



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



CASA ABIERTA AL TIEMPO

**“EFECTO DE LA INHIBICIÓN METABÓLICA SOBRE LA
LESIÓN TRAUMÁTICA DE LA MÉDULA ESPINAL”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA
M. en B. E. SERGIO TORRES CASTILLO

CODIRECTORES
DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS
DR. CAMILO RÍOS CASTAÑEDA

ASESOR
DR. GABRIEL GUÍZAR SAHAGÚN

MÉXICO, D. F.

31 DE ENERO 2011



“El doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

El jurado designado por la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas de la

UAM

(Unidad Iztapalapa)

aprobó la Tesis que presentó

SERGIO TORRES CASTILLO

El día 31 de Enero de 2011.

Sinodales:

Dr. Ramón González Camarena (Presidente) _____

Dra. Hermelinda Salgado Ceballos (Secretario) _____

Dr. Gabriel Guízar Sahagún (Vocal) _____

Dra. Sandra Orozco Suárez (Vocal) _____

Dr. Camilo Ríos Castañeda (Vocal) _____

COMITÉ TUTORIAL

CODIRECTORES

DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS

Investigador Titular A. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades
Neurológicas. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

DR. LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA

Profesor titular C Universidad Autónoma Metropolitana

ASESOR

DR. GABRIEL GUÍZAR SAHAGÚN

Investigador Titular B. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades
Neurológicas. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

SINODALES

DRA. SANDRA OROZCO SUÁREZ

Investigador Titular A. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades
Neurológicas. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

DR. RAMÓN GONZÁLEZ CAMARENA

Profesor titular C Universidad Autónoma Metropolitana

El presente trabajo se realizó en:

La Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

La Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades en CMN SXXI.

En el Centro de Investigación Proyecto Camina A. C.

En el Laboratorio de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

Dedicatorias

A Alejandra por darme clases de constancia y dedicación, por recordarme que las cosas deben hacerse con amor y responsabilidad.

A Flor por ser esa chispa que necesita mi vida para seguir funcionando, porque con ella encuentro paz y amor.

A mi esposa por todo su amor y apoyo incondicional.

A mi padre, por darme lecciones de vida todo el tiempo, por ser mi patrón a seguir.

A mi madre, por darme la oportunidad de ser, por su comprensión, pero sobre todo por su inmenso amor.

A toda mi familia por estar conmigo siempre.

A ti por todo el apoyo que siempre me brindas

Agradecimientos

Mi agradecimiento y retribución al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la beca, número 153029

A todos aquellos que forman parte de la UIMEN y de Proyecto Camina A. C. ya que sin su respaldo, este proyecto no habría sido posible.

Un agradecimiento infinito a todos aquellos que de alguna u otra forma participaron en el desarrollo del proyecto, en especial al Dr. Ramón González Camarena, a la Dra. Sandra Orozco Suárez y al Dr. Camilo Ríos Castañeda.

Un agradecimiento especial al Dr. Gabriel Guízar Sahagún por todo el apoyo y conocimiento brindado, gracias.

Un agradecimiento especial al Dr. Rubén Román Ramos y a la Dra. Reyna Fierro Pastrana quienes en los últimos tiempos se han hecho indispensables en la culminación del proyecto, muchas gracias por todo su apoyo.

Todo mi agradecimiento, cariño y respeto a la Dra. Hermelinda Salgado Ceballos, por todas sus enseñanzas, por su apoyo, por su amistad y cariño.

A DIOS por permitirme un sueño más

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. La lesión traumática de médula espinal (LTME) afecta principalmente a la población económicamente activa, pone en riesgo la vida de los pacientes en estado agudo y produce secuelas discapacitantes en los que sobreviven, de manera que aquellos con una LTME completa quedaran confinados a una silla de ruedas de por vida y aquellos con LTME incompleta permanecerán con diversos grados de déficit funcional. La discapacidad referida es el resultado tanto del nivel de lesión como de la severidad del trauma físico inicial, además de los mecanismos secundarios de lesión desencadenados a raíz de la lesión inicial incluyendo la excitotoxicidad, la isquemia, el daño mitocondrial, la alteración en el metabolismo energético y el estrés oxidativo. No obstante lo anterior, se ha demostrado experimentalmente que diversos organismos alteran su metabolismo como mecanismo de protección o defensa ante algún fenómeno desconocido o dañino, mediante el cual disminuyen la demanda energética y estabilizan al sistema. Más aun, se ha demostrado que el reactivar el metabolismo aeróbico en la fase aguda incrementa el daño tisular y reduce la función motora, por lo que se consideró, que la inhibición del metabolismo aeróbico posterior a una LTME podría actuar como un mecanismo de protección y no de daño. **OBJETIVO.** Determinar el efecto sobre el estrés oxidativo, la actividad enzimática y la recuperación funcional de los animales incluidos en el estudio al inhibir el metabolismo aeróbico mitocondrial en la fase aguda de la LTME. **MATERIAL Y MÉTODO.** Se emplearon ratas hembras y adultas divididas en 5 grupos: Grupo 1: Sin LTME y sin tratamiento; Grupo 2: LTME sin tratamiento; Grupo 3: LTME + rotenona; Grupo 4: LTME + azida de sodio y Grupo 5: LTME + Cocarboxilasa no

degradable (CND). La LTME se produjo usando el estereotáxico New York Impactor y 24 horas después, se evaluó por métodos espectrofotométricos, la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa (LDH) y de la creatinina kinasa (CK), así como el proceso de Peroxidación Lipídica (PL). La evaluación de la función motora de los miembros posteriores se llevó a cabo semanalmente empleando la escala Basso-Beattie-Breshnahan (BBB) durante 2 meses, al termino de los cuales se realizaron las pruebas histológico-morfométricas.

RESULTADOS. Se observo una disminución significativa en el proceso de PL en el grupo 4 con respecto al grupo 2 ($p < 0.05$) y un incremento en la actividad de CK y LDH en el grupo 4 comparado con el grupo 1 ($p < 0.05$), mientras que la recuperación de la función motora en el grupo 4 mostró diferencia significativa cuando se comparó con los grupos 2 y 3 ($p < 0.05$). Respecto a la cantidad de tejido preservado, no se observó diferencia significativa entre los grupos estudiados. **CONCLUSIÓN.** El inhibir el metabolismo aeróbico mitocondrial en la fase aguda de la LTME en un modelo en ratas, disminuye la PL y favorece la recuperación funcional motora en forma significativa, por lo que este mecanismo secundario podría ser más un mecanismo secundario de protección que de daño.

Palabras clave: Lesión de médula espinal, metabolismo, peroxidación lipídica.

SUMMARY

INTRODUCTION. The traumatic spinal cord injury (TSCI) affects the economically active population mainly, puts in risk the life of the patients in acute state and produces sequels disability in those that survive, with a complete TSCI were confined to a seat of wheels for life and with incomplete TSCI remain with diverse degrees of functional deficit. The disability is the result of the lesion level and of the severity of the initial physical trauma, as of the secondary mechanisms of injury including the excitotoxicity, ischemia, mitochondrial damage, alteration in energy metabolism and oxidative stress. Nevertheless the above-mentioned, it has been demonstrated experimentally that diverse organisms alter their metabolism like mechanism of protection or defense in the face of some unknown or harmful phenomenon, by means of which they diminish the energy demand and stabilize the system. More over, it had been demonstrated that the reactivation of the aerobic metabolism during the acute phase of the TSCI could damage more the nervous tissue and diminish the functional recovery, that is why we considered that the inhibition of the aerobic metabolism after a TSCI could act as protective instead a deleterious mechanism. **OBJECTIVE.** To determine the effect on the oxidative stress, enzymatic activity and functional recovery of animals after inhibiting the mitochondrial aerobic metabolism in the acute phase of TSCI. **MATERIAL AND METHOD.** Female adult rats were used divided in 5 groups: Group 1: Without TSCI and without treatment; Group 2: TSCI without treatment; Group 3: TSCI + rotenone; Group 4: TSCI + sodium azida and Group 5: TSCI + Cocarboxilasa no degradable (CND). The TSCI was produced using the estereotaxic New York Impactor and 24 hours later, the enzymatic activity of the deshidrogenasa lactate

(DHL) and of the creatinin kinase (CK), as well as the process of lipidic Peroxidation (LP) were evaluated by espectrofotometrics methods. Motor function evaluation at the hind limbs was carried out once a week using the Basso-Beattie-Breshnahan (BBB) scale during 2 months. Then, the histological-morphometric studies, were carried out. **RESULTS.** A significant decrease in the LP process was observed groups 4 and 2 ($p<0.05$) and an increase in the CK and DHL activity between groups 4 and 1 ($p<0.05$), while function recovery in the group 4 showed a significant difference comparing with groups 2 and 3 ($p<0.05$). Regarding the quantity of preserved tissue, there were not significant difference among groups. **CONCLUSION.** Inhibition of aerobic mitochondrial metabolism in the acute phase of the TSCI in rats, decreases the LP and increases the functional recovery in a significative way. So, this process could be more a protective instead a deleterious mechanism.

Keywords: Spinal cord injury, metabolism, lipid peroxidation.

ÍNDICE	
1. INTRODUCCIÓN	01
2. ANTECEDENTES	02
2.1 Lesión traumática de médula espinal (LTME)	02
2.1.1 Epidemiología de la LTME	02
2.1.2 Fisiopatología de la LTME	04
2.1.3 Tratamiento de la LTME	08
2.2 La Cocarboxilasa no degradable como activador del metabolismo	09
2.3 Inhibición metabólica mitocondrial	12
2.3.1 Actividad mitocondrial	14
2.3.2 Inhibidores de la cadena respiratoria	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
4. JUSTIFICACIÓN	21
5. HIPÓTESIS	22
6. OBJETIVO GENERAL	23
7. OBJETIVOS METODOLÓGICOS	23
8. OBJETIVOS PARTICULARES	23
9. MATERIALES Y MÉTODOS	25
9.1 Tipo de estudio	25
9.2 Población de estudio	25
9.3 Criterios	25
9.4 Variables	26
9.5 Diseño experimental	27

9.6 Técnica anestésica	28
9.7 Lesión traumática de la médula espinal	28
9.8 Administración de los inhibidores mitocondriales	28
9.9 Obtención de la muestra	29
9.10 Determinación de la actividad enzimática de NADH-DH, S-DH y C-OX	30
9.11 Determinación de la actividad enzimática de CPK	30
9.12 Determinación de la actividad enzimática de LDH	31
9.13 Evaluación de la peroxidación lipídica	33
9.14 Evaluación funcional	34
9.15 Evaluación histológico-morfométrica	37
9.16 Aspectos éticos	40
10. RESULTADOS	41
10.1 Experimentos preliminares	41
10.1.1 Inhibidores metabólicos	41
10.1.2 Actividad de NADH-DH evaluada una hora después de la LTME	42
10.1.3 Actividad de NADH-DH evaluada 24 horas después de la LTME	43
10.1.4 Actividad de S-DH evaluada una hora después de la LTME	44
10.1.5 Actividad de S-DH evaluada 24 horas después de la LTME	45
10.1.6 Actividad de C-OX evaluada una hora después de la LTME	46
10.1.7 Actividad de C-OX evaluada 24 horas después de la LTME	47
10.1.8 Evaluación del proceso de PL una hora después de la LTME	48
10.1.9 Evaluación del proceso de PL 24 horas después de la LTME	49

10.2 Experimentos finales	50
10.2.1 Inhibición y activación metabólica	50
10.2.2 Peroxidación Lipídica	51
10.2.3 Actividad de la enzima CPK	52
10.2.4 Actividad de la enzima LDH	53
10.2.5 Evaluación funcional	54
10.2.6 Evaluación histológico-morfométrica	55
10.2.7 Temperatura rectal	57
11.DISCUSIÓN	58
12.CONCLUSIONES	63
13.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUCCIÓN

La lesión traumática de médula espinal (LTME) es un problema de salud pública que pone en riesgo la vida de los pacientes en fase aguda, y puede producir incapacidad a largo plazo con pérdida permanente del control voluntario en la locomoción y del soporte corporal de las extremidades, además de generar una gran variedad de disfunciones sensitivas y autonómicas con repercusiones, personales, familiares y sociales (Whiteneck y Cols, 1992; Dituno y Formal, 1994; Fehlings, 2001).

La fisiopatología de la LTME, por ser un fenómeno complejo, se ha dividido en daño mecánico primario y mecanismos secundarios de lesión, siendo estos últimos los que provocan la mayor parte de la destrucción del substrato anatómico necesario para la adecuada función neurológica, y por lo tanto son responsables del déficit funcional que se presenta en este tipo de pacientes (Young y Flamm, 1982; Stokes y Cols, 1983; Iizuka y Cols, 1986; Fehlings, 2001; McDonald y Sadowsky, 2002).

Entre los mecanismos secundarios de lesión, se considera a la isquemia-reperfusión como uno de los más relevantes, ya que afecta directamente el metabolismo anaeróbico, generando un medio ácido y una precaria formación de adenosin trifosfato (ATP); además de incrementar el daño en la médula espinal (ME) por el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) lo que desencadena numerosos procesos autodestructivos, responsables del déficit

funcional permanente (Tator y Fehlings, 1991; Lu y Cols, 2000; Fehlings, 2001; McDonald y Sadowsky, 2002). En diversos estudios se ha demostrado que algunos organismos bajo condiciones adversas pueden cambiar su metabolismo del estado aeróbico al anaeróbico como un mecanismo de protección mediante el cual disminuye la demanda energética y se estabilizan diferentes sistemas (Hochachka, 1986; Andrew y Cols, 1998). Más aún, el intentar restablecer el metabolismo aeróbico en la fase aguda de la LTME produce efectos adversos ya que incrementa el daño tisular y altera la función motora (Torres, 2000). Por lo anterior en el presente trabajo se plantea conocer el efecto protector de la inhibición del metabolismo aeróbico mitocondrial en ratas con LTME.

2. ANTECEDENTES

2.1 Lesión traumática de médula espinal

En la LTME, el daño ocasionado a la ME, provoca alteraciones estructurales y funcionales tales como, el bloqueo transitorio de la conducción de los impulsos nerviosos, la pérdida total de la función motora, sensitiva y autonómica por debajo del sitio de lesión, traduciéndose en paraplejia si solo afecta miembros inferiores o en tetraplejia si afecta miembros inferiores y superiores (Tator y Fehlings, 1991; Lee y Mittelstaedt, 2004).

2.1.1 Epidemiología de la LTME

La LTME presenta una incidencia anual que oscila entre 15 y 40 casos por millón (Baptiste y Fehlings, 2007; Rowland y Cols, 2008). El reporte para México,

específicamente para el Distrito Federal, es de 18.6 casos por millón por año (Pardini, 1998). Aproximadamente, el 80% de las personas con LTME son del sexo masculino (Bracken y Cols, 1992; Fehlings, 2001) y al momento de sufrir la lesión alrededor del 75% se encuentra entre los 15 y los 35 años de edad (Tator y Fehlings, 1991; Fehlings, 2001; Dobkin y Havton, 2004; Ho y Cols, 2007).

Entre las principales causas de esta patología destacan los accidentes de tránsito en vehículos motorizados, los accidentes en la práctica deportiva, los accidentes en el trabajo y en actividades de recreación, la violencia y las caídas (Tator y Fehlings, 1991; Tator, 1995; Fehlings, 2001; McDonald y Sadowsky, 2002; Dobkin y Havton, 2004; Ho y Cols, 2007; Rowland y Cols, 2008; Bauchet y Cols, 2009).

A pesar de los avances en los cuidados médicos e incluso en los centros de atención especializados, la mortalidad en individuos con LTME se reporta entre 6 y 17% (DeVivo y Cols, 1990; Burney y Cols, 1993; Ho y Cols, 2007), mientras que la frecuencia del suicidio entre los pacientes con LTME se incrementa de manera significativa y depende del nivel de lesión, de la intensidad y de la edad de la persona que la padece (Rish y Cols, 1997; Soden y Cols, 2000; Ho y Cols, 2007).

Por sus características, la LTME representa un gasto económico elevado que incluye el tratamiento inicial que está directamente relacionado con el nivel de la lesión, además del manejo para reintegrar socialmente a los pacientes, incluyendo las terapias de rehabilitación, los aparatos ortopédicos, las sillas de ruedas y las adaptaciones especiales requeridas (Stripling, 1990; Fehlings, 2001; Dobkin y

Havton, 2004; Priebe y Cols, 2007). En nuestro medio este tipo de lesión es causa de incapacidad permanente, que para las instituciones de seguridad social implica una erogación agregada secundaria a las pensiones.

2.1.2 Fisiopatología de la LTME

La fisiopatología de la LTME es un fenómeno complejo, que ha sido dividido en daño mecánico primario y mecanismos secundarios de lesión. El daño primario tiene que ver con el mecanismo de lesión que puede ser contusión, compresión, laceración o sección; lo que produce la muerte inmediata de diferentes tipos celulares, mientras que los mecanismos secundarios de lesión incluyen una amplia cascada de procesos bioquímicos que se desencadenan a partir del daño primario y que va a destruir una gran cantidad de tejido nervioso. Lo relevante es que la mayor parte de la destrucción del substrato

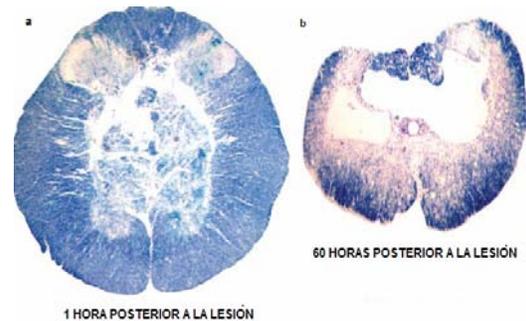


Figura 1. Evolución de la LTME. Se muestra la evolución del daño en la médula espinal, causada por una lesión de tipo traumática. a) Una hora posterior a la lesión y b) Sesenta horas posterior a la lesión (tomado de Hulsebosch, 2002).

anatómico necesario para la adecuada función neurológica, y el déficit funcional producido, son el resultado de los mecanismos secundarios de lesión más que del daño mecánico primario (Figura 1) (Young y Flamm, 1982; Stokes y Cols, 1983; Iizuka y Cols, 1986; Fehlings, 2001; Hulsebosch, 2002; McDonald y Sadowsky, 2002; Bareyre y Schwab, 2003; Hausmann, 2003; Rowland y Cols, 2008; Bauchet y Cols, 2009).

Entre los mecanismos secundarios de lesión destaca la excitotoxicidad, la formación de ERO, la activación de enzimas (proteasas, lipasas y endonucleasas), la respuesta inflamatoria y la isquemia. Esta última se considera uno de los eventos más relevantes, ya que aunada a otros procesos patológicos como el edema y la hemorragia dificultan e incluso impiden la perfusión de la ME no sólo en el sitio de lesión sino en varios segmentos medulares tanto en dirección cefálica como caudal, provocando bajos niveles energéticos en las células sobrevivientes por menor disposición de ATP y bloqueo de la bomba sodio potasio ATP ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$) principalmente. Debido a que el proceso isquémico es seguido por una fase de reperfusión tisular en la que el flujo de oxígeno promueve la formación de ERO y de otros productos tóxicos que desencadenan numerosos procesos autodestructivos, este proceso participa de manera importante en la generación del déficit funcional observado (Figura 2) (Tator y Fehlings, 1991; Lu y Cols, 2000; Fehlings, 2001; McDonald y Sadowsky, 2002; Bareyre y Schwab, 2003; Hausmann, 2003; Rowland y Cols, 2008; Bauchet y Cols, 2009).

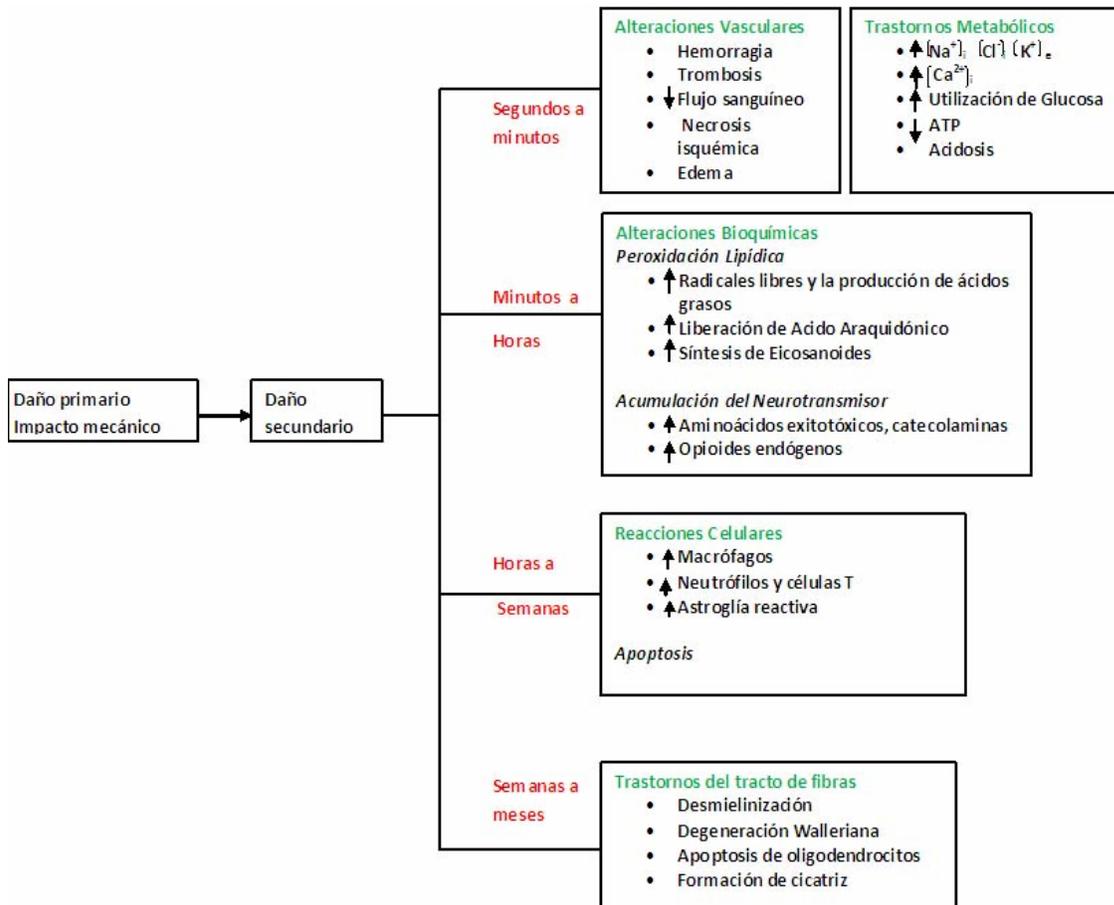


Figura 2. Fisiopatología de la lesión traumática de médula espinal. El diagrama muestra en orden cronológico las alteraciones moleculares, celulares e histológicas observadas durante distintas fases después de una lesión traumática de médula espinal (tomado de Bareyre y Schwab, 2003).

La isquemia produce alteraciones en la vía glucolítica, lo cual obliga a las células a recurrir al metabolismo anaerobio como un mecanismo homeostático en el que sólo se generan dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (Figura 3), permitiéndoles a las células sobrevivir precariamente y por un breve tiempo ya que una célula en anaerobiosis agota el ATP intracelular rápidamente, por lo que la membrana se despolariza y se bloquean tanto la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ como la entrada de nuevas moléculas de glucosa, razón por la cual la célula no puede por sí misma volver al metabolismo aeróbico, que le proporcione 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (Conn y Stump, 1976). Más aún, en condición anaeróbica el ácido pirúvico procedente de la glucólisis, se reduce a ácido láctico ocasionando un incremento en los niveles de lactato, provocando así la obtención insuficiente de energía, acidez intracelular y reducción en los sistemas amortiguadores perivasculares y sanguíneos. La acidosis resultante interfiere con la función enzimática normal (Ganong, 1980) y proporciona un medio ambiente favorable para la formación de ERO (Hogg, 1998). Lo que aunado a la liberación de hierro resultante del daño primario, incrementa la peroxidación lipídica (PL), y la formación del edema intracelular en células del sistema nervioso (Bareyre y Schwab, 2003; McTigue, 2008), constituyendo uno de los mecanismos más importantes de daño después de una LTME (Thomas y Cols, 1985; Gutteridge, 1986; Bareyre y Schwab, 2003; Hausmann, 2003; Christie y Cols, 2008). La acidosis y la disfunción celular coexisten simultáneamente y si no se corrigen en corto plazo causan muerte celular y/o lesiones orgánicas irreversibles (Conn y Stump, 1976).

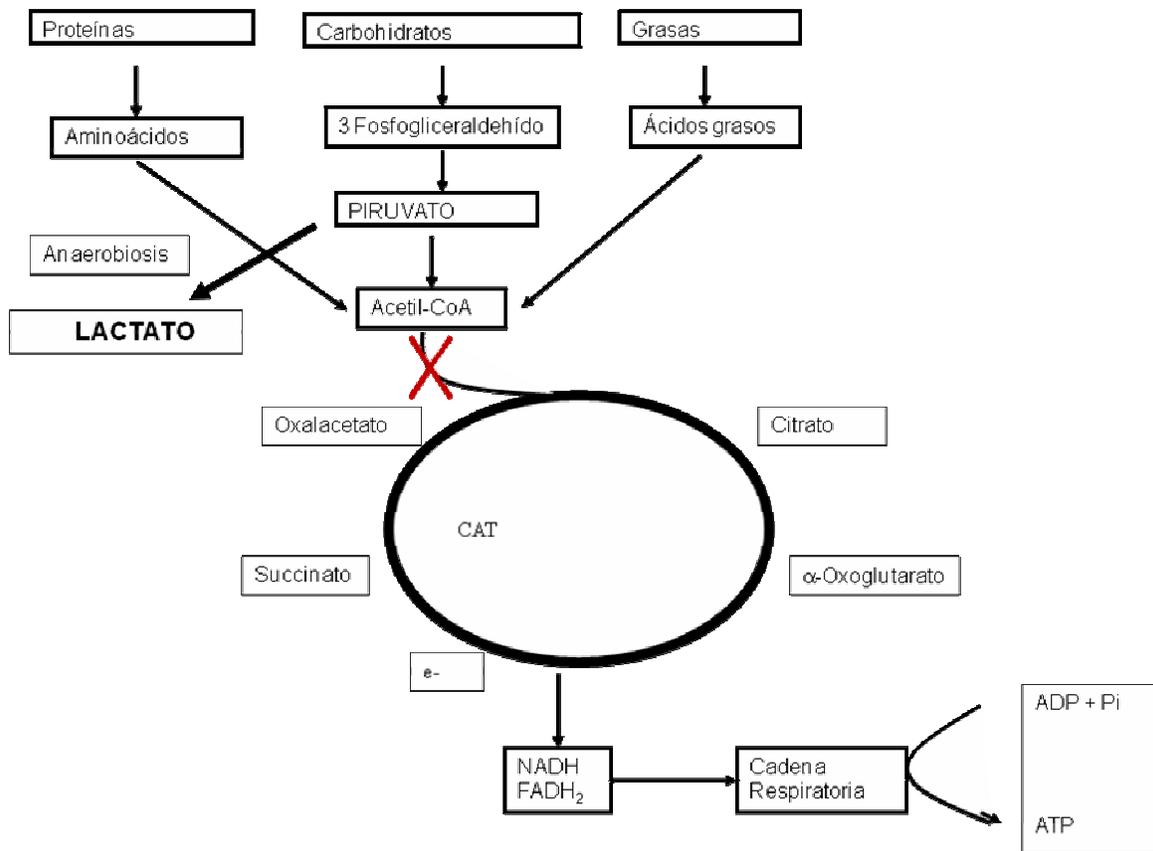


Figura No. 3. Metabolismo anaeróbico. Implica la vía de la glucólisis con producción total de 2 moléculas de ATP e incremento de lactato lo que permite un medio ácido.

2.1.3 Tratamiento de la LTME

Existen diferentes tipos de tratamiento para la LTME, como es el uso de esteroides, antagonistas de receptores a glutamato, la inhibición de la sintasa de óxido nítrico (NO_S), la administración de factores tróficos en el sitio de lesión o la modulación de la respuesta inflamatoria por mencionar algunos (Kwon y Wolfram, 2001; Dobkin y Havton, 2004; Baptiste y Fehlings, 2006). Sin embargo, en la actualidad, el único fármaco que se ha empleado para el manejo temprano de esta patología en seres humanos es el succinato de sodio de metilprednisolona (MPSS), esteroide de tipo glucocorticoide, que administrado en megadosis (30

mg/Kg de peso corporal en bolo inicial seguido de una infusión de 5.4 mg/Kg/h por 23 h) y de manera temprana fue el primer medicamento que permitió la recuperación motora y sensitiva en forma parcial de pacientes con LTME (Bracken y Cols, 1990; Bracken y Cols, 1992; Bracken y Cols, 1997; Wing y Cols, 1998; Bracken, 2005; Baptiste y Fehlings, 2006). Su uso en humanos se sustentó en estudios realizados en animales en los que se demostró experimentalmente que el MPSS mejora y mantiene el metabolismo energético aeróbico (Anderson y Cols, 1982; Braugher y Hall, 1983; Braugher y Hall, 1984), previene la isquemia postraumática en la ME mantiene el flujo sanguíneo tisular (Young y Flamm, 1982; Hall y Cols, 1984), disminuye la formación de ácido láctico, los niveles de arginina (substrato necesario para la producción de óxido nítrico) y las concentraciones extracelulares de glutamato (Farooque y Cols, 1996). Sin embargo, en fechas recientes se ha llegado incluso a recomendar que el manejo con altas dosis de MPSS sea excluido como una intervención posterior a una LTME, debido a que en otros estudios no se ha podido demostrar una recuperación funcional significativa con el tratamiento a base de este fármaco e inclusive se han resaltado los efectos deletéreos que provoca el uso de dicho esteroide (Short y Cols, 2000; Hurlbert, 2001; Bauchet y Cols, 2009). Lo anterior hace necesario continuar en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que solas o aunadas a MPSS permitan obtener resultados más alentadores.

2.2 La cocarboxilasa no degradable como activador del metabolismo

La cocarboxilasa no degradable (CND) o pirofosfato de tiamina es una coenzima que apoya la producción de energía y permite el mantenimiento de la reserva

alcalina y la normalización del pH, el cual se conserva entre 7.35 y 7.45 unidades en los organismos normales. Es una molécula libre de efectos secundarios de tipo inmunológico, resistente a las hidrolasas del medio interno, lo que le permite conservar su fosforilación y con ello alcanzar a todas las células para desempeñar su función enzimática. La CND posee una energía de activación superior a las 29 Kcal/mol, lo que le permite repolarizar la membrana celular y reactivar el ciclo de los ácidos tricarboxílicos para reanudar la degradación aeróbica de la glucosa y mantener con ello el metabolismo celular hasta que la circulación colateral modifique el cuadro (Patel y Korotchkina, 2001).

La CND es una molécula con enlace fosfato de alta energía, que participa en la síntesis de neurotransmisores y es indispensable en el metabolismo oxidativo al funcionar como coenzima de 3 importantes enzimas:

1. α -Cetoglutarato deshidrogenasa (DPG): participa en la formación irreversible de succinil-CoA a partir del α -cetoglutarico. La DPG favorece las reacciones del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en el sentido de la cadena respiratoria (Booth y Cols, 1996).
2. Transcetolasa: interviene en el metabolismo de las pentosas participando en la degradación de las hexosas y la biosíntesis de ácidos nucleicos. A nivel sanguíneo la CND actúa en los eritrocitos aumentando la acción de la transcetolasa y por tanto aumentando el nivel del 3 - fosfogliceraldehído que se convierte en 2,3-difosfogliceraldehído,

compuesto que aumenta la afinidad de la hemoglobina al oxígeno (fenómeno de suma importancia en procesos patológicos que implican hipoxia e isquemia). Permite la reducción y con ello la captación de moléculas de oxígeno (Blum, 1968; Schenk y Duggleby, 1998; Frank y Cols, 2007).

3. Piruvato deshidrogenasa: realiza la descarboxilación oxidativa del ácido piruvico proveniente de la glucólisis para formar acetil-CoA, combustible necesario para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Strumilo y Cols, 1999; Patel y Korotchkina, 2001; Frank y Cols, 2007).

Además por lo anterior, la CND es capaz de favorecer la fosforilación oxidativa a diversos niveles, incluyendo los canales iónicos (Mody y Cols, 1988; Mac Donald y Cols, 1989), permite una mejor captación de oxígeno por el eritrocito (Devlin, 1991) y atenúa el daño endotelial. Así mismo, se ha demostrado que la administración de complejos vitamínicos que contienen CND aumenta la utilización de la α -cetoglutarato en el tejido nervioso (Rozanov y Cols, 1990).

Debido a que los fenómenos hipóxicos-isquémicos presentes después de una LTME bloquean la actividad de la piruvato deshidrogenasa y otros complejos enzimáticos, la célula desvía la producción de energía hacia la glucólisis anaerobia, siendo aquí en donde la CND puede actuar, ya que forma parte de un complejo enzimático que descarboxila al piruvato (paso relevante para entrar al

ciclo de los ácidos tricarboxílicos), simplificando la acción de la piruvato deshidrogenasa (Khemelevsrx y Kornts-Kaya, 1987). La CND también actúa como donador de pirofosfato, mecanismo que permite mantener la estabilidad de los canales de la membrana plasmática y que aún en condiciones de hipoxia, mantiene la producción de energía a pesar de las condiciones desencadenadas, revirtiendo con ello la acidosis metabólica (Abeles, 1992; Werner, 1992).

2.3 Inhibición metabólica mitocondrial

En todos los organismos existen mecanismos compensatorios, protectores o de defensa, mediante los cuales logran mantener un mejor control sobre condiciones adversas. Un ejemplo de esto es el arresto metabólico, que se refleja cuando los organismos ante condiciones ambientales agresivas, bajan su frecuencia cardíaca, disminuyen el número de respiraciones y la temperatura orgánica cae, reduciendo las reacciones químicas orgánicas (Hochachka, 1986). En organismos que emplean la disminución del metabolismo celular aeróbico, como un mecanismo de defensa o protección, se ha observado inmunosupresión, inhibición de la síntesis de proteínas e incremento en la formación de antioxidantes (Zhou y Cols, 2001). Más aún, se ha demostrado que en mamíferos el arresto metabólico es capaz de extender el tiempo de supervivencia bajo condiciones de hipoxia (Hochachka, 1986).

El metabolismo anaeróbico produce acidosis, efecto que podría ser benéfico después de una LTME, ya que el medio ácido bloquea los receptores tipo N-metil-D-Aspartato (nNMDA) y por ende disminuye el efecto excitotóxico del glutamato

caracterizado por la entrada masiva al interior de la célula de iones calcio (Ca^{+2}), con la consecuente activación de enzimas dependientes de este ion como proteasas (NO_s , calpains), lipasas (fosfolipasa C y A_2) y endonucleasas (Vornov, 1996).

Por otra parte, se ha señalado a la formación de la cicatriz glial como una causa importante que evita la regeneración axonal en el sistema nervioso central (SNC) después de una LTME (Fawcett y Asher, 1999), condición que se ve limitada ante una actividad metabólica disminuida, ya que con ello se inhibe la síntesis de proteínas en el cerebro, específicamente de colágeno o tejido conectivo presente en el sitio de lesión (Frerichs y Cols, 1998). Aunque un fenómeno importante que se observa en esta condición, es que se mantiene activo el transporte axonal de componentes tanto microtrabeculares como del citoesqueleto, estructuras necesarias para mantener la estabilidad y elongación axonal, lo cual indica que la maquinaria necesaria para la regeneración durante la disminución de la actividad metabólica es funcional.

Lo anterior nos permiten sustentar la idea de que al disminuir la actividad metabólica aeróbica durante la fase aguda de la LTME experimental, podría ser una alternativa para disminuir el daño derivado de los mecanismos secundarios de lesión, que se reflejará en la disminución del proceso de PL y en el grado de recuperación funcional en las extremidades posteriores de los animales incluidos en el estudio.

2.3.1 Actividad mitocondrial

El ser humano genera a diario la energía metabólica suficiente para sintetizar su peso en ATP. Aunque en la glucólisis y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos se genera una pequeña cantidad de ATP, durante estos procesos tienen lugar también una serie de etapas de dehidrogenación que producen la reducción de 10 moles de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) a $\text{NADH}+\text{H}^+$ y 2 moles de flavín adenín dinucleótido (FAD) a FADH_2 , siendo la reoxidación de estos transportadores electrónicos reducidos, la que genera la mayor parte de la energía necesaria para la síntesis de ATP por las enzimas de la cadena respiratoria, que están firmemente embebidas en la membrana interna de la mitocondria (Conn y Stump, 1976).

Las proteínas transportadoras, que forman la cadena respiratoria, están ensambladas en cinco complejos multiproteicos: **Complejo I**, *NADH-deshidrogenasa (NADH-DH)*, *NADH-coenzima Q reductasa* o *NADH-ubiquinona oxidoreductasa* recibe los electrones de la oxidación del $\text{NADH}+\text{H}^+$ y los pasa a la coenzima Q, la cual se desplaza libremente a través de la membrana mitocondrial interna. **Complejo II**, *Succinato deshidrogenasa (S-DH)* o *Succinato-coenzima Q reductasa*, recibe los electrones de la oxidación del FADH_2 y los pasa a la coenzima Q. **Complejo III**, *Citocromo c-coenzima Q oxidoreductasa* o *Complejo citocromo bc_1* , recibe los electrones de la reoxidación de la coenzima Q y los transfiere al citocromo c, un transportador electrónico proteico que también puede desplazarse por la membrana. **Complejo IV o Citocromo oxidasa (C-OX)** acopla

la oxidación del citocromo *c* con la reducción del oxígeno molecular (O₂) a agua (Conn y Stump, 1976; Abeles, 1992).

El acoplamiento en la transferencia de electrones entre los complejos multiproteicos tiene lugar a través de moléculas de menor tamaño que pueden difundir libremente con objeto de transportar dichos electrones entre los distintos complejos. La coenzima Q (CoQ) también llamada ubiquinona (UQ^o), es una benzoquinona ligada a diversas unidades de isopreno. La cola isoprenoide proporciona a la molécula su carácter apolar, permitiéndole una difusión rápida a través de la membrana mitocondrial interna. Su oxidoreducción afecta a un electrón cada vez, a través de un intermediario semiquinona, proporcionando una interface de conexión entre los transportadores de dos electrones y los citocromos que sólo son transportadores de un electrón. Además, como no solo transporta electrones, sino también protones, juega un papel clave en el acoplamiento del flujo de electrones con el movimiento de protones. El citocromo *c* es una proteína pequeña (13 KDa), asociada a la membrana interna mitocondrial por el espacio intermembranal. Posee como grupo prostético un hemo de tipo *c* que acepta un electrón del cit *c*₁ del complejo III, que posteriormente se desplaza hasta el complejo IV para donar dicho electrón al centro de cobre binuclear que contiene este enzima (Conn y Stump, 1976; Abeles, 1992).

En resumen las reacciones globales de los complejos I, II, III y IV son exergónicas y la energía liberada en ellas crea un gradiente de protones a través de la membrana interna que se libera al espacio intermembranal generando la energía

suficiente para que tenga lugar la síntesis de ATP por la ATP sintasa (complejo V) (Abeles, 1992).

Cada uno de los complejo mitocondriales puede ser inhibido de manera específica empleando diversos inhibidores, de los cuales se seleccionaron algunos para el desarrollo experimental del presente trabajo.

2.3.2 Inhibidores de la cadena respiratoria

Se utilizaron distintos inhibidores específicos para los diferentes complejos proteicos mitocondriales con la finalidad de determinar el efecto de la inhibición del metabolismo aeróbico después de una LTME. Los inhibidores utilizados fueron rotenona, ácido 3-Nitropropionico (A-3-NP), antimicina A, azida de sodio y cianuro (Figura 4).

La rotenona es un flavonoide extraído de las raíces de la planta *Derris spp*, nativa de los trópicos orientales que actúa como insecticida de contacto e ingestión, inhibe la actividad de la enzima NADH-DH, bloqueando la transferencia de electrones del cofactor Fe-S a la ubiquinona en el complejo I de la cadena respiratoria (Sousa y Cols, 2003). Se ha reportado para la rotenona una DL₅₀ en rata de 132 mg/Kg vía oral y de 6 mg/Kg vía intravenosa (Soloway, 1976).

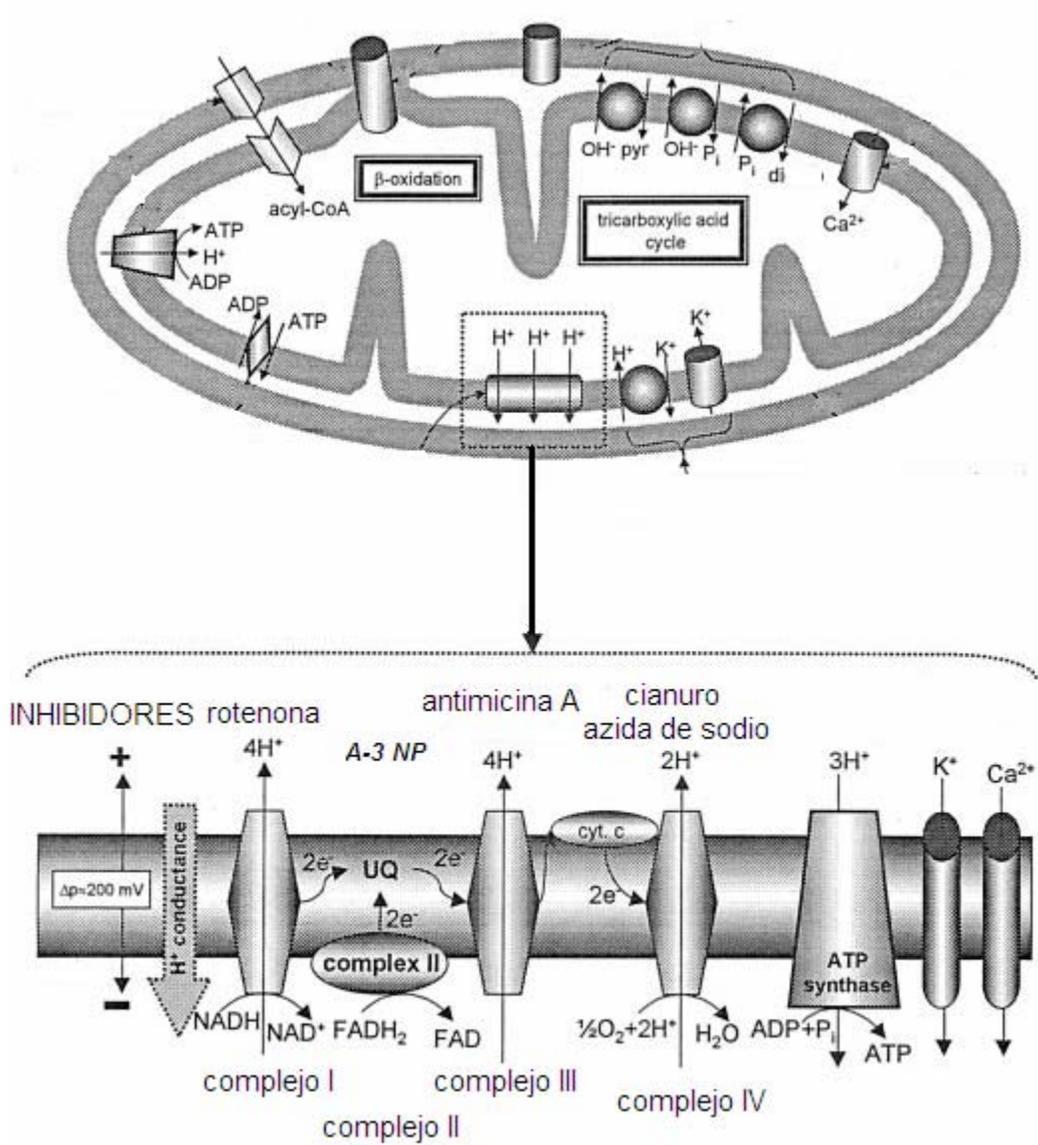


Figura No. 4. Inhibidores de los complejos proteicos mitocondriales en la cadena respiratoria. Rotenona (complejo I), A-3-NP (complejo II), antimicina A (complejo III), azida de sodio y cianuro (complejo IV) (modificado de Szewczyk y Wojtczak, 2002).

El A-3-NP se encuentra presente en la planta *Astragalus sa* y bloquea la producción de ATP actuando como un inhibidor irreversible de la enzima S-DH en el complejo II de la cadena respiratoria. La administración de A-3-NP en condiciones normales causa daño principalmente al estriado, hipocampo y corteza cerebral (Túnez y Santamaría, 2009). La DL₅₀ reportada en rata para el A-3-NP es de 67 mg/Kg cuando se administra vía intraperitoneal (Pass y Cols, 1985).

La antimicina A es un antibiótico derivado del *Streptomyces* capaz de bloquear el flujo electrónico, actúa como un inhibidor metabólico a nivel del complejo III de la cadena respiratoria y bloquea el paso de los electrones del citocromo B a la Co Q, al unirse al primero por el lado de la matriz mitocondrial. La DL₅₀ calculada para la antimicina A en ratas es de 0.81mg/Kg vía intraperitoneal (Karel, 1976).

La azida de sodio es un Inhibidor metabólico de tipo irreversible capaz de bloquear la actividad de la enzima citocromo oxidasa y evitar el paso de los electrones en la unión con el Fe²⁺ del grupo prostético hemo en el complejo IV de la cadena respiratoria (Park y Cols, 1999). La DL₅₀ de la azida de sodio en ratones es de 27mg/Kg al administrarla vía oral (Chiba y Cols, 1999). El cianuro es un compuesto que tiene la capacidad de formar un complejo estable con la enzima citocromo oxidasa, manteniendo el estado oxidado del hierro enzimático (Fe³⁺) y paralizando la cadena respiratoria por bloqueo del complejo IV. El cianuro tiene una DL₅₀ en rata de 2 mg/Kg de peso corporal al administrarse vía subcutánea (Tadic y Cols, 1992).

Debido a que la energía de oxidación de los sustratos es la que dirige la síntesis de ATP, si se inhibe el paso de electrones al O₂ en la cadena respiratoria, se bloquea la síntesis de ATP, condicionando al organismo a realizar sus actividades bajo condiciones de tipo anaeróbicas, situación relevante para el desarrollo de la presente investigación.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Después del daño mecánico inicial o lesión primaria en la LTME, se desencadenan mecanismos secundarios de “daño”, tanto en el sitio de lesión como en varios segmentos de la ME que se extienden en dirección rostral y caudal a partir del epicentro. En este contexto la extensión del “daño” está dada en gran medida por el proceso de isquemia/reperfusión en el cual el organismo entra en una condición anaeróbica en la primera fase, donde la precaria formación de ATP no permite cubrir las funciones básicas, además de desencadenar la generación exacerbada de moléculas dañinas como las ERO, producidas en gran medida ante el restablecimiento del metabolismo aeróbico durante la fase de reperfusión posterior a la isquemia. Las altas concentraciones de dichas ERO dañan estructuras lipídicas, proteicas y material genético, lo que puede llevar a la muerte celular.

Por lo anterior, en el presente trabajo se plantea la posibilidad de que la inhibición metabólica en la fase aguda de la LTME podría actuar más que como un mecanismo secundario de lesión, como un mecanismo de defensa o protección al impedir la formación de sustancias tóxicas y por ende al disminuir el daño celular y el déficit funcional resultante.

4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente no existe un tratamiento para la LTME que permita el restablecimiento total de las funciones perdidas en los individuos con esta patología, y aunque en las últimas décadas, se han realizado grandes esfuerzos por limitar el daño provocado por los mecanismos secundarios de lesión, y se ha avanzado en el conocimiento de la fisiopatología de esta afección, se requiere evaluar la participación real de cada uno de estos mecanismos a fin de establecer si su participación es negativa al incrementar el daño inicial o positiva al proteger contra el mismo.

5. HIPÓTESIS

Si la inhibición del metabolismo aeróbico mitocondrial en la fase aguda de la LTME actúa como un mecanismo de protección durante la etapa de isquemia/reperfusión, entonces disminuirá la actividad enzimática y la formación masiva de las ERO y, por lo tanto el daño al tejido medular lo cual se reflejará en una mejor función motora en los animales tratados después de la LTME.

6. OBJETIVO GENERAL

Conocer el efecto protector de la inhibición del metabolismo aeróbico mitocondrial en ratas con LTME.

7. OBJETIVOS METODOLÓGICOS

1. Evaluar el efecto de los inhibidores mitocondriales: rotenona, A-3 NP, antimicina A, azida de sodio y cianuro, a través de la actividad de las enzimas mitocondriales NADH-DH, S-DH y C-OX en ratas con LTME.
2. Seleccionar él o los inhibidores mitocondriales que produzcan un efecto benéfico en el modelo de LTME descrito en el presente trabajo.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto que sobre la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) tiene el inhibir el metabolismo aeróbico mitocondrial, después de una LTME en ratas.

2. Determinar el efecto que sobre la actividad de la enzima creatinina kinasa (CK) tiene el inhibir el metabolismo aeróbico mitocondrial, después de una LTME en ratas.
3. Evaluar el efecto que sobre el proceso de PL tiene el inhibir el metabolismo aeróbico mitocondrial después de una LTME en ratas.
4. Evaluar el efecto que sobre la función motora de las extremidades posteriores de ratas con LTME, tiene el inhibir el metabolismo aeróbico mitocondrial.
5. Evaluar el efecto que sobre la cantidad de tejido medular preservado tiene el inhibir el metabolismo aeróbico mitocondrial en ratas con LTME.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo experimental, comparativo, transversal y prospectivo.

9.2 Población de estudio

El estudio fue realizado en ratas de la cepa Long-Evans, hembras adultas con peso de 210 a 250 g, las cuales fueron divididas en 5 grupos, constituidos por 14 ratas cada uno.

Grupo 1. Ratas sanas, control

Grupo 2. Ratas con LTME y sin tratamiento

Grupo 3. Ratas con LTME y administración de rotenona

Grupo 4. Ratas con LTME y administración de azida de sodio

Grupo 5. Ratas con LTME y administración de CND

9.3 Criterios:

9.3.1 Inclusión. Se incluyeron todas las ratas con las características referidas previamente y que al ser sometidas a la LTME presentaron un hematoma en la zona central de la ME y que 24 horas después de la lesión obtuvieron una calificación de 0 a 1 en la escala BBB.

9.3.2 Exclusión. Se excluyeron las ratas que no cumplieron con las características referidas anteriormente y aquellas en las que el hematoma fue

lateralizado con respecto a la zona central de la ME o que obtuvieron calificaciones de más de uno en la escala BBB 24 horas después de la LTME.

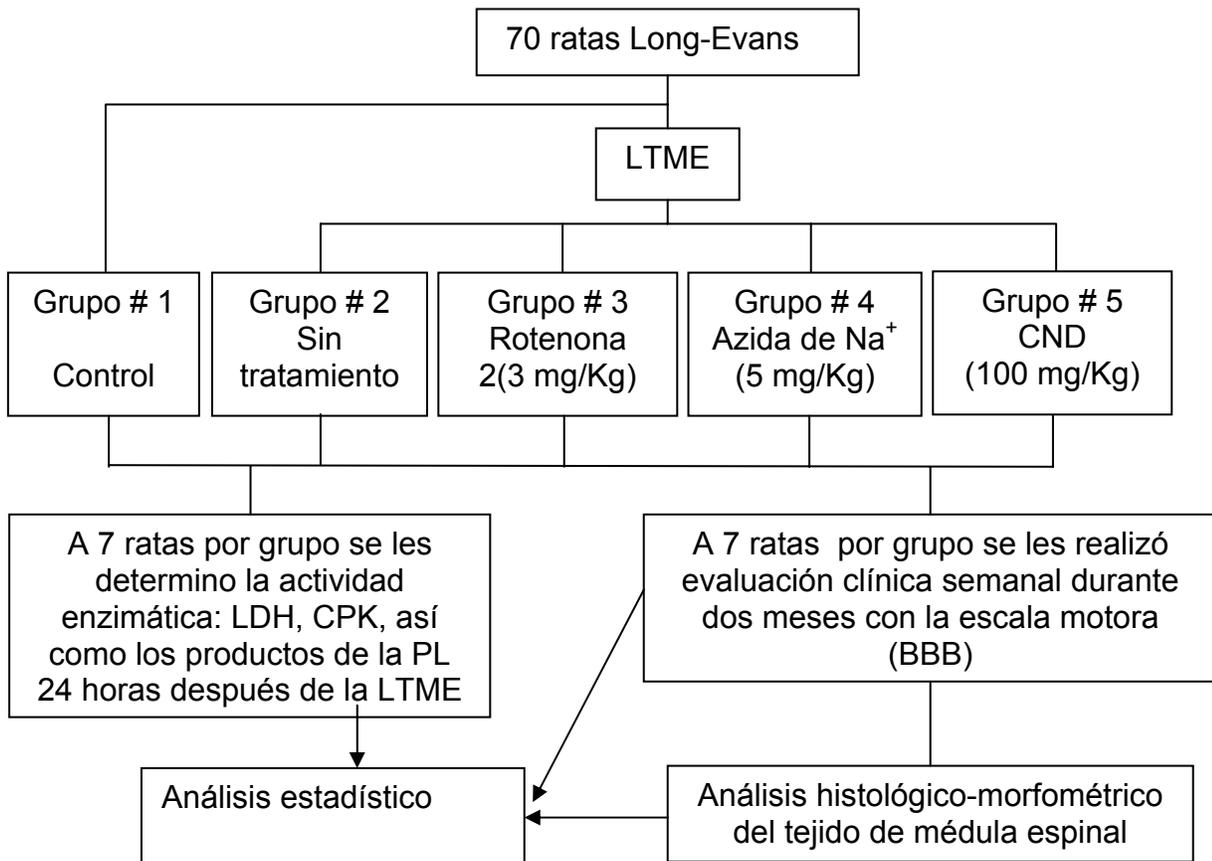
9.3.3 Eliminación. Se eliminaron todas las ratas que no completaron el tiempo de evaluación propuesto, es decir, aquellas que murieron antes de cumplir 2 meses de evaluación de seguimiento y aquellas ratas que se automutilaron durante el estudio.

9.4 Variables:

9.4.1 Independientes. La LTME, la administración de los inhibidores metabólicos y de CND.

9.4.2 Dependientes. La actividad de la LDH y de la CK, los niveles de los productos de la PL, la cantidad del tejido medular preservado y los resultados de la evaluación funcional de los miembros posteriores de los animales estudiados.

9.5 Diseño experimental



9.6 Técnica anestésica

Antes de cada procedimiento quirúrgico los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (clave 226, sector salud) e hidrocloreuro de xilacina (Bayer) a razón de 77.5 y 12.5 mg/Kg de peso corporal respectivamente.

9.7 Lesión traumática de la médula espinal

La LTME se realizó bajo efecto anestésico, previa asepsia y antisepsia, posteriormente se hizo una incisión media sagital en la piel de la región torácica y se disecaron los músculos paravertebrales de las apófisis espinosas. Se procedió a separar el periostio de las láminas vertebrales y se extirparon tres apófisis espinosas desde la torácica 8 a la 10 (T8–T10) para visualizar ampliamente las láminas correspondientes. Posteriormente se extirpó la lámina a nivel T9, para exponer la porción dorsal de la ME sin lesionarla y manteniendo las meninges intactas. Los animales programados para LTME, fueron colocados en un equipo de cirugía estereotaxica (New York Impactor), donde a través de una contusión controlada se generó una lesión de intensidad moderada sobre la ME expuesta. Se observó el sitio del impacto a través del microscopio quirúrgico para corroborar la formación de un hematoma a nivel central. La fascia muscular y la piel de la incisión quirúrgica se suturaron por planos con puntos separados.

9.8 Administración de los inhibidores mitocondriales

Todos los tratamientos se aplicaron vía intraperitoneal, la dosis y el tiempo de aplicación se asignó de manera individual (Tabla 1).

Tabla No 1. Tiempo de administración y dosis de los inhibidores metabólicos aplicados después de la LTME

Grupo	Bolo i. p. (mg/Kg)	Dosis (mg/Kg)	Total Tiempo de Administración posterior a la lesión
CND	100	100	5 min
ROTENONA*	3	3	5 min
A-3-NP	25	25	5 min
ANTIMICINA A**	0.5	0.5	5 min
AZIDA DE SODIO	5	5	5 min
CIANURO	3	3	5 min

*Disuelta en dimetilsulfoxido.

**Diluida en etanol al 0.05%.

9.9 Obtención de la muestra

Para las determinaciones bioquímicas, una vez cumplido el tiempo de estudio, los animales fueron decapitados y se extrajo la ME desde T8 hasta T 10 y se retiraron las meninges. La muestra se colocó en solución fisiológica y se congelo en hielo seco, se peso y homogenizó. Todo el proceso se efectuó en aproximadamente 30 segundos para evitar la oxidación del tejido.

9.10 Determinación de la actividad enzimática de NADH-DH, S-DH y C-OX

Todas las evaluaciones bioquímicas de la prueba piloto para medir la actividad enzimática de NADH DH, S DH y Citocromo oxidasa fueron de tipo espectrofotométricas.

9.11 Determinación de la actividad enzimática de la CPK

Debido a que se han reportado niveles elevados de la CPK en enfermedades cerebro-vasculares con componente isquémico (accidente cerebro vascular, desordenes neurológicos, hidrocefalia, epilepsia, etc.) desde las 4 horas después del evento, alcanzando su pico máximo entre las 24 y las 30 horas, en el presente trabajo se realizó la cuantificación de esta enzima a las 24 horas después de la LTME. Para la cuantificación de esta enzima se empleó el kit creatinina-kinasa (Sigma, formula No. 2550s) el cual se basa en las siguientes reacciones:



Donde la reducción de NAD a NADH+H a una absorbancia de 340 nm es proporcional a la actividad de la enzima CPK.

Procedimiento:

1. Se ajustó a cero el instrumento de absorción a 340nm usando agua destilada

2. Se reconstituyó la solución de trabajo y se precalentó durante 5 minutos a 37° C
3. En un vial de CPK, se añadió 1 ml de la solución de trabajo y 0.025 ml de la muestra dentro del tubo apropiado, se mezcló y se incubó a 37 °C
4. Después de un minuto de incubación se registró la absorción (lectura A) en un espectrofotómetro Beckman DU-650 y se regresó el tubo a la incubadora a 37 °C
5. Un minuto exactamente después se leyó y se registró nuevamente la absorción (lectura B)
6. Se hicieron los cálculos correspondientes para determinar la actividad de la CPK utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{IU/L} = \frac{(\text{A2} - \text{A1}) \times 1.025 \times 1000}{1 \times 6.22 \times 0.025}$$

9.12 Determinación de la actividad enzimática de la LDH

Debido a que los niveles elevados de LDH están asociados primeramente con infartos al miocardio (mecanismo que implica procesos isquémicos), la magnitud del grado de incremento es utilizado para estimar la extensión de daño al músculo cardiaco. Los niveles altos de LDH también se han observado en enfermedades del hígado, enfermedades renales y en algunos casos de trauma en músculo esquelético.

EN el presente trabajo se determinaron los niveles de LDH utilizando un método enzimático colorimétrico, para lo cual se empleó un kit de LDH (Sigma, formula No. 54), el cual se basa en la siguiente reacción:



Considerando que la NADH+H produce un aumento en la absorbancia a 340nm, el cambio de rango en la absorbancia es directamente proporcional a la actividad de LDH en la muestra.

Procedimiento:

1. Se ajustó a cero el instrumento de absorción a 340nm usando agua destilada.
2. Se reconstituyó la solución de trabajo y se calentó durante 5 minutos a 37° C.
3. En un vial, se añadió 1 ml de la solución de trabajo y 0.025 ml de muestra, se mezcló y se incubó a 37 °C por un minuto.
4. Exactamente un minuto después, se registró la absorción (lectura A) en un espectrofotómetro Beckman DU-650 y se regresó el tubo a la incubadora a 37 °C.
5. Un minuto más tarde se leyó y se registró nuevamente la absorción (lectura B).
6. Se hicieron los cálculos correspondientes para determinar la actividad de la LDH utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{IU/L} = \frac{(A2 - A1) \times 1.025 \times 1000}{1 \times 6.22 \times 0.025}$$

9.13 Evaluación de la peroxidación lipídica

La PL es un mecanismo de daño celular bien establecido, tanto en plantas como en animales y es utilizado como un indicador de estrés oxidativo en células y tejidos. Debido a que los peróxidos de los ácidos grasos poliinsaturados generan productos tales como las bases de Schiff, la medición de este parámetro es utilizada como indicador del proceso de PL.

La medición se realizó de tomando el peso del tejido medular, se agregaron 3 ml de solución salina y se homogenizó. Posteriormente se separó 1 ml en un tubo de ensayo (por duplicado) y se le agregó 4 ml de la mezcla cloroformo metanol (v/v 2:1). Se agitó por 5 minutos, se dejó en hielo durante 30 minutos y posteriormente se retiró la fase metanólica por aspiración. Para la medición se tomó 900 µl de la solución más 100 µl de metanol, se agitó suavemente y se midió en un fluorómetro a una longitud de onda de excitación de 370nm y de emisión de 430nm (Santamaría y Ríos, 1993).

Para los cálculos finales se tomo en consideración la medición de quinina la cual actuó como muestra patrón.

Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia / mg de proteínas a partir de la siguiente fórmula:

$$Xq \text{ ----- } 150$$

$$X/W \text{ ----- } ?$$

Donde:

X = valor promedio del valor de fluorescencia en la medición de las muestras problema

W = peso del tejido expresado en mg de proteínas

Xq = valor de la fluorescencia de la muestra control (quinina)

9.14 Evaluación funcional

La evaluación funcional se realizó 24 horas después de la LTME y posteriormente cada semana durante dos meses con base en la escala para locomoción Basso, Beathie y Bresnahan o BBB (Basso y Cols, 1996), la cual consta de 22 puntos donde 0 es ausencia total de movimiento y 21 es una marcha normal. Esta escala evalúa la movilidad de las 3 articulaciones de las extremidades posteriores (tobillo, rodilla y cadera), capacidad para sostener el tren posterior, colocación de las patas en relación al eje del cuerpo, equilibrio y coordinación entre otros aspectos de la marcha, según se indica a continuación:

Escala BBB

- 0 Sin movimiento observable en las extremidades posteriores
- 1 Ligero movimiento de 1 ó 2 articulaciones, generalmente cadera y/o rodilla
- 2 Movimiento extenso en 1 sola articulación o extenso movimiento en 1 articulación y movimiento discreto en otra
- 3 Movimiento extenso en 2 articulaciones
- 4 Ligero movimiento de las 3 articulaciones de la extremidad
- 5 Ligero movimiento de 2 articulaciones y movimiento extenso de la tercera
- 6 Movimiento extenso de 2 articulaciones y movimiento discreto de la tercera
- 7 Movimiento extenso de las 3 articulaciones de las extremidades posteriores
- 8 Arrastre con incapacidad para soportar el tren posterior o colocar la planta de la pata
- 9 Colocación de la planta de la pata con soporte del tren posterior por un instante o soporte del tren posterior ocasional, frecuente o consistentemente sin apoyar la planta al caminar
- 10 Soporte ocasional del tren posterior dando algunos pasos. No hay coordinación de las extremidades anteriores con las posteriores
- 11 Soporte del tren posterior ocasional o frecuentemente dando pasos apoyando la planta. No hay coordinación de las extremidades anteriores con las posteriores
- 12 Soporte del tren posterior ocasional o frecuentemente dando pasos apoyando la planta. Coordinación ocasional de las extremidades anteriores con las posteriores

- 13 Soporte del tren posterior frecuente u ocasionalmente dando pasos apoyando la planta. Coordinación frecuente de las extremidades anteriores con las posteriores
- 14 Soporte consistente del tren posterior dando pasos con la planta de la pata, coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores y colocación de la pata durante la locomoción predominantemente rotada (interna o externamente) al hacer contacto inicial con la superficie así como poco antes de terminar o pasos plantares frecuentes, coordinación consistente de los miembros anteriores y posteriores y soporte de peso ocasional en la superficie dorsal de la pata
- 15 Soporte del tren posterior consistente y coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores sin apoyo del todo correcto durante el avance del miembro hacia delante. Colocación de la planta predominantemente paralela al cuerpo al contacto inicial
- 16 Pasos plantares consistentes y coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores durante la marcha y colocación adecuada frecuentemente durante el avance del miembro hacia adelante. Colocación predominante de la pata en paralelo al contacto inicial y rotada al terminar
- 17 Pasos plantares consistentes y coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores durante la marcha y frecuente colocación correcta durante el avance del miembro hacia delante. Colocación de la planta predominantemente en paralelo al contacto inicial y al finalizar
- 18 Pasos plantares consistentes y coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores durante la marcha y apoyo correcto

consistentemente durante el avance del miembro hacia delante. Colocación de la pata en paralelo al contacto inicial y rotado al término

19 Pasos plantares consistentes y coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores durante la marcha y apoyo correcto consistentemente durante el avance del miembro hacia delante. Colocación de la pata en paralelo al contacto inicial y al término y la cola abajo la mayor parte o todo el tiempo

20 Pasos plantares consistentes y marcha coordinada consistentemente, apoyo consistente colocación de la pata predominantemente en paralelo al contacto inicial y al término e inestabilidad del tronco. La cola consistentemente arriba

21 Pasos plantares consistentes, marcha coordinada, apoyo correcto, colocación de la pata predominantemente en paralelo durante toda la postura. Estabilidad consistente del tronco y la cola consistentemente arriba.

Ocasional < ó = 50%, frecuentemente: entre el 51 y 94% y consistentemente: 95-100%

Nota: La persona que realizó las evaluaciones clínicas, estaba cegada respecto a los procedimientos realizados en cada animal incluido en el estudio a fin de evitar el sesgo en los resultados.

9.15 Evaluación histológico-morfométrica

Cuando las ratas seleccionadas para este estudio completaron los 2 meses de evaluación funcional, fueron sometidas a toracotomía amplia bajo anestesia previa para canular la aorta ascendente y perfundir vía intracardiaca, con una bomba

peristáltica, 100 ml de amortiguador de fosfatos más 1000 UI de heparina a temperatura ambiente, seguida de 500 ml de formol amortiguado al 10% con fosfatos. Las soluciones fueron perfundidas a una velocidad de 30ml/min. Al término de la perfusión se extrajo la ME desde T8 hasta T10, previa identificación macroscópica del sitio de lesión.

Para procesar las muestras de ME se incluyó el epicentro de la lesión más 0.5 cm de distancia en dirección rostral y otro en dirección caudal (aproximadamente de T8 a T10).

- Los tejidos obtenidos se lavaron con amortiguador de fosfatos (PBS 0.1 M a pH 7.4) por 1 h, a temperatura ambiente, con tres cambios.
- Se deshidrataron en:
 - Alcohol al 70% x 1h con 2 cambios
 - Alcohol al 96% x 1h con 2 cambios
 - Alcohol absoluto al 100% x 1h con 2 cambios
 - Alcohol absoluto xilol x 1h con 2 cambios
 - Xilol x 2h con 2 cambios
 - Xilol-parafina x 1h a 56°C
 - Parafina x 12h a 56°C
- Se incluyeron en moldes plásticos
- Se orientaron para hacer cortes transversales seriados de 10 µm de grosor hasta llegar al epicentro de la lesión

- Se tiñeron con “Hematoxilina y Eosina” para cuantificar la cantidad de tejido preservado, para lo cual el tejido se desparafinó e hidrató de la siguiente forma:
- Xilol x 2h con 2 cambios
- Alcohol absoluto xilol x 15 minutos con 2 cambios
- Alcohol absoluto al 100% x 15 minutos con 2 cambios
- Alcohol al 96% x 15 minutos con 2 cambios
- Se lavó con agua corriente
- Se colocó en solución de Hematoxilina de Harris de 2 a 5 min
- Se colocó en alcohol ácido (1ml de HCl x 99cc de alcohol de 96°)
- Se lavó en agua corriente
- Se colocó en solución de eosina durante 10 min (10 g de eosina, 800cc alcohol absoluto y 200 ml agua destilada)
- Alcohol al 96% x 15 minutos con 2 cambios
- Alcohol absoluto al 100% x 15 minutos con 4 cambios
- Xilol x 15 minutos con 2 cambios
- Se montaron las muestras (entellan de Merk)

Nota:

Con esta técnica los núcleos se observaron de color azul y el citoplasma de color rojo.

Una vez teñido los tejidos, se identificó el corte donde se observó el epicentro de la lesión a través de una técnica de iluminación denominada Normarsky, la cual permite ver las muestras en relieve y las diferencia por contraste de fases. En

estas condiciones se seleccionaron las muestras de las laminillas donde se encontró la mayor destrucción de tejido, una anterior y una posterior a esta. Se cuantificó la cantidad de tejido preservado, tomando como referencia el promedio del total del área de tejido medular a la altura de T-9 en ME de ratas sanas al que se le resta la cantidad de tejido medular degenerado de los cortes medulares de ratas de los grupos experimentales, esto mediante un analizador de imágenes especializado (software Image-data base).

9.16 Aspectos éticos

Todos los procedimientos quirúrgicos y experimentales se realizaron con apego a las normas de la Ley General de Salud (1990) de acuerdo a las recomendaciones del capítulo referente al manejo de animales en proyectos de investigación y ciencia, así como de la norma oficial mexicana para el uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) (Aluja, 2002). Lo anterior consistió en evitar al máximo el sufrimiento de los animales incluidos en el estudio, reduciendo el tamaño de muestra utilizados al mínimo necesario para el desarrollo de la investigación y cumpliendo con todas las características con las que debe contar un bioterio para realizar este tipo de experimentos.

10.RESULTADOS

10.1 Experimentos preliminares

10.1.1 Inhibidores metabólicos

Se realizó una prueba piloto con el fin de observar el efecto de los inhibidores mitocondriales en relación a la actividad enzimática de NADH-DH, S-DH y C-OX (Figura 5, 6, 7, 8, 9, 10) así como sobre el proceso de PL (Figura 11 y 12). Lo anterior con el fin de seleccionar los inhibidores que mejor efecto sobre los parámetros mencionados anteriormente pudieran tener.

10.1.2 Actividad de NADH-DH evaluada una hora después de la LTME

La actividad de la enzima NADH-DH se evaluó una hora después de la LTME, observándose diferencias significativas cuando se comparó el grupo de ratas con LTME contra el grupo de ratas sanas y contra los grupos tratados con rotenona, azida de sodio o cianuro (* $p < 0.05$). De igual forma se observó diferencias significativas al comparar el grupo de ratas sanas contra el tratado con azida de sodio y contra el de rotenona (* $p < 0.05$) (Figura 5).

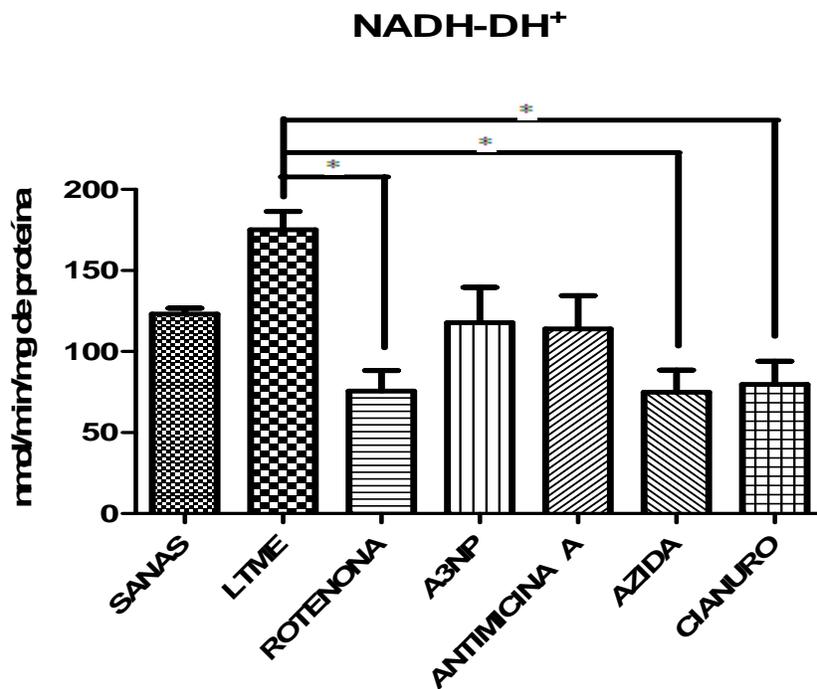


Figura 5. En la gráfica las barras muestran el valor promedio de la actividad de la enzima NADH-DH en la ME de ratas una hora después de la lesión y de la administración de los distintos tratamientos (LTME = lesión traumática de la médula espinal; A-3-NP = Ácido 3 nitropropionico). Cada grupo está representado por la media \pm la desviación estándar (n=7). ANOVA seguida de la prueba de Tukey. * $p < 0.05$.

10.1.3 Actividad de NADH-DH evaluada 24 horas después de la LTME

Se evaluó la actividad de la enzima NADH-DH 24 horas después de la lesión y se encontró que no existía diferencia significativa alguna entre los distintos grupos evaluados. Sin embargo el grupo que mostró cierta tendencia a disminuir la actividad de la enzima fue el tratado con azida de sodio. Por otra parte el grupo de rotenona, inhibidor específico de la enzima NADH-DH, incrementó su actividad en este modelo experimental (Figura 6).

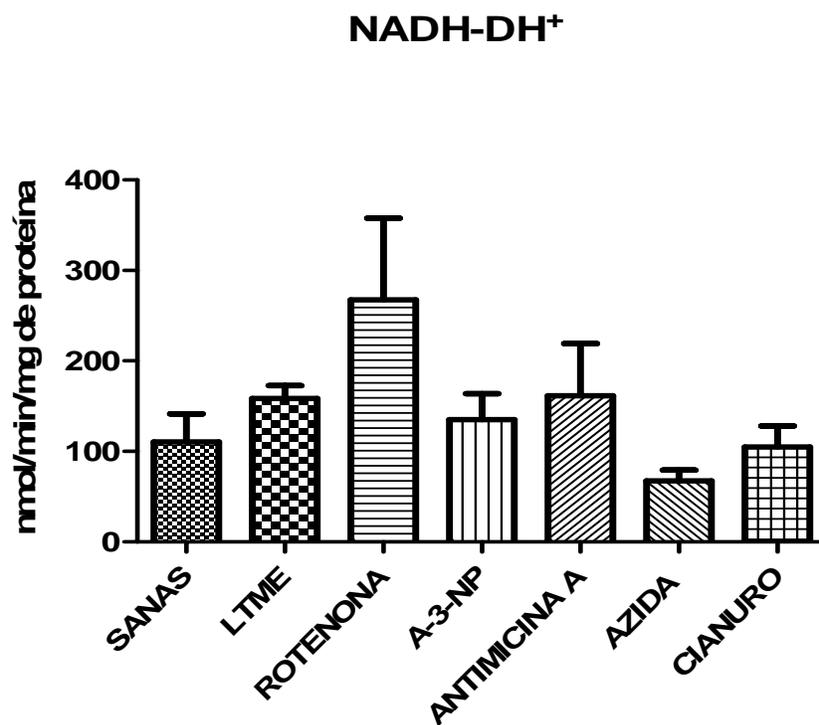


Figura 6. En la gráfica las barras muestran el valor promedio de la actividad de NADH-DH en la ME de ratas, 24 horas después de la lesión y después de administrar los distintos tratamientos (LTME = lesión traumática de la médula espinal; A-3-NP = Ácido 3 nitropropionico). Cada grupo está representado por la media \pm la desviación estándar (n=7). Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunns *p<0.05.

10.1.4 Actividad de la enzima S-DH evaluada una hora después de la LTME

La prueba se realizó una hora después de la lesión y se encontró diferencias significativas cuando se comparó el grupo de ratas sanas con los grupos tratados con antimicina A, azida de sodio o cianuro (* $p < 0.05$). De igual forma, también se observó una diferencia significativa al comparar el grupo de ratas con LTME en relación a los grupos tratados con antimicina A, azida de sodio o cianuro (* $p < 0.05$) (Figura 7).

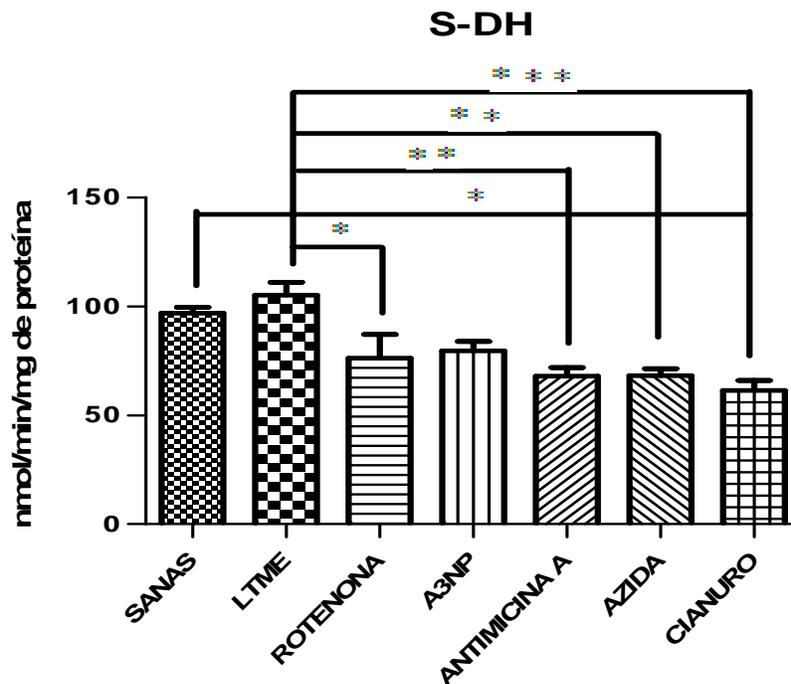


Figura 7. En la gráfica las barras muestran el valor promedio de la actividad de la enzima S-DH en la ME de ratas, una hora después de la lesión y de la administración de los distintos tratamientos (LTME = lesión traumática de médula espinal; A-3-NP = Ácido 3 nitropropionico). Cada grupo está representado por la media \pm desviación estándar (n=7). Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunns. * $p < 0.05$.

10.1.5 Actividad de la enzima S-DH evaluada 24 después de la LTME

Esta prueba se realizó 24 horas después de la lesión y no se encontró diferencia significativa entre los distintos grupos evaluados. No obstante lo anterior, los grupos de antimicina A y azida de sodio mostraron cierta tendencia a reducir la actividad de la enzima (Figura 8).

En ninguna de las dos evaluaciones se observó el efecto del inhibidor específico del A-3-NP sobre la enzima S-DH (Figura 7 y 8).

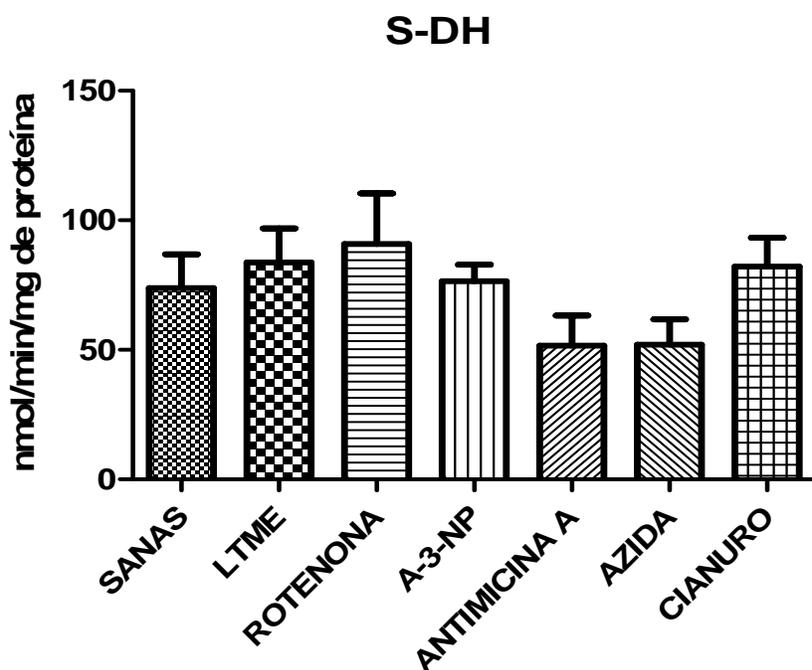


Figura 8. En la gráfica las barras muestran el valor promedio de la actividad de la enzima S-DH en la ME de ratas, 24 horas después de la lesión y de la administración de los tratamientos correspondientes (LTME = lesión traumática de médula espinal; A-3-NP = Ácido 3 nitropropionico). Cada grupo está representado por la media \pm la desviación estándar (n=7). ANOVA seguida de la prueba de Tukey DVS. *p<0.05.

10.1.6 Actividad de la enzima C-OX evaluada una hora después de la LTME

Esta prueba se realizó una hora después de la lesión y se encontró diferencia significativa cuando se comparo el grupo de LTME con los grupos de ratas tratadas con azida de sodio o cianuro (*p<0.05). Así mismo, también se encontró diferencia significativa cuando se comparó el grupo de ratas sanas con respecto a los grupos tratados con azida de sodio y cianuro (*p<0.05) (Figura 9).

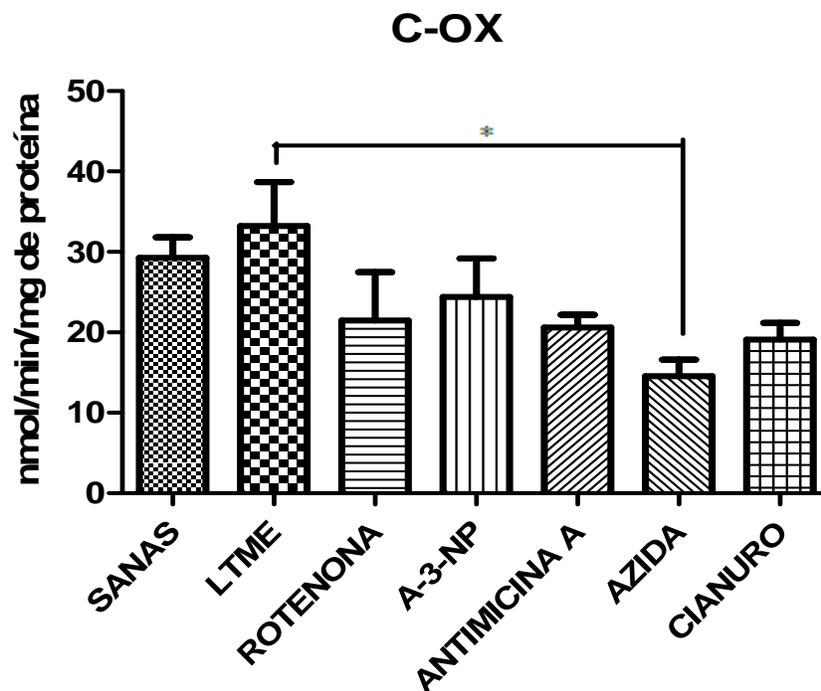


Figura 9. En la gráfica, las barras muestran el valor promedio de la actividad de la enzima C-OX en la ME de ratas, una hora después de la lesión y de la administración de los tratamientos correspondientes (LTME = lesión traumática de médula espinal; A-3-NP = Ácido 3 nitropropionico). Cada grupo está representado por la media \pm la desviación estándar (n=7). Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunns. *p<0.05.

10.1.7 Actividad de la enzima C-OX evaluada 24 horas después de la LTME

Esta prueba se realizó 24 horas después de la lesión encontrándose diferencia significativa cuando se comparó el grupo de LTME con los grupos de ratas tratadas con rotenona o azida de sodio (* $p < 0.05$). Así mismo, también se encontró diferencia significativa entre el grupo tratado con A-3-NP y el que recibió azida de sodio (* $p < 0.05$) (Figura 10).

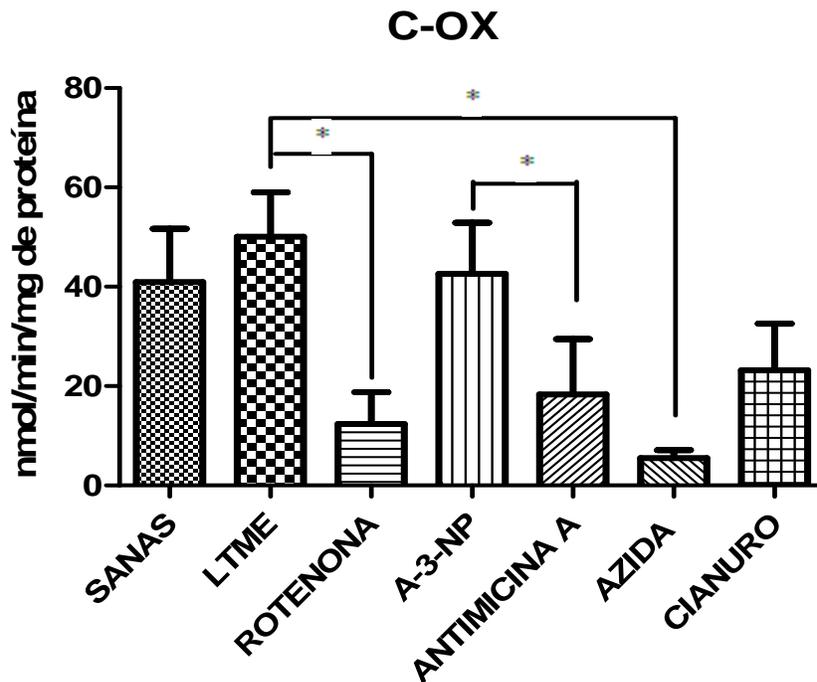


Figura 10. En la gráfica, las barras muestran el valor promedio de la actividad de la enzima C-OX en la ME de ratas, 24 horas después de la lesión y de la administración de los tratamientos correspondientes (LTME = lesión traumática de médula espinal; A-3-NP = Ácido 3 nitropropionico). Cada grupo está representado por la media \pm la desviación estándar ($n=7$). Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunns. * $p < 0.05$.

10.1.8 Evaluación del proceso de PL una hora después de la LTME

Esta prueba se realizó una hora después de la LTME, no encontrándose diferencia significativa entre los distintos grupos. Sin embargo, los grupos tratados con rotenona, azida de sodio o cianuro mostraron cierta tendencia a disminuir este fenómeno con respecto al grupo de LTME que no recibió tratamiento alguno (Figura 11). Más aún, en ninguno de los grupos tratados con los inhibidores metabólicos se incrementó el proceso de PL por arriba de los niveles observados en el grupo con LTME sin tratamiento.

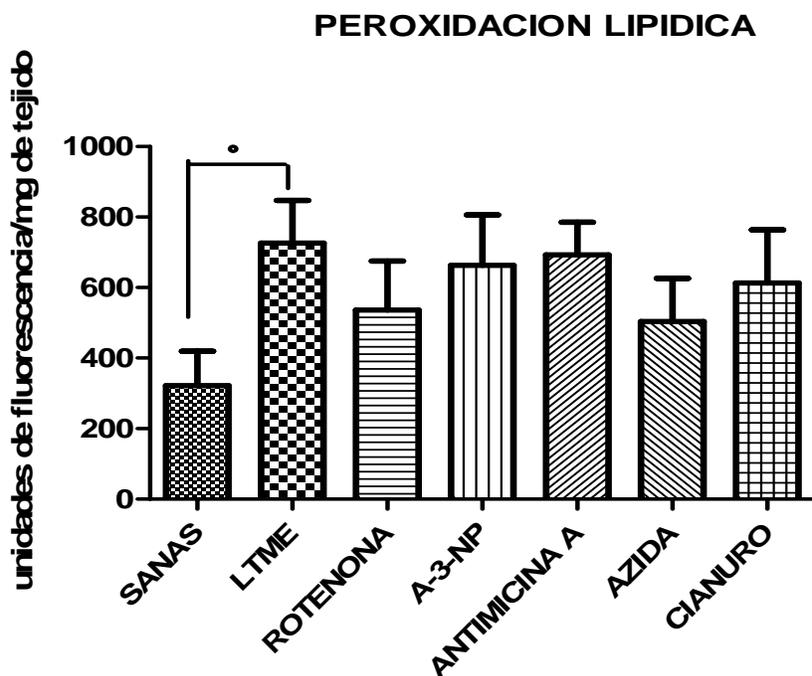


Figura 11. En la gráfica las barras muestran el valor promedio de la PL en la ME de ratas una hora después de la lesión y seguida a los tratamientos correspondientes (LTME = lesión traumática de médula espinal; A-3-NP = Ácido 3 nitropropionico). Cada grupo está representado por la media \pm la desviación estándar (n=7). ANOVA seguida de la prueba de Tukey. *p<0.05.

10.1.9 Evaluación del proceso de PL 24 horas después de la LTME

Esta prueba se realizó 24 horas después de la lesión y se observó diferencia significativa al comparar el grupo de LTME sin tratamiento con respecto a los grupos tratados con rotenona o azida de sodio ($*p < 0.05$) (Figura 12).

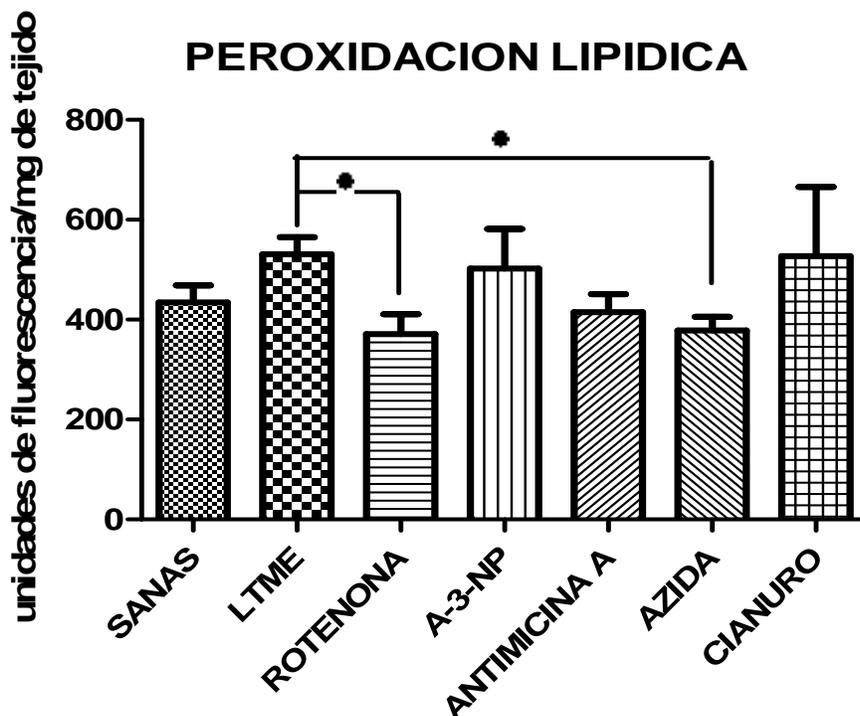


Figura 12. En la gráfica las barras muestran el valor promedio de la PL en la ME de ratas, 24 horas después de la lesión y de la administración de los tratamientos correspondientes (LTME = lesión traumática de médula espinal; A-3-NP = Ácido 3 nitropropionico). Cada grupo está representado por la media \pm desviación estándar (n=7). ANOVA seguida de la prueba de Tukey. $*p < 0.05$.

A partir de esta fase del estudio se decidió continuar la investigación solamente con el uso de los inhibidores rotenona y azida de sodio por los resultados obtenidos en la prueba piloto descrita anteriormente.

10.2 Experimentos finales

10.2.1 Inhibición y activación metabólica

En las pruebas bioquímicas se hizo la evaluación del activador metabólico CND, para hacer una comparación con los resultados obtenidos en este mismo fenómeno pero utilizando a los inhibidores más eficaces de las pruebas piloto que se realizaron previamente, los cuales fueron rotenona y azida de sodio, ya que estos dos inhibidores actuaron de manera consistente sobre su enzima y disminuyeron en forma significativa el proceso de PL.

10.2.2 Peroxidación Lipídica

Esta prueba se realizó 24 horas después de la lesión observándose diferencia significativa al comparar los grupos tratados con rotenona o azida de sodio con respecto al grupo de LTME sin tratamiento y al que recibió la CND (* $p < 0.05$) (Figura 13).

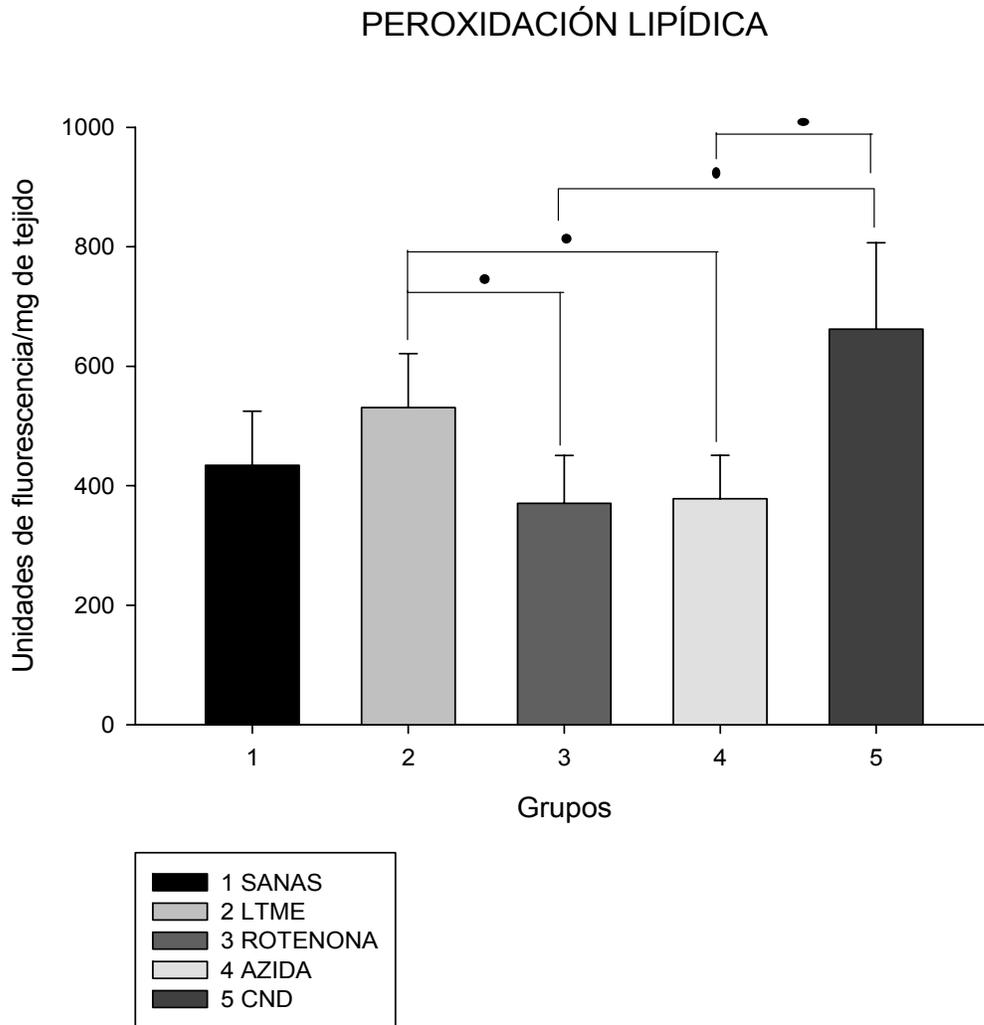


Figura 13. En la gráfica las barras muestran el valor promedio de la PL en la ME de ratas, 24 horas después de la lesión y de la administración de los tratamientos correspondientes (LTME = lesión traumática de médula espinal; CND = Cocarboxilasa No Degradable). Cada grupo está representado por la media \pm desviación estándar ($n=7$). ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey DVS. * $p < 0.05$.

10.2.3 Actividad de la enzima CPK

Se evaluó el efecto de la administración temprana de rotenona y azida de sodio sobre la actividad de CPK 24 horas después de la LTME y se encontró diferencia significativa cuando se comparó el grupo de ratas sanas con respecto al grupo de ratas tratadas con azida de sodio. Aunque el grupo tratado con rotenona mostró una clara tendencia a disminuir la actividad de la enzima CPK, no hubo diferencia significativa demostrable (* $p < 0.05$). En cambio, el grupo de LTME mantuvo los valores de la actividad de la enzima CPK elevados (Figura 14).

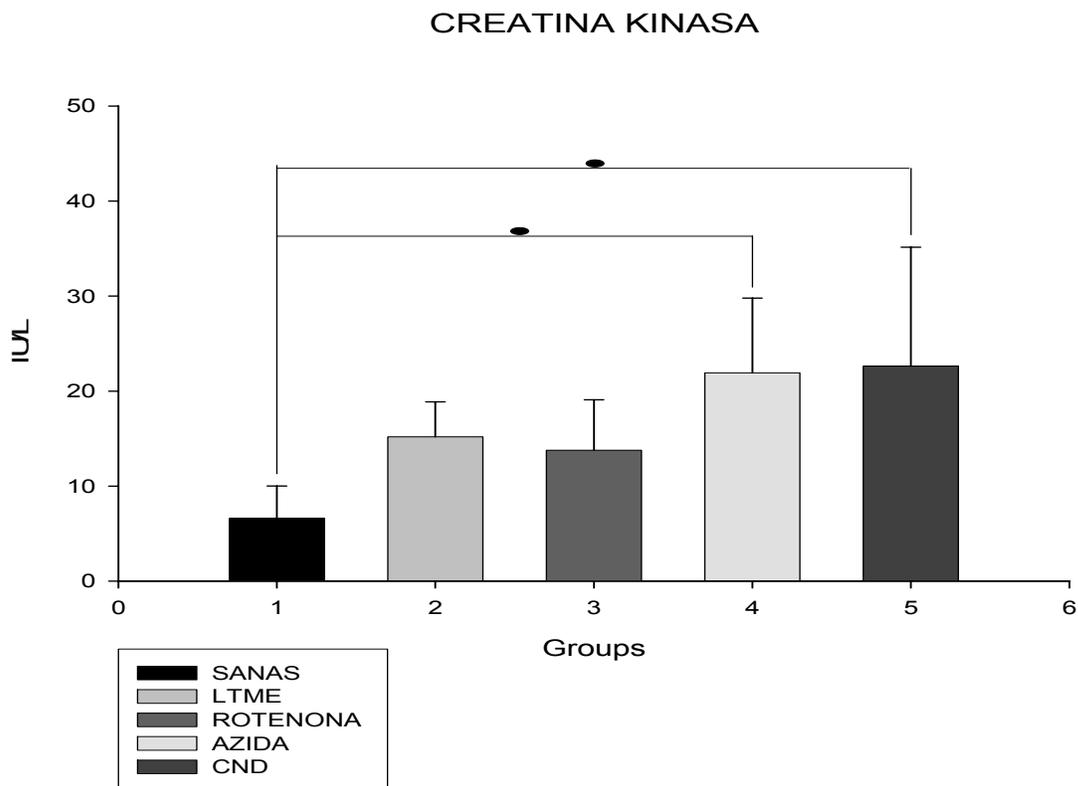


Figura 14. En la gráfica las barras muestran el valor promedio de la actividad de la enzima CK en la ME de ratas, 24 horas después de la lesión y de los tratamientos correspondientes (LTME = lesión traumática de médula espinal). Cada grupo está representado por la media \pm desviación estándar (n=7). ANOVA seguida de la prueba de Tukey. * $p < 0.05$.

10.2.4 Actividad de la enzima LDH

Se evaluó el efecto de la rotenona y de la azida de sodio sobre la actividad de LDH a las 24 horas y se encontró diferencia significativa cuando se comparo el grupo de ratas sanas con respecto al grupo de ratas tratadas con azida y el grupo de LTME sin tratamiento (*p<0.05). Aunque el grupo al que se le administró rotenona mostró una tendencia a disminuir la actividad de la enzima, no se demostró diferencia significativa (Figura 15).

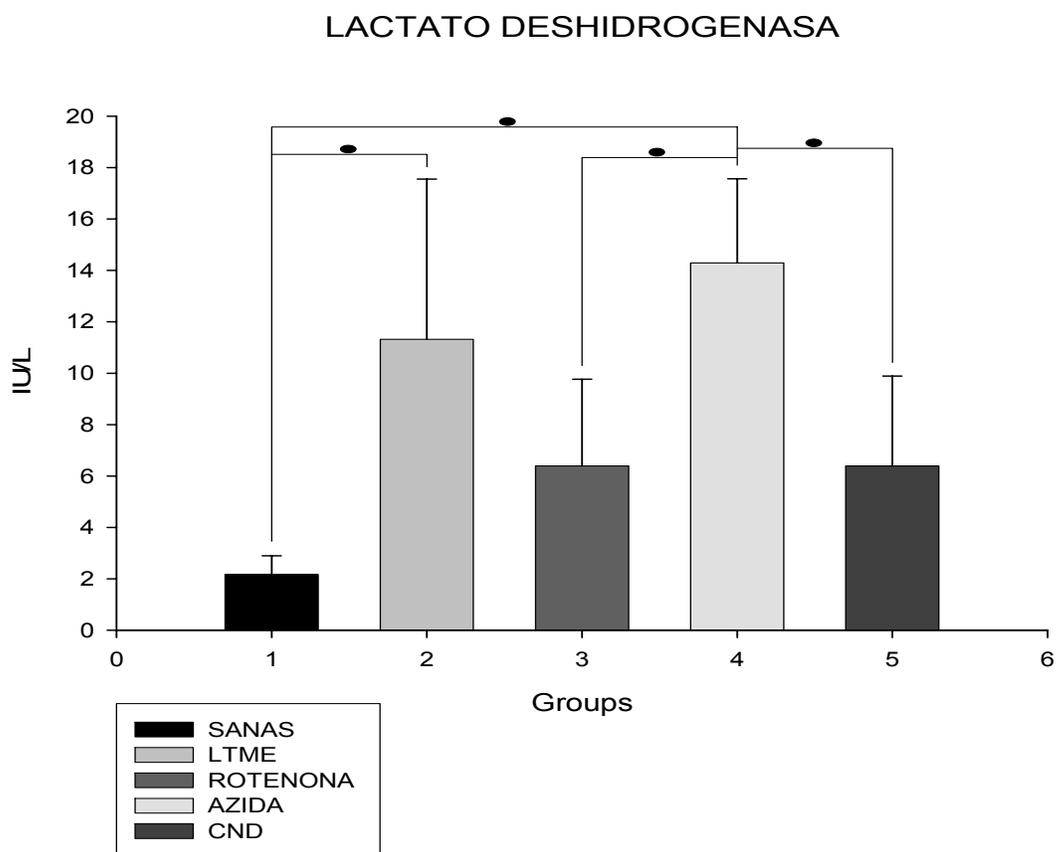


Figura 15. En la gráfica las barras muestran el valor promedio de la actividad de la enzima LDH en la ME de ratas, 24 horas después de la lesión y de la administración de los tratamientos correspondientes (LTME = lesión traumática de médula espinal; CND = Cocarboxilasa no degradable). Cada grupo está representado por la media \pm desviación estándar (n=7). ANOVA seguida de la prueba de Tukey. *p<0.05.

10.2.5 Evaluación funcional

Se evaluó la función motora de los miembros posteriores de las ratas con LTME con y sin la administración de los diferentes tratamientos observándose una diferencia significativa en la segunda y tercer semana de evaluación entre el grupo tratado con azida de sodio y el que recibió la CND (* $p < 0.05$). Durante el tiempo de estudio en el cual fueron evaluados los diferentes grupos se encontró que el que recibió el tratamiento con azida de sodio fue el que mostro una mayor y más rápida recuperación en relación a los demás grupos (Figura 16).

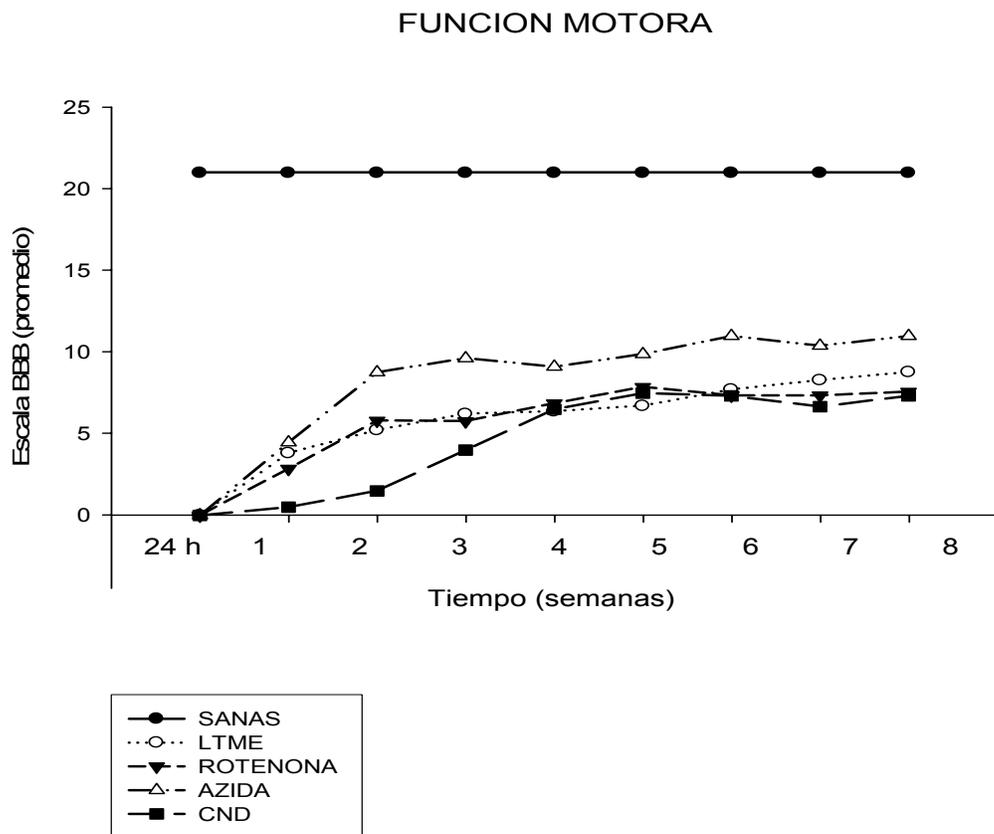


Figura 16. En la gráfica se observa el valor promedio de la función motora de los miembros posteriores en relación al tiempo transcurrido después de la LTME y de la administración de los tratamientos correspondientes. (LTME = lesión traumática de médula espinal; CND = Cocarboxilasa No Degradable). Cada grupo está representado por la media \pm desviación estándar ($n=7$). ANOVA de medidas repetidas. * $p < 0.05$.

10.2.6 Evaluación histológico-morfométrica

Tejido preservado. Cuando se compararon los grupos experimentales con el grupo de ratas sanas, se observaron diferencias significativas respecto a la cantidad de tejido preservado ($*p<0.05$), pero no se pudo demostrar significancia entre los grupos experimentales. No obstante lo anterior, el grupo que mostró la mayor cantidad de tejido preservado fue el tratado con azida de sodio, seguido por el grupo con LTME sin tratamiento, mientras que el grupo que menos tejido preservado presentó fue el grupo que recibió la rotenona (Figura 17).

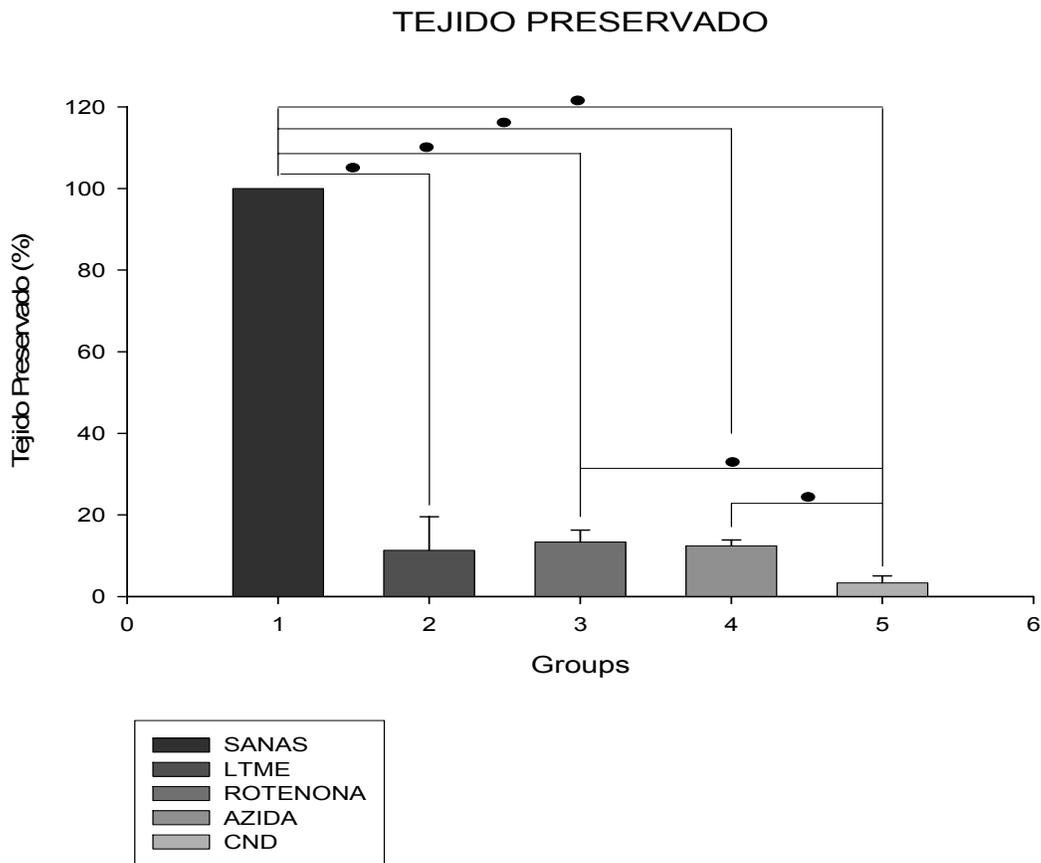


Figura 17. En la gráfica las barras muestran el valor en porcentaje de la cantidad de tejido medular preservado en ratas con LTME, 2 meses después de la lesión y de la administración de los tratamientos correspondientes (LTME = lesión traumática de médula espinal; CND = cocarboxilasa no degradable). Cada grupo está representado por una n=7. ANOVA seguida de la prueba de Tukey. $*p<0.05$.

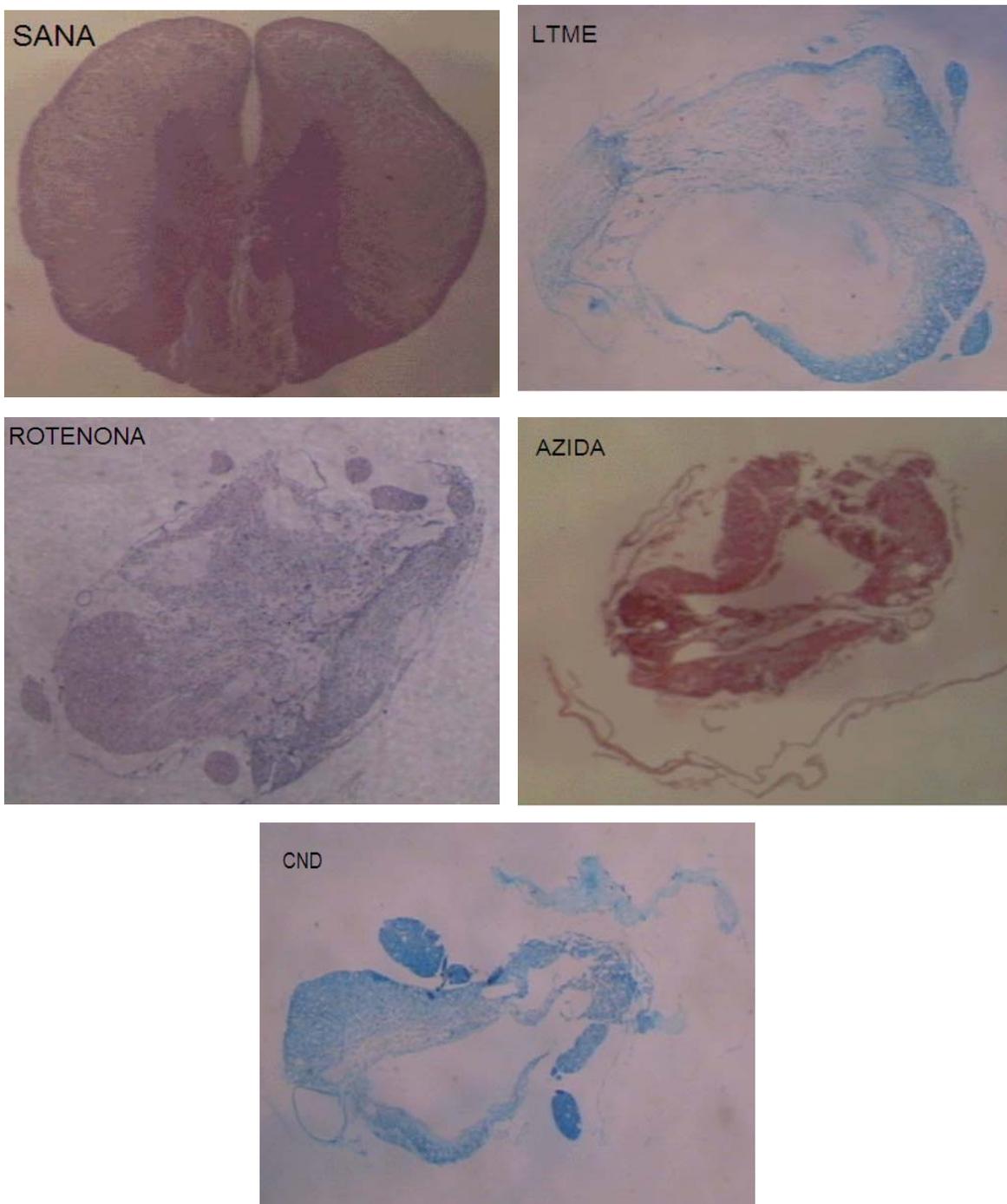


Figura 18. En las imágenes se muestran cortes transversales de la ME tomados del epicentro de la lesión o de la zona correspondiente en el grupo control en ratas, 2 meses después de la LTME y de la administración de los tratamientos correspondientes, en las que se observa la cantidad de destrucción de tejido medular como consecuencia de la LTME, (LTME = lesión traumática de médula espinal; CND = cocarboxilasa no degradable).

10.2.7 Temperatura rectal

Se determino la temperatura corporal con la finalidad de observar una posible relación entre esta y la inhibición metabólica, encontrándose que efectivamente una vez aplicado el inhibidor metabólico, la temperatura baja alrededor de los 30° C en comparación con la temperatura normal, manteniéndose así por lo menos durante la primera hora y media después de la LTME y la aplicación del inhibidor metabólico. Posteriormente, al medir la temperatura un día después de la lesión encontramos que la temperatura se incrementa de manera considerable casi alcanzando la temperatura corporal que mostró el grupo de ratas sanas. Los grupos de LTME y rotenona mostraron un comportamiento muy similar, siendo el tratado con azida el grupo que mostró, por lo menos en algunos tiempos, mantener más baja la temperatura en comparación con el resto de los grupos (Figura 19).

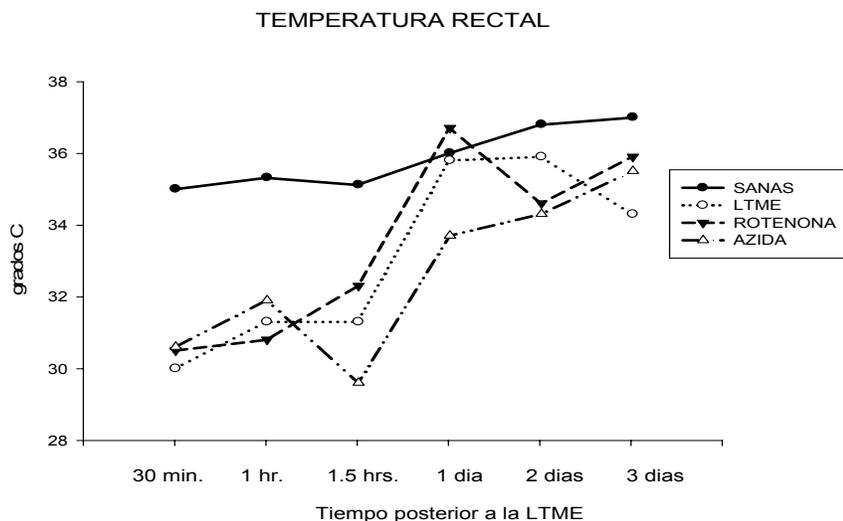


Figura 19. En la gráfica, las líneas muestran el valor promedio a través del tiempo que mostró la temperatura rectal de ratas con diferentes tratamiento (LTME = lesión traumática de médula espinal) a 1 y 1.5 horas y 1, 2 y 3 días después de la lesión. Cada punto representa el promedio.

11.DISCUSIÓN

La cadena respiratoria mitocondrial es un sitio donde se genera el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) de manera natural (Nicholls, 2008), cuyo nivel basal puede ser alterado por diferentes condiciones fisiológicas o fisiopatológicas (Kowaltowski y Vercesi, 1999). En este contexto se ha demostrado que mientras que un desacoplamiento completo o prolongado de la cadena mitocondrial resulta en una respuesta desfavorable de la función celular, existe una clara evidencia de que desacoplar la cadena mitocondrial de manera parcial o transitoria puede proteger contra un proceso como la excitotoxicidad (Maragos y Korde, 2004).

La producción del radical $O_2^{\cdot-}$ es muy sensible a la fuerza protomotriz y esta puede ser fuertemente disminuida por medio de un desacople mitocondrial. Diversos registros sugieren que la hipótesis del desacople de proteínas ya había sido planteada desde hace mucho tiempo con el fin de disminuir la formación del $O_2^{\cdot-}$ por parte de la mitocondria, aumentando así la protección en ciertos organismos contra enfermedades y daño por estrés oxidativo a expensas de una pérdida pequeña de energía (Brand y Esteves, 2005) y en este sentido, varios estudios han demostrado que el uso de inhibidores metabólicos puede ser benéfico en ciertas condiciones patológicas. Así, diversas intervenciones dirigidas a mantener baja la actividad mitocondrial, han proporcionado nuevas alternativas para atenuar lesiones agudas del sistema nervioso central (Maragos y Korde, 2004; Pandya y Cols, 2007).

En la LTME, los mecanismos secundarios de daño producen una importante cantidad de ERO (Dumont y Cols, 2001), generando oxidación en diferentes sustratos y favoreciendo con ello en el proceso de PL, considerada como la principal causa de daño en la ME debido a la importante cantidad de lípidos que constituyen la mielina (Azbill y Cols, 1997), por lo que consideramos que un desacople eficaz de la cadena mitocondrial podría ser un mecanismo que pudiera contribuir a la neuroprotección del tejido nervioso después de una LTME. Sugerimos anterior por el hecho de que el desacople de la cadena respiratoria incrementa la proporción respiratoria mitocondrial, disminuyendo la vida media de la UQ^{\bullet} en la cadena respiratoria y la probabilidad de generar radical $O_2^{\bullet-}$ por la donación electrónica de la UQ^{\bullet} al O_2 . Otra interesante hipótesis del porque el desacople de la cadena respiratoria reduce la generación de ERO se basa en el hecho de que el radical $O_2^{\bullet-}$ formado en el sitio citoplasmático de la membrana mitocondrial interna durante el ciclo de la coenzima Q, puede combinarse con protones y formar el radical perhydroxil, el cual puede difundirse rápidamente a través de la membrana interna y generar radical $O_2^{\bullet-}$ en la matriz mitocondrial. Este proceso puede disminuir la concentración del radical $O_2^{\bullet-}$ en la cara citoplasmática de la membrana mitocondrial interna, incrementando dicho radical en la matriz mitocondrial, lo cual es estimulado por la presencia del gradiente protónico. Este modelo también explica como el radical $O^{\bullet-}$ generado en la cara citoplasmática de la membrana mitocondrial interna difunde y es convertido en peróxido de hidrogeno por la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso en la matriz mitocondrial. No obstante lo anterior, es probable que

solo una fracción del radical $O_2^{\cdot -}$ generado en el espacio intermembranal se combine con protones, mientras que otra parte se combine con el *citocromo c* o promueva la oxidación lipídica (Kowaltowski y Vercesi, 1999).

Evidencias recientes, obtenidas en un modelo de isquemia focal, sugieren que inhibiendo el metabolismo energético aeróbico, se incrementa la actividad enzimática de la LDH, generando con ello un medio ácido (pH=6.2) que ejerce un mecanismo neuroprotector contra el daño provocado por la excitotoxicidad, debido a que un pH ácido genera cambios conformacionales en los rNMDA, principales responsables del fenómeno de excitotoxicidad, y porque el inhibir el metabolismo aeróbico implica una baja en la producción de ATP, moléculas energéticas necesarias para mantener estable la estructura de los rNMDA (Vornov y Cols, 1996).

En el presente trabajo se demostró que la disminución de la actividad metabólica favorece la recuperación motora, esto indica que probablemente se disminuya también el daño al tejido, aunque no se observaron diferencias significativas entre los grupos en la preservación del tejido.

Por otro lado la atenuación en el flujo de electrones provocada por la administración del inhibidor del complejo I mitocondrial rotenona en ratas con LTME, así como la limitada preservación de tejido medular y pobre recuperación funcional motora de los miembros posteriores, podría estar explicada porque en estudios previos se ha demostrado como el uso de este inhibidor en condiciones

de hipoxia no permite la estabilidad del Factor inductor de Hipoxia (HIF-1 α por sus siglas en ingles) el cual se ha asociado con la proliferación y supervivencia celular (Schroedl y Cols, 2002). En contra parte el inhibidor del complejo IV mitocondrial azida de sodio que en el modelo de la LTME mostró una recuperación funcional importante, podría estar actuando a través de permitir el arrastre del flujo electrónico hasta el complejo III mitocondrial, que ha sido propuesto por Schroedl y Cols (2002) como un sensor al oxígeno que permite la activación de señales intracelulares por las ERO mitocondriales, permitiendo la estabilización del HIF.

Al inhibir el metabolismo con azida de sodio, demostramos una disminución significativa en la formación de ERO además de incrementar la actividad de las enzimas LDH y CPK favoreciendo con ello la recuperación funcional de las extremidades posteriores de las ratas con LTME. Aunado a lo anterior, se demostró que con el uso de un activador metabólico como la CND, capaz de reactivar el metabolismo aeróbico (Patel y Korotchkina, 2001; Tittmann, 2009), se incrementa de manera considerable el proceso de PL y esto se refleja en la escasa recuperación funcional de los animales, resultados compatibles con estudios previos (Torres, 2000).

Por otra parte se ha descrito que en todos los organismos existen mecanismos compensatorios, protectores o de defensa mediante los cuales logran mantener un control sobre condiciones adversas. Un ejemplo, se observa en la tolerancia a la hipoxia por ciertos animales, problema que es resuelto a través de mecanismos bioquímicos y fisiológicos como el arresto metabólico y ciertas funciones capaces

de estabilizar las membranas celulares, lo cual constituye una de las estrategias más efectivas para extender la tolerancia a la hipoxia (Hochachka, 1986; Gentile y Cols, 1996; Andrews y Cols, 1998). Por lo anterior, el disminuir la actividad metabólica a través de inhibidores mitocondriales después de una LTME, podría funcionar como un mecanismo compensatorio o de defensa, que le permitiría al organismo evitar la formación masiva de moléculas dañinas tales como las ERO, lo que se reflejaría en un menor daño al tejido nervioso y por ende en una recuperación funcional significativa de los miembros posteriores de las ratas sujetas a este tratamiento, pese a que paralelamente se disminuya la formación de estructuras energéticas necesarias para el organismo, ya que este se mantiene con las reservas mínimas que evitan que las células nerviosas se dañen permanentemente.

12. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo concluimos que el tratar de restablecer o incrementar el metabolismo celular aeróbico con CND en las etapas agudas posterior a una LTME, incrementa el daño provocado por los mecanismos secundarios de lesión, activa procesos adversos como la PL y la muerte celular, además de que no favorece la recuperación de la función motora de los animales que recibieron dicho tratamiento.

De manera contrastante la inhibición del metabolismo celular aeróbico mediante la administración de azida de sodio en la etapa aguda posterior a una LTME, disminuye el daño provocado por los mecanismos secundarios de lesión, ya que reduce significativamente procesos adversos como la PL y la muerte celular, además de favorecer una mayor recuperación en la función motora de los animales que recibieron este tratamiento.

Los resultados permiten sugerir que algunos mecanismos secundarios de lesión desencadenados después de una LTME, podrían más bien ser mecanismos de protección, en particular la inhibición del metabolismo aeróbico a través de inhibidores de las enzimas de complejos mitocondriales.

13.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeles R H. Biochemistry. Jones and Bartlett Publishers, U.S.A. 1992 p. 484-485.

Aluja S. A. Animales de laboratorio y la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Gaceta Médica de México. 2002; 138(3): 294-298.

Anderson DK, Means ED, Waters TR, Green ES. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. J Neurosurg. 1982 Jan;56(1):106-13.

Andrews MT, Squire TL, Bowen CM, Rollins MB. Low-temperature carbon utilization is regulated by novel gene activity in the heart of a hibernating mammal. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jul 7;95(14):8392-7.

Azbill RD, Mu X, Bruce-Keller AJ, Mattson MP, Springer JE. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. Brain Res 1997; 765: 283–290.

Baptiste DC, Fehlings MG. Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. J Neurotrauma. 2006 Mar-Apr;23(3-4):318-34.

Baptiste DC, Fehlings MG. Update on the treatment of spinal cord injury. Prog Brain Res. 2007;161:217-33.

Bareyre FM, Schwab ME. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *Trends Neurosci.* 2003 Oct;26(10):555-63.

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

Bauchet L, Lonjon N, Perrin FE, Gilbert C, Privat A, Fattal C. Strategies for spinal cord repair after injury: a review of the literature and information. *Ann Phys Rehabil Med.* 2009 May;52(4):330-51.

Blum K. U. Cocarboxilase and the Erythrocyte Membrane. *Met Membrane permeability Erythrocytes Thombocytes Int.* 1968; 402-406.

Booth A. A., Khalifah R. G. y Hudson B. G. Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end products: comparison whit aminoguanidine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996. 7; 220(1): 113-119

Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF Jr, Holford TR, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon JC, Marshall LF, et al. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. *Results of*

the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg.* 1992 Jan;76(1):23-31.

Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. *N Engl J Med.* 1990 Oct 25;323(17):1207-9.

Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. 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 May 28;277(20):1597-604.

Bracken MB. Methylprednisolone and acute spinal cord injury: an update of the randomized evidence. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001 Dec 15;26(24 Suppl):S47-54.

Brand MD, Esteves TC. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* 2005 Aug;2(2):85-93.

Braughler JM, Hall ED. Effects of multi-dose methylprednisolone sodium succinate administration on injured cat spinal cord neurofilament degradation and energy metabolism. *J Neurosurg.* 1984 Aug;61(2):290-5.

Braugher JM, Hall ED. Lactate and pyruvate metabolism in injured cat spinal cord before and after a single large intravenous dose of methylprednisolone. *J Neurosurg.* 1983 Aug;59(2):256-61.

Burney RE, Maio RF, Maynard F, Karunas R. Incidence, characteristics, and outcome of spinal cord injury at trauma centers in North America. *Arch Surg.* 1993 May;128(5):596-9.

Chiba M, Ohmichi M, Inaba Y. [Sodium azide: a review of biological effects and case reports] *Nippon Eiseigaku Zasshi.* 1999 Jan;53(4):572-9.

Christie SD, Comeau B, Myers T, Sadi D, Purdy M, Mendez I. Duration of lipid peroxidation after acute spinal cord injury in rats and the effect of methylprednisolone. *Neurosurg Focus.* 2008;25(5):E5.

Conn E. y Stump P. K. *Bioquímica Energética.* John Wiley and Sons, Inc. New York. 1976. p137-155.

DeVivo MJ, Kartus PL, Stover SL, Fine PR. Benefits of early admission to an organised spinal cord injury care system. *Paraplegia.* 1990 Nov;28(9):545-55.

Devlin M. T. *Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas.* Ed. Reverté. 1991;Tomo I: p339-344.

Ditunno J. F. y Formai C. S. Chronic Spinal Cord Injury. *New Engl J. Med.* 1994; 330: 550-556.

Dobkin BH, Havton LA. Basic advances and new avenues in therapy of spinal cord injury. *Annu Rev Med.* 2004;55:255-82.

Dumont JR, Okonkwo OD, Verma S, Hurlbert JR, Boulos TP, Ellegala BD and Dumont SA. Acute spinal cord injury, part I: Pathophysiologic mechanisms. *Clinical Neuropharmacology* 2001; 24:254-264.

Farooque M, Hillered L, Holtz A, Olsson Y. Effects of methylprednisolone on extracellular lactic acidosis and amino acids after severe compression injury of rat spinal cord. *J Neurochem.* 1996 Mar;66(3):1125-30.

Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* 1999 Aug;49(6):377-91.

Fehlings MG. The Use of Methylprednisolone in Acute Spinal Cord Injury. *SPINE.* 2001; 26(24s): s55- s57.

Fehlings MG; Spine Focus Panel. Summary statement: the use of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001 Dec 15;26(24 Suppl):S55.

Frerichs KU, Smith CB, Brenner M, DeGracia DJ, Krause GS, Marrone L, Dever TE, Hallenbeck JM. Suppression of protein synthesis in brain during hibernation involves inhibition of protein initiation and elongation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Nov 24;95(24):14511-6.

Ganong FW. Manual de Fisiología Médica. Ed. El Manual Moderno. 1980 México, p575-77.

Gentile NT, Spatz M, Brenner M, McCarron RM, Hallenbeck JM. Decreased calcium accumulation in isolated nerve endings during hibernation in ground squirrels. Neurochem Res. 1996 Aug;21(8):947-54.

Gutteridge JM. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. FEBS Lett. 1986 Jun 9;201(2):291-5.

Hall ED, Wolf DL, Braugher JM. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. Dose-response and time-action analysis. J Neurosurg. 1984 Jul;61(1):124-30.

Hausmann ON. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. Spinal Cord. 2003 Jul;41(7):369-78.

Ho CH, Wuermsler LA, Priebe MM, Chiodo AE, Scelza WM, Kirshblum SC. Spinal cord injury medicine. 1. Epidemiology and classification. Arch Phys Med Rehabil. 2007 Mar;88(3 Suppl 1):S49-54.

Hochachka PW. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. Science. 1986 Jan 17;231(4735):234-41.

Hogg N. Free radicals in disease. Semin reprod endocrinol. 1998; 16: 241-248.

Hulsebosch CE. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. Adv Physiol Educ. 2002 Dec;26(1-4):238-55.

Hurlbert RJ. The Role of Steroids in Acute Spinal Cord Injury. SPINE. 2001;26(24s): s39-s46.

Karel MH. The manipulation of circadian rhythms. Arch. Toxicology. 1976; 36: 277-303.

Khemelevsrx Y. V. y Kornts-Kaya A. L. Diversas investigaciones realizadas en países socialistas sobre la acción de la cocarboxilasa degradable en procesos isquémicos. Com Inv Clin Latin 1987; 2: 24-25.

Kowaltowski JA. y Vercesi EA. Mitochondrial Damage Induced by Conditions of Oxidative Stress. Free Radical Biology & Medicine. 1999. 26 (3/4): 463-471.

Kwon B. K y Wolfram T. Spinal Cord Regeneration. SPINE. 2001; 26 (24s): s13-s22.

Lee Y, Mittelstaedt R. Impact of injury level and self-monitoring on free time boredom of people with spinal cord injury. Disabil Rehabil. 2004 Oct 7;26(19):1143-9.

Ley General de Salud de la República Mexicana. Título Séptimo: De la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación. Editorial Porrúa, sexta Edición., México D. F. 1990; pp430-431.

Lizuka H, Iwasaki Y, Yamamoto T, Kadoya S. Morphometric assessment of drug effects in experimental spinal cord injury. J Neurosurg. 1986 Jul;65(1):92-8.

Lu J, Ken WS, Ashwell y Waite P. Advances in secondary spinal cord injury. 2000; 25(14): 1859-1866.

Mac Donald J. F., Mody I. y Salter M. W. Regulation of NMDA receptors revealed by intracellular dialysis of murine neurons in culture. J. Physiol. (London). 1989; 414: 53-60.

McTigue DM. Potential Therapeutic Targets for PPARgamma after Spinal Cord Injury. PPAR Res. 2008;2008:517162.

Maragos WF, Korde AS. Mitochondrial uncoupling as a potential therapeutic target in acute central nervous system injury. *J Neurochem.* 2004 Oct;91(2):257-62.

McDonald JW, Sadowsky C. Spinal-cord injury. *Lancet.* 2002 Feb 2; 359 (9304): 417-25.

Mody I., Salter M. W. y MacDonald J. F. Requirement of NMDA receptor/channels for intracellular high-energy phosphates and the extent of intraneuronal calcium buffering in cultured mouse hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 1988; 93: 73-78.

Nicholls DG. Oxidative Stress and Energy Crises in Neuronal Dysfunction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008; 1147: 53–60.

Pandya JD, Pauly JR, Nukala VN, Sebastian AH, Day KM, Korde AS, Maragos WF, Hall ED, Sullivan PG. Post-Injury Administration of Mitochondrial Uncouplers Increases Tissue Sparing and Improves Behavioral Outcome following Traumatic Brain Injury in Rodents. *J Neurotrauma.* 2007 May;24(5):798-811.

Pardini CM. Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal. [Tesis posgrado]. México D. F. Universidad Nacional Autónoma de México; 1998.

Park LC, Zhang H, Sheu KF, Calingasan NY, Kristal BS, Lindsay JG, Gibson GE. Metabolic impairment induces oxidative stress, compromises inflammatory

responses, and inactivates a key mitochondrial enzyme in microglia. *J Neurochem.* 1999 May;72(5):1948-58.

Pass MA, Muir AD, Majak W, Yost GS. Effect of alcohol and aldehyde dehydrogenase inhibitors on the toxicity of 3-nitropropanol in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1985 Apr;78(2):310-5.

Patel MS, Korotchkina LG. Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. *Exp Mol Med.* 2001 Dec 31;33(4):191-7.

Priebe MM, Chiodo AE, Scelza WM, Kirshblum SC, Wuermsler LA, Ho CH. Spinal cord injury medicine. 6. Economic and societal issues in spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2007 Mar;88(3 Suppl 1):S84-8.

Rish BL, Dilustro JF, Salazar AM, Schwab KA, Brown HR. Spinal cord injury: a 25-year morbidity and mortality study. *Mil Med.* 1997 Feb;162(2):141-8.

Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, Fehlings MG. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus.* 2008;25(5):E2.

Rozanov V. A., Abu – Sali I., Rozanov A. I. Neurometabolic effects and antihypoxic activity of a vitamin-coenzyme complex, including thiamine

pyrophosphate, lipoate, phosphopantotenate, nicotinate and flavinadeine mononucleotide. *Vopr Med Khim* 1990; 36: 66-69.

Santamaría A, Ríos C. MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett*. 1993 Sep 3;159(1-2):51-4.

Schenk G. y Duggleby R. G. Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998; 30: 1297-1318.

Schroedl C, McClintock DS, Budinger SGR, and Navdeep SC. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1 α requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L922-L931.

Sheri L. Fink, Dora Y. Ho and Robert M. Sapolsky. Energy and Glutamate Dependency of 3-Nitropropionic Acid Neurotoxicity in Culture Experimental Neurology. 1996;138 (2): 298-304

Short DJ, El Masry WS, Jones PW. High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury - a systematic review from a clinical perspective. *Spinal Cord*. 2000 May;38(5):273-86.

Soden RJ, Walsh J, Middleton JW, Craven ML, Rutkowski SB, Yeo JD. Causes of death after spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2000 Oct;38(10):604-10.

Soloway BS. Naturally Occurring Insecticides. *Environmental Health Perspectives* 1976; 14: 109-117.

Sousa SC, Maciel EN, Vercesi AE, Castilho RF. Ca²⁺-induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone. *FEBS Lett*. 2003 May 22;543(1-3):179-83.

Stokes BT, Fox P, Hollinden G. Extracellular calcium activity in the injured spinal cord. *Exp Neurol*. 1983 Jun;80(3):561-72.

Stripling TE. The cost of economic consequences of traumatic spinal cord injury. *Paraplegia News*. 1990: 50-54.

Strumilo S., Czerniecki J., y Dobrzyn P. Regulatory effect of thiamin pyrophosphate on pig Heart pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999. 16; 256(2): 341-345.

Szewczyk A, Wojtczak L Mitochondria as a Pharmacological Target. *Pharmacol Rev*. 2002; 54:101–127

Tadić V. The in vivo effects of cyanide and its antidotes on rat brain cytochrome oxidase activity. *Toxicology*. 1992 Nov 22;76(1):59-67.

Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*. 1991 Jul;75(1):15-26.

Tator CH. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol*. 1995 Oct;5(4):407-13.

Thomas CE, Morehouse LA, Aust SD. Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 1985 Mar 25;260(6):3275-80.

Tittmann K. Reaction mechanisms of thiamin diphosphate enzymes: redox reactions. *FEBS J*. 2009 May;276(9):2454-68.

Torres CS. Efecto de la cocarboxilasa no degradable sobre el metabolismo celular, la preservación de tejido y la función motora de ratas adultas con lesión traumática moderada de la médula espinal. [Tesis de maestría] México: Universidad autónoma Metropolitana.; 2000.

Túnez I, Santamaría A. [Model of Huntington's disease induced with 3-nitropropionic acid] *Rev Neurol*. 2009 Apr 16-30;48(8):430-4.

Vornov JJ, Thomas AG, Jo D. Protective effects of extracellular acidosis and blockade of sodium/ hydrogen ion exchange during recovery from metabolic inhibition in neuronal tissue culture. *J Neurochem* 1996; 67: 2379–2389.

Werner R. *Essential Biochemistry and Molecular Biology*. Appleton and Lange Eds. U.S.A. 1992 pp49-50.

Whiteneck GG, Charlifue SW, Frankel HL, Fraser MH, Gardner BP, Gerhart KA, Krishnan KR, Menter RR, Nuseibeh I, Short DJ, et al. Mortality, morbidity, and psychosocial outcomes of persons spinal cord injured more than 20 years ago. *Paraplegia*. 1992 Sep;30(9):617-30.

Young W, Flamm ES. Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury. *J Neurosurg*. 1982 Nov;57(5):667-73.

Zhou F, Zhu X, Castellani RJ, Stimmelmayer R, Perry G, Smith MA, Drew KL. Hibernation, a model of neuroprotection. *Am J Pathol*. 2001 Jun;158(6):2145-51.