

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“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
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:
BIOL. SERGIO TORRES CASTILLO

Tutores:
Dra. Hermelinda Salgado Ceballos
Dr. Gabriel Guízar Sahagún

Asesor:
Dra. Alicia Lara Lemus

México, D. F. Noviembre del 2002

La Maestría en Biología Experimental con número de registro 309-0 de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa se encuentra dentro del padrón de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Mi agradecimiento al consejo nacional de ciencia y tecnología por la beca-crédito otorgada, número 153029

Agradecimientos

A la Dra. Salgado, por su gran apoyo y confianza.

Al Dr. Guízar por su honestidad y sus aportaciones siempre atinadas.

A la Dra. Lara por el apoyo en los momentos difíciles.

A todos aquellos que con su participación hicieron posible este trabajo.

A toda mi familia por el apoyo permanente.

A mi esposa por su tolerancia y amor.

A mi hija por ser mi estímulo principal.

Si avanzo... seguirme;

Si me detengo... empujarme;

Si retrocedo... matadme.

Ernesto Che Guevara

ABREVIATURAS

ANOVA	análisis de varianza
ATP	adenosina trifosfato
BBB	Basso, Beattie y Bresnahan
CAT	catalasa
CND	cocarboxilasa no degradable
CPK	creatinina fosfocinasa
DSO	dismutasa del superóxido
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
LP	lipoperoxidación
LTME	lesión traumática de la médula espinal
MDA	malondialdehído
ME	médula espinal
MP	metilprednisolona
NADPH	nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato
O ₂ ^{°-}	anión superóxido
Ons	sintasa de óxido nítrico
rNMDA	receptores de N-metil-D-aspartato

RESUMEN

La administración de megadosis (30 mg/Kg de peso corporal) de metilprednisolona (MP) en la fase aguda posterior a una lesión traumática de la médula espinal (LTME), es hasta la fecha el único tratamiento aceptado en los seres humanos. Sin embargo en los resultados obtenidos existe controversia incluso en modelos experimentales. Por ello es que se continua buscando alternativas terapéuticas para este tipo de lesión; tal es el caso de coarboxilasa no degradable (CND), coenzima que en otras condiciones patológicas apoya la producción de energía, restableciendo el metabolismo aeróbico, además de mantener la reserva alcalina y normalizar el pH. **OBJETIVO:** Determinar el efecto de CND sobre el metabolismo celular, la preservación de tejido y la función motora de ratas adultas con lesión traumática moderada de médula espinal. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se estudiaron ratas adultas de la cepa Long-Evans divididas al azar en 7 grupos (n=6); grupo 1: ratas sanas sin LTME; grupo 2: ratas con LTME; grupo 3: ratas con LTME + CND; grupo 4: ratas con LTME + MP; grupo 5 ratas con LTME + CND + MP; grupo 6 ratas con LTME + CND + dismutasa del superóxido (DSO) + catalasa (CAT) y grupo 7 ratas con LTME + DSO + CAT. Los animales designados fueron sometidos a LTME de intensidad moderada, utilizando el modelo de lesión por contusión, dejando caer un peso de 15 g a una distancia de 5 cm. sobre la médula espinal (ME) expuesta. A los 5 min., 2, 6, y 20 h después de la LTME, se administro la MP a dosis de 30 mg/Kg de peso corporal. La CND se administró a los mismos tiempos con dosis progresivamente mayores (50, 80, 100 y 150 mg/Kg). La DSO y CAT se aplicaron en 4 dosis c/u a razón de 1.2 y 2.5 mg/Kg de peso corporal respectivamente. Para los estudios bioquímicos, las ratas se sacrificaron 24 h después por decapitación y se extrajo 1 cm de médula espinal con la zona de lesión en el centro, se libero de meninges y se homogenizó para evaluar las concentraciones de lactato, Creatinina fosfoquinasa (CPK) y Malondialdehído (MDA) por espectrofotometría. Los animales que se utilizaron para la parte clínica, se evaluaron durante 2 meses después de la LTME utilizando la escala motora Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) y finalmente se realizaron las pruebas histológicas y morfométricas para determinar el tejido preservado y numero de axones mielinizados. **RESULTADOS:** A nivel bioquímico, la administración de CND incrementa los niveles de MDA, disminuye significativamente los niveles de lactato ($p < 0.05$) y no modificó los niveles de CPK. Al combinar CND con MP no se disminuyeron los niveles de MDA con respecto al grupo control. Sin embargo al combinar CND con DSO + CAT se observo una disminución de los niveles de lactato y se mantuvo disminuida la concentración de MDA. En el aspecto clínico no se observo diferencia significativa entre los grupos con diferentes tratamientos ($p < 0.05$), no obstante el grupo de los antioxidantes fue el que mayor recuperación presento; los grupos de CND y MP también presentaron escasa recuperación motora y el grupo tratado con CND + MP no presento recuperación alguna. Morfología; a) Aunque no se presento

diferencia significativa ($p < 0.05$) el grupo con mayor tejido preservado fue el tratado con DSO + CAT, seguido por el de lesión sin tratamiento. El grupo con menor cantidad de tejido preservado fue el tratado con CND, seguido por el tratado con CND + DSO + CAT. b) No se observó diferencia significativa entre los grupos experimentales ($p < 0.05$). Sin embargo, el grupo de lesión sin tratamiento presentó el mayor número de axones mielinizados con respecto a los grupos con tratamiento, seguido por los tratados con MP, CND y antioxidantes. **CONCLUSIONES:** Después de una LTME de intensidad moderada en ratas, la CND es un compuesto capaz de disminuir la acidez intracelular, pero incrementa el proceso de lipoperoxidación. Al combinarlo con DSO + CAT se disminuyó el proceso de lipoperoxidación, lo cual no sucede cuando se combinó con megadosis de MP. En cuanto a la recuperación motora, se observó que la CND provoca una recuperación similar a la de MP; obteniéndose mayor recuperación cuando se combina con los antioxidantes. Así mismo, la CND preservó la menor proporción de tejido nervioso y aun cuando se combinó con antioxidantes ó MP no se observó un mejor efecto. Por lo anterior es posible que el intentar restaurar el metabolismo energético en las etapas iniciales después de una LTME puede producir efectos negativos que finalmente se reflejan en la recuperación clínica.

ÍNDICE

Introducción.....	1
Antecedentes.....	1
Fisiopatología de la LTME.....	2
Tratamiento farmacológico de la LTME.....	5
Cocarboxilasa no degradable.....	6
Antioxidantes.....	9
Dismutasa del superóxido mimética.....	9
Catalasa.....	10
Problema.....	12
Hipótesis.....	12
Objetivo general.....	13
Objetivos particulares.....	13
Material y método.....	14
Muestra.....	14
Diseño del estudio.....	14
Aspectos éticos.....	14
Variables.....	14
Diseño experimental.....	15
Criterios de inclusión.....	15
Criterios de exclusión.....	16
Técnica anestésica.....	16
Lesión traumática de la médula espinal.....	16
Administración de fármacos.....	17
Obtención de la muestra.....	17
Determinación de lactato.....	18
Determinación de CPK en plasma.....	18
Determinación de MDA en tejido.....	19
Evaluación funcional.....	19
Evaluación histológica.....	22

Resultados.....	25
Experimentos preliminares.....	25
a) Ratas decapitadas y perfundidas.....	25
- Lactato en plasma y tejido.....	26
- MDA en tejido.....	27
- CPK en plasma y tejido.....	28
b) Determinación de la dosis de CND a administrarse.....	29
Bioquímicos.....	30
- Lactato.....	30
- MDA.....	31
- CPK.....	32
Evaluación funcional.....	33
Morfológicos.....	34
- Tejido preservado.....	34
- Axones mielinizados.....	35
Discusión.....	36
Conclusiones.....	41
Bibliografía.....	43

INTRODUCCIÓN.

Antecedentes.

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

De acuerdo a la intensidad con la que se produce el daño, la LTME ocasiona alteraciones estructurales y funcionales que oscilan desde el bloqueo transitorio de la conducción de los impulsos nerviosos, hasta la pérdida total de las funciones motora y sensitiva por debajo del sitio dañado, traducéndose en paraplejia si solo afecta miembros inferiores o en tetraplejia si afecta miembros inferiores y superiores (Tator y Fehlings., 1991).

A nivel mundial la LTME presenta una incidencia anual que oscila entre 12 y 40 casos por millón (Whiteneck et al., 1992; Dixon et al., 1993; Dituno y Formal., 1994; Tator., 1995 y Fehlings., 2001), reportándose específicamente para nuestro país, en el único estudio que existe hasta la fecha, una incidencia anual para la zona metropolitana de 12 casos por millón (Ibarra et al., 1990).

Aproximadamente, el 80% de las personas con LTME son del sexo masculino (Bracken et al., 1992 y Fehlings., 2001) y al momento de la lesión alrededor del 75% se encuentra entre los 15 y los 35 años de edad (Eisenberg y Tierney., 1985; Tator; Fehlings., 1991 y Fehlings., 2001), ubicándose entre las principales causas de esta patología a 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 y Fehlings., 2001).

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 et al., 1990; Burney et al., 1993) y la frecuencia del suicidio entre los pacientes parapléjicos rebasa 10 veces la reportada en poblaciones similares pero sin este tipo de lesión (Rish et al., 1997).

Por todo lo anterior, la LTME representa un gasto económico elevado que comprende el ocasionado por el tratamiento inicial y el 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 y Fehlings., 2001). 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.

Fisiopatología de la Lesión Traumática de Médula Espinal.

El principal problema en una LTME radica en su complejidad, ya que su fisiopatología involucra tanto al daño mecánico primario como, a los mecanismos secundarios de lesión. Lo relevante es que la mayor parte de la destrucción del substrato anatómico necesario para la recuperación neurológica, y el déficit funcional total, son el resultado de los mecanismos secundarios de lesión más que del daño mecánico primario (Young y Flamm., 1982; Stokes et al., 1983; Iizuka et al., 1986; y Fehlings., 2001).

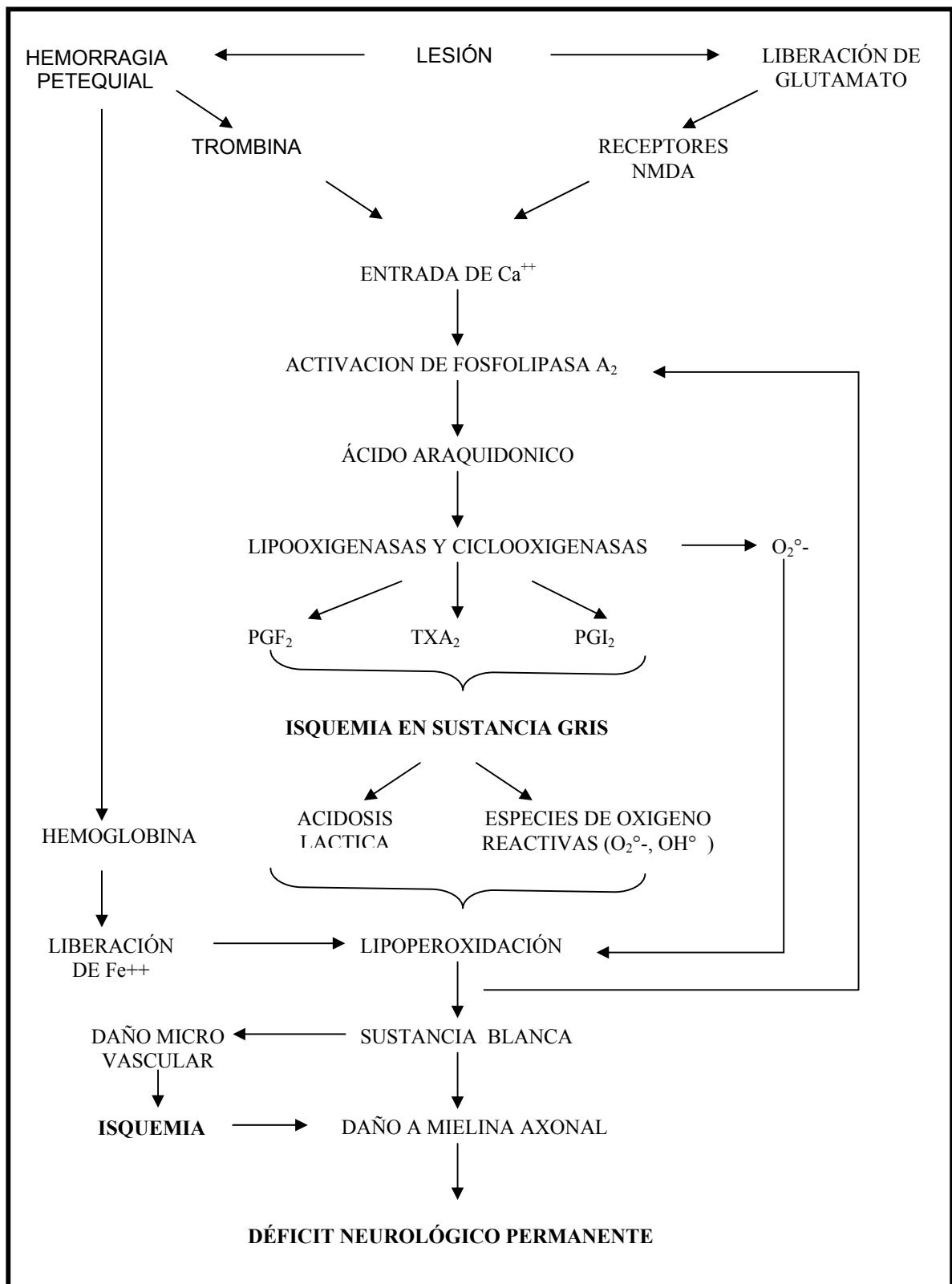
Entre los mecanismos secundarios de lesión se considera a la isquemia como uno de los más relevantes, ya que aunada a otros procesos patológicos como el edema y la hemorragia, dificultan e incluso impiden la perfusión de la médula espinal (ME), no sólo en el sitio de lesión, sino en varios segmentos medulares, provocando bajos niveles energéticos celulares, menor disposición de ATP,

bloqueo de la bomba sodio-potasio y otros canales, acumulación citosólica de calcio e hidrogeniones, despolarización de la membrana, muerte celular (Jannot y Raccach., 1999) y por ende incremento en la extensión de la lesión original (Fig. 1). El proceso isquémico suele estar seguido por una fase de reperfusión tisular la cual puede incrementar el daño en la ME al promover el flujo de especies de oxígeno reactivas y otros productos tóxicos que desencadenan numerosos procesos autodestructivos y producen déficit funcional permanente (Tator y Fehlings., 1991; Lu et al., 2000 y Fehlings., 2001).

La isquemia produce alteraciones en la vía glucolítica aeróbica que obligan a las células a recurrir a un mecanismo homeostático de respiración anaerobia que sólo les proporciona 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, permitiéndoles sobrevivir precariamente. Sin embargo, la célula en anaerobiosis agota el ATP intracelular en poco tiempo, la membrana se despolariza y se bloquean tanto la bomba ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)-ATPasa como la entrada de nuevas moléculas de glucosa, por lo que la célula no puede por sí misma volver a un metabolismo aeróbico, que le proporcione 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (Conn y Stump., 1976).

En condiciones anaerobias, el ácido pirúvico procedente de la glucólisis, se reduce a ácido láctico ocasionando incremento en los niveles de lactato, obtención insuficiente de energía, acidez intracelular y reducción en los sistemas amortiguadores a nivel perivascular y en la sangre. La acidosis resultante interfiere con la función enzimática normal (Ganong, 1980), proporciona un medio ambiente favorable para la formación de especies reactivas de oxígeno (Hogg, 1998) y la subsecuente lipoperoxidación, que se ve incrementada por la presencia de hierro (Thomas et al., 1985; Gutteridge, 1986), además de constituir un mecanismo importante en la formación del edema intracelular en células del sistema nervioso (Staub et al., 1993). La acidosis y la disfunción tisular coexisten simultáneamente y si no se corrigen en corto plazo producen despolarización de la membrana, muerte celular y lesiones orgánicas irreversibles (Conn y Stump., 1976).

Figura 1. Fisiopatología de la lesión aguda en médula espinal (Hall., 1992).



Tratamiento Farmacológico de la Lesión Traumática de Médula Espinal.

Se han intentado diferentes tipos de tratamiento para la LTME, como es el uso de esteroides, antagonistas de receptores a glutamato, la inhibición de la oxido nítrico sintasa, la administración de factores tróficos en el sitio de lesión o la modulación de la respuesta inflamatoria (Kwon y Wolfram., 2001). Sin embargo, en la actualidad, el único fármaco aceptado a nivel mundial para el manejo temprano de esta patología en seres humanos es la metilprednisolona (MP), esteroide de tipo glucocorticoide (fig. 2) que administrado en megadosis (30 mg/Kg de peso corporal) y de manera temprana fue el primer medicamento que permitió la recuperación motora y sensitiva en forma parcial de pacientes con LTME (Bracken et al., 1990; Bracken et al., 1992; Hall., 1992; Bracken et al., 1997; Wing et al., 1998 y Bracken., 2001). Se ha descrito que la MP mejora y mantiene el metabolismo energético aeróbico (Anderson et al., 1982; Braughler y Hall, 1983; Braughler y Hall, 1984), previene la isquemia postraumática en la ME manteniendo el flujo sanguíneo tisular (Young y Flamm, 1982; Hall et al., 1984), disminuye la formación de ácido láctico y los niveles de arginina (substrato necesario para la producción de oxido nítrico) y disminuye las concentraciones extracelulares de glutamato (Farooque et al., 1996).

Sin embargo, el empleo de MP en pacientes con LTME no ha permitido una recuperación clínica completa (Bracken et al., 1992) y aún existe controversia en los resultados funcionales obtenidos por diferentes grupos con la administración de este fármaco (Faden et al., 1984; Hall et al., 1984; Iizuka et al., 1986; Holtz et al., 1990; Constantini y Young 1994; Braughler et al., 1997 y Fehlings et al., 2001).

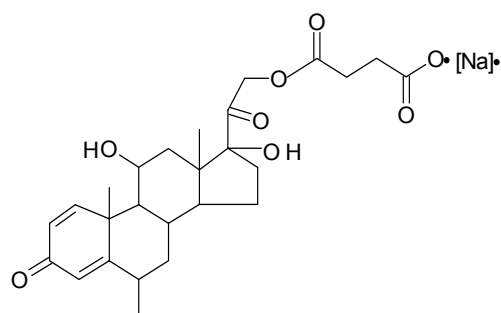


Figura 2. Metilprednisolona succinato de sodio.

En fechas recientes, se ha llegado incluso a recomendar, que el manejo con altas dosis de MP sea excluido como una intervención posterior a una LTME. Lo anterior se debe a que en algunos estudios no se ha podido demostrar una recuperación funcional significativa ya que en otros se han resaltado los efectos deletéreos que provoca (Short et al., 2000 y Hurlbert., 2001), por lo que es necesario continuar en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que solas o aunadas a la MP permitan resultados más consistentes.

Cocarboxilasa no degradable.

La cocarboxilasa no degradable (CND) o pirofosfato de tiamina es una coenzima que apoya la producción de energía y que ejerce sus efectos a nivel de la mitocondria, en el mantenimiento de la reserva alcalina y la normalización del pH, el cual en organismos normales se conserva entre 7.35 y 7.45 unidades. La CND 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 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 el metabolismo celular, hasta que la circulación colateral modifique el cuadro.

La CND es una molécula con enlace fosfato de alta energía (fig, 3), que participa en la síntesis de neurotransmisores y es indispensable en el metabolismo oxidativo al funcionar como coenzima de 3 importantes enzimas (Fig, 4):

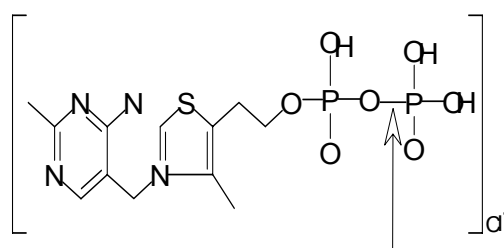


Figura 3. Cocarboxilasa no degradable.

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 Khalifah, 1996).

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 y Schenk y Duggleby., 1998).

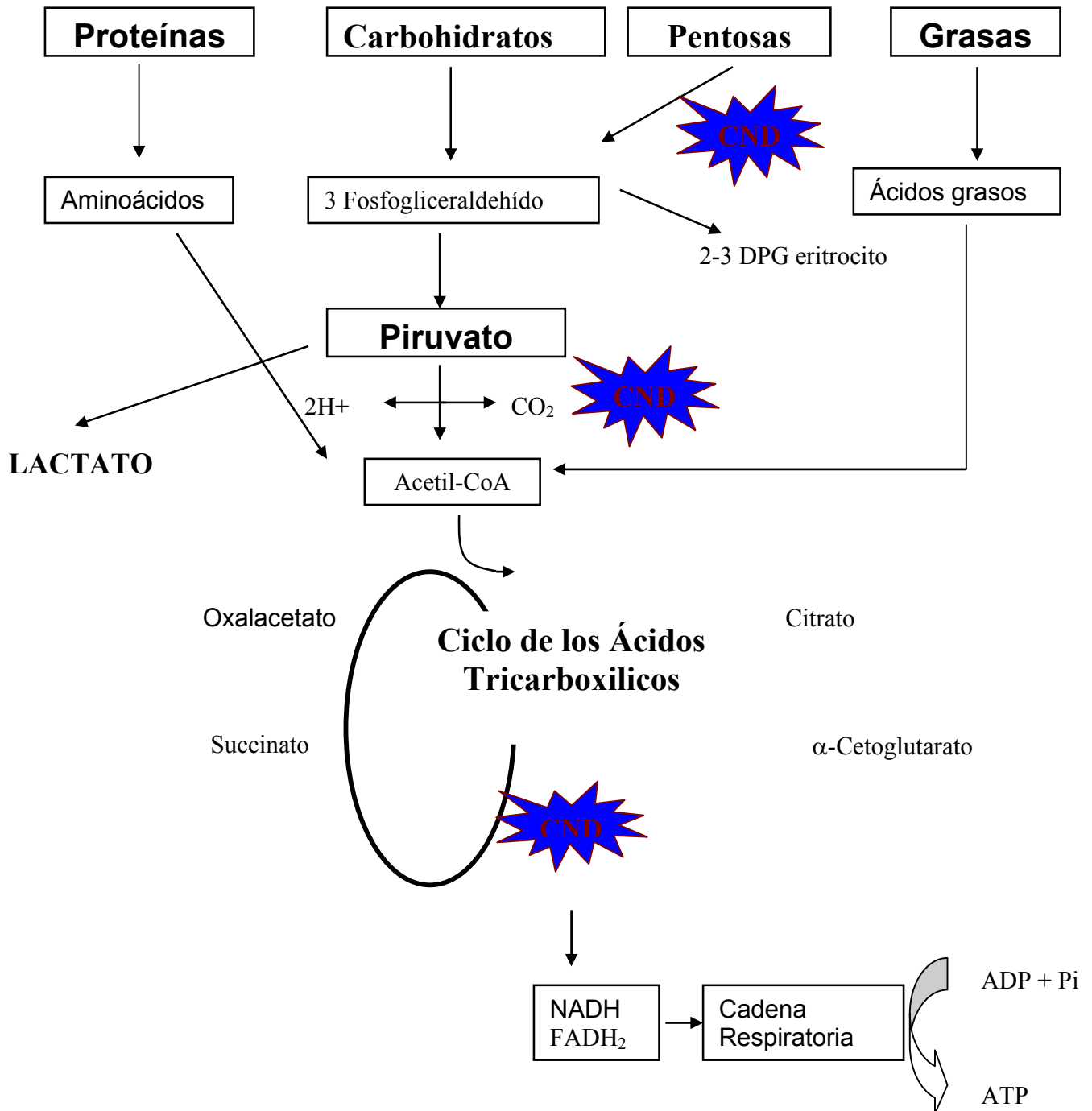
Piruvato deshidrogenasa: realiza la descarboxilación oxidativa del ácido piruvico proveniente de la glucólisis para formar acetil-CoA, combustible necesario para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Strumilo y Czernieck, 1999).

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

Debido a que los fenómenos hipóxicos-hipovolémicos bloquean la actividad de la piruvato deshidrogenasa y otros complejos enzimáticos, la célula desvía la producción de energía hacia la glucólisis anaerobia y es 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 aún en condiciones de hipoxia, logra mantener la producción de energía a pesar de las condiciones desencadenadas, revirtiendo la acidosis metabólica (Abeles, 1992 y Werner, 1992).

Figura 4. Sitios de acción de la CND.



La vida media de la CND después de administrar un bolo de 50 mg de tiamina es de 664 minutos y más del 50% se excreta por orina (Tallaksen et al., 1993). En cuanto a su toxicidad, se ha reportado que la máxima dosis tolerada en animales sanos es de 120 mg/Kg, ya que con 150 mg/Kg muere el 15% y con 250 mg/Kg, el 65% (Malachovs, 1965). No obstante lo anterior, en animales con problemas hipoxicos se ha reportado que dosis de 150 mg/Kg de peso son benéficas y ayudan a revertir el proceso y a disminuir el daño (Larrieu et al., 1987b).

A la fecha la CND se ha empleado con éxito en el tratamiento auxiliar de patologías tales como infarto al miocardio (Larrieu et al., 1987b; Lindenbaum et al., 1989), trombosis renal o mesentérica (Benítez, 1996), alcoholismo (Rooprai et al., 1997), shock séptico (Lindenbaum et al., 1989), acidosis diabética y metabólica, hipoxia neonatal (Larrieu et al., 1987a; Yllescas et al., 1997), accidentes anestésicos, procesos neuríticos, accidente cerebral vascular e isquemia cerebral (Eninia, 1974).

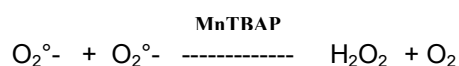
En patologías similares también se han empleado algunos antioxidantes dentro de los que se destacan la dismutasa del superóxido y la catalasa.

Dismutasa del superóxido mimética.

La dismutasa del superóxido (DSO) fue la primer enzima que se conoció, que actuaba sobre un radical libre, se conoce que existen tres diferentes tipos la citoplasmática, mitocondrial y una de tipo extracelular, el tamaño y características de esta enzima (compuesta por dos subunidades idénticas de peso molecular de 31.2 kd; con aproximadamente 25 residuos de glicina por cada subunidad para la DSO citosólica) evita que se transporten a través de las membranas celulares, por lo que en la actualidad se han desarrollado compuestos miméticos que tienen una actividad similar y a demás, si pueden atravesar las membranas celulares.

La dismutasa del superóxido mimética (fig, 5) de la cual su formula química es Manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride (MnTBAP) y es una

molécula con la capacidad de atravesar a las membranas celulares, tiene la misma función que la SDO, dismutando el anión superóxido ($O_2^{\circ-}$) y formando peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2).



Estudios realizados en hepatocitos de ratas indican que el 20% del $O_2^{\circ-}$ que se forma en la mitocondria puede pasar al citosol, mientras que el 80% restante puede ser neutralizado por la DSO mitocondrial, dejando ver la importancia de esta enzima evitando el estrés oxidativo.

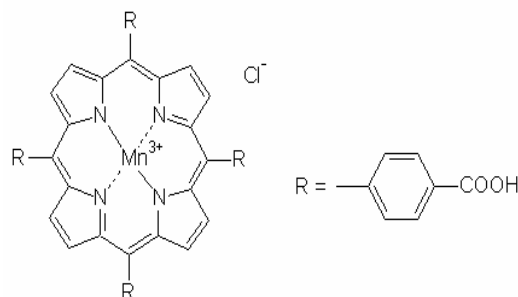
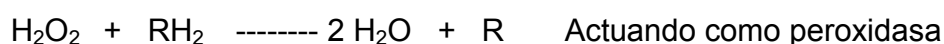
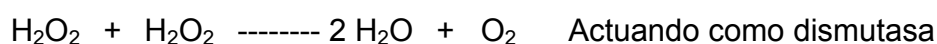


Figura 5. MnTBAP

La DSO ha mostrado efecto protector en diferentes patologías como son, procesos inflamatorios (Frank., 1983), en tejidos sometidos a isquemia (Mc Cord., 1985), así como disminuyendo la lipoperoxidación en lesión de médula espinal (santoscoy et al., 2002).

Catalasa.

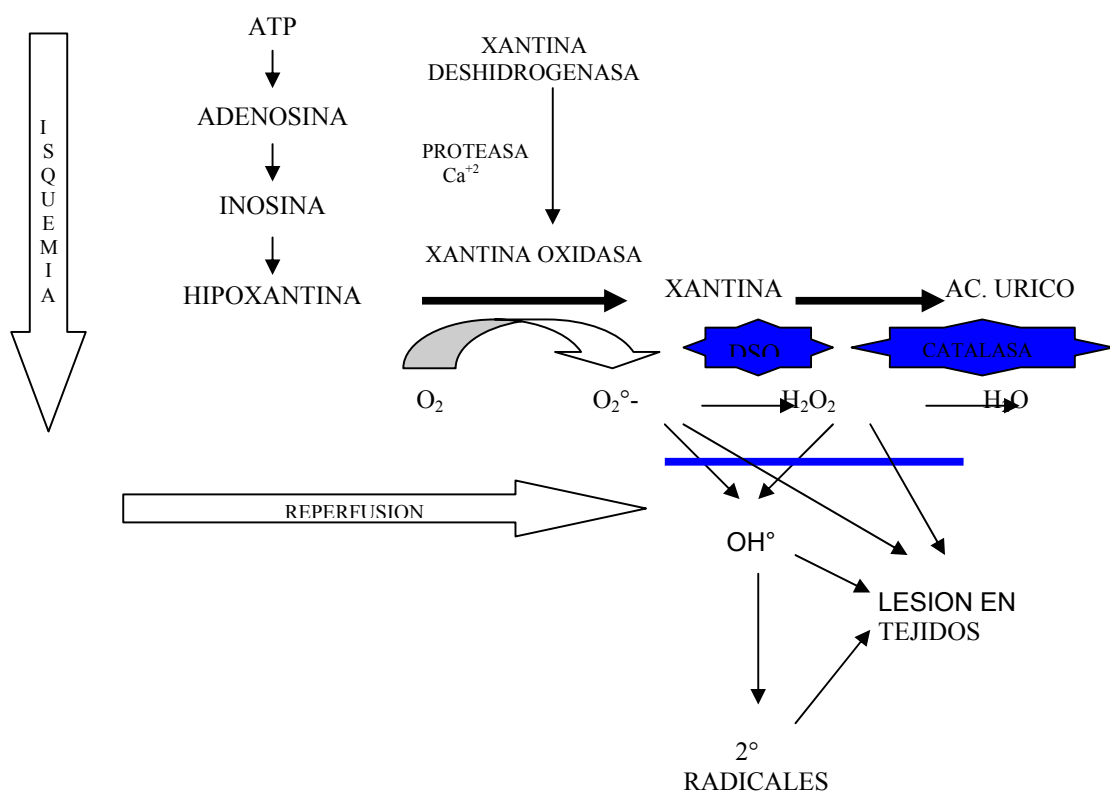
La catalasa es una enzima que es localizada mayormente en los peroxisomas, protege a la célula de la acumulación de H_2O_2 (es una molécula estable no radical y que puede difundirse a través de las membranas biológicas a una velocidad rápida) por dismutación formando H_2O o trabajando como una peroxidasa.



La catalasa ha sido utilizada a tratar procesos en los cuales el H_2O_2 a sido involucrado como un agente deletéreo en lesiones inflamatorias (Till et al., 1982).

En ultimas fechas se han utilizado a los antioxidantes como tratamiento para inhibir la formación de especies de oxigeno reactivas y evitar el daño que estas pueden provocar en estructuras como ácidos grasos poliinsaturados (lipoperoxidación), proteínas y material genético (fig, 6).

Figura 6. Mecanismos bioquímicos de lesión por isquemia-reperfusión y la participación de DSO y CAT.



PROBLEMA

El proceso isquémico que se observa después de una LTME no sólo afecta el sitio de lesión sino que se extiende varios segmentos en la ME y es capaz de desencadenar alteraciones en el metabolismo celular por falla en la vía glucolítica aeróbica con el consecuente incremento del lactato y por lo tanto de la acidez intracelular, lo cual interfiere con la función enzimática normal y genera obtención insuficiente de energía. La acidosis y la disfunción tisular coexisten simultáneamente y si no se corrigen en corto plazo producen despolarización de la membrana, muerte celular y lesiones orgánicas irreversibles que repercuten directamente sobre el estado funcional de los sujetos con LTME.

HIPÓTESIS

Si la CND es capaz de mantener la producción de energía en el área afectada después de una LTME, entonces el daño a la ME por los mecanismos de lesión secundarios se reducirá, los niveles de lactato tenderán a la normalidad, las concentraciones de los productos derivados de la lipoperoxidación como el malondialdehído (MDA) se mantendrán bajas, la actividad de enzimática se recuperará y las condiciones clínicas de los animales serán mejores al compararlos con aquellos a los que no se les administró la CND.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de 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.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Evaluar la capacidad de la CND para disminuir las concentraciones de lactato después de una LTME.
2. Evaluar el efecto de la CND sobre la actividad de la creatina fosfocinasa (CPK) después de una LTME.
3. Evaluar la capacidad de la CND para disminuir la concentración de MDA después de una LTME.
4. Evaluar el efecto de CAT y DSO en la LTME.
5. Evaluar la capacidad de la CND para disminuir la extensión del tejido de ME afectado.
6. Evaluar el efecto de la CND sobre la función motora de las extremidades posteriores de animales con LTME.
7. Evaluar el posible efecto sinérgico entre CND mas MP y CND mas CAT mas DSO.

MATERIAL Y MÉTODO.

Muestra.

El estudio se realizó con ratas de la cepa Long-Evans adultas de las cuales 42 fueron machos con un peso de 300 a 350g y 42 hembras con un peso de entre 200 y 300g (12 a 14 semanas de edad). Las cuales se dividieron en 7 grupos, constituidos por 12 ratas cada uno (Fig. 5).

Grupo 1. Grupo control de estrés quirúrgico: Ratas sanas a las que se les realizó la misma maniobra quirúrgica que a los demás grupos pero no se les produjo la LTME ni se les administro tratamiento alguno.

Grupo 2. Ratas con LTME y sin tratamiento.

Grupo 3. Ratas con LTME y administración de CND.

Grupo 4. Ratas con LTME y administración de MP.

Grupo 5. Ratas con LTME y administración de CND+MP.

Grupo 6. Ratas con LTME y administración de CND+DSO+CAT.

Grupo 7. Ratas con LTME y administración de DSO+CAT.

Diseño del estudio.

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

Aspectos éticos.

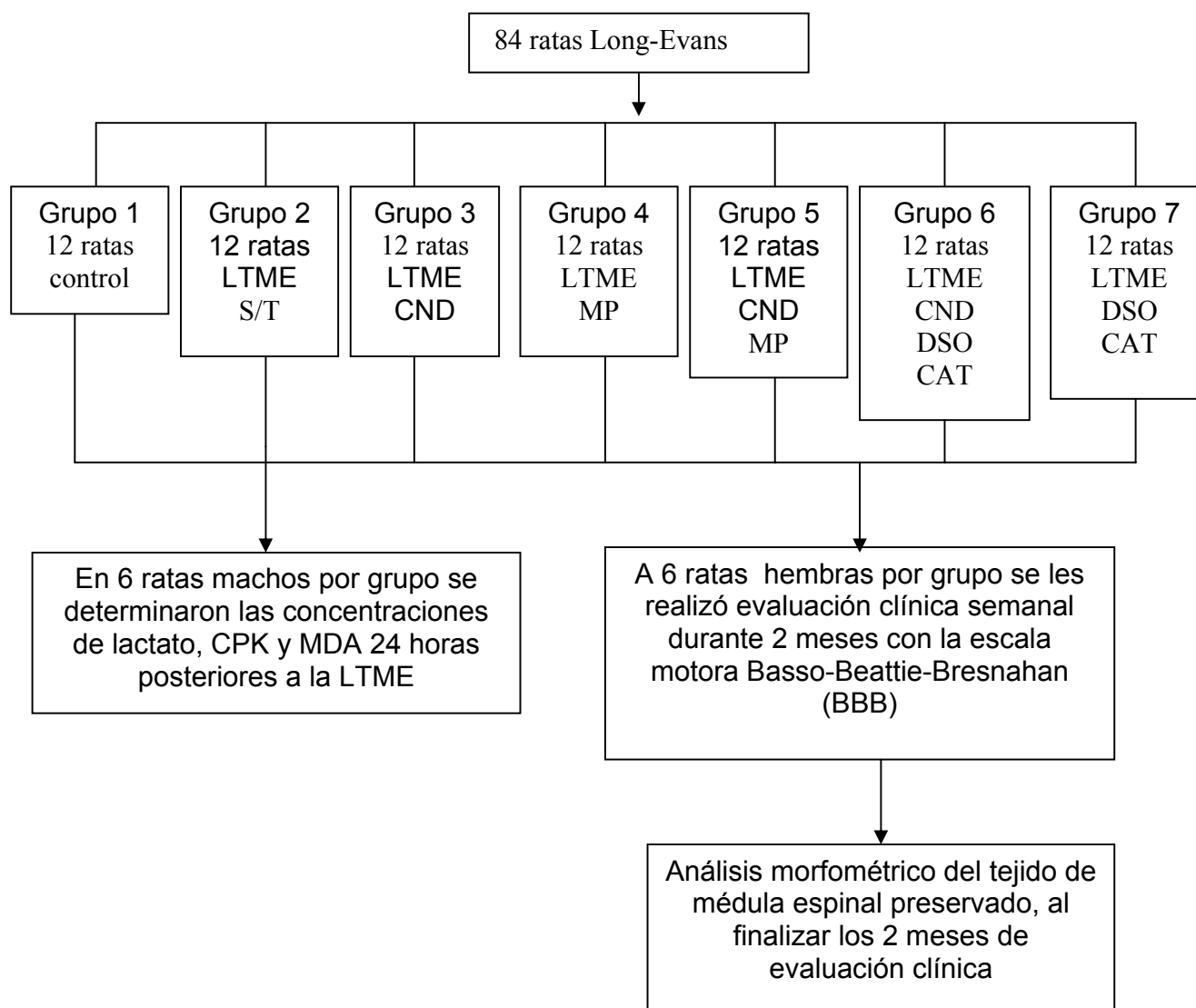
Todos los procedimientos quirúrgicos y experimentales se realizaron con apego a las normas de la Ley General de Salud (1990) y de acuerdo a las recomendaciones del capítulo referente al manejo de animales en proyectos de investigación y ciencia, así como de la norma oficial mexicana para animales de laboratorio (Aluja., 2002).

Variables.

a) Variables independientes: LTME, administración de CND, MP, DSO y CAT.

b) Variable dependientes: niveles de lactato, CPK, MDA, cantidad del tejido medular preservado y resultados de la evaluación funcional de los animales de estudio.

Figura 7. Diseño experimental.



Criterios de 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.

Criterios de exclusión

Se excluyeron todas las ratas cuyo hematoma fue lateralizado con respecto a la zona central de la ME y las ratas que no completaron el tiempo de evaluación propuesto (ratas que murieron antes de cumplir 2 meses posterior a la lesión).

Técnica anestésica:

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

Lesión traumática de la médula espinal.

Bajo el efecto de la anestesia, previa asepsia y antisepsia, se realizó una incisión media sagital en la piel de la región torácica baja y se disecaron los músculos paravertebrales de las apófisis espinosas. Posteriormente, se separó el periostio de las láminas vertebrales. Se extirparon tres apófisis espinosas de torácica 8 a 10 (T8–T10) para visualizar ampliamente las láminas correspondientes. Posteriormente se extirpó la lámina a nivel de T9, para exponer la porción dorsal de la ME sin lesionarla y manteniendo las meninges intactas. Bajo la técnica descrita por Allen en 1911; modificada por Guízar en 1994, los animales programados para LTME, fueron colocados en un equipo de cirugía estereotaxica, donde se dejó caer un cilindro de acero inoxidable (con peso de 15g con una punta roma de 2mm de diámetro y 1cm de largo) de una altura de 5cm (lesión de intensidad moderada), a través de un tubo guía sobre la ME expuesta. La intensidad de lesión fue de 75g/cm. 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 en la incisión quirúrgica se suturaron por planos con puntos simples.

Administración de cocarboxilasa no degradable.

Se aplicó la CND vía intraperitoneal a los 5 min., 2, 6 y 20h posterior a la LTME. Las dosis se incrementaron progresivamente: 50, 80, 100 y 150mg/Kg de peso corporal, en volumen variado de acuerdo a la proporción de 100mg de CND/ml (Larrieu et al., 1987 y Yllescas et al., 1997).

Administración de la metilprednisolona.

La MP (sector salud, clave 476) en forma de succinato de sodio se disolvió en solución fisiológica (NaCl al 0.9%) y se inyectó vía intraperitoneal a los 5 min., 2, 6 y 20h después de la LTME, en bolo, a razón de 30mg/Kg de peso corporal en un volumen de 0.48ml (Braugher y Hall, 1983).

Administración de dismutasa del superóxido mimética y catalasa

La MnTBAP (Sigma, No. M1018) y CAT (Sigma, No. 232-577-1) de *Aspergillus niger* se aplicaron vía intraperitoneal a los 5 min, 2, 6 y 20h después de la LTME, en bolo, a razón de 1.2 y 2.5mg/ml/Kg de peso corporal respectivamente.

Obtención de la muestra.

Para las determinaciones bioquímicas de MDA, CPK y lactato. Una vez cumplido el tiempo de estudio, los animales fueron decapitados y se extrajo la ME desde T8 hasta T10 y se retiraron las meninges. La muestra se colocó en solución fisiológica enfriada en hielo. Se pesó y se colocó en buffer Tris 20 mM guardando una relación peso/volumen de 3 x 7 para hacer el homogenizado correspondiente. Posteriormente se congelaron las muestras con hielo seco hasta su utilización. Todo el proceso se efectuó en aproximadamente 30 segundos para evitar la oxidación del tejido.

Para las pruebas de CPK, se obtuvo sangre del animal decapitado la cual se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min para obtener el plasma donde se realizó la evaluación.

A fin de evitar el sesgo durante el análisis de las muestras, se asignó una clave especial a cada una de las muestras, la cual se conservó hasta el final de la fase del análisis estadístico.

Determinación del lactato.

Los niveles de lactato se determinaron utilizando un método enzimático colorimétrico de punto final para el cual no se requiere desproteinización. Se empleó un kit de Lactato PAP (Sigma, formula No. 735) que consta de 3 reactivos R1: estándar de lactato, R2: amortiguador y R3 enzimas. La linealidad es de 10 mmol/l (900mg/l).

Para esta prueba se emplearon 10 μ l del homogenizado de ME. La muestra del homogenizado se incubó con el reactivo durante 5 minutos a una temperatura de 20 –25°C, para posteriormente leerse en un espectrofotómetro Beckman DU-650 a 505 nm.

Determinación de la creatinina fosfocinasa en plasma.

Se han reportado niveles elevados de la CPK en enfermedades cerebro-vasculares con componente isquémico desde las 4 a 6 horas después del evento y han alcanzado su pico entre las 18 y 30 horas (accidentes cerebro vascular, lesión vascular hemorrágica, desordenes neurológicos, hidrocefalia, epilepsia, etc.). Para la cuantificación de esta enzima se empleó el kit creatinina-fosfocinasa (Sigma, formula No. 45-UV) para detectar dicha enzima.

Procedimiento:

1. Se mantuvo estable la temperatura durante la incubación de las muestras.
2. En un vial de CPK, se añadieron 3 ml de solución de trabajo y 0.1 ml de plasma (muestra).
3. Se cubrió y mezcló por inversión varias veces. No se agitó. Se transfirió el contenido a la cubeta para introducir la muestra en el aparato.
4. Se esperaron 5 min en lo que la reacción se linearizó (Orden-cero).

5. Después de 5 min se leyó y registró absorbancia a 540nm (espectrofotómetro Beckman DU-650) usando agua como referencia (inicial A).
6. Exactamente 5 min después otra vez se volvió a leer (Final A).
7. Se hicieron los cálculos correspondientes para determinar la actividad de la CPK.

Determinación de malondialdehído en tejido.

La lipoperoxidación 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. Los peróxidos de los ácidos grasos poliinsaturados generan MDA y la medición de este parámetro es una indicador de lipoperoxidación.

Procedimiento: La medición se realizó de acuerdo con la técnica de Ohkawa y colaboradores (1979), para lo cual se colaron 200µl de dodecil sulfato de sodio al 8.1% para solubilizar la muestra (50µl de homogenizado de ME), se añadieron 1.5 ml de ácido acético al 20% y se mantuvo un pH de 3.5, posteriormente se agrega 1.5 ml de ácido tiobarbiturico al 0.8%. El volumen final de cada tubo fue llevado a 4 ml con agua destilada y las muestras se incubaron a 95°C por 60 minutos, posteriormente los tubos se enfriaron a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a 532 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-650.

Evaluación funcional.

La evaluación funcional se realizó 24 h. después de la LTME y posteriormente cada semana durante 2 meses con base en la escala para locomoción Basso, Beattie y Bresnahan (1996):

- 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 3 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 frecuente u ocasionalmente dando pasos apoyando la planta. No hay coordinación de las extremidades anteriores con las posteriores
- 12 Soporte del tren posterior frecuente u ocasionalmente 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 consiste 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 colocación correcta frecuentemente durante el avance del miembro hacia adelante. 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 adelante. 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 adelante. 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 a través de toda la estancia. Estabilidad consistente del tronco y la cola consistentemente arriba.

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

La persona que realizó las evaluaciones clínicas ignoró que procedimiento se le realizó al animal en estudio, a fin de evitar el sesgo en los resultados.

Evaluación histológica.

Cuando las ratas seleccionadas para este estudio completaron los 2 meses de evaluación clínica, bajo previa anestesia fueron sometidas a toracotomía amplia 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%. Las soluciones fueron perfundidas a una velocidad de 30ml/min. Al término de la perfusión se extrajo la ME desde el nivel torácico 8 hasta el 10, previa identificación macroscópica del sitio de lesión.

De las muestras de ME se tomo en consideración el epicentro de la lesión + 2mm de distancia en ambas direcciones (aproximadamente 8-10mm).

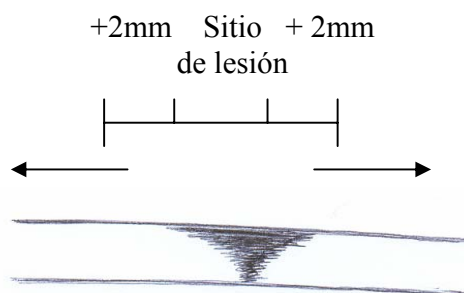


Figura 8. Médula espinal lesionada

- Se lavaron con amortiguador de fosfatos (PBS 0.1 M a pH 7.4) por 1 h, a temperatura ambiente, con tres cambios.
- Se deshidrato 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
- Inclusión en moldes plásticos

- Se oriento para hacer cortes transversales
- Se hicieron cortes seriados de 10µm hasta llegar al epicentro de la lesión
- Se hizo tinción de “Hematoxilina y Eosina”, para determinar el tejido preservado y tinción de “Luxol Fast Blue” para poder cuantificar los axones mielinizados.

Para la tinción de “Luxol Fast Blue”

- Se desparafinó a 56°C y se hidrató
- Se colocaron en solución de luxol a 60°C durante 24h, cubriendo el vaso con tela adherida herméticamente para evitar la evaporación
- Se pasaron las laminillas a alcohol al 95%
- Se lavó con agua destilada
- Se colocó en carbonato de litio al 0.05%
- Se enjuagó con agua destilada
- Se paso por alcohol a 70°C (baño rápido)
- Se enjuagó con agua destilada
- Se colocó en violeta de cresilo 5 min al 0.1%
- Nuevamente se enjuagó con agua corriente
- Y se viró con alcohol al 70% rápido
- Se deshidrató en alcoholes crecientes hasta xilol
- Y se montó con resina sintética (entellan de Merk)

Nota:

La mielina se observa azul prusia.

El núcleo se observa azul claro.

El citoplasma se observa fucsia.

Para la tinción de “Hematoxilina Eosina”

- Se desparafinó e hidrató
- Se hidrata en:
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

- Lavar con agua corriente
- Se coloca en solución de Hematoxilina de Harris de 2 a 5 min
- Alcohol ácido (1cc de HCl x 99cc de alcohol 96°)
- Se lava en agua corriente
- Se coloca en solución de eosina 10 min (10 g de eosina, alcohol absoluto 800cc y agua destilada 200 cc)
- 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 montan las muestras (entellan de Merk)

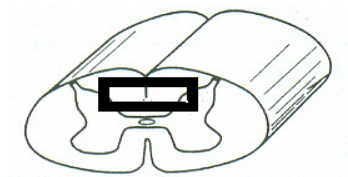
Nota:

Los núcleos se observan de color azul

El citoplasma de color rojo.

Una vez teñido los tejidos, se identificó el corte donde se observó la máxima destrucción del tejido a través de una técnica de iluminación (normarky) que permite ver las muestras en relieve y las diferencia por contraste de fases. Se seleccionaron las muestras de las laminillas donde se encontró la mayor destrucción de tejido, una anterior y una posterior. Se cuantificó la cantidad de tejido preservado, en toda el área del corte medular. Para el conteo de axones mielinizados se restringió la zona a una área de $1740904.28\mu\text{m}^2$ la cual se localizó en la parte posterior del corte transversal de la ME, frente al epéndimo. Ambas mediciones se realizaron mediante un analizador de imágenes (software image-data base).

Figura 9. Zona donde se contabilizo el número de axones viables en la ME.



RESULTADOS

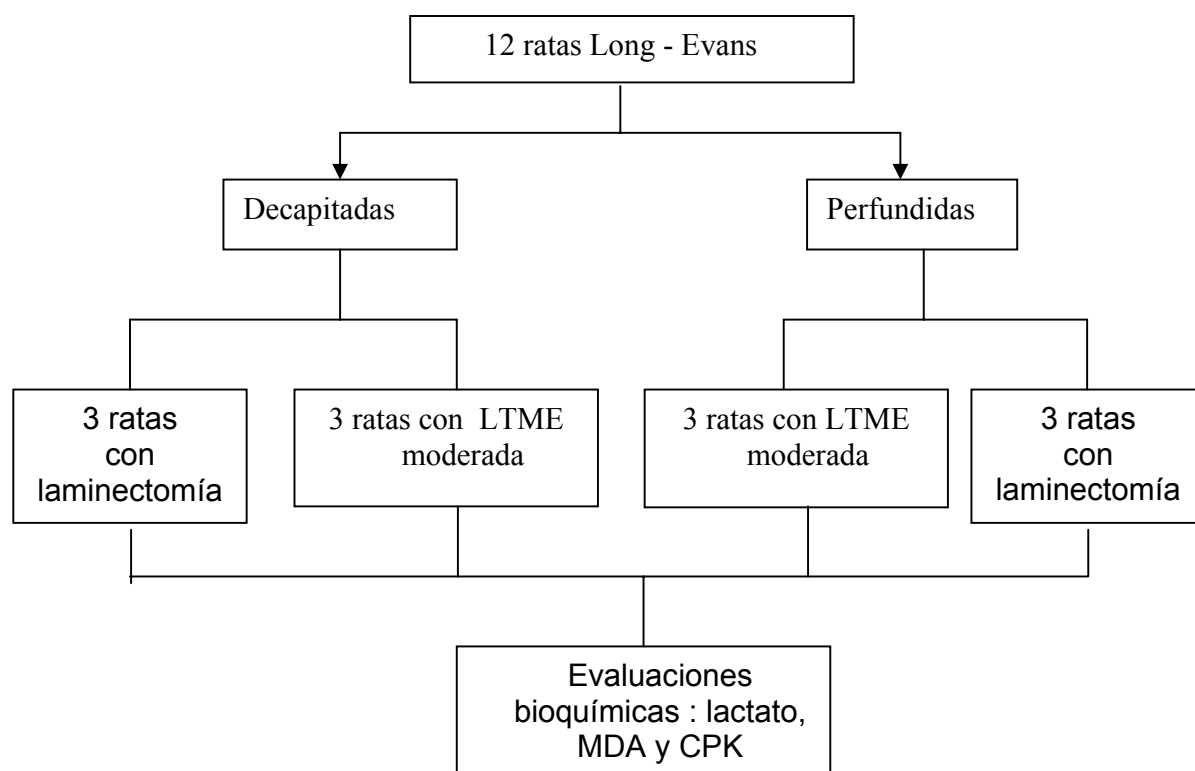
Experimentos preliminares:

➤ Ratas Decapitadas y Perfundidas.

Para la evaluación bioquímica se realizó previamente una prueba piloto para observar el comportamiento de las concentraciones de lactato, CPK y MDA tanto en ratas perfundidas como decapitadas. Con el fin de seleccionar la mejor técnica para el presente estudio.

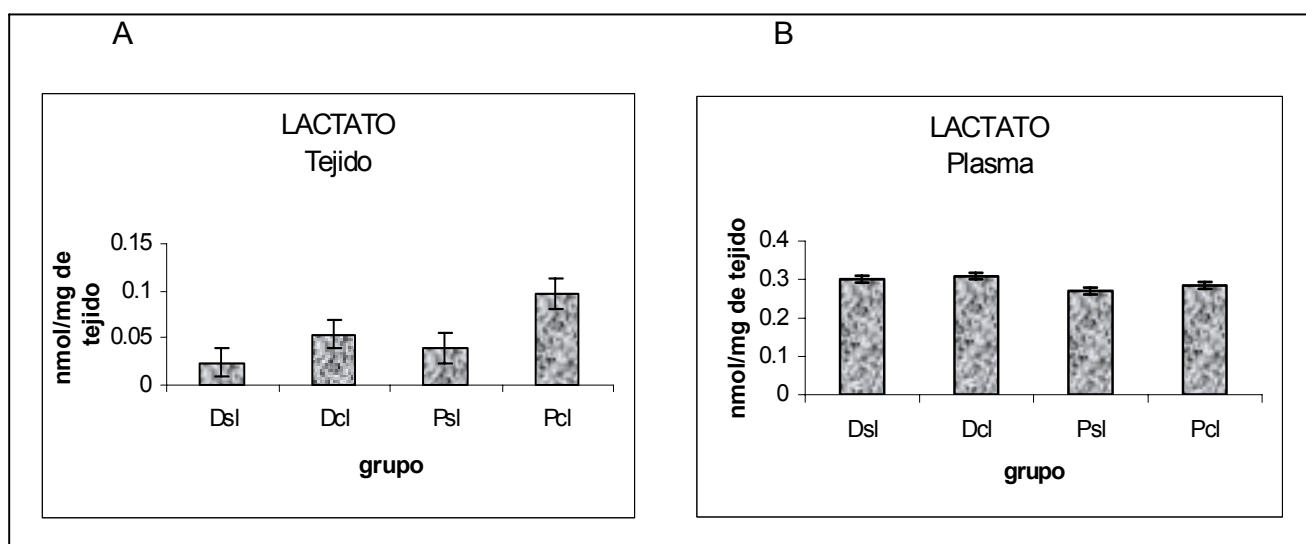
Las evaluaciones de CPK y de lactato se realizaron en tejido y plasma, MDA se determinó de manera específica en tejido medular.

Figura 10. Diseño experimental del experimento preliminar. Ratas decapitadas y perfundidas.



Cuando se determino la concentración de lactato, tanto en tejido como en plasma de ratas decapitadas y perfundidas (fig, 11), se observo que no había diferencia significativa cuando se compararon los grupos de ratas con y sin LTME por separado. Sin embargo si una mayor diferencia en los resultados que correspondían a muestras de tejido en ratas decapitadas.

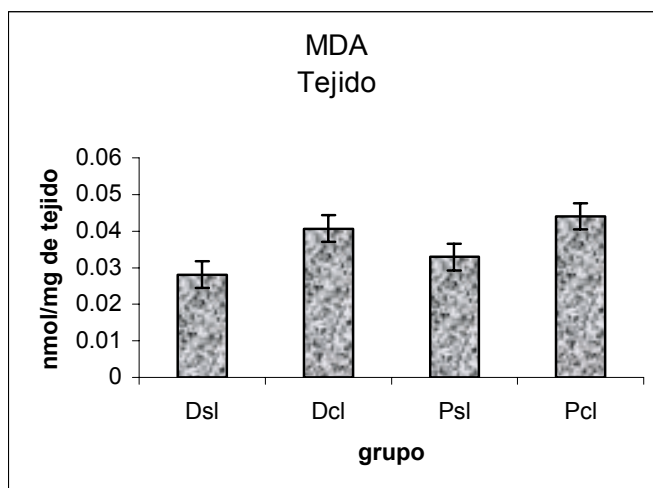
Figura 11. Niveles de lactato en tejido y plasma de ratas perfundidas y en decapitadas.



En las graficas se muestra el valor promedio de las concentraciones de lactato en tejido medular y plasma de ratas sacrificadas por decapitación o perfusión (Dsl = decapitadas sin lesión; Dcl = decapitadas con lesión; Psl = perfundida sin lesión y Pcl = perfundida con lesión) 24h después de la lesión. Cada punto representa la media $\pm$ e. e. (n=3).

El MDA fue medido en tejido de ME de ratas decapitadas y perfundidas (fig, 12), los resultados mostraron que no había una diferencia significativa, cuando se comparo por separado los grupos de ratas con y sin LTME ($p < 0.05$). Y el comportamiento de los datos tanto en ratas perfundidas como decapitadas fue muy similar.

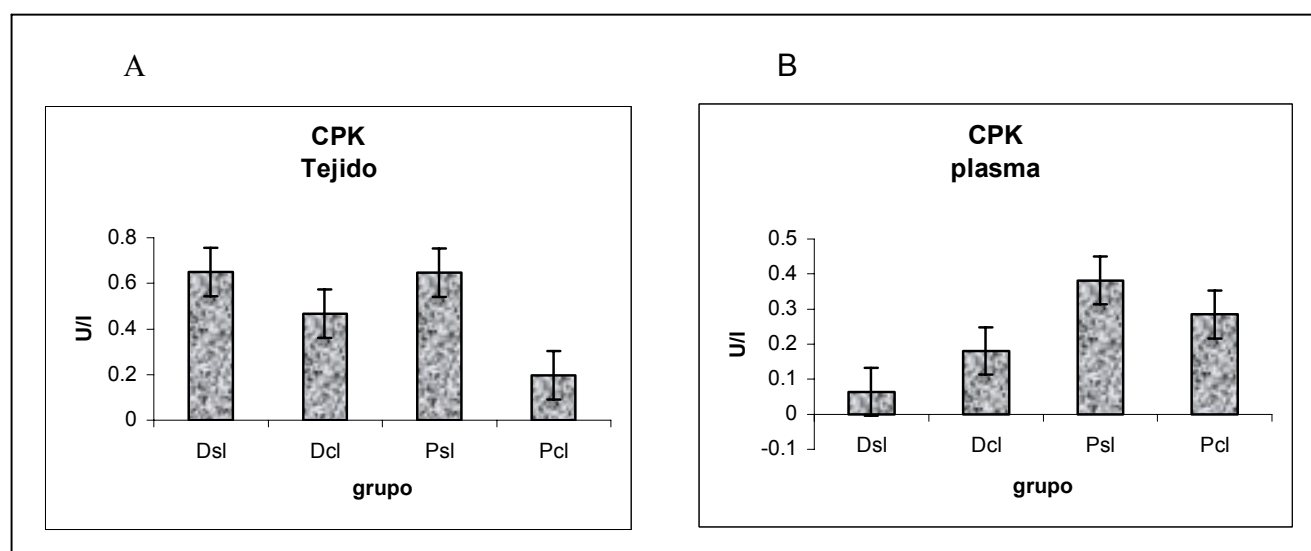
Figura 12. Niveles de MDA en tejido medular de ratas perfundidas y decapitadas



En la grafica se muestra el valor promedio de los niveles de MDA en tejido medular de ratas sacrificadas por decapitación o perfusión (Dsl = decapitadas sin lesión; Dcl = decapitadas con lesión; Psl = perfundida sin lesión y Pcl = perfundida con lesión) 24h posterior a la lesión. Cada punto representa la media $\pm$ e. e. (n=3).

Cuando se determino la concentración de CPK, tanto en tejido como en plasma, en muestras de ratas decapitadas y perfundidas (fig, 13), no se observo una diferencia significativa en los diferentes grupos tanto en los de ratas con y sin LTME por separado así como en ratas decapitadas y perfundidas ($p < 0.05$). Se observó que las muestras de ratas sin LTME mantenían una mayor actividad de CPK en comparación con el grupo con LTME. Excepto en el grupo de ratas decapitadas donde la medición fue en plasma, se encontró una actividad mayor de la enzima en las muestras de ratas con LTME que en las de sin lesión.

Figura 13. Actividad de CPK en tejido medular y plasma tanto en ratas perfundidas como decapitadas

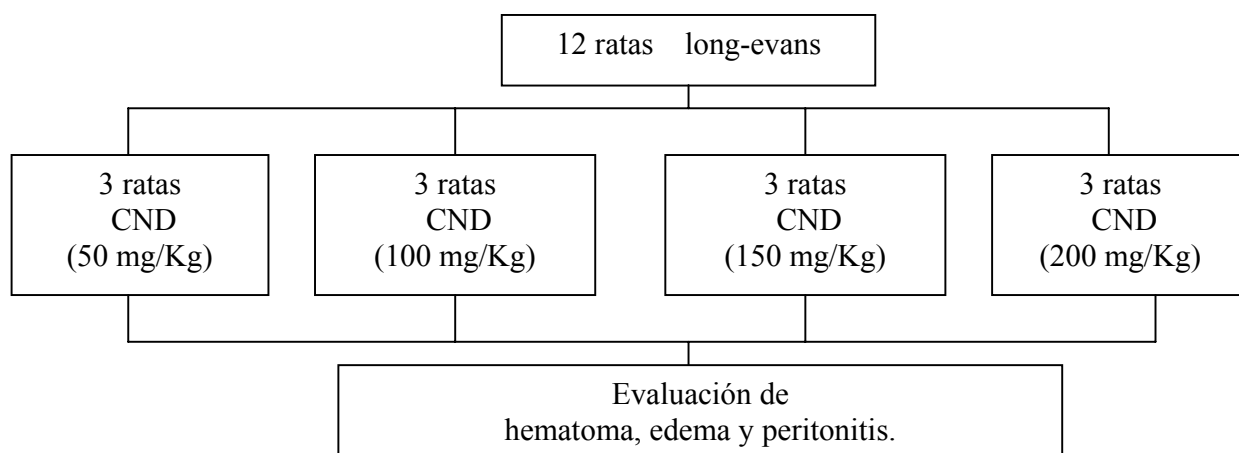


En las graficas se muestra el valor promedio de CPK en tejido medular y plasma de ratas sacrificadas por decapitación o perfusión (Dsl = decapitadas sin lesión; Dcl = decapitadas con lesión; Psl = perfundida sin lesión y Pcl = perfundida con lesión) 24h posterior a la lesión. Cada punto representa la media $\pm$ el e. e. (n=3).

- Determinación de la dosis de CND a administrarse.

Para encontrar las concentraciones de CND que se administraron durante el proyecto, se realizó una curva dosis respuesta en ratas sanas y se les evaluó a través del tiempo los síntomas y la mortalidad que presentaron.

Figura 14. Diseño experimental de la curva dosis respuesta a CND.



Los resultados mostraron que las ratas sanas de la cepa Long–Evans toleran hasta 200 mg/Kg de peso corporal sin manifestar síntomas como hematoma, edema y peritonitis a consecuencia de la administración intraperitoneal de la CND.

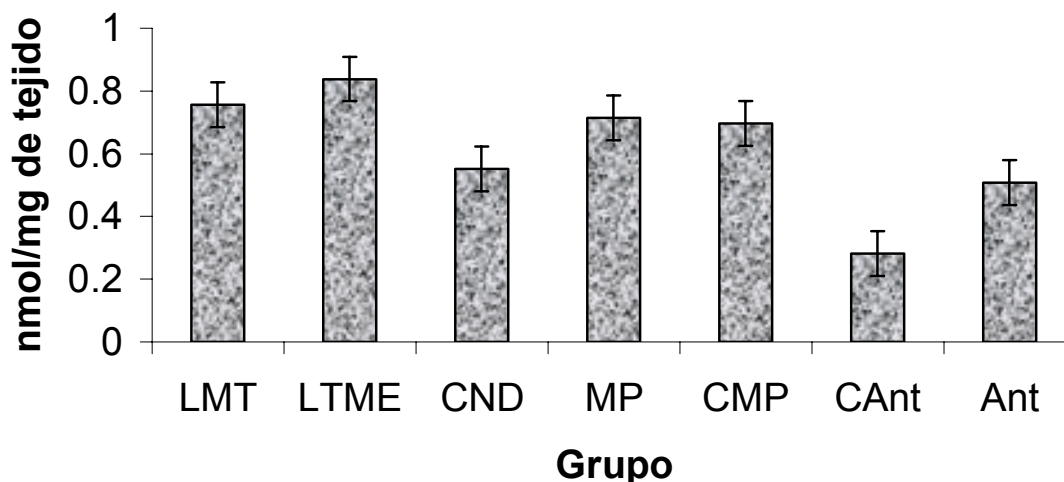
Con lo anterior se comprobó que la dosis administrada en el presente trabajo no produciría efectos adversos ya que esta se administró hasta un máximo de 200mg/Kg de peso corporal.

Bioquímicos:

Lactato. Se encontró una disminución en los niveles de lactato en los grupos de “CND”, “Cant” y “Ant”, con respecto al grupo de LTME sin tratamiento. De estos grupos el que presentó diferencia estadística fue el de “Cant”, ya que la disminución en los niveles de lactato en este grupo fue del doble al compararlo con el grupo de LTME sin tratamiento.

Mientras que los grupos de “MP” y “CMP” no presentaron una diferencia significativa con respecto a el grupo de “LMT” y el de LTME sin tratamiento (Fig, 15).

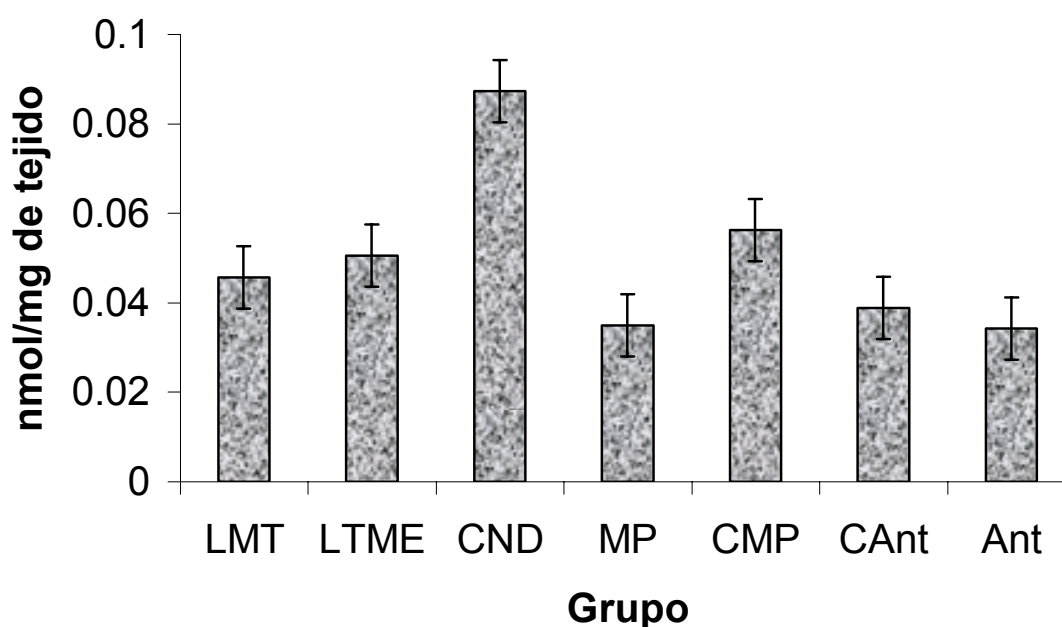
Figura 15. Niveles de lactato en la médula espinal de ratas con diferente tratamiento.



En la gráfica, las barras muestran el valor promedio de lactato en la médula espinal de ratas, 24 h después de la lesión y de los tratamientos correspondientes (LMT = laminectomía; LTME = lesión traumática de médula espinal; MP = metilprednisolona; CND = cocarboxilasa no degradable; CMP = cocarboxilasa no degradable mas metilprednisolona, CAnt = cocarboxilasa no degradable en combinación con dismutasa del superóxido mas catalasa, y Ant = dismutasa del superóxido mas catalasa). Cada grupo esta representado por la media $\pm$ e. e. (n=6). Prueba paramétrica tipo ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey DVS.

Malondialdehído. No se observó una diferencia significativa de los niveles de “MDA” en los diferentes grupos. Sin embargo los grupos de “MP”, “Ant” y “Cant” mostraron una tendencia a disminuir los niveles de “MDA” al compararlos con el grupo de LTME sin tratamiento. Por otra parte los grupos tratados con “CND” y el de “CMP” mostraron un incremento en los niveles de MDA con respecto al grupo de “LMT” y el grupo de LTME sin lesión (Fig, 16).

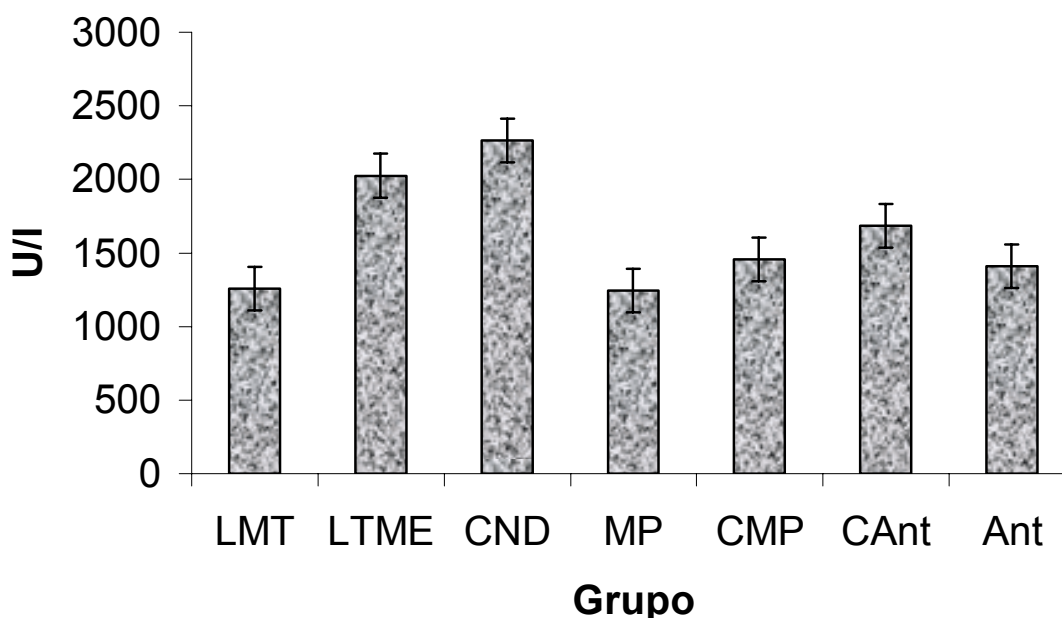
Figura 16. Niveles de MDA en la médula espinal de ratas con diferente tratamiento.



En la gráfica, las barras muestran el valor promedio de MDA en la médula espinal de ratas, 24 h después de la lesión y de los tratamientos correspondientes (LMT = laminectomía; LTME = lesión traumática de médula espinal; MP = metilprednisolona; CND = cocarboxilasa no degradable; CMP = cocarboxilasa no degradable mas metilprednisolona, CAnt = cocarboxilasa no degradable en combinación con dismutasa del superóxido más catalasa, y Ant = dismutasa del superóxido más catalasa). Cada grupo esta representado por la media $\pm$ e. e. (n=6). Prueba no paramétrica tipo Kruskal-Wallis.

Creatinina Fosfoquinasa. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en ninguno de los grupos incluidos, sin embargo, el grupo que incrementó los valores de esta enzima, incluso por arriba de los mostrados por el grupo de LTME sin tratamiento, fue el de “CND”. Mientras que el que presentó el menor incremento, fue el tratado con MP esto cuando se comparó con el grupo de LTME sin tratamiento (Fig, 17).

Figura 17. Niveles de CPK en la médula espinal de ratas con diferente tratamiento.

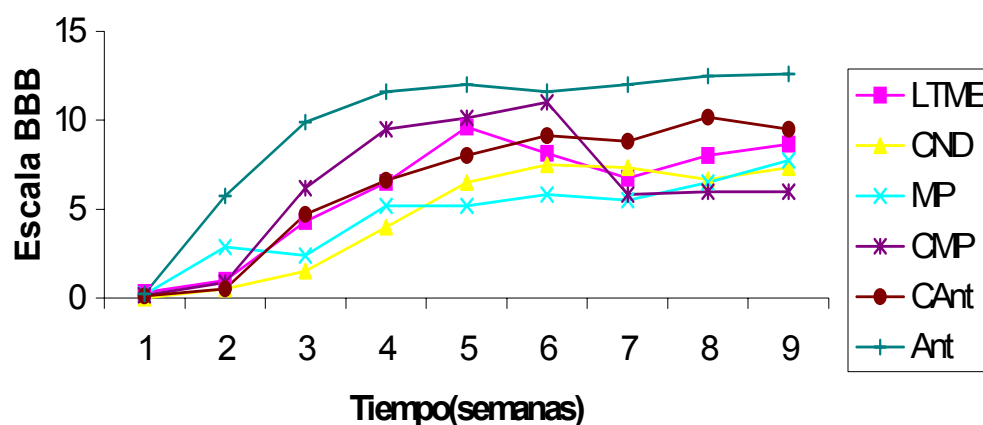


En la gráfica, las barras muestran el valor promedio de CPK en la médula espinal de ratas, 24 h después de la lesión y de los tratamientos correspondientes (LMT = laminectomía; LTME = lesión traumática de médula espinal; MP = metilprednisolona; CND = cocarboxilasa no degradable; CMP = cocarboxilasa no degradable mas metilprednisolona, CAnt = cocarboxilasa no degradable en combinación con dismutasa del superoxido más catalasa, y Ant = dismutasa del superoxido más catalasa). Cada grupo esta representado por la media $\pm$ e. e. (n=6). Prueba no paramétrica tipo Kruskal-Wallis.

Evaluación funcional. Al utilizar la escala BBB para evaluar la actividad motora en las extremidades posteriores de los animales incluidos en el estudio se observó una diferencia significativa ($p<0.05$), al comparar los distintos grupos experimentales con respecto al grupo de laminectomía. Sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando la comparación se realizó entre los diferentes grupos experimentales (Fig, 18).

El grupo que mostró la mayor recuperación motora y en tiempo mas corto, fue el de “Ant”, alcanzando un nivel mayor de 12 puntos de acuerdo a la escala BBB. Por otra parte, el grupo de “CMP” presentó, hasta la sexta semana, una recuperación aproximada a 12 puntos mayor a la observada en los grupos restantes que recibieron algún tipo de tratamiento. No obstante lo anterior, ninguno de los animales de este grupo concluyó las nueve semanas de evaluación previstas.

Figura 18. Recuperación motora de ratas con LTME y diferente tratamiento.

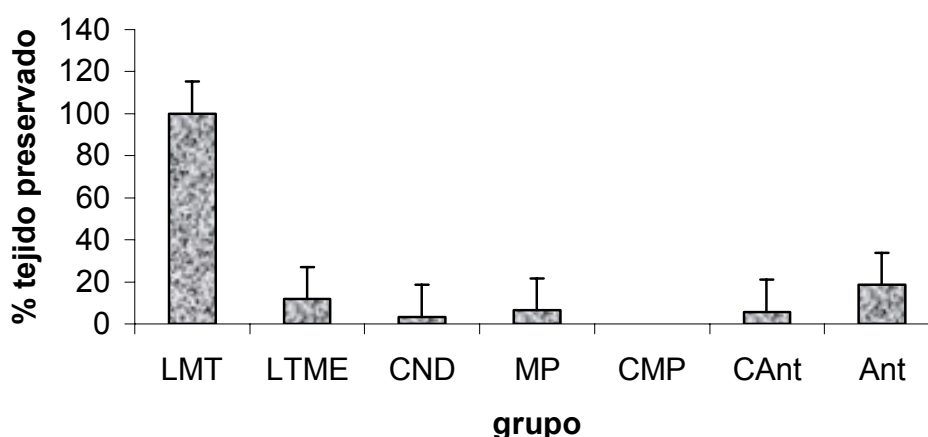


En la gráfica, las líneas muestran el valor promedio a través del tiempo obtenidos al emplear la escala motora Basso-Beati-Bresnahan (BBB), de ratas con diferente tratamiento (LTME = lesión traumática de médula espinal; MP = metilprednisolona; CND = cocarboxilasa no degradable; CMP = cocarboxilasa no degradable más metilprednisolona, CAnt = cocarboxilasa no degradable en combinación con dismutasa del superóxido más catalasa, y Ant = dismutasa del superóxido más catalasa) 24 h después de la lesión y posteriormente cada semana hasta cumplir dos meses. Cada punto representa la media sin medidas de dispersión. Prueba no paramétrica tipo Kruskal-Wallis.

Morfológicos:

Tejido preservado. Cuando se compararon los grupos experimentales con el grupo control se observó una diferencia estadística ($p < 0.05$). Entre los grupos que recibieron los diferentes tratamientos, no se observó diferencia significativa alguna. No obstante lo anterior, el grupo “Ant” fue el que más tejido preservado mostró, seguido por el grupo de ratas con LTME sin tratamiento, mientras que el grupo con menor porcentaje de tejido preservado fue el que recibió la “CND”, seguido por el grupo “Cant” (Fig. 19).

Figura 19. Porcentaje de tejido preservado en la médula espinal de ratas con diferente tratamiento.



En la gráfica, las barras muestran el valor promedio de tejido preservado en cortes transversales de médula espinal de ratas, 2 meses después de la lesión y del correspondiente tratamiento (LMT = laminectomía; LTME = lesión traumática de médula espinal; MP = metilprednisolona; CND = cocarboxilasa no degradable; CMP = cocarboxilasa no degradable más metilprednisolona, CAnt = cocarboxilasa no degradable en combinación con dismutasa del superóxido más catalasa, y Ant = dismutasa del superóxido más catalasa). Ninguna de las ratas del grupo CMP llegó al término del estudio, por lo que no se pudo contabilizar el porcentaje de axones viables en estos animales. Cada grupo está representado por la media $\pm$ e. e. Prueba no paramétrica tipo Kruskal-Wallis.

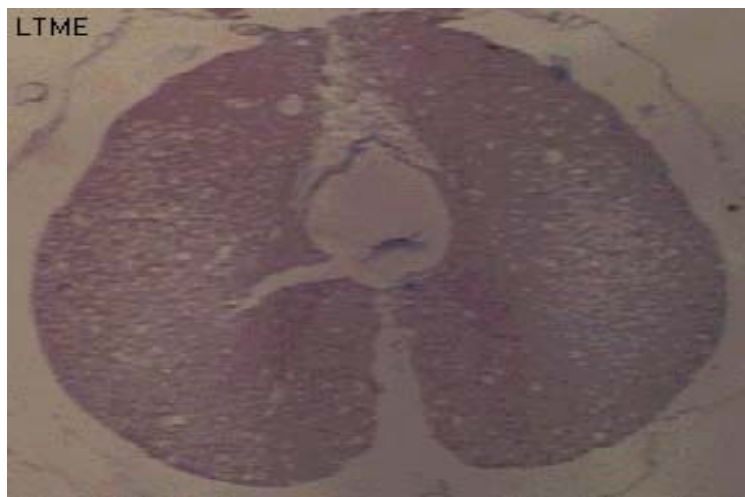
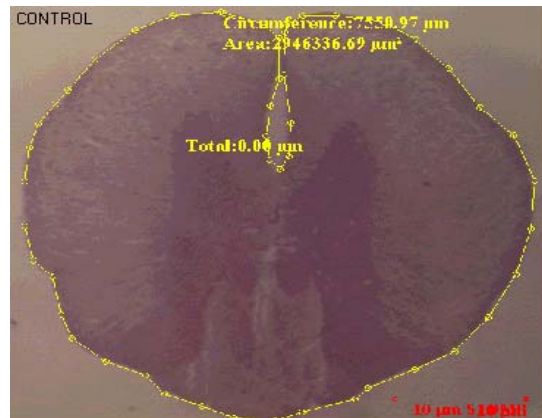
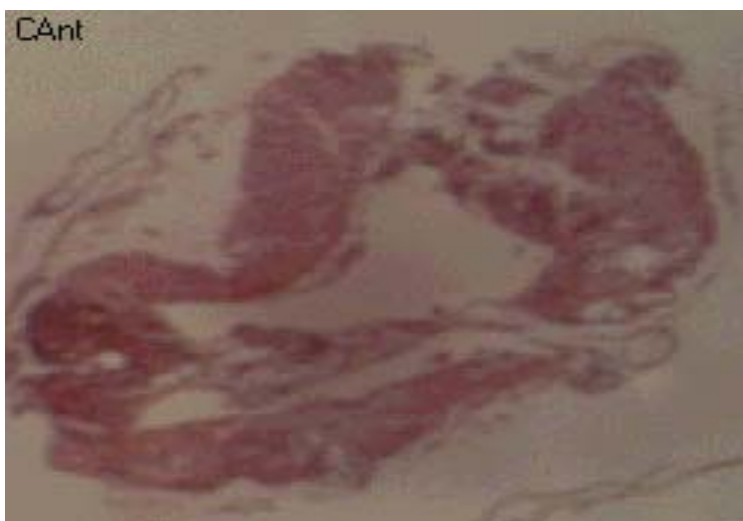
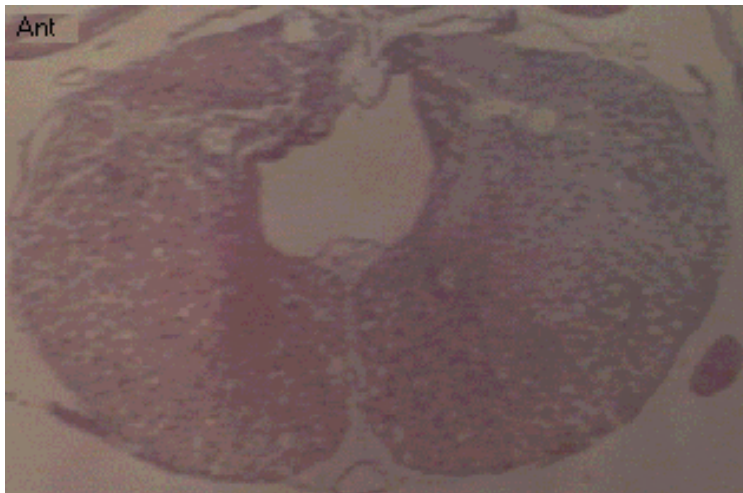
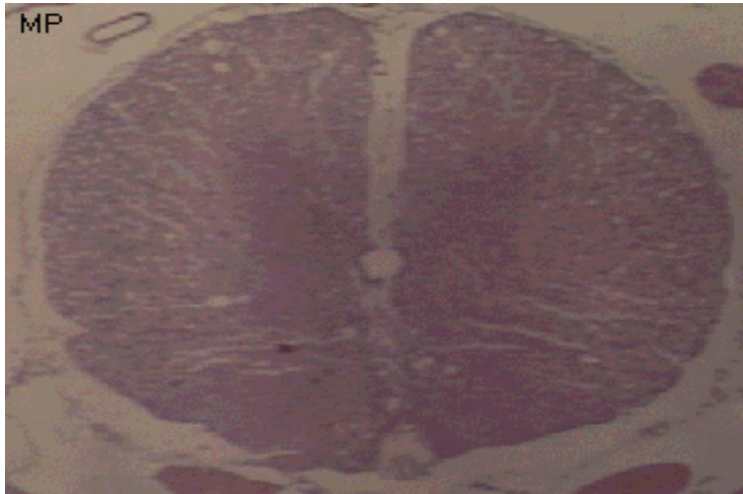


Figura 20

Corte transversal de la médula espinal en el epicentro de la lesión o en el área correspondiente en el grupo control.

Tinción Hematoxilina-eosina.

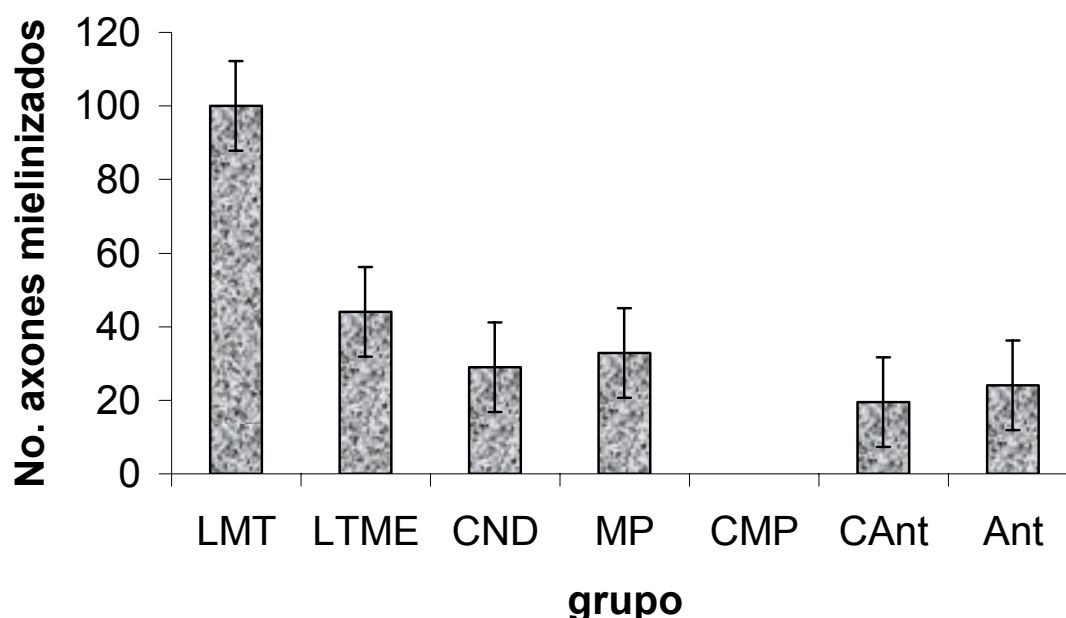
En A se muestra una panorámica de la médula espinal sin lesión y en A' la misma imagen pero digitalizada con el programa image data base. En B se muestra la médula espinal de una rata sin tratamiento.



Las imágenes muestran el tejido preservado después de una lesión traumática de médula espinal en el grupo que recibió tratamiento con metilprednisolona (C), cocarboxilasa no degradable (D), antioxidantes (E) y cocarboxilasa no degradable en combinación con antioxidantes (F). Barra = 200 μ m

Axones mielinizados. Al comparar el número de axones viables en los grupos con tratamiento y en el grupo control, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). El grupo al que sólo se le realizó la LTME pero que no recibió tratamiento fue el que presentó el mayor número de axones viables con respecto a los grupos con tratamiento, seguido por los grupos tratados con “MP” y el de “Ant”. No se observó diferencia alguna al comparar entre sí a los grupos que recibieron los diferentes tratamientos (Fig, 20).

Figura 20. Porcentaje de axones viables en la médula espinal de ratas con diferente tratamiento.



En la gráfica, las barras muestran el valor promedio de axones viables, en cortes transversales de médula espinal de ratas 2 meses después de la lesión y del correspondiente tratamiento (LMT = laminectomía; LTME = lesión; MP = metilprednisolona; CND = cocarboxilasa no degradable; CMP = cocarboxilasa no degradable mas metilprednisolona, CAnt = cocarboxilasa no degradable en combinación con dismutasa del superóxido más catalasa, y Ant = dismutasa del superóxido más catalasa). Ninguna de las ratas del grupo CMP llegó al término del estudio, por lo que no se pudo contabilizar el porcentaje de axones viables en estos animales. **Cada grupo esta representado por la media $\pm$ e. e. Prueba no paramétrica tipo Kruskal-Wallis.**

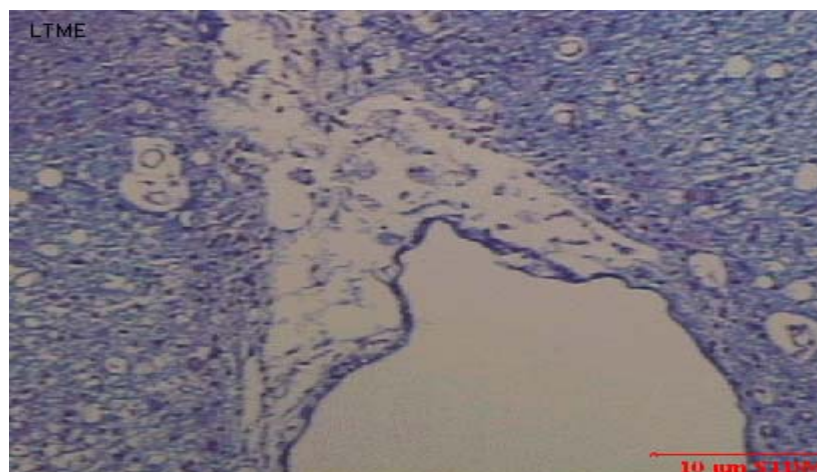
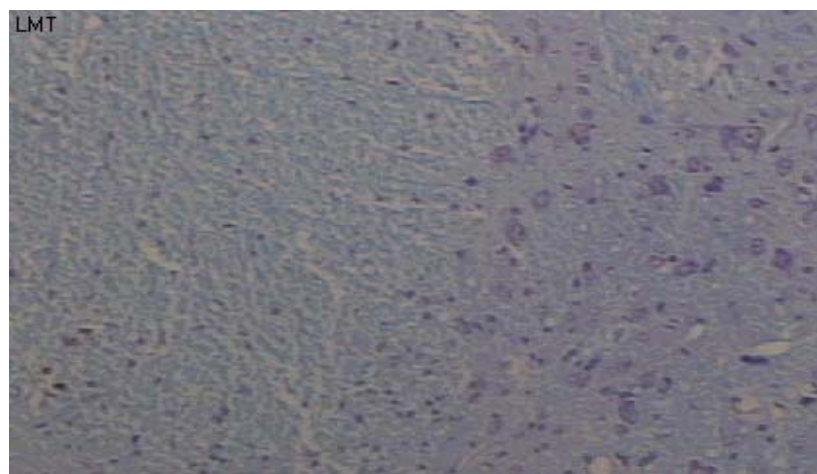
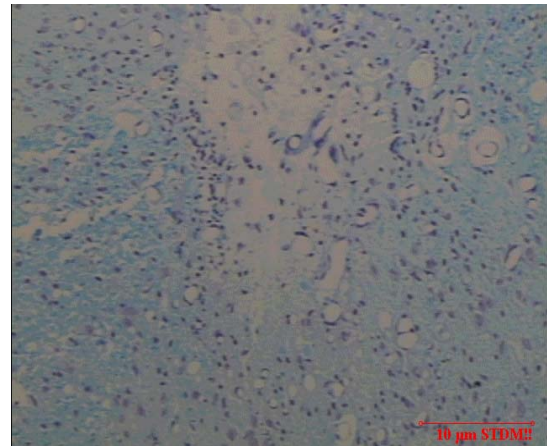
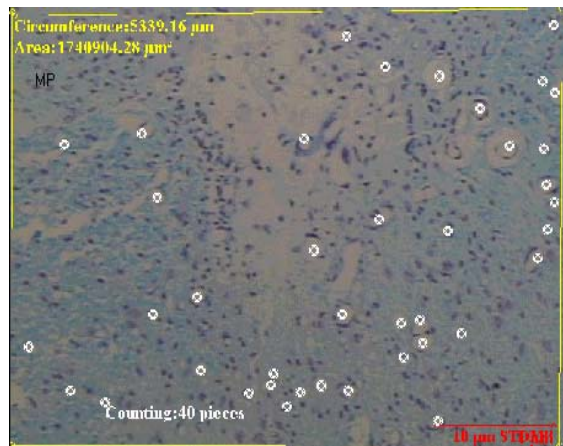


Figura 22

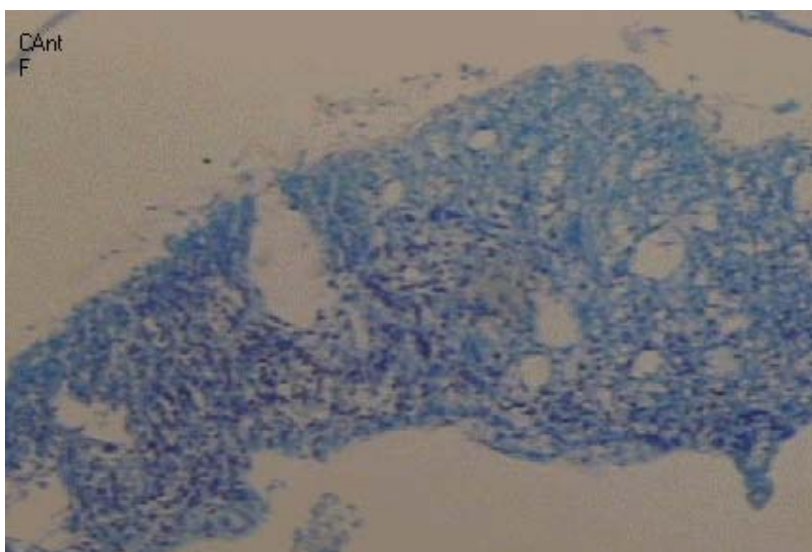
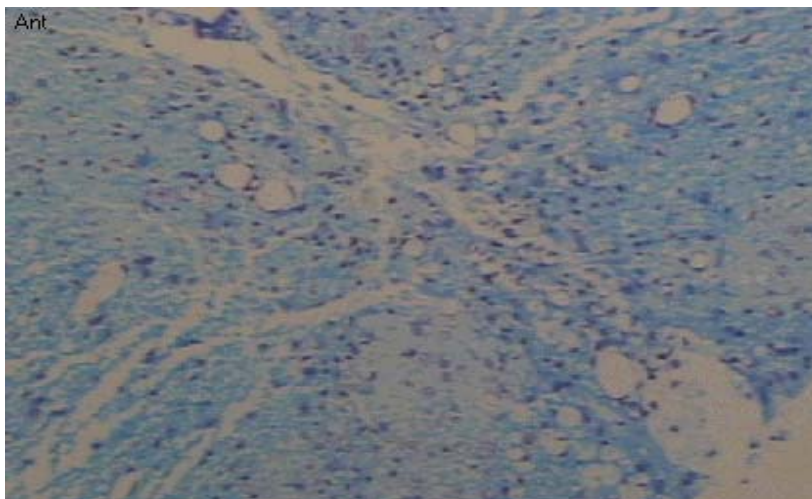
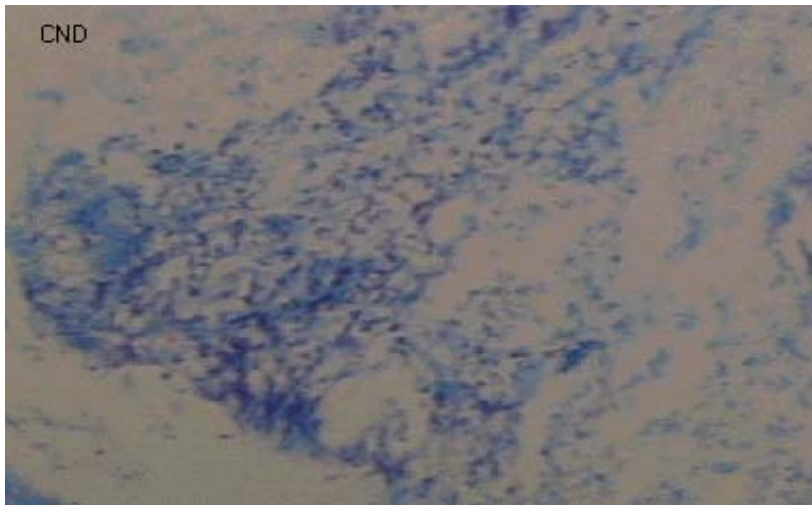
Corte transversal de la médula espinal en el epicentro de la lesión o en el área correspondiente en el grupo control.

“Tinción Luxol Fast Blue”.

En A se muestra una semipanorámica de la médula espinal con LTME y con tratamiento de MP y en A' la misma imagen pero digitalizada con el programa image data base.

En B se muestra la médula espinal de una rata sin lesión.

En C se observa la médula espinal de una rata con LTME.



Las imágenes muestran el número de axones mielinizados después de una lesión traumática de médula espinal en el grupo que recibió tratamiento con cocarboxilasa no degradable (D), antioxidantes (E) y carboxilasa no degradable en combinación con antioxidantes (F). Barra = 200 μ m

DISCUSIÓN

El sistema nervioso central difiere en forma importante del resto de los tejidos en lo referente a su metabolismo energético, ya que sólo representa un 2% del peso total del cuerpo, recibe el 15% del flujo cardíaco y utiliza el 20% del oxígeno que consume el cuerpo. Su capacidad para almacenar glucógeno es reducida ya que esta reserva es capaz de mantener los requerimientos energéticos menos de 5 minutos (Clarke., 1999), cuando los niveles de glucosa y oxígeno disminuyen, por ejemplo, durante la isquemia. Con base en lo anterior se consideró qué el proceso de isquémico observado después de una LTME es uno de los puntos medulares para tratar de revertir esta patología, por lo que en el presente trabajo se intentó, mediante la administración de CND, restablecer el metabolismo celular que se altera posterior al trauma con la finalidad de facilitar al máximo la recuperación de las neuronas parcialmente dañadas y por ende evitar o disminuir la muerte tanto de células nerviosas como gliales.

Al administrar la CND a los animales con LTME, se disminuyeron considerablemente las concentraciones de lactato como consecuencia de la reactivación metabólica producida por esta coenzima, ya que la CND desvía el metabolismo anaeróbico a uno aeróbico, evitando que el piruvato se transforme en ácido láctico, transformándolo en cambio, en acetil Co-A, sustrato necesario para mantener activo el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y por ende la cadena respiratoria. Con base a lo anterior, se esperaba que al administrar la CND después de una LTME y al mejorar con ello el metabolismo energético, el número de axones viables y la cantidad de tejido preservado fuera mayor que en el grupo control y por ende, que los niveles de MDA fueran más bajos y el puntaje en la escala motora BBB fuera mayor. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron totalmente contrarios a lo planteado. Al parecer, el mismo fenómeno que incrementa el metabolismo y que mantiene a la célula con los suficientes sustratos energéticos como es el adenosina trifosfato (ATP), provoca un incremento considerable en los niveles de MDA, un producto del proceso de lipoperoxidación

que se encuentra en relación directa con la presencia de especies de oxígeno reactivas. Se ha observado que durante los mecanismos secundarios de lesión posteriores al trauma en la médula espinal se genera una gran cantidad de especies de oxígeno reactivas, debido a la activación de enzimas como la sintasa de óxido nítrico (ONs), la formación de prostanoídes, reacción durante la cual se libera H_2O_2 , el proceso de isquemia-reperfusión durante el cual también se libera una gran cantidad de H_2O_2 y $O_2^{\circ-}$ y la activación de la cadena respiratoria que trae consigo la formación del $O_2^{\circ-}$. De esta última reacción, se conoce que durante los pasos intermedios que permiten la reducción del oxígeno biológico se forma y libera entre el 1 y el 5 % en forma de $O_2^{\circ-}$ (Kowaltowsky y Vercesi., 1999). Lo anterior sugiere que este mecanismo de la cadena respiratoria, reactivado en forma súbita por la participación de la CND, podría permitir un incremento en la formación de especies de oxígeno reactivas y por consecuencia un incremento en los niveles de MDA.

Es posible que después de una LTME el organismo disminuya su actividad metabólica como un mecanismo de defensa natural para evitar la formación de especies de oxígeno reactivas. Esto concuerda hasta cierto punto con trabajos donde ratas con LTME recibieron un tratamiento a bases de hipotermia con la finalidad de disminuir la actividad metabólica en el sitio de lesión y con ello se observó una disminución en la formación de los radicales libres que participan en el proceso de lipoperoxidación y en la generación de MDA (Dimar J R., et al 2000). En otro trabajo, con un principio similar, se utilizó lidocaina para disminuir el daño provocado por la isquemia en la médula espinal lesionada. En dicho trabajo se destaca el efecto que tiene el fármaco como estabilizador de las membranas celulares, así como la semejanza de su efecto al de la hipotermia, como medida terapéutica. ya que la lidocaina mostró ser efectiva en la disminución de la actividad metabólica de las células nerviosas. En los resultados finales de este estudio se observa una recuperación significativa de los animales tratados con lidocaina, al compararlos con el resto de los grupos (Apaydin y Buket., 2001).

Por otra parte, se ha descrito que los receptores N-metil-D-aspartato (rNMDA), juegan un papel importante en el daño generado al sistema nervioso posterior a una LTME, ya que al incrementar su actividad permiten la entrada masiva de Ca^{+2} al interior de las células nerviosas y con ello la activación de un sin número de enzimas que dañan las estructuras y pueden provocar incluso un daño permanente (Hall, 1992). La actividad de los rNMDA es regulada por muchas sustancias endógenas, incluyendo segundos mensajeros. Más aún, la CND puede regular la función y mantener la estructura de los rNMDA a partir de los fosfatos de alta energía que dona (Mody et al., 1988). En estudios recientes se observó que el pH es un inhibidor alostérico de la actividad de rNMDA durante la isquemia, ya que suprime su actividad cuando el pH fisiológico de 7.4 baja a 6.0. Esta inhibición puede servir como retroalimentación negativa (Traynelis et al., 1995), constituyéndose como un posible mecanismo natural de defensa, debido a que después de una LTME se aumenta la acidez láctica y con ello se disminuye el pH, se inactivan los rNMDA y consecuentemente se disminuye la formación de especies reactivas de oxígeno. En nuestro estudio los animales con LTME que recibieron la CND como tratamiento disminuyeron la acidez láctica, ello podría haber sido causal de la reactivación de los rNMDA y por ende del incremento en el daño observado al final del estudio en este grupo.

Se sabe que la actividad de CPK, es proporcional a la concentración de “nicotinamida-adenina dinucleotido fosfato” (NADPH), y se ha observado que durante procesos patológicos ocasionados por agentes oxidantes, existe una disminución en la concentración de estos substratos, lo que conlleva a un deterioro de la función mitocondrial caracterizado por la baja producción de ATP y una disminución en la actividad de las ATPasas, enzimas involucradas en el equilibrio iónico (Pascoe y Reed., 1989). No obstante lo anterior, y aunque en el presente estudio CND logró incrementar los valores de la CPK, la recuperación motora no fue la esperada. Es posible que esto se deba a que el substrato NADPH es el responsable de la reducción del glutatión (GSH) y este último además de transformar el H_2O_2 en H_2O , paradójicamente también juega un papel importante

en el proceso metabólico de ciertos compuestos endógenos como son prostaglandinas y leucotrienos, factores que participan en la fisiopatología de la LTME, provocando inflamación e incrementando el daño durante la isquemia-reperusión.

A la fecha se reconoce a la MP como el único fármaco aceptado para tratar en seres humanos la LTME en su fase aguda, cuando esta se administró sola o en combinación con CND o con antioxidantes, no se obtuvieron resultados bioquímicos, funcionales ni morfológicos que respaldaran los mostrados por el “National Acute Spinal Cord Injury Study” (Bracken et al., 1992; Bracken et al., 1997). Nuestros resultados, al igual que los de algunos otros grupos, indican que la recuperación motora mostrada por este glucocorticoide no es tan efectiva como inicialmente se argumentó (Fehlings et al; 2001) y como se ha demostrado en otros estudios, este fármaco pone en riesgo la vida del paciente por su carácter inmunosupresor. También se conoce que MP es un antiinflamatorio hasta 4 veces más potente que la hidrocortisona capaz de evitar la acción de prostanoides como son las prostaglandinas, con lo cual disminuye de manera importante el proceso isquémico. Debido a lo anterior, MP de alguna forma se comporta de manera similar a CND, ya que al reestablecer el flujo sanguíneo, se estimula la formación súbita de estructuras que potencialmente pueden incrementar el daño posterior a una LTME.

Es importante mencionar que los animales en los cuales se evitó en gran parte la formación de las especies de oxígeno reactivas a través del tratamiento con antioxidantes fueron finalmente los que presentaron una mejor recuperación motora y un mayor porcentaje de tejido preservado. Lo cual indica de cierta manera que los diferentes mecanismos de lesión secundarios (lipoperoxidación, exitotoxicidad, isquemia, incremento de las concentraciones de Ca^{+2} intracelular, etc.) posiblemente tengan un peso diferente en cuanto al daño final que puedan provocar por separado en el proceso fisiopatológico de la LTME. Es decir que, posiblemente en un balance final sea más importante inhibir la formación de las

especies de oxígeno reactivas para evitar la lipoperoxidación, que el tratar de mantener en forma estable el metabolismo energético de las células nerviosas (incremento de moléculas de ATP) para que estas realicen sus funciones adecuadamente. Quizá a futuro deberá plantearse la terapéutica a diferentes tiempos después de una LTME, es decir, que en un inicio podría atacarse la formación de especies reactivas de oxígeno, en una etapa posterior se podría restaurar el flujo sanguíneo y activar el metabolismo energético y después se podría tratar de activar fenómenos de plasticidad, en lugar de tratar de atacar toda la cascada de eventos fisiopatológicos posteriores a una LTME desde un inicio.

CONCLUSIONES.

En la LTME de intensidad moderada de ratas adultas se observa que:

1. La CND disminuye la acidez láctica significativamente, pero se observa cierta tendencia a incrementar el proceso de lipoperoxidación y los valores de CPK.
2. La CND más MP muestran una tendencia a disminuir el proceso de lipoperoxidación, no así la acidez láctica. Y los valores de CPK se mantienen sin un cambio importante con respecto al control.
3. La CND combinada con DSO y CAT disminuyen tanto el proceso de lipoperoxidación como la acidez láctica y mantienen los valores de CPK.
4. La CND produce una mínima recuperación motora similar a la generada por la MP.
5. Cuando se administró la CND en conjunto con la MP, no se observó la recuperación debido a la mortalidad.
6. La CND administrada en combinación con DSO y CAT, presenta un grado de recuperación motora similar al del grupo con LTME sin tratamiento.
7. La CND provoca una baja preservación del tejido medular, cuando es combinada con antioxidantes CAT + DSO. Y la preservación es nula cuando la combinación es con la MP.
8. El grupo tratado con CND, mantuvo el mayor número de axones mielinizados, después del grupo de LTME sin tratamiento y de laminectomía.

9. Existen diferentes mecanismos secundarios de lesión en la LTME y es posible que alguno de estos tengan mayor peso en cuanto al daño final que se provoca, en comparación con los otros.
10. El intentar restaurar el metabolismo energético en las etapas iniciales después de una LTME puede producir efectos negativos que finalmente se reflejan en la recuperación clínica.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Abeles R H. Biochemistry. Jones and Bartlett Publishers, U.S.A. 1992 p. 484-485.
2. Allen A. R. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. A preliminary report. J Am Med Assn 1911; 57: 878-880.
3. Aluja S. A. Animales de laboratorio y la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Gaceta Médica de México. 2002; 138(3): 294-298.
4. Anderson D. K., Means E. D., Waters T. R. y Green E. S. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. J. Neurosurg. 1982; 56: 106-113.
5. Apaydin Z. A y Buket S. Regional lidocaine infusion reduces postischemic spinal cord injury in rabbits. Tex Heart Inst J. 2001; 28 (3): 172-176.
6. Basso D. M., Beattie M. S. and Bresnahan J. C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. Exp Neurol. 1996; 139: 24-256.
7. Benítez M. T. Aplicación terapéutica del pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa. Información profesional especializada, S.A. de C.V. 1996; 183.
8. Blum K. U. Cocarboxilase and the Erythrocyte Membrane. Met Membrane permeability Erythrocytes Thombocytes Int. 1968; 402-406.
9. 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.
11. Bracken M. B., Shepard M. J., Collins W. F., Holford T. R., Young W. y Baskin D. S. A randomized controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. New Engl. J. Med. 1990; 322: 1405-1411.

12. Bracken M. B., Shepard M. J., Collins W. F., Holford T. R., Baskin D. S., Eisenberg H. M., Flamm E., Summers LL., Maroon J., Marshall L. F., Perot P. L., Sonntag V. K., Wagner F. C., Wilberger J. E. y Winn H. R. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. *J. Neurosurg.* 1992; 76: 26-31.
13. Bracken M. B., Shepard M. J., Holford T. R., Leo-Summers L., Aldrich E. F., Fazi M., Fehlings M., Herr D. L., Hitchon P. W., Marshall L. F., Nockles R. P., Pascale V. y Perot P. L. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazadmesylated for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA.* 1997; 277(20): 1597-1604.
14. Bracken M. B. Methylprednisolone and acute spinal cord injury. An update of the randomized evidence. *SPINE.* 2001; 26(24s): s47-s54.
15. Braughler J. M. y Hall E. D. Lactate and Pyruvate metabolism in injured cat spinal cord before and after a single large intravenous dose of methylprednisolone. *J. Neurosurg.* 1983; 59: 256-261.
16. Braughler J. M. y Hall E. D. Effects of multi-dose methylprednisolone sodium succinate administration on injured cat spinal cord neurofilament degradation and energy metabolism. *J. Neurosurg.* 1984; 61: 290-295.
17. Braughler J. M., Hall E. D., Menas E. D., Waters T. R y Anderson D. K. Evaluation of an intensive methylprednisolone sodium succinate dosing regimen in experimental spinal cord injury. *J. Neurosurg.* 1997; 67: 102-105.
18. Burney R. E., Mario R. F., Maynard F. y Karunas R. Incidence, characteristics and outcome of spinal cord injury at trauma centers in North America. *Arch Surg.* 1993; 128: 596-599.
19. Clarke D. D. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* 6th Ed., edited by G. J. Siegel et al. Published by Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1999. p638-640.
20. Conn E. y Stump P. K. *Bioquímica Energética.* John Wiley and Sons, Inc. New York. 1976. p137-155

21. Constantini S. y Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats : J. Neurosurg. 1994; 80: 97-111.
22. DeVivo M. J., Kartus P. L., Stover S. L. y Fine R.R. Benefits of early admission to an organised spinal cord injury care system. Paraplegia 1990; 510: 355-359.
23. Devlin M. T. Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas. Ed. Reverté. 1991;Tomo I: p339-344.
24. Dimar R. J., Shields B. C., Zhang P. Y., Burke A. D., Raque H. G., y Glassman D. S. The Role of Directly Applied Hypothermia in Spinal Cord Injury. SPINE. 2000; 25: 2294-2302.
25. Ditunno J. F. y Formal C. S. Chronic Spinal Cord Injury. New Engl J. Med. 1994; 330: 550-556.
26. Dixon G. S., Danesh J. N. y Caradoc T. H. Epidemiology of spinal cord injury in new Zeland. Neuroepidemiology. 1993; 12: 88-95.
27. Eisenberg M. G. y Tierney D. O. Changing demographic profile of the spinal cord injury population: implications for health care support systems. Paraplegia. 1985; 23: 335-343.
28. Eninia G. I. Effect o f cocarboxylase on cerebral circulation of patients with arteriosclerosis. Vrach Delo. 1974.
29. Faden A. I., Jacobs t. P. y Patrick D. H. Megadose corticosteriod therapy following experimental spinal cord injury. J. Neurosurg. 1984; 60: 712-717.
30. Farooque M., Hillered L., Holtz A. y Olsson Y . Effects of methylprednisolone on extracellular lactic acidosis and amino acids after severe compression injury of rat spinal cord. J. Neurochem. 1996; 66: 1125-1130.
31. Frank L. TIPS. 1983; p. 4124.
32. Fehlings M. G. y Spine focus panel. The Use of Methylprednisolone in Acute Spinal Cord Injury. SPINE. 2001; 26(24s): s55- s57.
33. Fehlings M. G. Introduction to Focus Issue on Spinal Cord Injury. SPINE. 2001; 26(24s): s1- s12.

34. Ganong F. W. Manual de Fisiología Médica. Ed. El Manual Moderno 1980 México, p575-77.
35. Guizar-Sahagún G., Grijalva I., Madrazo I., Franco-Bourland R., Salgado-Cevallos H., Ibarra A. Y Larriva-Sahd. J. Neuroprotection of completely lacerated spinal cord of adult rats by homotopic and heterotopic transplantation. Restor Neurol Neurosci 1994; 7: 61-70.
36. Gutteridge J. M. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. FEF Lett. 1986; 201: 291-295.
37. Hall E. D., Wolf D. L. y Bruaglier J. M. 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; 61: 124-130.
38. Hall E. D. The Neuroprotective Pharmacology of Methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord. J. Neurosurg. 1992; 76: 13-22.
39. Hogg N. Free radicals in disease. Semin reprod endocrinol. 1998; 16: 241-248.
40. Holtz A., Nyström B. y Gredin B. Effect of methylprednisolone on motor function and spinal cord blood flow after spinal cord compression in rats. acta neurol. Scand. 1990; 82: 68-73.
41. Hurlbert R. J. The Role of Steroids in Acute Spinal Cord Injury. SPINE. 2001; 26 (24s): s39-s46.
42. Ibarra L. G., Donati S. R. y Contreras R. V. Lesiones traumáticas de la médula espinal. Estudio epidemiológico. Cirugía y Medicina de Urgencia 1990; 15 (63): 51-55.
43. Iizuka H., Iwasaki Y. y Yamamoto T. Morphometric assessment of drug effects in experimental spinal cord injury. J Neurosurg 1986; 65: 92-98.
44. Jannot M. F., Raccah D., Dufayet de la Tour D., Coste D., Gouvernet J y Vahgue P. Relationship between neuropathy, hypertension and red blood

- cellNa/K ATPase in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 1999; 25: 35-42.
45. 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.
 46. Kowaltowski J. A. y Vercesi E. A. Mitochondrial Damage Induced by Conditions of Oxidative Stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999. 26 (3/4): 463-471.
 47. Kwon B. K y Wolfram T. Spinal Cord Regeneration. *SPINE*. 2001; 26 (24s): s13-s22.
 48. Larrieu A. J., Kao R. L., Yazdanfar S., Redovan E., Silver J., Ghosh S. C., Magovern G. J. Preliminary evaluation of cocarboxylase on myocardial protection of the rat heart. *Ann Thorac Surg* 1987a; 43:168-171.
 49. Larrieu A. J., Yazdanfar S., Redovan E., Eftychiadis A., Kao R., Silver J., Ghosh S. C. Beneficial effects of cocarboxylase in the treatment of experimental myocardial infarction in dogs. *Am Surg* 1987b; 53: 721-725.
 50. Ley General de Salud de la República Mexicana. Título Séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. Editorial Porrúa, sexta Edición., México D. F. 1990; pp430-431.
 51. Lindenbaum G. A., Larrieu A. J., Carroll S. F., Kapusnick R. A. Effect of cocarboxylase in dogs subjected to experimental septic shock. *Crit Care Med* 1989; 17: 1036-1040.
 52. Lu J., Ken W. S., Ashwell y Waite P. Advances in secondary spinal cord injury. 2000; 25(14): 1859-1866.
 53. 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.
 54. Malachovs K. A. Cocarboxylase toxicity. *Lietuvus TSR Ausbujrs Mokykles Mekslo Darbai, Biol.* 1965; 5: 5-8.
 55. Mc Cord J. M. Superoxide Dismutase, Vol. III (L. W. Oberley, ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985; p. 143.

56. 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.
57. Ohkawa H., Ohishi N. y Yagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissue by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.* 1979; 95: 351-358.
58. Pascoa G. A. y Reed D. J. Free Radical Biol. Med. 1989; 6: 209.
59. Rish B. L., Dilustro J. F. Salazar A. M., Schwab K. A, y Brown H. R. Spinal cord injury: a 25 years morbidity and mortality study. *Mil-Med.* 1997; 162: 141-148.
60. Rooprai H. H., Pratt O. E., Shaw G. K. y Thomson A. D. Thiamine pyrophosphate effect and normalized erythrocyte transketolase activity ratio in wernicke-korsakoff patients and acute alcoholics undergoing detoxification. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997; 21(4): 576-580.
61. 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.
62. Santosacoy C., Ríos C., Franco R., Hong E., Bravo G., Rojas G. y Guizar S .G. Lipid peroxidation by nitric oxide supplements after spinal cord injury: effect of antioxidants in rats. *Neuroscience Letters* 2002; 330: 94-98.
63. 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.
64. Short D. J., El Masry W. y Jones P. High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury – a systematic review from a clinical perspective. *Spinal Cord.* 2000; 38: 273-286.
65. Staub F., Mackert B., Kempfski O., Peters J. y Baethmann A. Swelling and death of neuronal cells by lactic acid. *J Neurol Sci.* 1993; 119: 79-84.
66. Stokes B. T., Fox P. y Hollinden G. Extracellular calcium activity in the injured spinal cord. *Exp Neurol* 1983; 80: 561-572.

67. Stripling T. E. The cost of economic consequences of traumatic spinal cord injury. *Paraplegia News*. 1990: 50-54.
68. 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.
69. Tallaksen C. M., Sande A., Bohmer T., Bell H. Y Karlsen J. Kinetics of thiamin and thiamin phosphate esters in human blood, plasma and urine after 50 mg intravenously or orally. *Eur J Clin Pharmacol*. 1993; 44: 73-78.
70. Tator C. H. y Fehlings M. G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanism. *J. Neurosurg*. 1991; 75: 15-26.
71. Tator C. B. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathology*. 1995; 5: 407-413.
72. Thomas C. E., Morehouse L. A. y Aust S. D. Feritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1985; 260: 3275-3280.
73. Till G. O., Johnson K. J., Kunkel R. y Ward P. A. *J. Clin. Invest.* 1982; 69: 1126.
74. Traynelis S. F., Hartley M., y Heinemann S. F. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science*. 1995; 268: 873-876.
75. Werner R. *Essential Biochemistry and Molecular Biology*. Appleton and Lange Eds. U.S.A. 1992 pp49-50.
76. Whiteneck G. G., Charlifue S. W., Frankel H. L., Fraser M. H., Gardner B. P., Kerhart K. A., Krishnan K. R., Meter R. R., Nuseibeh I., Short D. J. y Silver J. R. Mortality, morbidity, and psychosocial outcomes of persons spinal cord injured more than 20 years ago. *Paraplegia. J. Neurosurg*. 1992; 30: 617-630.
77. Wing P. C., Nance P., Connell D. G. y Gagnon F. Risk of avascular necrosis following short term megadose methylprednisolone treatment. *Spinal Cord*. 1998; 36: 633-636.
78. Yau H. W. Mitochondrial DNA mutation and oxidative damage in aging and

diseases: An emerging paradigm of gerontology and medicine. Proceeding of the National Science Council, ROC. Part B: Life Sciences. 1998; 22(2): 55-67.

79. Yllescas M. E., Udaeta M. E., Salinas R. V. Efecto de la Cocarboxilasa no degradable en la acidosis metabólica del neonato de termino con asfixia perinatal. Perinatal Reprod Hum. 1997; 11: 76-81.
80. Young W. y Flamm E. S. Effects of high dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury. J Neurosurg. 1982; 57: 667-673.