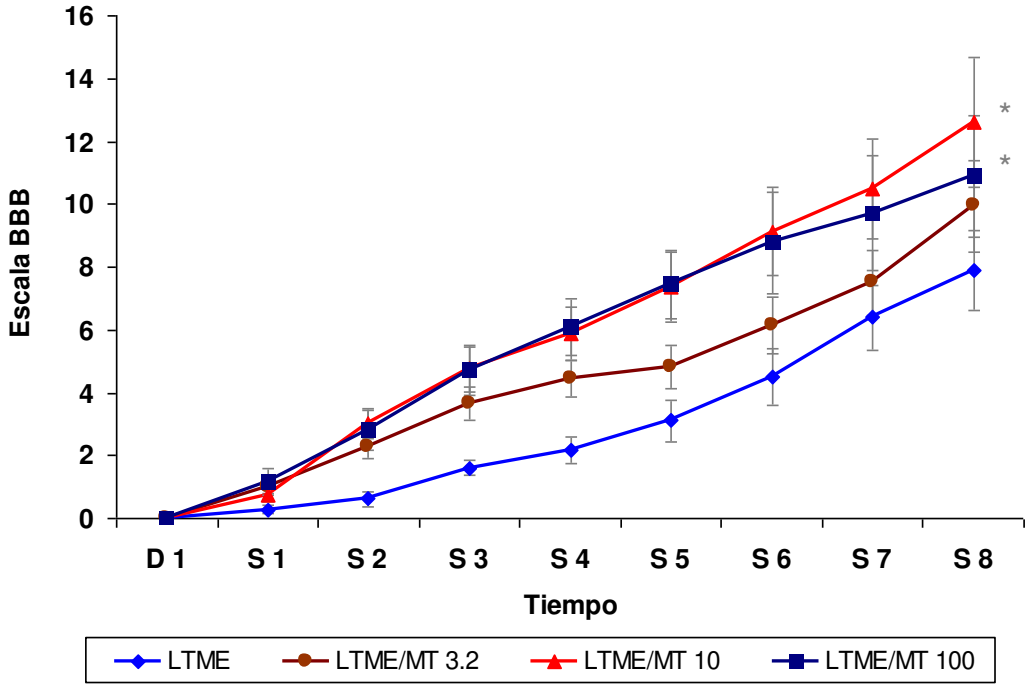

Figura 24. Resultados de la recuperación funcional evaluada con la escala de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) durante ocho semanas, de animales sometidos a una lesión traumática de la medula espinal (LTME) y tratados con diferentes dosis de MT (3.2, 1 0 y 100 μg) administradas a las 2 y 8 h después de la lesión (dos dosis para cada rata).

En la figura 25, se muestran los resultados obtenidos del ABC, a partir de los promedios de la recuperación funcional que presentaron los animales que recibieron MT II como tratamiento a tres dosis diferentes (3.2μg, 10μg y 100 μg) y el grupo control que no recibió tratamiento. Los resultados obtenidos de la regresión no lineal para calcular Emax y DE50 fueron de 46.235 y de 1.073 respectivamente, utilizando la ecuación de Hill.

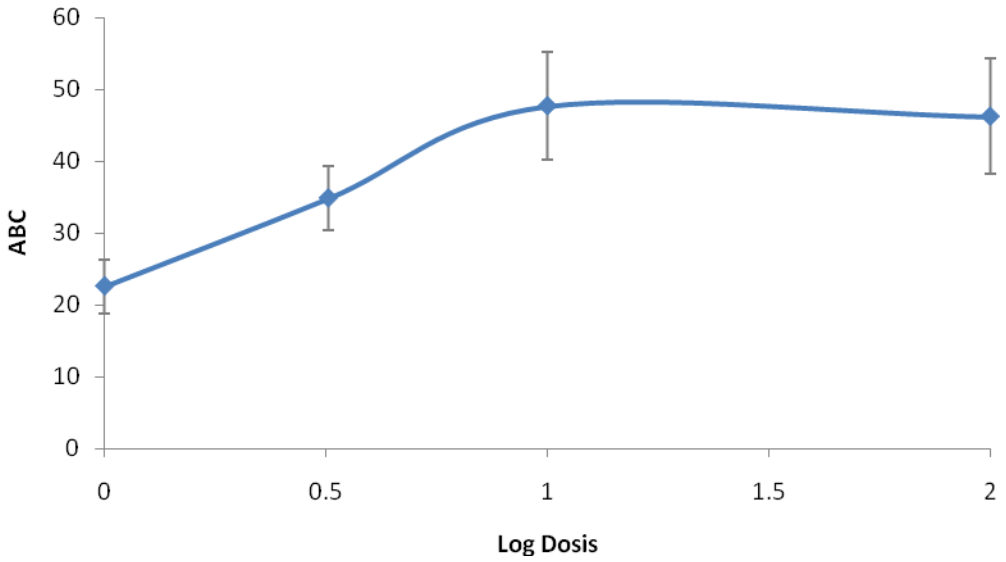

Figura 25. Gráfica en la que se muestran los resultados del ABC, durante ocho semanas de evaluación, de los animales tratados con diferentes dosis de MT (3.2, 1 0 y 100 μg), administradas a las 2 y 8 h después de la lesión. La ecuación fue ajustada por regresión no – lineal al modelo: Area = (E x Dosis) / (K + Dosis) ***[Ecuación de Hill]***. Donde E= 46.235 es el efecto máximo y K= 1.073 es la Dosis efectiva media.

Resultados de evaluación del efecto neuroprotector de la MT II administrada a diferentes dosis, con base en la cantidad de tejido preservado, en un modelo de LTME por contusión en la rata.

Las muestras de médula, obtenidas de los tres grupos de animales tratados con MT (3.2μg, 10μg y 100μg) y el grupo control (solución salina), fueron analizadas con el programa IM500, con el fin de contabilizar el tejido preservado de cada muestra. Los resultados obtenidos, mostraron una diferencia significativa al comparar el tejido preservado del grupo control y los grupos tratados, (ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett, $p< 0.05$).

En el tabla 5, se muestran los valores obtenidos de la estadística descriptiva del análisis de tejido preservado, de las muestras de los animales utilizados en el estudio de recuperación motora.

Tabla 5. Resultados de la estadística descriptiva realizada al tejido preservado de animales sometidos a una lesión traumática de médula espinal (LTME) y tratados con diferentes dosis de metalotioneína (MT) (3.2μg, 1 0μg y 100 μg) y el grupo control.

TRATAMIENTO	Media
LTME/Sol.salina	5.3211 ± 0.316
LTME/MT 3.2 μg	6.0277 ± 0.195
LTME/MT 10 μg	6.6225 ± 0.218
LTME/MT 100 μg	6.2975 ± 0.313

Promedio ± EE. n=8-9

Al hacer una comparación entre las medias de los tratamientos por la prueba de Dunnett, se encontró una diferencia significativa entre el grupo control y los grupos tratados con 10µg y 100µg de MT II ($p < 0.05$), como se muestra en el tabla 6. Este resultado concuerda con el efecto neuroprotector de MT II encontrado en la evaluación de la función motora de las ratas.

Tabla 6. Resultados obtenidos al realizar una comparación entre las medias de los tratamientos (ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett).

Tratamiento		Diferencia de medias	p
LTME+ MT 3.2 µg	**LTME+Vehículo**	0.70667 ± 0.366	0.078
LTME+ MT 10 µg	**LTME+Vehículo**	1.30139 ± 0.377	0.002*
LTME+ MT 100 µg	**LTME+Vehículo**	0.97639 ± 0.377	0.020*

***Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, p< 0.05.**

Las imágenes que muestran el tejido preservado correspondiente a cada grupo de estudio se muestran en la figura 26.

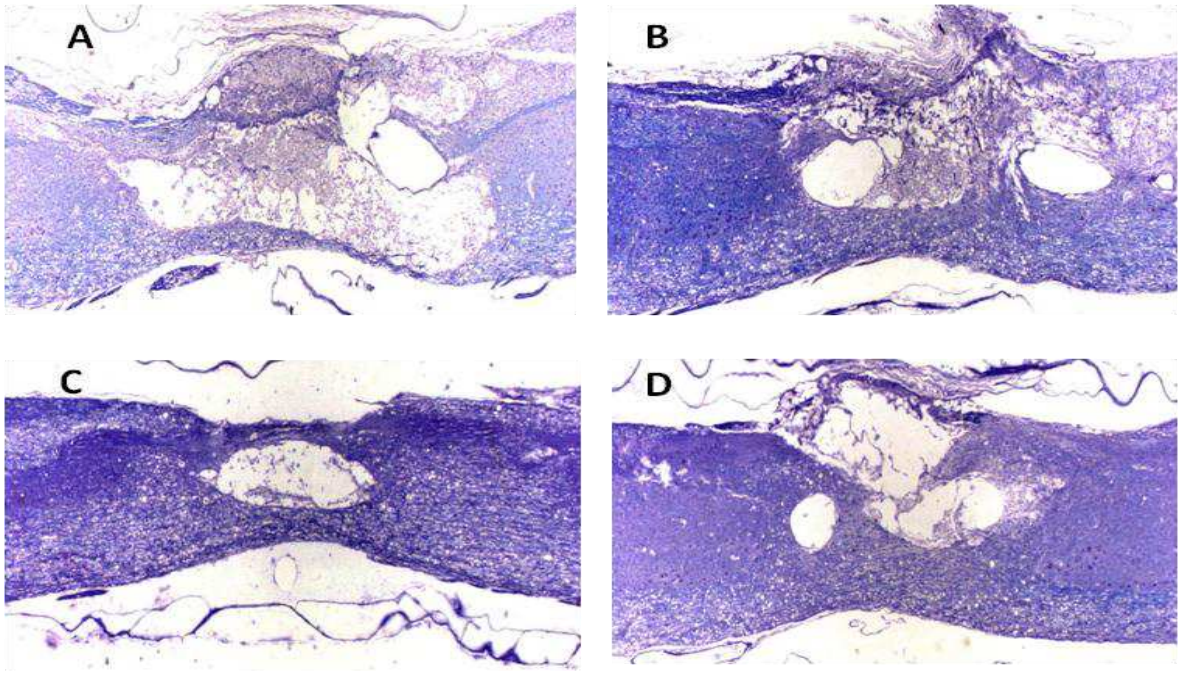

Figura 26. Imágenes representativas de los animales sometidos a una lesión traumática de médula espinal (LTME) con administración de diferentes dosis de metalotioneína (MT). A)Corte longitudinal de la médula de un animal sin tratamiento y con administración de solución salina. B)Corte longitudinal de la médula de un animal que recibió 3.2µg de MT como tratamiento. C)Corte longitudinal de la médula de un animal que recibió 10µg de MT como tratamiento. D)Corte longitudinal de la médula de un animal que recibió 100µg de MT como tratamiento.

En la figura 27, se muestran los valores promedio obtenidos de la cuantificación del tejido preservado en mm^2, correspondiente a cada uno de los grupos de estudio, MT (3.2µg, 10µg y 100 µg) y el grupo control (solución salina).

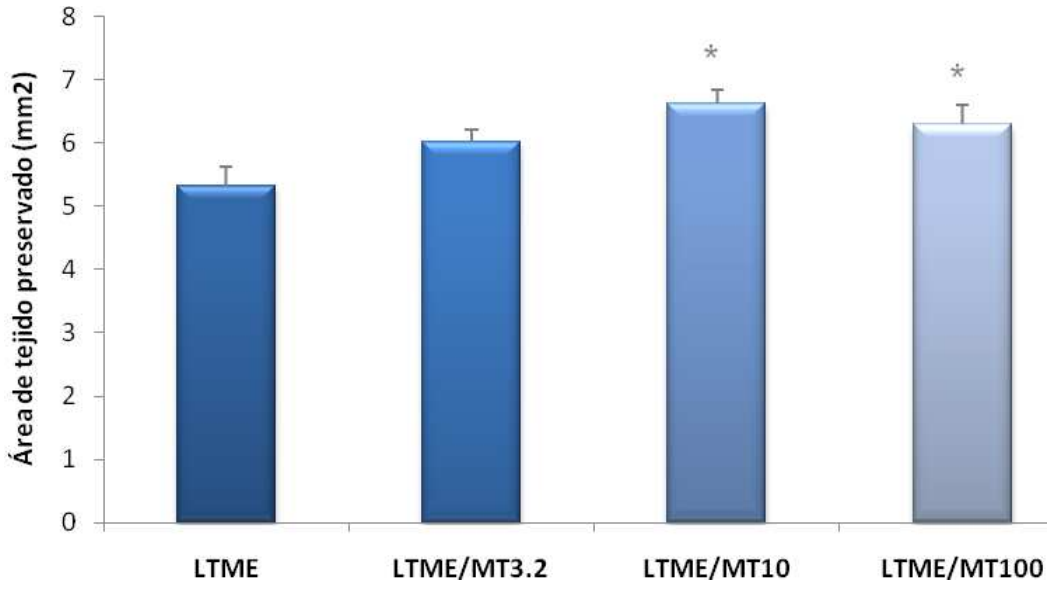

Figura 27. Gráfica en la que se muestran los valores promedios de 8 a 9 animales por grupo de la cuantificación de tejido preservado: LTME-vehículo; LTME- MT 3.2µg; LTME- MT 10µg; LTME- MT 100µg. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnet, (*$p<0.05$) (lesión traumática de médula espinal: LTME; metalotioneína: MT).

Resultados de la determinación de las isoformas de las Metalotioneínas I, II y III, utilizando Electroforesis Capilar de Zona (ECZ), en un modelo de LTME por contusión en rata.

Los resultados de las curvas estándar, a partir de las cuales se determinó la concentración de las isoformas de la MT I, MTII y MTIII, se pueden observar en las figuras 28, 29 y 30, en ellas se muestran las representaciones gráficas correspondientes a la linealidad promedio y los valores de los parámetros de la ecuación de regresión y el coeficiente de correlación lineal (r^2).

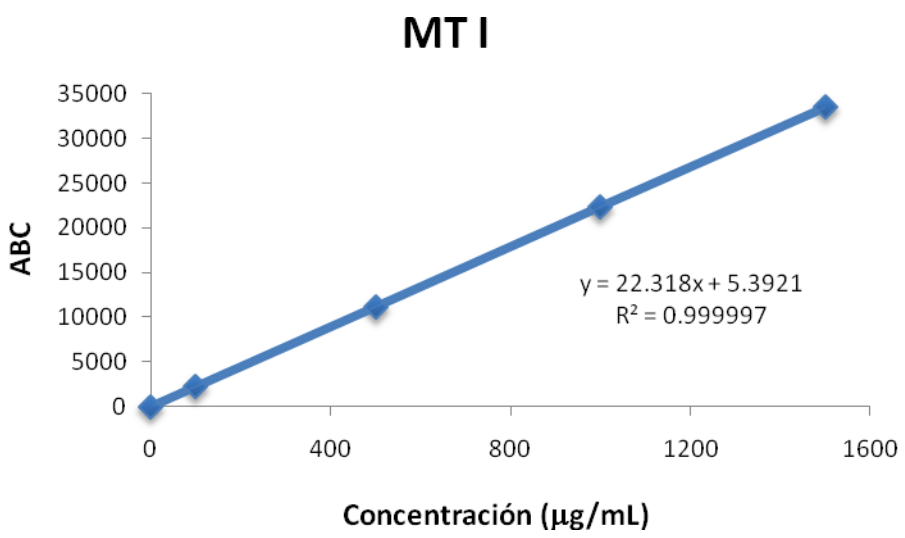

Figura 28: Representación gráfica de la linealidad promedio, de la curva estándar de la MT I.

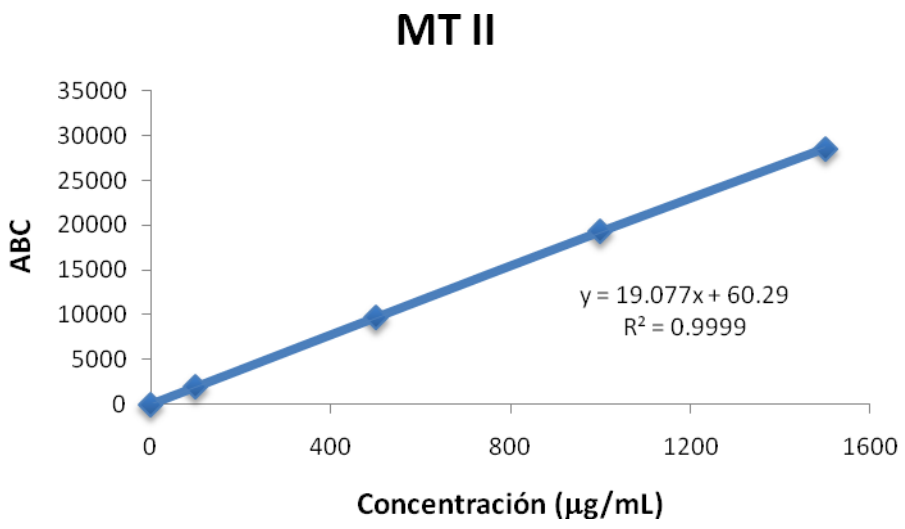

Figura 29: Representación gráfica de la linealidad promedio, de la curva estándar de la MT II.

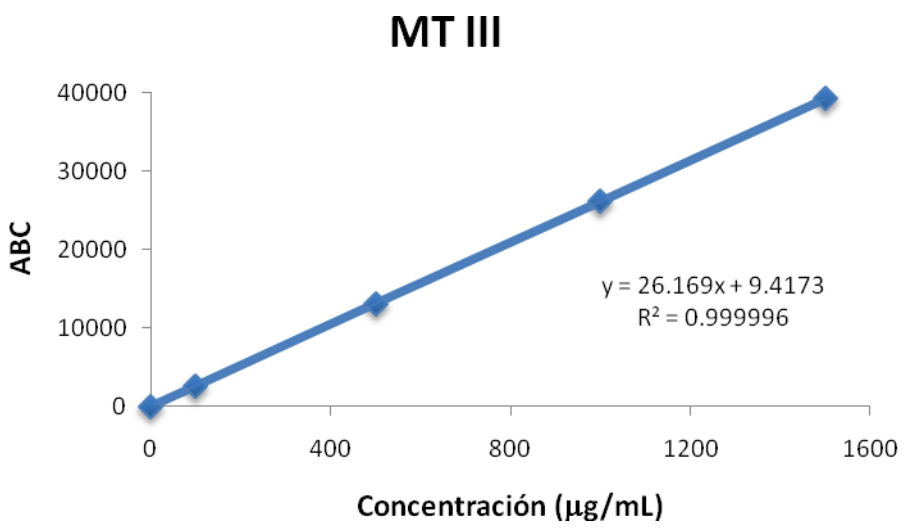

Figura 30: Representación gráfica de la linealidad promedio, de la curva estándar de la MT III.

En las tablas 7, 8 y 9 se muestran los resultados de la precisión calculados con los datos de la linealidad utilizando los estándares de la MT I, II y III.

Tabla 7: Precisión del sistema, utilizando el estándar de la metalotioneína I (MT I).

Cantidad Adicionada [MT I] (µg/mL)	Cantidad Recuperada Promedio [MT I] (µg/mL)	CV (%)
0	0.0	0.0
100	100.5	0.5
500	499.0	0.2
1000	998.0	0.2
1500	1504.5	0.3

Tabla 8: Precisión del sistema, utilizando el estándar de la metalotioneína II (MT II).

Cantidad Adicionada [MT II] (μg/mL)	Cantidad Recuperada Promedio [MT II] (μg/mL)	CV (%)
0	0.0	0.0
100	99.4	0.6
500	497.5	0.5
1000	991.0	0.9
1500	1488.0	0.8

Tabla 9: Precisión del sistema, utilizando el estándar de la metalotioneína III (MT III).

Cantidad Adicionada [MT III] (μg/mL)	Cantidad Recuperada Promedio [MT III] (μg/mL)	CV (%)
0	0.0	0.0
100	99.1	0.9
500	498.0	0.4
1000	997.0	0.3
1500	1498.5	0.1

La precisión se demostró al obtener experimentalmente, un coeficiente de variación menor al 2%, para eventos por triplicado e independientes en todos los casos, según Jones (2005).

La separación de las isoformas endógenas de la MT se llevó a cabo mediante ECZ. En la figura 31 se muestran los electroferogramas representativos correspondientes a los tejidos analizados para cada una de las isoformas de MT en los cuales se aprecia la separación de las isoformas de la MT I, II y III presentes en los tejidos, así como los tiempos de migración y las áreas bajo la curva para cada una de las isoformas de la MT en animales control (laminectomía) y animales lesionados correspondientes a los tiempos de sacrificio de 2h, 4h, 12h y 24 h.

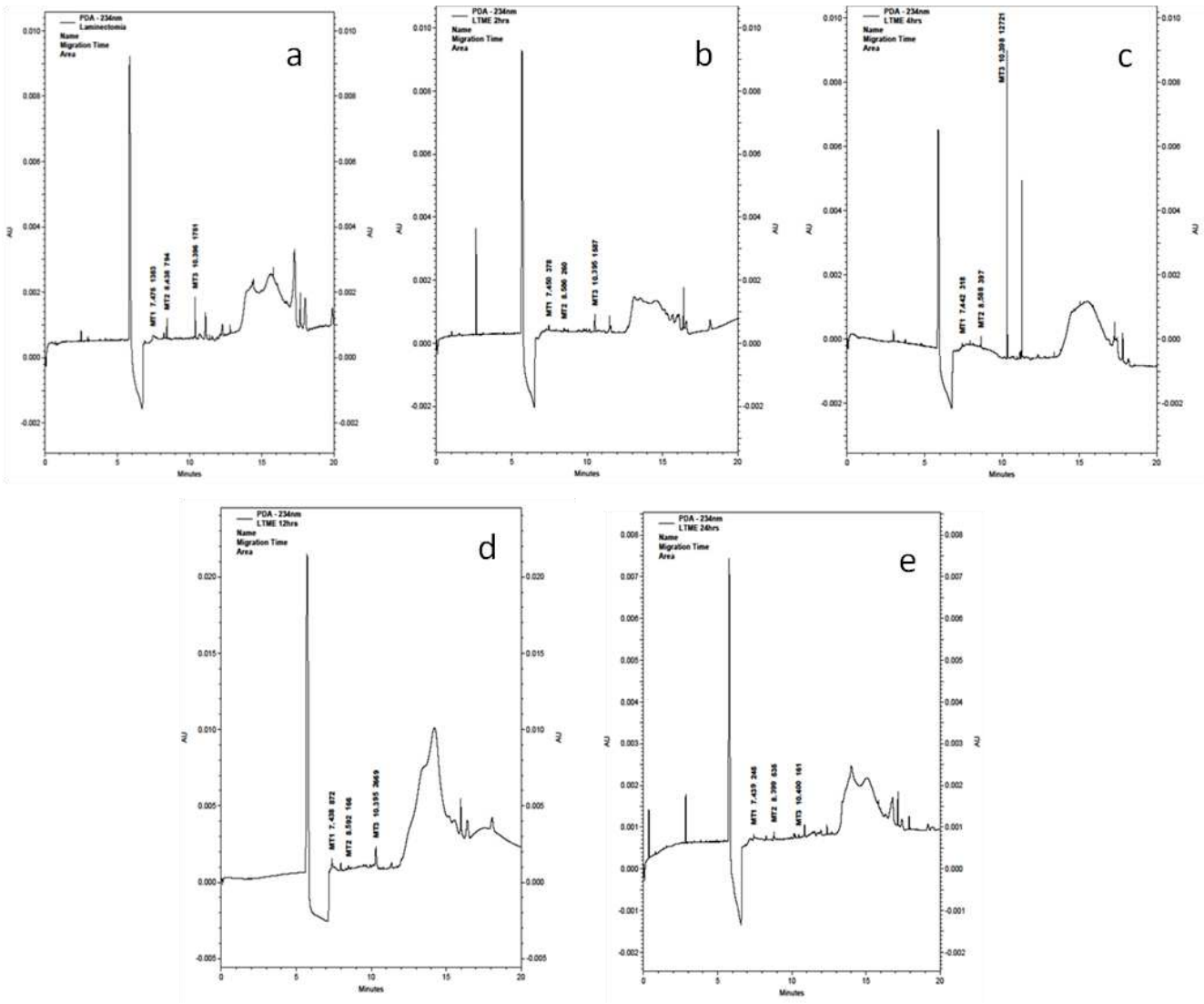

Figura 31: Electroferogramas representativos de los tejidos analizados de médula espinal donde se muestran los tiempos de migración y las áreas bajo la curva para las isoformas I, II y III de las MT en: (a) animales control (sacrificados 2h después del procedimiento de laminectomía) y animales lesionados correspondientes a los tiempos de sacrificio de (b) 2h, (c) 4h, (d) 12h y (e) 24 hrs.

En el tabla 10, se muestran los valores promedio obtenidos de la caracterización de las isoformas de la MT I, II y III, del grupo control (animales con laminectomía sacrificados después de 2 hrs) y los grupos experimentales (animales con LTME sacrificados a las 2, 4, 12 y 24 hrs respectivamente), utilizando ECZ.

Tabla 10: Estadística descriptiva que corresponde a los valores obtenidos del análisis de las isoformas de la MT I, II y III evaluada a diferentes tiempos después de la lesión, así como de los valores del grupo control (solo con el procedimiento quirúrgico de laminectomía).

ISOFORMA ENDÓGENA	GRUPOS EXPERIMENTALES				
	Laminectomía	**LTME/2hrs**	**LTME/4hrs**	**LTME/12hrs**	**LTME/24hrs**
MT I	25.51 ± 7.51	17.76 ± 12.85	8.96 ± 1.71	11.49 ± 2.90	9.70 ± 5.98
MT II	9.58 ± 5.29	2.92 ± 0.94	6.02 ± 4.43	2.64 ± 0.80	3.51 ± 0.75
MT III	37.54 ± 5.44	14.73 ± 2.85	35.18 ± 10.03	17.69 ± 4.73	2.27 ± 0.19

n= 2 animales por grupo.

Así mismo en los resultados obtenidos del análisis de las muestras de médula espinal, del grupo control y los animales sometidos a LTME y sacrificados a las 2, 4, 12 y 24 horas, para cuantificar las isoformas de la MT I, II y III por ECZ, podemos observar que, a pesar de mostrar valores promedio diferentes entre los grupos con lesión estos no fueron estadísticamente significativos cuando se compararon con su respectivo grupo control (animales solo con laminectomía), esto debido a la gran variabilidad entre los grupos (prueba de Kruskal-Wallis), (tabla 11).

Tabla 11. Valores H de la prueba estadística de Kruskal-Wallis para analizar las diferencias de la cantidad de MT I, II y III presente en el tejido nervioso de animales con y sin lesión.

ISOFORMA ENDÓGENA	Significancia
MT I	0.549
MT II	0.431
MT III	0.093

En las figuras 32, 33 y 34 se muestran las gráficas que ejemplifican las diferencias de concentración que se pudieron observar en cada tiempo de sacrificio para cada una de las isoformas de la MT.

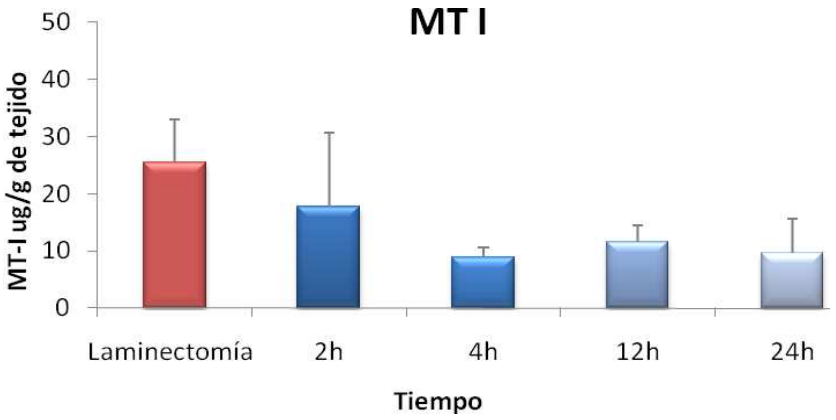

Figura 32: Gráfica en la que se muestra la diferencia en la concentración de metalotioneína I (MT I) encontrada en el tejido analizado, de animales control (Laminectomía – barra roja) *vs* animales lesionados (LTME – barras azules), correspondientes a los tiempos de sacrificio de 2, 4, 12 y 24 h, (promedio de los datos obtenidos de 2 animales por grupo).

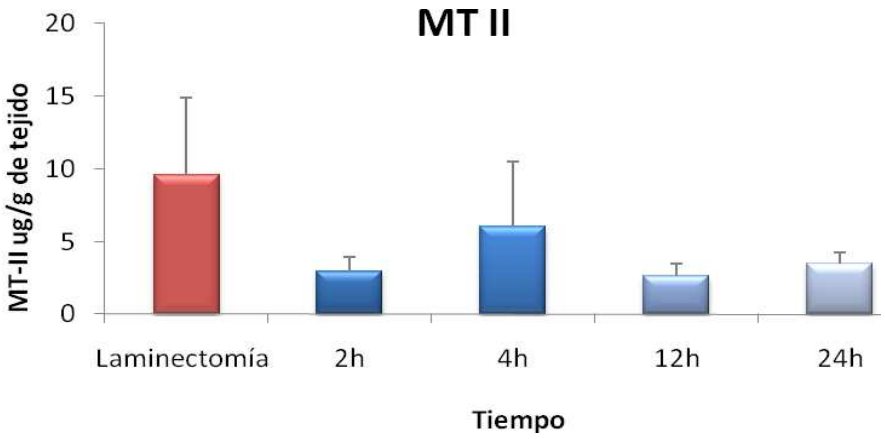

Figura 33: Gráfica en la que se muestra la diferencia en la concentración de metalotioneína II (MT II) encontrada en el tejido analizado, de animales control (Laminectomía – barra roja) *vs* animales lesionados (LTME – barras azules), correspondientes a los tiempos de sacrificio de 2, 4, 12 y 24 h, (promedio de los datos obtenidos de 2 animales por grupo).

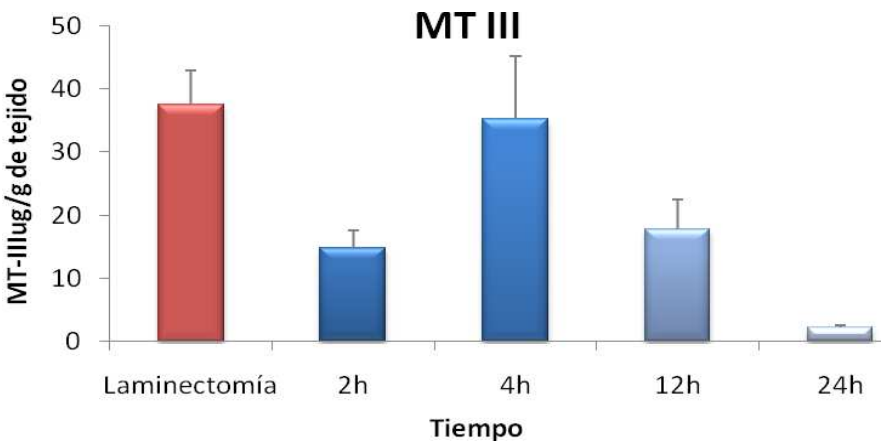

Figura 34: Gráfica en la que se muestra la diferencia en la concentración de metalotioneína III (MT III) encontrada en el tejido analizado, de animales control (Laminectomía – barra roja) *vs* animales lesionados (LTME – barras azules), correspondientes a los tiempos de sacrificio de 2, 4, 12 y 24 h, (promedio de los datos obtenidos de 2 animales por grupo).

Discusión de resultados

Los resultados obtenidos tanto de la evaluación funcional como del análisis de la cantidad de tejido preservado muestran que la MT-II posee un efecto neuroprotector, ya que al hacer una comparación entre los valores promedio de los tratamientos utilizando la prueba estadística ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba Dunnett (para la evaluación motora) y ANOVA de una vía seguida de la prueba Dunnett (para la cuantificación de tejido preservado), se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los grupos tratados con dosis tanto de 10, como de 100 µg de MT II ($p< 0.05$).

A partir de los resultados promedio obtenidos del ABC, obtenidos de los animales tratados con diferentes dosis de MT (3.2, 1 0 y 100 µg) y evaluados durante ocho semanas, se obtuvieron los valores correspondientes del Emax: 46.235 y K: 1.073, utilizando para ello la ecuación de Hill.

Así mismo, la curva dosis-respuesta refleja que la relación entre las diferentes dosis administradas de MT (3.2µg, 10µg y 100 µg) y el efecto obtenido es dosis dependiente, es decir, el incremento de la dosis produce un aumento paralelo en la intensidad de la respuesta; aunque se puede observar un efecto de saturación con la dosis de 10µg.

Lo anterior concuerda con lo reportado por Hidalgo y Penkowa (2001), quienes reportan que la dosis de 100µg de MT II es efectiva ya que los animales presentan disminución de los síntomas clínicos, de la mortalidad y de la concentración de citocinas proinflamatorias, en un modelo de encefalomielitis autoinmune (EAE). En el mismo estudio los autores sugieren que el efecto que la MT II presenta sobre la modulación de la apoptosis durante la EAE, se puede relacionar a las propiedades antioxidantes que posee la proteína.

Al respecto, algunos estudios *in vitro* han demostrado una asociación directa entre los niveles incrementados de MT y la disminución de RL y apoptosis (Apostolova, 1999).

Por otra parte, la funcionalidad del tejido viable permite hablar de una neuroprotección funcional y es claro además que a mayor cantidad de tejido preservado mayor recuperación funcional, así los animales tratados con dosis de 10 y 100 μg, en donde se observó mayor respuesta en la recuperación funcional, mostraron también un incremento en la cantidad de tejido preservado.

Sin embargo, es necesario mencionar que dicho efecto es parcial ya que los animales no lograron recobrar la funcionalidad motora total de las patas traseras.

Se ha descrito que la MT está involucrada en procesos de inflamación, estrés oxidativo y enfermedades degenerativas del SNC (Hidalgo y cols., 2001), por lo que el efecto benéfico que presenta en este estudio, al ayudar a recuperar la función motora de los animales sometidos a una LTME, puede deberse a su capacidad antioxidante, ya que esta proteína es capaz de atrapar RL como el $OH^{\cdot}$ que es altamente reactivo.

Las especies reactivas de oxígeno son los mayores inductores de apoptosis en al SNC (Cassarino, 1999), y la administración exógena de la MT II ha demostrado reducir la inmunoreactividad de marcadores del estrés oxidativo como iNOS y MDA (malondialdehído) (Pentkowa y cols., 2000).

In vitro se ha observado que la MT-I es capaz de interaccionar con el radical $OH^{\cdot}$ y en menor medida con el $O_2^{\cdot -}$ producidos por la actividad de la xantina oxidasa. La afinidad con que reacciona con el $OH^{\cdot}$ es superior a la de cualquier otra molécula biológica conocida por lo que se piensa que su función podría ser la de proteger a la célula frente a este radical. La interacción se realizaría directamente con los grupos tioles al ser desplazados los metales. La capacidad de secuestrar RL por las MTs se refleja en un efecto protector, frente al daño causado por los radicales producidos por la actividad de la xantina oxidasa al DNA, o a las membranas. En algunos casos se ha demostrado que su efecto protector es muy superior al conseguido por cantidades idénticas de glutatión. Las MT-I y -II también son capaces de proteger *in vitro* de los efectos de la irradiación con rayos-X (Carrasco y cols., 2000).

In vivo también se ha constatado el efecto protector de las MT-I y -II frente al estrés oxidativo. La preinducción mediante metales causa una mayor supervivencia a irradiación por rayos-X e inhibe la peroxidación lipídica producida por el estrés (Carrasco y cols., 2000).

Se ha observado además, que la MT-II administrada de manera exógena puede reducir significativamente la activación de macrófagos y linfocitos T, así como IL-1, IL-6, IL-12 y TNF-α, que tienen especial importancia en la respuesta inflamatoria (Hidalgo y cols., 2001), este efecto anti-inflamatorio puede ser, también, responsable del efecto protector de la MT-II después de la lesión.

Así, la MT puede jugar un papel relevante en la neurobiología de las motoneuronas, modulando la toxicidad de algunos metales y brindando protección antioxidante (Kinighman y cols., 1995).

Al menos parte de los efectos de las MT-I y -II sobre las células inmunitarias parecen mediados por unión de estas proteínas a la membrana plasmática. Se ha sugerido que la interacción entre estas proteínas y la membrana de las células inmunes causaría la activación de vías de transmisión de señales que afectarían al comportamiento de las células. Esto implica que las MT-I y -II tendrían que ser liberadas al medio, y podrían ser secretadas por mecanismos específicos o ser liberadas como consecuencia de un proceso de muerte celular. En cualquiera de los casos las MT-I y -II tendrían la oportunidad de ejercer efectos extracelulares. En este sentido se ha detectado que las MT-I y -II podrían unirse a factores celulares aún por determinar e incluso unirse a la membrana de linfocitos macrófagos, células endoteliales y astrocitos (Carrasco y cols., 2000).

Es importante señalar que el mecanismo de acción de la MT aún no ha sido esclarecido, por lo que se desconoce la ruta por la cual la MT llega al lugar de acción a partir de una administración exógena. Aún así, la administración exógena de la MT se ha utilizado como tratamiento en modelos de lesión traumática de cerebro, mostrando como resultado una reducción en la neurodegeneración,

estrés oxidativo y apoptosis, en los días y/o semanas siguientes a la lesión, en comparación con animales que no recibieron dicho tratamiento (Pentkowa, 2006).

Estudios en ratones con deficiencia genética de MT han demostrado un incremento en la apoptosis en el SNC, lo que sugiere que la MT tiene una participación directa en la prevención de la muerte celular (Carrasco,1999).

En experimentos donde se han utilizado ratones Knockout pata MT I y II, los animales mostraron atrofia de axones largos mielinizados, esto debido a los efectos del estrés oxidativo en ausencia de la MT (Stankovic, 2005). Así mismo, después del aplastamiento del nervio ciático en ratones Knockout pata MT I y II se demostró que la regeneración axonal fue deficiente en comparación con animales cuya expresión de la MT no fue inhibida (Ceballos y cols., 2003).

En relación a estos resultados, Giralt y colaboradores (2002), observaron que el tratamiento con MT I y MT II es efectivo después de una lesión cerebral tanto en ratones Knockout como en animales sin inhibición de la proteína.

Cabe mencionar, que los estudios que se han hecho utilizando MT III como tratamiento en lesiones cerebrales, han mostrado que esta isoforma no tiene efecto significativo en relación a muerte celular y estrés oxidativo, por lo que los autores concluyen que la MT III tiene funciones diferentes a las isoformas de la MT I y II durante una lesión cerebral (Carrasco y cols., 2003)

Existen algunas propuestas que podrían explicar como es que la MT II puede incrementar la capacidad de los astrocitos para promover la regeneración neuronal, por ejemplo, sus funciones sobre la homeostasis de los metales esenciales, el almacenamiento y la destoxificación de los metales no esenciales, apoptosis y depuración de RL (West A.K y cols., 2008).

Es probable que la MT sea un mecanismo por el cual los astrocitos se defienden de elementos tóxicos, tales como los RL. En este modelo la MT y otras proteínas actúan primordialmente para permitir a los astrocitos reducir el ambiente nocivo alrededor de la lesión, de tal manera que, la probabilidad de supervivencia y

regeneración neuronal se incrementan (Chung y cols., 2004). Sin embargo, se ha demostrado que la función de las MT I y II, es más compleja que una simple participación con los astrocitos, por ejemplo, estas isoformas incrementan fuertemente la regeneración después de una lesión, al agregarse directamente a cultivos de neuronas dañadas. En estos experiemntos no hay glía ó células del sistema inmune presentes, mostrando así, que esta proteína puede actuar directamente en las neuronas dañadas, fuera del contexto de los astrocitos (Chung y cols., 2003).

Por otro lado las isoformas de la MT I y II son inmunomoduladores, siendo estas, factores antiinflamatorios que reducen significativamente la activación y reclutamiento cerebral de monocitos/macrófagos y linfocitos T, como se ha demostrado en diferentes condiciones neuropatologías. Las MT I y II pueden inhibir las células inflamatorias por interferencia directa con la superficie celular, alterando de este modo la adhesión y la interacción célula- célula; de hecho, estas isoformas se fijan específicamente a la membrana celular de macrófagos, células B y T, lo cual podría contribuir a la inhibición de la activación, proliferación e invasión de los leucocitos (Penkowa, 2006).

En el SNC también se han detectado efectos de las MTs sobre el crecimiento y la diferenciación de células (Carrasco y cols., 2000).

En cuanto a los resultados obtenidos de la determinación de las isoformas de la MT I, II y III por ECZ, según la técnica planteada por Beattie (1998), se observó que dichas isoformas presentaron concentraciones bajas, y al realizar la comparación entre el grupo control (animales con laminectomía sin lesión sacrificada después de 2h) y los grupos experimentales (animales con LTME sacrificados después de 2, 4, 12 y 24h) el análisis estadístico no fue significativo en ningún caso, prueba de Kruskal-Wallis.

Las bajas concentraciones detectadas de las isoformas inducibles podrían explicarse por el efecto antioxidante que posee la proteína, ya que, al reaccionar con los RL, particularmente el radical $OH^{\cdot}$, esta es consumida, dando como resultado niveles de detección bajos de la forma reducida. Además, el problema

que representa la alta oxidación de la molécula y el polimorfismo que puede presentarse *in vivo*, complican el esclarecimiento de las funciones específicas de las isoformas (Dabrio y cols., 2002).
Al respecto, se ha argumentado que el factor determinante del efecto antioxidante de la MT es la liberación de Zn de la MT (Thomas y cols., 1986). Se sabe que la presencia de Zn en la MT le confiere estabilidad y que bajo condiciones de estrés el Zn es liberado de la MT, por ejemplo, cuando los niveles de ON o RL incrementan, es decir, la liberación de Zn está condicionada a alteraciones en el ambiente intracelular (Kang, 2006).Cabe resaltar que la liberación de este metal lleva a la formación de la tioneína, nombre que hace referencia a la MT sin metales (Carrasco y cols., 2000)

La identificación, cuantificación y caracterización de las isoformas de la MT, constituyen una importante contribución para poder elucidar el papel específico de cada isoforma en el organismo, siendo la ECZ una herramienta muy poderosa de separación que puede ayudar a revelar la importancia de cada isoforma a nivel biológico (Minami y cols., 2002); sin embargo, es necesario proponer y desarrollar un método que ayude a optimizar la detección y cuantificación de las isoformas.

Con la finalidad de corroborar si los resultados representativos que se obtuvieron en este estudio son correctos es necesario realizar un estudio aumentando el número de animales de experimentación y variando las condiciones para el tratamiento de la muestra.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, así como lo reportado en la literatura, se le pueden conferir propiedades neuroprotectoras a la MT II, ya que es capaz de reducir el estrés oxidativo y la producción de citocinas proinflamatorias (Hidalgo y cols., 2000). Sin embargo, es necesario realizar estudios que ayuden a esclarecer su mecanismo de acción, no obstante, esta proteína representa una alternativa terapéutica para ayudar a reducir el daño después de una LTME.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos de la evaluación funcional de los animales es posible concluir que la MT II, posee un efecto de neuroprotección funcional parcial, ya que al hacer una comparación entre las medias de los tratamientos por la prueba de Dunnett, se encontró una diferencia significativa entre el grupo control y los grupos tratados con 10µg y 100µg de MT II ($p < 0.05$), no así al administrarse a una dosis de 3.2 µg.

Los resultados del ajuste con la ecuación de Hill, de los resultados promedio del ABC, durante ocho semanas de evaluación, de los animales tratados con diferentes dosis de MT (3.2, 1 0 y 100 µg), administradas a las 2 y 8 h después de la lesión, mostraron que los valores de Emax y K fueron 46.235 y 1.073 respectivamente.

Los resultados obtenidos del análisis de tejido preservado muestran que la MT II tiene un efecto neuroprotector, ya que al hacer una comparación entre las medias de los tratamientos utilizando una ANOVA seguida por la prueba de Dunnett, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los grupos tratados con 10µg y 100µg de MT II ($p < 0.05$), no así al administrarse a una dosis de 3.2 µg.

Se realizó una caracterización primaria de las isoformas de la MT I, MT II y MT III, así como la cuantificación de las mismas, en un modelo de LTME en la rata.

REFERENCIAS

Acarin L, González B, Hidalgo J, Castro AJ, Castellano B. Primary cortical glial reaction versus secondary thalamic glial response in the excitotoxically injured young brain: astroglial response and metallothionein expression. Neurosci. 1999; 92: 827-839.

Agrawal SK, Fehlings MG. Role of NMDA and Non-NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury. J Neurosci. 1997; 17: 1055-1063.

Apostolova M, Ivanova I, Cherian M. Metallothionein and apoptosis during differentiation of myoblasts to myotubes: Protection against free radical toxicity. Toxicol Appl. Pharmacol. 1999; 159: 175-184.

Aschner M. The functional significance of brain metallothionein. FASEB B. 1996, 10:1129-1136.

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

Barnés DJ, Bender BJ, Hernández GE, Infante VE. Alteraciones radiológicas en el lesionado medular. Rev Mex Neuroci. 2002; 3(5): 261.

Barranco RF, Blasco Morillo J. Principios de Urgencias, Emergencia y Cuidados Críticos. Editorial Alhulia. Sociedad Andaluza de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias. 1999.

Beattie JH. Strategies for the qualitative and quantitative analysis of metallothionein isoform by capillary electrophoresis. Talanta. 1998; 46:255-270

Benlloch M.J. A, Segura LLopis F, Soler Heredia A. Laguia Garzaran M. Tratamiento quirúrgico de las fracturas vertebrales mediante instrumentación segmentaria Cotrel-Dubousset. Revista Española de Cirugía Osteoarticular.*1993; 28: 77-8.*

Binz PA, Kägi JHR. Metallothionein: Molecular evolution and classification. Metallothionein IV. Birkhäuser Verlag, Basel. 1999; 7-13.

Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon J, Marshall LF, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VKH, Wagner FC; Wilberger JE, Winn HR. A randomized controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. N. Engl. J. Med. 1990; 322: 1405-1411

Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, NockelsRP, 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. 1997; 277: 1597-1604.

Carlson N.R. Fisiología de la conducta. Octava edición. Pearson. España. 2006.

Carpenter M. Neuroanatomía: fundamentos. Editorial médica panamericana. Buenos Aires. 1994.

Carrasco TJ, Hidalgo J. Regulación de las metalotioneínas durante el estrés y la inflamación, y su influencia durante la respuesta inflamatoria . Departamento de Biología Celular, Fisiología e inmunología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra.2000.

Carrasco J, Penkowa M, Giralt, Moss T, Hidalgo J. CNS wound healing is severely depressed in metallothionein- I and II- deficient mice. J.Neurosci. 1999; 19: 2535-2545.

Carrasco J, Penkowa M, Giralt M, Camats J, Lago N, Molinero A, Campbell I, Palmiter R, Hidalgo J. Role of Metallothionein-3 following Central Nervous System damage. Neurobiol Dis. 2003; 13:22-26.

Cassarino D, Bennett J. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: Mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurogeneration. Brain Res. Rev. 1999; 29: 1-25.

Castagnino J.M. Bioquímica y fisicoquímica. Electroforesis capilar. Reimpresión Acta Bioquim Clin L. 1999; 33(3): 297-329.

Ceballos D, Lago N, Verdú E, Penkowa M, Carrasco J, Navarro X, Palmiter RD, Hidalgo J. Role of metallothioneins in peripheral nerve function and regeneration. Cell Mol Life Sci. 2003; 60(6):1209-16.

Chinnock P, Roberts I, Gangliosides for acute spinal cord injury, Cochrane Database. 2008; 4.

Chung R, Adlard PA, Dittman J, Vickers JC, Chuah MI, West AK. Neuron-glia communication: metallothionein expression is specifically up-regulated by astrocytes in response to neuronal injury. J Neurochem 2004; 88: 454-461.

Chung R, Vickers J, Chuah M, West A. Metallothionein – IIA promotes initial neurite elongation and postinjury reactive neurite growth and facilitates healing after focal cortical brain injury. J Neurosci. 2003; 23: 3336- 3342.

Chusid JG. Neuroanatomía correlativa y neurología funcional. México. 1987.

Dabrio M, Rodríguez A, Bordin G, Bebianno M, De Ley M, Sestáková I, Vasák M, Nordberg M. Recent developments in quantification methods for metallothionein. Journal of Inorganic Biochemistry. 2002; 88: 123-134.

Harris DC. Análisis químico cuantitativo. Reverté. 3ra edición. 2003; 654-657.

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

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 dapsone protects from tissue damage and improves recovery after spinal cord injury. J Neurosci Res. 2011; 89(3):373-80.

Diaz-Ruiz A, Salgado-Ceballos H, Montes S, Maldonado V, Tristan L, Alcaraz-Zubeldia M, Ríos C. Acute alterations of glutamate, glutamine, GABA, and other amino acids after spinal cord contusion in rats. Neurochem Res. 2007; 32: 57-63.

Diaz-Ruiz A, Alcaraz-Zubeldia M, Maldonado V, Salgado-Ceballos H, Mendez-Armenta M, Rios C. Differential time-course of the increase of antioxidant thiol-defenses in the acute phase after spinal cord injury in rats. Neurosci Lett. 2009 452(1):56-9.

Edward C, Benzel. Spinal Cord Injury (SCI): Aftermath and Diagnosis. Cleveland Clinic Spine Institute. 2009.

Escarabajal A, López G, Portavella G, Vargas P. Fundamentos de Psicobiología. Libro de práctica I. Las Rozas (Madrid), España. Delta. 2005.

García L, López M. J, Sánchez C. M. Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. Servicio de Medicina Intensiva. Revisión. Madrid. 2000.

Gasull T, Giralt M, García A, Hidalgo J. Regulation of metallothionein-I+IIlevels in specific brain areasand liver in the rat: role of catecholamines. Glia 1994;12:135-143.

Giralt M, Penkowa M, Lago N, Molinero A, Hidalgo J. Metallothionein 1+2 protect the CNS after a focal brain injury. Experimental Neurology. 2002. 173:114-128.

Guyton AC. Anatomía y fisiología del sistema nervioso. Neurociencia Básica. Segunda edición. Editorial médica panamericana. Buenos Aires. 1999.

Hidalgo J, Penkowa M. Metallothionein Treatment Reduces Proinflammatory Cytokines IL-6 and TNF-α and apoptotic death during experimental autoinmune encephalomyelitis (EAE). Exp Neuro 2001; 170: 1-14.

Hill P. What is neuroprotection. Medical News Today. 2006. http://www.medicalnewstoday.com

Holland L, Chetwyn N, Perkins M, Lunte S. Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis.Pharmaceutical Research. 1997;14(4):372-387.

Hulsebosch CE. Recent advances in patophysiology and treatment of spinal cord injury. Adv. Physiol. Educ. 2002; 26: 238-255.

Hurlbert RJ, Hamilton MG. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: 5-year practice reversal. Can J Neurol Sci. 2008; 35: 41-45.

Jandik P, Bonn G. Capillary Electrophoresis of small molecules and ions. VCH Publishers, Inc. NY. 1993.

Jones D. Pharmaceutical Statistics. Pharmaceutical Press: London. 2005; 210-212, 215-341.

Jouyban A, Batish A, Rumbelowb SJ, Clarka SJ,. Calculation of the electrophoretic mobility of amines in metanol-aqueous electrolyte systems. Analyst. 2001; 126: 1958-1962.

Kang YJ. Metallothionein redox cycle and function. Exp. Biol. Med. 2006; 231:1459-1467.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Principios de neurociencias. McGrawHill.Cuarta edición. 2000; 19-28, 105-123,317-322,713-735.

Kiningham K, Xuguang B, Kassarski E. Neuronal localization of metallothioneins in rat and human spinal Cord. Neurochemestry. 1995; 27: 105-109.

Koester J, Siegelbaum SA, Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Poencial de membrana. Principios de neurociencias. McGrawHill.Cuarta edición. 2000; 125-138.

Kolb B, Wishaw IQ. Fundamentals of Human Neuropsychology. Freeman.3rd Ed. New York. 1990.

Kuhn R, Hoffstetter KS, 1993. Capillary Electrophoresis: Principles and Practice, Ed. Springer-Verlag, Berlin, Ch. 3, p. I(X), 375 pp.

Kwon BK y Wolfram T. Spinal Cord Regeneration. SPINE. 2001; 26(24):13-22.

Li S, Jiang Q, Stys PK. Important role of reverse Na+-Ca2+ exchange in spinal cord white matter injury at physiological temperature. Journal of Neurophysiology.2000; 84(2): 1116-1119.

Liu K, Wang Z, Wang H and Zhang Y. Nestin expression and proliferation of ependymal cells in adult rat spinal cord after injury. Chin Med J. 2002; 115 (3): 339-41.

Matute C, Alberdi E, Domercq M, Sánchez-Gómez MV, Pérez-Samartín A, Rodríguez-Antigüedad A, Pérez-Cerdá F. Excitotoxic damage to white matter. Journal of Anatomy. 2006; 210(6): 693-702.

McMurry J. Perspetiva de las reacciones orgánicas. Química Orgánica. Thomson. 6ta ed. 2004; 137-138.

Minami T, Ichida S, Kubo K. Study of metallothionein using capillary zone electrophoresis. Journal of Chromatography. 2002:781:303-311.

Mocchetti I, Wrathall JR. Neurotrophic factors in central nervous system trauma. J Neurotrauma 1995; 12: 853-70.

National Institutes of Health, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Department of Health and Human Services. 2005; 160 (05): 1-58.

NSCIA, National Spinal Cord Injury Association. Spinal cord injury treatment and cure research. 2007. http://www.spinalcord.org

Penkowa M, Hidalgo J. Metallothionein I+II (MT I+II) espression and their role on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Glia. 2000; 32: 247-263.

Penkowa M, Metallothioneins are multipurpose neuroprotectans during brain pathology. FEBS Journal. 2006; 273: 1857-1870.

Piani D, Fontana A. Involvement of the cystine transport system in the macrophage induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. J. Irnmunol. 1994; 152: 3578-3585.

Profyris C, Cheema SS, Zang DW, Azari M.F, Boyle K, Petrastos S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. Neurobio Dise.2004; 15: 415-436.

Ray SK, Hogan EL, Banik NL. Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. Brain Res. Rev. 2003; 42: 169-185.

Regan C. Neuronal and glial markers of the central nervous system. Cell Mol Life Scien. 1988; 44(8): 695-697.

Riordan J.F, Vallee B.L. Metallobiochesmistry. Metallothionein and related molecules. Academic Press, INC. 1991: 205.

Rowland LP, Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Enfermedades de la unidad motora. Principios de neurociencias. McGrawHill.Cuarta edición. 2000; 19-28, 703-705.

Samson SL, Gedamu L. Molecular analyses of metallothionein gene regulation. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 1998; 59: 257-288.

Sandino M, Carreón A, Parra M, Ibarra P. Spinal cord injury and regenerative medicine. Salud Pública de Mexico. 2007; 49:437-444.

Skoog DA, West DM, Holler F, Crouch SR. Química analítica. Séptima edición. McGraw Hill. México.2001.

Snell R.S. Neuroanatomía clínica. . Editorial médica panamericana. Buenos Aires.2003.

Shunsuke N, Takumi K, Akihiro N, Kanenobu K, Takeshi M, Hiromu Sakurai. Implication of the differential roles of metallothionein 1 and 2 isoforms in the liver of rats as determined by polyacrylamide-coated capillary zone electrophoresis. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2004; 320: 1193–1198.

Siegelbaum SA, Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Interacciones elementales entre neuronas: transmisión sináptica. Principios de neurociencias. McGrawHill.Cuarta edición. 2000; 175-185.

Stankovic R.K. Atrophy of Large Myelinated Axons in Metallothionein-I, II Knockout Mice. Cell Mol Neuro . 2005; 25(5): 943-953.

Thomas JP, Bachowski GJ, Girotti AW. Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium- and zinc-metallothioneins. Biochim Biophys Acta. 1986; 884(3):448-461.

Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. Neuron. 1991; 7: 337-347.

van Lookeren C, Thibodeaux H, van Bruggen N, Cairns B, Gerlai R, Palmer JT, Williams SP, Lowe DG. Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci. 1999; 96: 12870-12875.

Vasák M, Kägi JHR. Metallothionein. In King, R.B. (ed.) Encyclopedia of Inorganic Chemistry. J. Wiley & Sons Ltd., New York. 1994; 2229-2241.

Vela JM, Hidalgo J, González B, Castellano B. Induction of metallothionein in astrocytes and microglia in the spinal cord from the myelin-deficient jimpy mouse. Brain Res.1997;767:345-355.

West AK, Hidalgo J, Eddins D, Levin E D, Aschner M. Metallothionein in the central nervous system: roles in protection, regeneration and cognition Neurotoxicology. 2008 ; 29(3): 488–502.

Young JK, Garvey JS,Huang PC. Glial immunoreactivity for metallothionein in the rat brain. Glia. 1991;4:602-610.

ANEXOS

40TH ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE.

SAN DIEGO, CALIFORNIA, USA. 2010.

Control/Tracking Number: 2010-S-15711-SfN **Activity:** Scientific Abstract

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF METALLOTHIONEIN II AFTER SPINAL CORD INJURY IN RATS.

AUTHOR BLOCK: S. ARELLANO-RUIZ1, *A. DIAZ-RUIZ2, H. SALGADO-CEBALLOS3, M. MENDEZ-ARMENTA2, M. ALTAGRACIA1, J. KRAVZOV1, K. JIMENEZ-GARCIA1, C. RIOS2; 1Univ. Autonoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico City, Mexico; 2Neurochemistry, Natl. Inst. of Neurol Mexico, Mexico, Mexico; 3UIMEN-CMN Siglo XXI, Inst. Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico.

Abstract: After spinal cord injury (SCI), a complex cascade of pathophysiologic processes damages the nervous tissue rapidly. The initial damage spreads to the surrounding tissue by different mechanisms, including excitotoxicity, increased intracellular calcium, and exacerbated inflammatory response, leading to a raised production of free radicals and subsequent oxidative stress. We have recently reported an induction of metallothionein (MT) protein as an endogenous rapid-response mechanism after spinal cord injury. MT is a low-molecular-weight, cystein-rich peptide able to scavenge free radicals. The participation of MT in neuroprotective processes after SCI is unknown. The aim of the present study was to evaluate the possible neuroprotective effect of exogenously administered MT-II during the acute phase after SCI in rats. Female Wistar rats weighing 200-250g were submitted to spinal cord contusion, by means of a computer-controlled device (NYU impactor). Rats received MT-II treatment at different i.p. doses (3.2, 10 and 100 μg/Kg of weight), 2 and 8h after SCI. Control group rats received saline solution 2 and 8 h after SCI. Motor recovery of the animals was assessed using the BBB scale, every week for 5 weeks. At the end of the study, spinal cord tissue was processes for histological evaluation of spared tissue, using morphometric analysis. Results of the BBB scale were statistically analyzed using the repeated-measures ANOVA, followed by the Tukey's test. MT-II. From the three doses tested, only 10 and 100 μg/Kg were able to significantly increase ($p<0.04$) BBB scale scores, from a mean of 2.5 of the control group at week five, to means of 6.4 and 6.6 for the 10 and 100 μg/Kg of MT-II, respectively. Spared tissue was also higher in the groups treated with 10 and 100 μg/Kg, as compared to the control group values. Results from the present study demonstrate a significant neuroprotective effect of exogenously administered MT-II. Further studies are needed in order to characterize the mechanisms involved in this neuroprotective action.

SOCIETY FOR NEUROSCIENCE

Society for Neuroscience
Neuroscience 2010
November 13-17, 2010
San Diego, CA

Please let this serve to certify that

Susana Arellano Ruiz,

has attended Neuroscience 2010, the 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience at the San Diego Convention Center in San Diego, California.

The Society for Neuroscience (SfN) is a nonprofit membership organization of basic scientists and physicians who study the brain and nervous system. The Society's primary goal is to promote the exchange of information among researchers. For this purpose, SfN holds a prestigious annual meeting, attended by scientists and researchers from around the globe. It is considered the most important annual forum for the neuroscience research community, offering attendees the opportunity to learn about the latest advances in brain research and to meet and network with their colleagues at top destinations throughout the United States.

Staff Signature:

Date: Monday, November 15, 2010

Liz Rumsey
Assistant Director of Annual Meeting Program
Society for Neuroscience

1121 14th Street, NW ■ Suite 1010 ■ Washington, DC 20005 ■ Telephone: (202) 962-4000 ■ www.sfn.org

EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA METALOTIONEÍNA II, ADMINISTRADA A DIFERENTES DOSIS, SOBRE LA RECUPERACIÓN MOTORA EN UN MODELO DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL EN RATA.

SUSANA ARELLANO RUIZ[1], ARACELI DIAZ RUIZ[1], MARISELA MENDEZ ARMENTA[2], HERMELINDA SALGADO CEBALLOS[3], KARLA CRISTINA JIMÉNEZ GARCÍA[1], CAMILO RÍOS[1].

[1]Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurologia y Neurocirugia Manuel Velasco Suarez S.S.A México. [2]Laboratorio de Neuropatología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez S.S.A México. [3]Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI México.

Introducción: Después de una lesión traumática de la médula espinal (LTME) el daño se incrementa por la acción de una serie de mecanismos autodestructivos. Para inhibir o disminuir estos fenómenos, se han utilizado diversos tratamiento neuroprotectores sin embargo su eficacia no ha sido satisfactoria. Por tal motivo se siguen desarrollando otras estrategias neuroprotectoras a nivel experimental y clínico. En este trabajo proponemos el uso de la metalotioneína (MT) una proteína antioxidante con capacidad para atrapar radicales hidroxilo y superóxido, como tratamiento neuroprotector después de una LTME. **Objetivo:**Evaluar el efecto neuroprotector de Metalotioneína II administrada a diferentes dosis en un modelo de LTME en ratas. **Material y métodos:** Se utilizaron ratas Wistar, hembras de 200 a 250gr sometidas a LTME, posteriormente los animales fueron divididos en cuatro grupos y se les administraron 3 diferentes dosis de MT (3.2,10.0 y 100.0μg) por vía i.p. a las 2 y 8 horas después de la lesión de acuerdo a los niveles mínimos presentes en el sitio del daño. Se estableció la curva dosis-respuesta a partir de la evaluación de la recuperación motora utilizando la escala motora BBB que evalúa la calidad de la marcha. **Resultados:**Los resultados demostraron una mayor recuperación funcional en todos los animales que recibieron tratamiento con MT a diferentes dosis al ser comparados con el grupo control (lesionado sin tratamiento). **Discusión:**De acuerdo con los resultados obtenidos podemos observar que la MT-II es un tratamiento neuroprotector parcial por que la recuperación motora de los animales no es satisfactoria. Este efecto se ve muy claro cuando los valores de recuperación funcional fueron comparados con los de dapsona (fármaco neuroprotector con mejores resultados), por lo que una opción sería combinar ambos tratamientos. **Conclusiones**: La MT es una terapia neuroprotectora que no genera efectos adversos y podría ser útil en combinación con otros tratamientos.

Área: Investigación Básica

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

Otorga la presente

CONSTANCIA

A:

Susana Arellano Ruiz, Araceli Díaz Ruiz, Marisela Mendez Armenta, Hermelinda Salgado Ceballos, Karla Cristina Jiménez García, Camilo Ríos.

Por su participación en la XXV Reunión Anual de Investigación, llevada a cabo en la ciudad de México durante los días 20 y 21 de mayo de 2010, con el trabajo titulado:

EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA METALOTIONEÍNA II, ADMINISTRADA A DIFERENTES DOSIS, SOBRE LA RECUPERACIÓN MOTORA EN UN MODELO DE LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL EN RATA

México D.F., a 21 de mayo de 2010.

DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN

S.E. MARTHA EVELIA LEGORRETA HERNÁNDEZ
COORDINADORA GENERAL

Tabla en la que se muestran los resultados de la recuperación funcional evaluada con la escala de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) durante ocho semanas, de animales sometidos a una lesión traumática de la medula espinal (LTME) y tratados con diferentes dosis de MT (3.2, 1 0 y 100 μg) administradas a las 2 y 8 h después de la lesión (dos dosis para cada rata). LTME: Lesión traumática de la médula espinal más 500 μl de solución salina; LTME MT 3.2μg ó 10μg ó 100μg: Animales tratados con Metalotioneína (MT) a diferentes dosis de 3.2μg, 10μg y 100μg respectivamente.

Promedios	**D 1**	**S 1**	**S 2**	**S 3**	**S 4**	**S 5**	**S 6**	**S 7**	**S 8**
LTME	0	0.27	0.61	1.61	2.16	3.11	4.5	6.38	7.88
LTME/MT 3.2	0	1	2.27	3.66	4.44	4.83	6.16	7.5	9.94
LTME/MT 10	0	0.75	3	4.75	5.87	7.37	9.12	10.5	12.62
LTME/MT 100	0	1.16	2.83	4.72	6.11	7.44	8.77	9.72	10.88
E.E.	**D 1**	**S 1**	**S 2**	**S 3**	**S 4**	**S 5**	**S 6**	**S 7**	**S 8**
LTME	0	0.12	0.21	0.23	0.40	0.67	0.88	1.03	1.28
LTME/MT 3.3	0	0.18	0.37	0.53	0.59	0.68	0.89	1.04	1.47
LTME/MT 10	0	0.21	0.46	0.70	0.82	1.12	1.4	1.6	2.07
LTME/MT 100	0	0.40	0.66	0.79	0.9	1.08	1.6	1.84	1.94

Tabla en la que se muestran los resultados promedio del ABC, durante ocho semanas de evaluación, de los animales tratados con diferentes dosis de MT (3.2, 1 0 y 100 μg), administradas a las 2 y 8 h después de la lesión.

Dosis	Log Dosis	ABC	EE
LTME/Vehículo	0	22.611	3.752
LTME/MT 3.2	0.5	34.861	4.536
LTME/MT 10.0	1	47.687	7.528
LTME/MT 100.0	2	46.222	8.032

Tabla en la que se muestran los resultados del ajuste con la ecuación de Hill, de los resultados promedio del ABC, durante ocho semanas de evaluación, de los animales tratados con diferentes dosis de MT (3.2, 1 0 y 100 μg), administradas a las 2 y 8 h después de la lesión.

Parámetro	Estimación	EE	Intervalo de Confianza 95%	
K	1.073	1.109	-1.222	3.367
Emax	46.235	7.533	30.651	61.819

Tabla en la que se muestran los valores promedios de 8 a 9 animales por grupo de la cuantificación de tejido preservado: LTME-vehículo 5.32 ± 0.32mm^2; LTME- MT 3.2µg 6.02 ± 0.19mm^2; LTME- MT 10µg 6.62 ± 0.21mm^2; LTME- MT 100µg 6.29 ± 0.31mm^2.

	MEDIA	EE	N
LTME	5.3211	.31621	9
LTME/MT3.2	6.0278	.19569	9
LTME/MT10	6.6225	.21821	8
LTME/MT100	6.2975	.31317	9
Total	6.0441	.15226	34

Tabla donde se muestran los datos de la linealidad promedio utilizando el estándar de la MT I, λ= 234nm.

[MT I] (µg/mL)	AUC (1)	AUC (2)	AUC (3)	AUC (Promedio)
0	0	0	0	0
100	2220	2241	2234	2232
500	11160	11187	11139	11162
1000	22312	22370	22398	22360
1500	33480	33356	33542	33459

r	r^2	m	b
0.99999878	0.99999755	22.3177	5.5743

Tabla donde se muestran los datos de la linealidad promedio utilizando el estándar de la MT II, λ= 234nm.

[MT II] (μg/mL)	AUC (1)	AUC (2)	AUC (3)	AUC (Promedio)
0	0	0	0	0
100	1921	1943	1937	1934
500	9695	9621	9703	9673
1000	19210	19132	19453	19265
1500	28815	28511	28376	28567

r	r^2	m	b
0.98426087	0.96876947	19.0763	60.4723

Tabla donde se muestran los datos de la linealidad promedio utilizando el estándar de la MT III, λ= 234nm.

[MT III] (μg/mL)	AUC (1)	AUC (2)	AUC (3)	AUC (Promedio)
0	0	0	0	0
100	2618	2587	2633	2613
500	13090	13132	13204	13142
1000	26176	26056	26212	26148
1500	39294	39265	39243	39267

r	r^2	m	b
0.99999838	0.99999675	26.1684	9.5995