

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Influencia de la lesión traumática de la médula espinal
sobre la inflamación periférica inducida y su respuesta
al naproxeno**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Arianna Rodríguez Cal y Mayor

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

En la especialidad de

Farmacología

Directores de Tesis

Dra. Liliana Favari Perozzi

Dr. Gabriel Guízar Sahagún

CDMX, México.

Junio, 2018.

El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo la dirección de la Dra. Liliana Favari Perozzi y en co-dirección del Dr. Gabriel Guízar Sahagún. Los experimentos se realizaron en el Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), y en el Centro de Investigación Proyecto Camina A. C.

AGRADECIMIENTOS

*A la **Dra. Liliana Favari** y **Dr. Gabriel Guízar** por su apoyo, atención y enseñanzas en la culminación de este trabajo de investigación.*

*Agradezco a la **Dra. Leticia Cruz** y **Dr. Gilberto Castañeda** por ser mis formadores, por su gran apoyo y amistad brindada, ha sido un privilegio poder contar con su guía.*

*A la **Dra. Ma. Carmen García** y **Dra. Claudia Pérez** como sinodales, por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo.*

*A la **QFB. Ma. de Lourdes González**, a la **Biol. Teresa García** y a la **MVZ. Angelina Martínez** por su asistencia técnica en la realización de este proyecto.*

*A **Lulu, amigos y compañeros del Laboratorio 34** con quienes compartí todos estos años: experiencias, conocimientos y trabajo en el laboratorio e hicieron amena y alegre mi estancia. Gracias por su amistad.*

*Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt)**, por el apoyo económico brindado a lo largo del doctorado (no. Beca 378379).*

A mi papá, mamá y hermana

Por estar conmigo y apoyarme siempre, sobre todo por creer en mí, por la motivación constante a superarme y que me ha permitido ser una persona de bien, por su amor.

A toda mi familia

Por su apoyo, sus porras, por adoptarme y acompañarme en estos años y también por su gran cariño hacia mí.

A mis amigas de siempre

Aunque a la distancia, pero siempre en contacto y motivándonos a ser mejores.

A mis amigos

Quienes iniciaron conmigo este nuevo camino, los que se fueron y los que se sumaron, gracias por su amistad y cariño.

Muchas gracias a todos por ayudarme a alcanzar esta meta.

DEDICATORIA

A mi familia y amigos.

Cuanto mayor es el esfuerzo, mayor es la satisfacción al lograrlo.

Los resultados de este trabajo de investigación se presentaron en el XLIX Congreso Nacional y VII Internacional de Ciencias Farmacéuticas 2016, que se llevó a cabo en septiembre del 2016 en Huatulco, Oaxaca, México.

Y se publicó el artículo:

Rodríguez-Cal y Mayor, A., Cruz-Antonio, L., Castañeda-Hernández, G., Favari-Perozzi, L., Guízar-Sahagún, G. **Time-dependent changes in paw carrageenan-induced inflammation above and below the level of low thoracic spinal cord injury in rats.** *Spinal Cord*, 2018.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	<i>i</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>v</i>
LISTA DE TABLAS	<i>vii</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>viii</i>
RESUMEN	<i>ix</i>
ABSTRACT	<i>xi</i>
1 INTRODUCCIÓN	<i>1</i>
1.1 Generalidades del sistema nervioso	<i>1</i>
1.1.1 Sistema nervioso autónomo	<i>2</i>
1.2 Anatomía de la médula espinal	<i>3</i>
1.3 Lesión de la médula espinal	<i>8</i>
1.3.1 Clasificación de la lesión medular	<i>9</i>
1.3.2 Fisiopatología de la LM	<i>10</i>
1.3.2.1 Fases del daño a la médula espinal	<i>11</i>
1.3.2.1.1 Fase aguda	<i>11</i>
1.3.2.1.2 Fase subaguda	<i>13</i>
1.3.2.1.3 Fase crónica	<i>14</i>
1.3.3 Alteraciones sistémicas y metabólicas posteriores a la LM	<i>15</i>
1.4 Respuesta inflamatoria periférica	<i>18</i>
1.4.1 Clasificación	<i>18</i>
1.4.1.1 Inflamación Aguda	<i>18</i>
1.4.1.2 Inflamación Crónica	<i>21</i>
1.4.2 Mediadores de la inflamación	<i>22</i>
1.4.3 Inflamación neurogénica	<i>23</i>
1.5 Modelo de inflamación subplantar inducida por carragenina	<i>24</i>

1.6	Fármacos Anti-inflamatorios	26
1.6.1	Mecanismo de acción periférico	26
1.6.2	Mecanismo de acción central	28
1.7	Naproxeno	29
1.7.1	Propiedades físicas y químicas	29
1.7.2	Características farmacocinéticas	30
1.8	Alteraciones farmacocinéticas después de LTME	31
2	JUSTIFICACIÓN	34
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
4	HIPÓTESIS	36
5	OBJETIVOS	37
5.1	General	37
5.2	Particulares	37
6	MATERIALES Y MÉTODOS	38
6.1	Animales de experimentación	38
6.1.1	Anestesia	38
6.1.2	Cirugía simulada, Sham	39
6.1.3	Lesión medular a nivel de T9	39
6.1.4	Cuidados post-cirugía	39
6.2	Evaluación de la Respuesta Inflamatoria	40
6.2.1	Inducción de la respuesta inflamatoria	40
6.2.1.1	Preparación de Carragenina 2%	41
6.2.2	Cuantificación de la respuesta inflamatoria	41
6.2.2.1	Preparación de la solución para el Pletismómetro	42
6.3	Método Analítico para la cuantificación de naproxeno por HPLC	43
6.3.1	Equipo y condiciones cromatográficas	43
6.3.2	Soluciones para el análisis por HPLC	44
6.3.2.1	Preparación del buffer de fosfato de sodio 0.01M	44
6.3.2.2	Preparación de la fase móvil	44
6.3.2.3	Preparación del Estándar Interno (EI)	45

6.3.2.4	Preparación de soluciones estándar de Naproxeno	45
6.3.2.4.1	Solución de Naproxeno 100 µg/mL	45
6.3.2.4.2	Solución de Naproxeno 10 µg/mL	45
6.3.3	Procedimiento para el análisis de muestras de plasma de rata para la revalidación del método analítico.	45
6.3.3.1	Selectividad	45
6.3.3.2	Curva de Calibración	46
6.3.3.3	Precisión y Exactitud	47
6.3.3.3.1	Análisis intra-día (Repetibilidad)	48
6.3.3.3.2	Análisis inter-día (Reproducibilidad)	48
6.3.3.4	Límite inferior de Cuantificación (LIC)	48
6.3.3.5	Límite de Detección (LD)	49
6.4	Estudio Farmacocinético del Naproxeno	49
6.4.1	Administración del fármaco	49
6.4.1.1	Preparación de la dosis de naproxeno	49
6.4.2	Toma de muestras	50
6.4.3	Análisis de muestras	50
6.4.4	Determinación de los parámetros farmacocinéticos	51
6.5	Evaluación del efecto anti-inflamatorio de Naproxeno	52
6.6	Análisis Estadístico	52
6.7	Aspectos Éticos	53
7	RESULTADOS	54
7.1	Modelo de Inflamación subplantar inducida por carragenina	54
7.2	Influencia de la LTME sobre la respuesta inflamatoria	56
7.2.1	Efecto de la lesión medular en la etapa aguda sobre la respuesta inflamatoria local inducida por carragenina	56
7.2.2	Efecto de la lesión medular en la etapa subaguda sobre la respuesta inflamatoria local inducida por carragenina	58
7.2.3	Efecto del tiempo post-lesión medular en la respuesta inflamatoria local	60
7.3	Revalidación del Método Analítico para la Cuantificación del Naproxeno	62
7.3.1	Selectividad	62
7.3.2	Curvas de Calibración	64

7.3.3	Precisión y Exactitud	65
7.3.4	Límite Inferior de Cuantificación	67
7.3.5	Límite de Detección	67
7.4	Efecto de la LTME sobre la farmacocinética del naproxeno	68
7.4.1	Perfiles y parámetros farmacocinéticos de los grupos controles	68
7.4.2	Efecto de la lesión medular en la etapa aguda sobre la farmacocinética de NPX	70
7.4.3	Efecto de la lesión medular en la etapa subaguda sobre la farmacocinética de NPX	71
7.4.4	Efecto del tiempo post-lesión sobre la farmacocinética del naproxeno	73
7.5	Efecto anti-inflamatorio del Naproxeno	76
7.5.1	Efecto anti-inflamatorio de la administración de Naproxeno IV en ratas con cirugía sham	76
7.5.2	Influencia de la LTME sobre el efecto anti-inflamatorio del Naproxeno	79
8	<i>DISCUSIÓN</i>	83
8.1	Sobre el diseño experimental de este trabajo	84
8.2	Influencia de la LTME en la etapa aguda sobre la respuesta inflamatoria	86
8.3	Influencia de la LTME en la etapa subaguda sobre la respuesta inflamatoria	88
8.4	Acerca de la región o el nivel de la lesión medular	91
8.5	Influencia de la LTME sobre la farmacocinética del naproxeno	93
8.6	Influencia de la LTME sobre el efecto anti-inflamatorio del naproxeno	98
8.7	Implicaciones clínicas del estudio	99
9	<i>CONCLUSIONES</i>	101
10	<i>PERSPECTIVAS</i>	103
11	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	104
12	<i>ANEXOS</i>	117
	Anexo 1: Variación del peso corporal de la rata	117
	Anexo 2: Cuantificación de las proteínas plasmáticas totales	118
	Anexo 3: Cuantificación de la albúmina plasmática	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema Nervioso.	2
Figura 2. Segmentos de la columna vertebral.	3
Figura 3. Estructura de la médula espinal.	5
Figura 4. Nervios raquídeos y vías autonómicas eferentes de la médula espinal.	7
Figura 5. Etiología de la lesión de la ME.	9
Figura 6. Clasificación de la LM según el nivel.	10
Figura 7. Mecanismos de la lesión medular.	11
Figura 8. Estructura Química de λ -Carragenina.	25
Figura 9. Mecanismo de acción de los AINES.	27
Figura 10. Estructura química del naproxeno.	29
Figura 11. Efecto de la inyección de carragenina y solución salina en las patas de ratas sham.	55
Figura 12. Curso temporal del cambio de volumen de la pata después de la inyección de carragenina en ratas con 1 día post-cirugía.	57
Figura 13. Curso temporal del cambio de volumen de la pata posterior a la inyección de carragenina en ratas 15 días post-cirugía.	59
Figura 14. Comparación de la inflamación producida en las extremidades entre 1 y 15 días post-cirugía.	61
Figura 15. Comparación de la inflamación producida por CRG entre las extremidades superiores e inferiores de las ratas lesionadas.	61
Figura 16. Cromatogramas representativos.	63
Figura 17. Curva de calibración para la determinación de NPX en plasma de rata.	65
Figura 18. Concentraciones plasmáticas promedio de naproxeno en plasma de rata sham a 1 y 15 días post-cirugía.	69
Figura 19. Concentraciones plasmáticas promedio de naproxeno en el plasma de rata con lesión medular en la etapa aguda (1 día post-cirugía).	70
Figura 20. Concentraciones plasmáticas promedio de naproxeno en plasma de rata con lesión medular en la etapa subaguda (15 días post-cirugía).	72
Figura 21. Concentraciones plasmáticas promedio de naproxeno en plasma de rata con lesión medular a 1 y 15 días post-cirugía.	74

Figura 22. Efecto anti-inflamatorio del naproxeno después de la inyección de carragenina en ratas sham.	77
Figura 23. Efecto anti-inflamatorio del naproxeno en ratas sham.	78
Figura 24. Efecto anti-inflamatorio del naproxeno después de la inyección de carragenina en ratas LTME.	80
Figura 25. Efecto anti-inflamatorio en ratas con lesión medular.	81
Figura 26. Variación del peso corporal en los grupos experimentales.	117
Figura 27. Cuantificación de las proteínas plasmáticas totales en los grupos experimentales.	119
Figura 28. Cuantificación de la albúmina plasmática en los grupos experimentales.	121

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Alteraciones sistémicas y metabólicas después de una LTME.	17
Tabla 2. Condiciones cromatográficas del método para la determinación simultánea de los fármacos.	44
Tabla 3. Curva de calibración para la determinación de naproxeno en plasma de rata.	47
Tabla 4. Puntos Controles para determinar la precisión y exactitud del método.	48
Tabla 5. Áreas bajo la curva de la respuesta inflamatoria inducida por la inyección de carragenina subplantar.	56
Tabla 6. Curva de calibración del método para naproxeno.	64
Tabla 7. Precisión y exactitud intra-día para la determinación de NPX.	66
Tabla 8. Precisión y exactitud inter-día para la determinación de NPX.	66
Tabla 9. Determinación del límite de cuantificación de NPX.	67
Tabla 10. Determinación del límite de detección de NPX.	68
Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos controles para el naproxeno.	69
Tabla 12. Parámetros farmacocinéticos para el naproxeno después de una lesión medular en la etapa aguda.	71
Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos para el naproxeno después de una lesión medular en la etapa subaguda.	72
Tabla 14. Parámetros farmacocinéticos para el naproxeno después de una lesión medular en T9.	74
Tabla 15. Resumen de los parámetros farmacocinéticos del NPX en todos los grupos experimentales.	75
Tabla 16. Áreas bajo la curva del volumen de la repuesta anti-inflamatoria por efecto de la administración de naproxeno.	82

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidónico
ABC	Área bajo la curva
AINES	Anti-inflamatorios no esteroideos
CI	Depuración
COX	Enzima Ciclooxygenasa
CRG	Carragenina
CV	Coeficiente de variación
DE	Desviación estándar
EI	Estándar interno
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (siglas en inglés)
IC	Intervalo de confianza
IV	Vía intravenosa
LIC	Límite inferior de cuantificación
LD	Límite de detección
LM	Lesión medular
LTME	Lesión traumática de la médula espinal
ME	Médula espinal
NO	Óxido Nítrico
NOM	Norma Oficial Mexicana
NPX	Naproxeno
PGs	Prostaglandinas
SCI	Spinal Cord Injury (siglas en inglés)
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
t_{1/2}	Tiempo de vida media
T9	Torácica 9
UV	Ultravioleta
Vd	Volumen de distribución

RESUMEN

Diversas evidencias sugieren que la lesión medular (LM) altera la respuesta inmune e inflamatoria, lo que se manifiesta, en una elevada predisposición a sufrir infecciones. Tales alteraciones pueden resultar de la falta de control cerebral a múltiples órganos y tejidos por la desconexión anatómica y funcional que produce el daño medular. La información sobre la respuesta inflamatoria periférica en personas o animales con LM es muy escasa. Se desconoce en particular si la respuesta inflamatoria es diferente entre extremidades paralizadas vs. íntegras y si la respuesta a un anti-inflamatorio varía de acuerdo al estatus en la señalización neurológica. Por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar la influencia de la lesión traumática de médula espinal (LTME) en la etapa aguda y subaguda ante un desafío inflamatorio, así como también determinar el efecto de dicha lesión sobre la farmacocinética y el efecto anti-inflamatorio de la administración de naproxeno (NPX) por vía intravenosa (IV). Para cumplir con este propósito, se utilizaron ratas adultas Sprague-Dawley a las cuales se le produjo una lesión severa en la médula espinal por contusión a nivel de la región torácica baja (T9). Posteriormente, a los uno y 15 días después de la lesión se les indujo la inflamación mediante una inyección de carragenina (CRG) al 2% en el cojinete de la pata delantera y trasera, y solución salina como testigo. Se evaluó la respuesta inflamatoria de 0 a 6 horas usando un pletismómetro. De la misma forma se procedió con ratas sujetas a lesión simulada (sham). Adicionalmente, en otro grupo de ratas empleando el mismo tipo de lesión y cirugía sham, se realizó un estudio farmacocinético de NPX IV (10 mg kg^{-1}) utilizando un método analítico basado en determinaciones plasmáticas del fármaco por HPLC. Así mismo, se evaluó el efecto anti-inflamatorio de dicha administración, y de su vehículo como testigo, en ratas con las mismas condiciones experimentales mencionadas. Como resultados del estudio, se observó que la LTME en su etapa aguda (1 día posterior a la lesión) suprime drásticamente la respuesta inflamatoria en ambas extremidades, mientras que en la etapa subaguda (15 días posteriores a la lesión) la inflamación en la extremidad superior fue re-establecida completamente y en la

extremidad inferior se recuperó solo un 50% con respecto a los grupos sham. Al evaluar la farmacocinética del NPX no se observaron cambios significativos entre los grupos que afectaran su farmacodinamia. El efecto anti-inflamatorio del NPX no se pudo determinar en la etapa aguda debido a la ausencia de inflamación, mientras que en la etapa subaguda el efecto del NPX sólo fue significativo en la extremidad superior (íntegra). Lo anterior sugiere que la pérdida de la regulación neuronal después de una LM ocasiona alteraciones en la respuesta inflamatoria periférica y en el efecto anti-inflamatorio del NPX, donde dichos cambios son influenciados significativamente por el estado neurológico de la región expuesta a la inflamación y por el tiempo transcurrido después de la lesión.

ABSTRACT

Spinal cord injury (SCI) alters immune and inflammatory responses, resulting in a high predisposition to infections. It is presumed that such alterations result from the lack of cerebral control of immune organs and tissues due to the anatomical and functional disconnection produced by spinal cord damage. Information on the peripheral inflammatory response in persons or animals with SCI is scarce. In particular it is unknown if the inflammatory response is different between paralyzed versus intact limbs and if the response to anti-inflammatory drugs varies according to the neurological status. Therefore, the objective of this study was to characterize the influence of acute and subacute stage SCI on paw-induced inflammation in intact and paralyzed limbs, as well as on the pharmacokinetics and anti-inflammatory effect of the administration of naproxen (NPX) given intravenously (IV). For these purposes, adult Sprague-Dawley rats were subjected to severe spinal cord contusion at low thoracic level (T9). Subsequently, one and 15 days after injury, inflammation was induced by injection of 2% carrageenan (CRG) in the pad paw of the fore and hindlimbs, and saline as a control. The inflammatory response was evaluated from 0 to 6 hours using a plethysmometer. Rats subject to sham-injury (sham) were used as control. In other series of experiments, rats with the same type of lesion and sham surgery were used for a pharmacokinetic study of NPX IV (10 mg kg^{-1}) by an analytical method based on plasma determinations of the drug by HPLC. In addition, the anti-inflammatory effect of NPX, and of its vehicle as control, was evaluated in rats with the same injury or sham conditions. Results: the SCI suppressed in the acute stage (1 day post-injury) the induced inflammatory response in both limbs, while in the subacute stage (15 days post-injury) the inflammation in the forelimb was completely re-established and in the hindlimb only 50% was recovered with respect to the sham groups. When evaluating the pharmacokinetics of NPX, no significant changes were observed between the groups that affected their pharmacodynamics. The anti-inflammatory effect of NPX could not be determined in the acute stage due to the absence of inflammation, while in the subacute stage

the effect of NPX was only significant in forelimb (intact limbs). Our results suggest that the loss of neuronal regulation after SCI causes alterations in the inflammatory response and in the anti-inflammatory effect of NPX. Such alterations are significantly influenced both by the neurological status of the exposed limbs to the inflammatory challenge, and by the time elapsed after injury.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del sistema nervioso

El sistema nervioso tiene dos partes, el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). La médula espinal junto con el cerebro componen el SNC, que controla la mayoría de las funciones del cuerpo. El SNP comprende todos los otros nervios del cuerpo (Figura 1).

Los nervios periféricos y la médula espinal tienen muchas fibras nerviosas las cuales transportan información entre el cerebro y las diferentes partes del cuerpo. Esta información puede ser relacionada con actividades conscientes como el movimiento y las sensaciones. Esta parte consciente del sistema nervioso, se conoce también como sistema nervioso somático. La parte inconsciente del sistema nervioso se conoce como sistema nervioso autónomo (SNA). Este sistema está dividido en sistema nervioso simpático, el cual estimula los órganos y sus funciones en condiciones de estrés y excitación, y en el sistema nervioso parasimpático, el cual conserva energías y recursos durante momentos de descanso y relajación (1). Por su importancia para nuestro estudio, detallamos diversos aspectos del SNA en la siguiente sección.

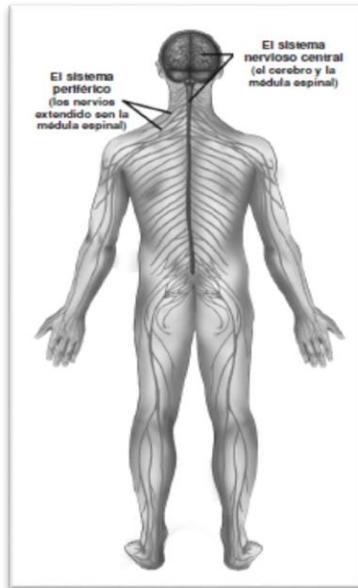


Figura 1. Sistema Nervioso.

El Sistema Nervioso se divide en SNC y SNP. Modificada de NINDS, 2005 (2).

1.1.1 Sistema nervioso autónomo

El cuerpo posee un SNA, el cual controla las actividades involuntarias del cuerpo como la presión sanguínea, la temperatura corporal y el sudor. El SNA está constituido por dos divisiones o ramas que están anatómica y funcionalmente diferenciadas: la parte simpática y la parasimpática.

Los centros de la división simpática se hallan situados en las regiones dorsal y lumbar de la médula espinal, mientras que los de la división parasimpática se localizan en el tallo cerebral y en la región sacra de la médula. Las neuronas preganglionares de carácter simpático, se encuentran en el asta lateral de la médula espinal torácica y lumbar. Las neuronas preganglionares del parasimpático salen del tallo cerebral junto con los nervios craneales para dirigirse a los músculos y glándulas de la cabeza, así como a los órganos en el tórax y el abdomen. La mayoría de los órganos reciben innervaciones de ambas divisiones para regular sus funciones y las respuestas frente a la estimulación por ambos tipos de fibras pueden ser antagónico o sinérgico (1) (Figura 4).

1.2 Anatomía de la médula espinal

La médula espinal es una estructura blanda y gelatinosa que está protegida por la columna vertebral. La columna vertebral está compuesta por 33 vértebras. Las vértebras están alineadas una encima de otra por lo que la médula espinal se extiende a lo largo del canal hueco creado por la unión de estos huesos. La columna vertebral se divide en secciones y las vértebras son identificadas y enumeradas de arriba hacia abajo de acuerdo con su ubicación a lo largo de la espina dorsal.

Teniendo así las vértebras cervicales (1-7) situadas en el cuello, las vértebras dorsales o torácicas (1-12) en la parte superior de la espalda, las vértebras lumbares (1-5) en la parte inferior de la espalda, las vértebras sacras (1-5) en el área de la cadera y las vértebras coccígeas (1-4) fusionadas, localizadas en el cóccix (Figura 2) (3).



Figura 2. Segmentos de la columna vertebral.

Las cuatro divisiones de las vértebras y sus nervios raquídeos asociados. Modificada de NINDS, 2005 (2).

La médula espinal tiene una región central de tejido que contiene el cuerpo de células nerviosas y está rodeada por paquetes de fibras nerviosas largas (axones). Los axones se extienden hacia arriba y hacia abajo de la médula espinal, transmitiendo señales hacia y desde el cerebro. La dimensión promedio de la médula espinal varía en su circunferencia a lo largo de la misma. La médula espinal se extiende hacia abajo a través de los dos tercios superiores del conducto vertebral, desde la base del cerebro hasta la parte inferior de la espalda.

El interior de la médula espinal está compuesto de neuronas, células gliales (astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células ependimarias) y vasos sanguíneos. Las neuronas y sus dendritas (prolongaciones cortas, ramificadas, que ayudan a las neuronas a comunicarse unas con otras) habitan en una región en forma de H llamada “sustancia gris” (Figura 3), esta contiene las neuronas motoras que controlan el movimiento, las interneuronas de menor tamaño que manejan la comunicación al interior y entre los segmentos de la médula espinal, y las células que reciben las señales sensitivas y luego envían la información hacia el control cerebral.

Rodeando a la sustancia gris se encuentra la sustancia blanca, formada principalmente por axones envueltos en una sustancia llamada mielina, la cual permite que las señales eléctricas se muevan libre y rápidamente. La mielina tiene una apariencia blancuzca, razón por la cual se le llama a esta sección “sustancia blanca”. Las funciones de estos nervios están determinadas por su ubicación en la médula espinal. Ellos controlan todo, desde las funciones del cuerpo, como respirar, sudar, la digestión y la eliminación, hasta las habilidades motoras y las actividades motoras finas, así como las sensaciones en brazos y piernas (3).

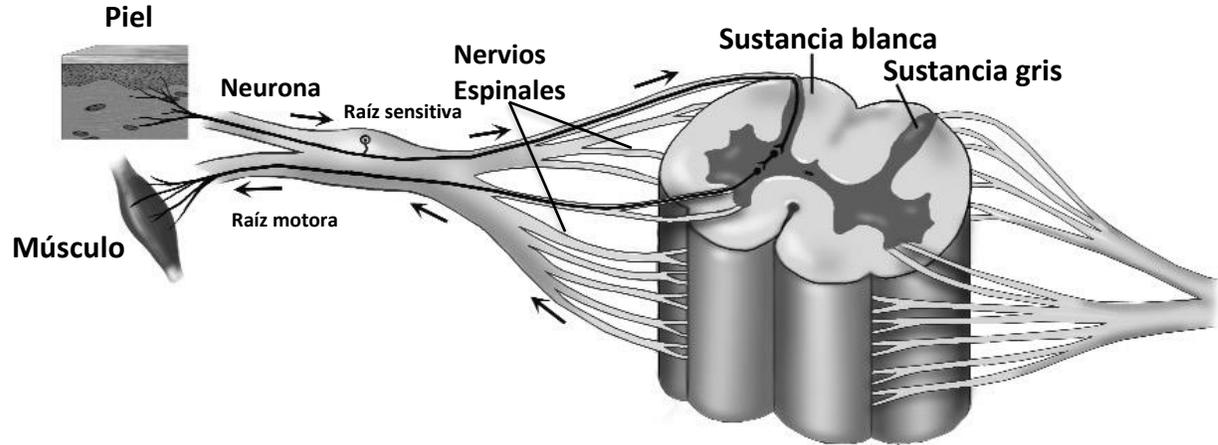


Figura 3. Estructura de la médula espinal.

Corte transversal de la médula espinal que muestra la distribución de la sustancia gris, de la sustancia blanca, y de los nervios raquídeos. Modificada de NINDS, 2005 (2).

La médula espinal también está organizada en segmentos que son identificados y enumerados de arriba hacia abajo. Cada segmento marca el punto donde los nervios raquídeos salen de la médula para conectar con regiones específicas del cuerpo. La ubicación de los segmentos de la médula espinal no corresponde exactamente con la ubicación de las vértebras, pero son aproximadamente equivalentes.

Por lo que los nervios raquídeos se dividen en:

Nervios raquídeos cervicales (C1-C8): controlan las señales que van a la parte de atrás de la cabeza, al cuello y los hombros, a los brazos y las manos, y al diafragma.

Nervios raquídeos dorsales (T1-T12): controlan las señales que van a los músculos torácicos, a ciertos músculos de la espalda y a partes del abdomen.

Nervios raquídeos lumbares (L1-L5): controlan las señales que van a partes inferiores del abdomen y la espalda, a las nalgas, a algunas partes de los órganos genitales externos y a partes de las piernas.

Nervios raquídeos sacros (S1-S5) controlan las señales que van a los muslos y a las partes inferiores de las piernas, a los pies, a la mayoría de los órganos genitales y al área alrededor del ano.

Y el único nervio coccígeo (C1) de la médula espinal que transmite la información sensitiva proveniente de la piel de la región inferior de la espalda (Figura 4) (1).

La médula espinal actúa como la principal vía de información entre el cerebro y todos los otros sistemas nerviosos del cuerpo. Recibe información sensitiva de la piel, las articulaciones y los músculos del tronco, los brazos y las piernas, y luego la retransmite hacia el cerebro. Asimismo, transmite mensajes descendentes desde el cerebro hacia el sistema nervioso periférico, y contiene neuronas motoras que dirigen los movimientos voluntarios y regulan los movimientos reflejos. Debido al papel central que juega en la coordinación de los movimientos musculares y la interpretación de los estímulos sensitivos, cualquier clase de lesión de la médula espinal puede causar problemas significativos en todo el cuerpo(3).

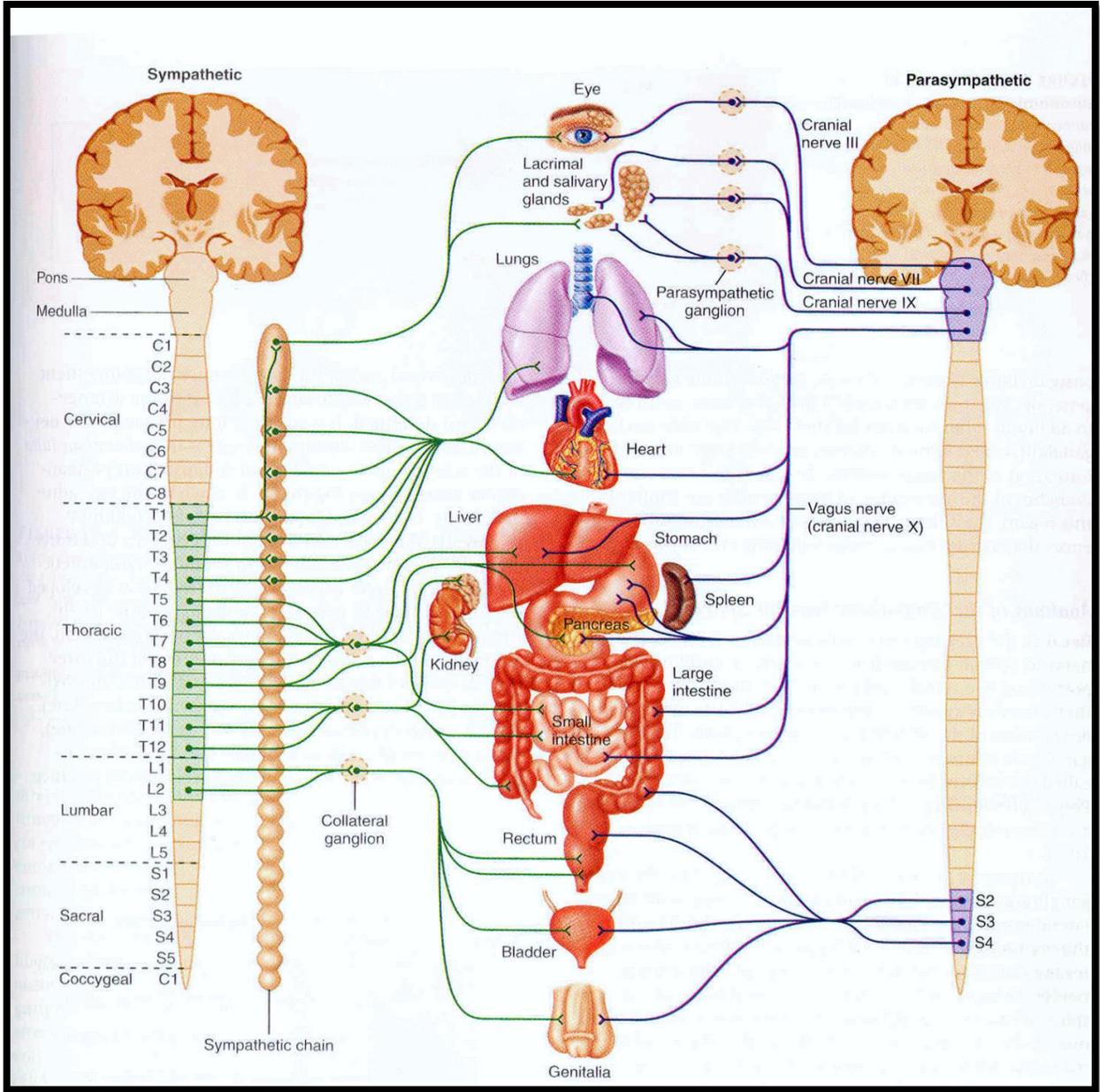


Figura 4. Nervios raquídeos y vías autonómicas eferentes de la médula espinal.
 Líneas verdes: fibras preganglionares de carácter simpático; Líneas moradas: fibras preganglionares de carácter parasimpático. Modificada de Guyton, 2006 (1)

1.3 Lesión de la médula espinal

A pesar de que los huesos de la columna vertebral protegen la médula espinal, la columna vertebral no está compuesta completamente por hueso, entre las vértebras se encuentran discos de cartílago semirígido, y en el espacio estrecho que hay entre estos discos se encuentran los conductos por donde salen los nervios raquídeos hacia el resto del cuerpo. Estos son los lugares donde la médula espinal es vulnerable a las lesiones directas (4).

Las vértebras se pueden romper o dislocar en una variedad de formas y causar lesiones traumáticas a la médula espinal. Las lesiones pueden ocurrir a cualquier nivel de la médula espinal. El segmento de la médula que es lesionado y la severidad de la lesión, determinarán qué funciones del cuerpo quedarán afectadas o se perderán y que consecuencias fisiológicas se presentarán.

Una lesión medular se puede definir como un trauma o trastorno fisiopatológico a nivel de la médula espinal, que altera la transmisión de impulsos nerviosos, en la que los nervios por encima de la lesión funcionan normalmente, pero por debajo de ésta, funcionan de manera anormal.

La médula puede lesionarse por fracturas de la columna vertebral o por luxación, por heridas penetrantes causadas por fragmentos metálicos de proyectiles o por otras causas traumáticas, y ocasiona pérdida motora, sensorial y alteraciones en la función del SNA. Las causas más frecuentes de este tipo de lesión son las caídas domésticas o laborales, accidentes de tránsito, violencia (heridas por arma de fuego) y la práctica de algunos deportes extremos (Figura 5). Afecta principalmente a la población económicamente activa (5, 6).

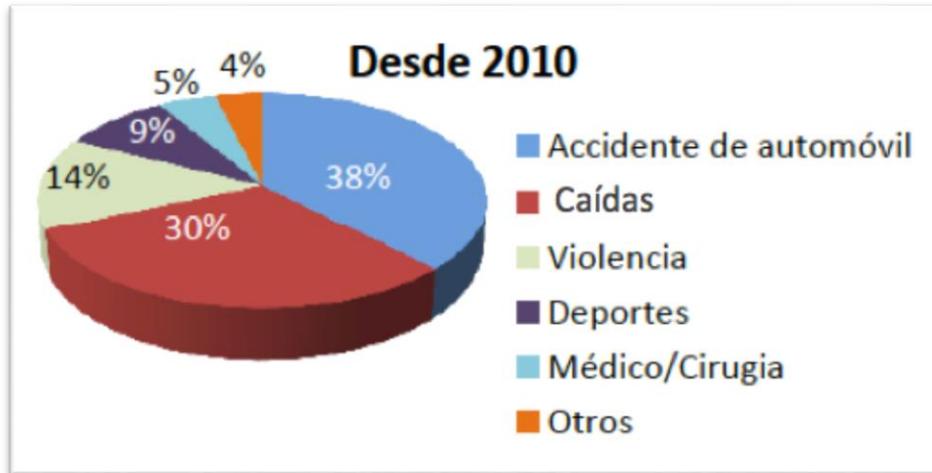


Figura 5. Etiología de la lesión de la ME.

Causas más frecuentes de una lesión en la médula espinal. Tomada de National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2016 (7).

1.3.1 Clasificación de la lesión medular

Cualquier daño a la médula espinal es una lesión muy compleja. Cada lesión es diferente y puede afectar el cuerpo en formas diferentes. La lesión en la médula puede ser de tipo completa e incompleta de acuerdo a la severidad. En personas con lesión completa no hay movimientos voluntarios ni sensibilidad por debajo del nivel de la lesión, mientras que en una lesión incompleta se preserva parcialmente alguna de estas funciones. Entre más alta sea la lesión, es decir más cercana al cerebro, mayor será la pérdida de la función (8).

También se clasifica dependiendo del nivel afectado. Se puede producir una paraplejía, cuando la lesión se localiza en el área torácica o lumbar, y sólo las piernas quedan paralizadas. Y una tetraplejía o cuadriplejía cuando el daño se ubica en el área cervical, donde se produce una parálisis tanto de brazos como de piernas (8) (Figura 6).

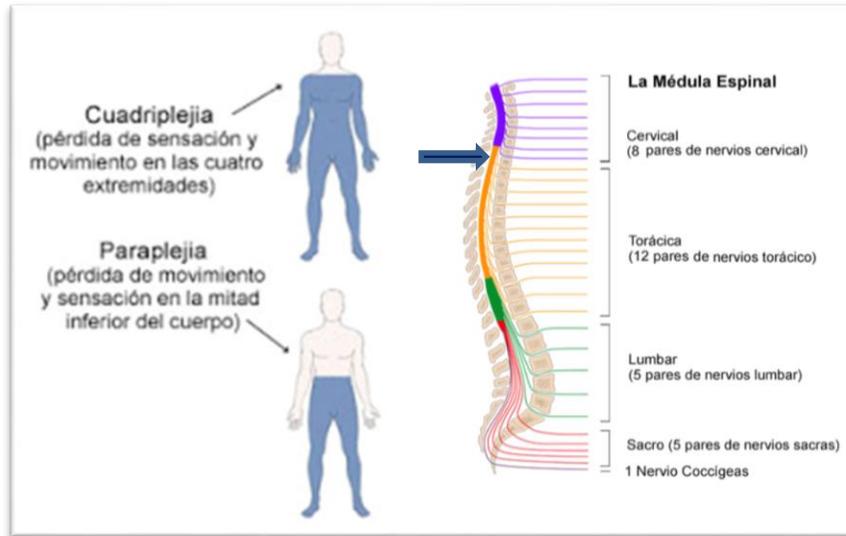


Figura 6. Clasificación de la LM según el nivel.

Se produce una cuadriplejía cuando la LM ocurre a nivel cervical y una paraplejía cuando sucede a nivel torácico-lumbar. Modificada de International Standards for Neurological Classification of SCI, 2011 (8).

1.3.2 Fisiopatología de la LM

Después de una lesión medular se produce un daño primario que resulta del efecto mecánico del traumatismo. Este daño directo a la médula espinal afecta el tejido nervioso y los vasos sanguíneos de manera inmediata y desencadena una serie de mecanismos autodestructivos y en cierta medida reparadores, que se conoce como “daño secundario” y que se han asociado a la destrucción progresiva de tejido originalmente preservado. Estos mecanismos incluyen excitotoxicidad, formación de radicales libres, liberación de proteasas y una respuesta inflamatoria que inicialmente involucra a los neutrófilos y más tarde a linfocitos y macrófagos(9, 10) (Figura 7). La cascada de acontecimientos iniciada por el trauma medular incluye cambios en la permeabilidad vascular, el desarrollo de edema, la infiltración de células inflamatorias y la activación de la microglía (11, 12).

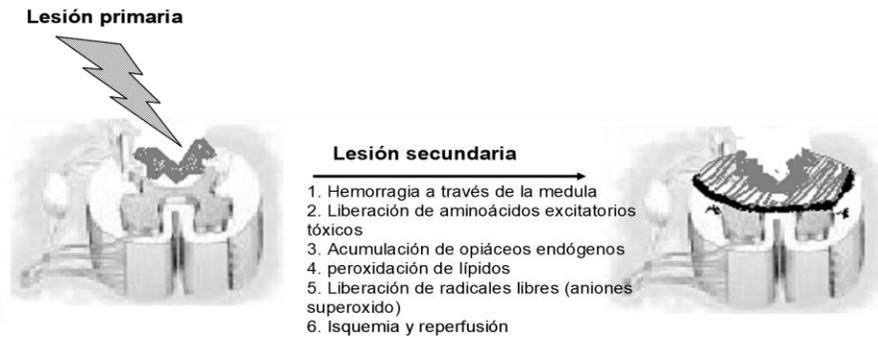


Figura 7. Mecanismos de la lesión medular.

La lesión primaria son los daños estructurales que ocurren inmediatamente después del evento traumático y la lesión secundaria resulta de las cascadas bioquímicas que se producen después del evento inicial. Modificada de Zeidman SM, *et al.*, 1996 (13).

1.3.2.1 Fases del daño a la médula espinal

En la médula espinal dañada por compresión o traumatismo, la secuencia temporal de los cambios anatómicos-patológicos luego de una lesión se divide en fases: aguda, subaguda y crónica (14).

1.3.2.1.1 Fase aguda

- Se destruye la barrera hematoencefálica y los vasos sanguíneos locales, y se produce la alteración en la microvasculatura de la sustancia gris.
- Las células sanguíneas y las proteínas del plasma invaden el área lesionada, se presenta el edema. La destrucción de los capilares causa isquemia e hipoxia.
- Necrosis y degeneración de la mielina de los axones dañados entre 8-24 h más tarde y después de 48 h, los fagocitos sanguíneos se acumulan localmente para eliminar la mielina degenerada y otros residuos celulares.
- Cambios en el flujo sanguíneo e hipoperfusión postraumática afectan principalmente a la sustancia gris e inducen la muerte neuronal primaria (15).

- La sustancia blanca es más resistente a los efectos de la isquemia e hipoxia, aunque con la lesión se produce una hiperemia inicial y una isquemia posterior.
- Sustancias como los tromboxanos, los leucotrienos, el factor activador de plaquetas, la serotonina y los opioides endógenos, contribuyen a reducir el flujo microcirculatorio (16).
- Las concentraciones de fosfatos de alta energía disminuyen, la función metabólica se deprime y el ambiente medular se vuelve anaeróbico tras el trauma. Entre 4-24 h después, la función metabólica tiende a aumentar y cambia a un metabolismo oxidativo en el tejido que permanece viable, originando acidosis láctica.
- Interrupción del flujo sanguíneo debida al estrés mecánico propicia la formación de edema generado por el aumento de la presión local. El edema se localiza en la porción central del cordón espinal y se expande de manera centrífuga a la sustancia blanca.
- La formación de edema es máxima los primeros días después de la lesión, éste comprime el tejido y produce una variación anormal en las concentraciones de electrolitos.
- Se induce la liberación de bradicininas, citocinas, histaminas y óxido nítrico que contribuyen a aumentar la permeabilidad vascular (17-19).
- Las variaciones leves sobre las concentraciones de los iones, como Ca^{++} , Na^+ y K^+ en el fluido intersticial, perturban la excitabilidad y la transmisión sináptica.
- El exceso de calcio tiene un efecto nocivo sobre la función de las neuronas que aún permanecen vivas y puede llegar a causar su muerte. La activación de las fosfolipasas dependientes de calcio, como la fosfolipasa C y A2, tiene como resultado la alteración de la membrana celular y la producción de ácido araquidónico (20).
- El metabolismo del ácido araquidónico produce tromboxanos, leucotrienos y especies reactivas de oxígeno, que promueven el daño tisular e inflamación, afectan el flujo sanguíneo e influyen en el daño secundario.

- La agregación plaquetaria contribuye a la reducción postraumática del flujo sanguíneo.
- La hidrólisis de fosfolípidos causa liberación y oxidación de ácidos grasos polinsaturados, así como producción de radicales libres de oxígeno (21).
- La elevación del calcio intracelular estimula la liberación de aminoácidos excitatorios como glutamato y aspartato, cuya concentración extracelular máxima ocurre pocos minutos después del trauma, éstos resultan ser altamente tóxicos para las neuronas que no sufrieron daño (22).
- La respuesta inflamatoria, iniciada a las pocas horas del trauma medular, se mantiene por varios días. Esta respuesta incluye daño endotelial, liberación de mediadores proinflamatorios como las interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6), el factor de necrosis tumoral (TNF α) y las proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP)-1 α y β (23).

1.3.2.1.2 Fase subaguda

- Reactivación de las células gliales como consecuencia de la necrosis, la hemorragia e isquemia local posteriores al trauma medular.
- Durante la primera semana después del trauma, se conforman las zonas de penumbra isquémica, muerte neuronal secundaria, formación de cavidades y quistes, formados por glía reactiva (microglía y astrogía), en el área de la lesión.
- Formación de la “cicatriz glial”, consiste en una acumulación de astrocitos fibrosos hipertróficos en la superficie de la lesión.
- Los fibroblastos del tejido conjuntivo adyacente proliferan sobre la capa de astrocitos fibrosos, depositan colágeno y forman una barrera que separa las neuronas que antes de la lesión estaban conectadas.
- Las neuronas que han perdido su inervación original son inervadas por neuronas cercanas no dañadas, lo que, en general, no conduce a la

recuperación de la función primitiva. Esta barrera implica un serio obstáculo para el restablecimiento de nuevas conexiones (24).

- Otros tipos celulares como las células de Schwann, las células meníngeas y los fibroblastos invaden también el sitio de la lesión medular.
- En la lesión hay un aumento en la concentración del factor de crecimiento fibroblasto básico (FGF-2), que promueve la proliferación de fibroblastos y de angiogénesis (25).
- Se produce la infiltración de células inflamatorias. Primero, se infiltran los granulocitos polimorfonucleares que depende de la hemorragia en el sitio de la lesión; y posteriormente, los monocitos macrófagos invaden la lesión y fagocitan el tejido muerto.
- La activación microglía es un proceso graduado que depende de la severidad de la lesión, empieza en la zona central de la médula espinal y se extiende a la sustancia gris y blanca adyacente.
- Las células inflamatorias pueden persistir por semanas dentro de las cavidades de la lesión (26).

1.3.2.1.3 Fase crónica

- El proceso degenerativo de la médula espinal continúa y se extiende a lo largo del sitio de la lesión primaria. La destrucción neuronal se extiende en el tiempo y en el espacio.
- Se produce la llamada muerte neuronal secundaria o tardía que comienza uno o dos días después de la lesión y es responsable de la muerte de más neuronas que las que ocasiona la muerte neuronal primaria.
- El tejido neural (neuronas y glía) cercano al área lesionada o conectado con ella, presenta actividad eléctrica y actividad funcional deprimidas, esta zona, llamada zona de penumbra en las lesiones isquémicas, evoluciona hacia lo que se conoce como lesión secundaria.

- El trauma causa muerte, tanto de neuronas como de células gliales, destrucción de vasos sanguíneos y lesión de tractos axonales. Ya que las neuronas muertas no son reemplazadas, los axones lesionados no se regeneran y los trastornos funcionales son permanentes.
- El trauma medular agudo y subagudo se resuelven varios días, semanas o meses después de la lesión.
- Los macrófagos fagocíticos desaparecen del área lesionada y dejan una cavidad llamada quiste, carente de células, llena de fluido cerebroespinal rodeada de glía reactiva (25).
- La pérdida de mielina es dependiente del tiempo y empieza a las 24 horas de la lesión. A los siete días, se presentan los axones sin protección de mielina y la desmielinización se incrementa después de dos semanas. A las tres semanas, algunas fibras presentan degeneración walleriana y pérdida del diámetro axonal (27).
- En zonas adyacentes a la lesión medular se encuentran formas inmaduras no dañadas de oligodendrocitos. Estos precursores, al madurar, son capaces de remielinizar algunos axones, y la depleción de macrófagos es concomitante con la remielinización.

1.3.3 Alteraciones sistémicas y metabólicas posteriores a la LM

La LM no solo produce discapacidad física, también ocasiona alteraciones autonómicas que pueden estar relacionadas con complicaciones que ponen en riesgo la vida, que interfieren con la rehabilitación y que se asocian a la falla terapéutica de diversos tratamientos farmacológicos (28).

Entre las alteraciones sistémicas y metabólicas destacan la pérdida progresiva de peso corporal, la atrofia muscular, el desbalance de fluidos y electrolitos, y disfunción en los sistemas cardiovascular, gastrointestinal, renal, endocrino e inmunológico (28) (Tabla 1). Las alteraciones atribuidas a la presencia de un desequilibrio entre los sistemas simpático-parasimpático, llegan a provocar

cambios significativos en el mantenimiento de la homeostasis del sistema (29). La severidad de dichas alteraciones fisiológicas depende tanto de la intensidad, el nivel anatómico y el tiempo transcurrido después de la lesión medular (28-32).

Se ha observado que las personas con LTME tienen mayor riesgo de sufrir infecciones en comparación con la población general, principalmente en los sistemas genitourinario y respiratorio (33). En parte, esta predisposición a sufrir infecciones se debe a un desequilibrio en el sistema inmunológico.

La lesión de la médula espinal induce una alteración en la interacción normalmente equilibrada entre el sistema inmunológico y el sistema nervioso central; lo anterior podría ser el mecanismo por el cual la lesión neurológica conduce a una inmunodeficiencia secundaria, aumentando la susceptibilidad de infección. La lesión de la médula espinal (al igual que algunas lesiones cerebrales) interrumpen la señalización neuro-inmune (34), lo que puede llevar a una desregulación sistémica de la inmunidad innata y adaptativa (35, 36). La disminución en la actividad simpática contribuye a la inmunodepresión debido a la baja activación de células inmunes en la sangre (37).

La disfunción inmune provocada por las células inflamatorias circulantes de la lesión medular desencadenan el síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, por sus siglas en inglés) (38), condición amenazante caracterizada por la producción de mediadores proinflamatorios, la activación de las células inmunitarias residentes y la infiltración de células inflamatorias en múltiples órganos vitales, causando daño a los pulmones, riñones e hígado (29, 38-40). Este fenómeno ha sido atribuido a un incremento de la actividad oxidativa en neutrófilos y monocitos circulantes de personas con LTME (41).

Tabla 1. Alteraciones sistémicas y metabólicas después de una LTME.

Modificada de Guízar-Sahagún G, *et al.*,1998 (28).

Sistema Alterado	Alteraciones tempranas (durante el choque espinal)	Alteraciones tardías (durante el estado crónico)
Cardiovascular	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Bradicardia ♦ Hipotensión 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Bradicardia ♦ Hipotensión episódica y postural ♦ Episodios de hipertensión (disreflexia autonómica)
Gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Baja motilidad gastrointestinal 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Tránsito GI prolongado ♦ Dificultad en la evacuación ♦ Esofagitis y gastritis
Renal	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Disminución del flujo plasmático renal ♦ Incremento de la depuración renal 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Decremento de la depuración renal ♦ Falla renal asociada con patología concomitante
Endocrino y Metabólico	<p>Niveles disminuidos en plasma de:</p> <ul style="list-style-type: none"> ♦ Hormona paratiroidea ♦ Hormonas tiroideas ♦ Albúmina ♦ Vitamina D <p>Niveles elevados en plasma de:</p> <ul style="list-style-type: none"> ♦ Fosforo ♦ Prolactina ♦ Hormona antidiurética ♦ ACTH ♦ Enzimas hepáticas 	<p>Niveles disminuidos en plasma de:</p> <ul style="list-style-type: none"> ♦ Hormonas tiroideas ♦ Noradrenalina ♦ Hormonas luteinizantes y folículo estimulantes <p>Desórdenes en el metabolismo de lípidos y carbohidratos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ♦ Hiperinsulinemia ♦ Flujo hepático disminuido ♦ Disminución de las lipoproteínas de alta densidad y elevación de las lipoproteínas de baja densidad
Inmune	<p>Inmunodepresión</p> <ul style="list-style-type: none"> ♦ Decremento de las respuestas inmunes naturales y adaptativas ♦ Alteración de la función fagocítica de neutrófilos circulantes 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Elevados niveles en plasma de: IL-6, IL-2R e ICAM-1

1.4 Respuesta inflamatoria periférica

La inflamación es una reacción local del tejido vascularizado frente a un agente injuriante o daño tisular. Los componentes que participan en la respuesta inflamatoria son la microcirculación, las células sanguíneas, el plasma y las células del tejido conectivo. Su función es localizar, eliminar o aislar al agente injuriante y tejido dañado, permitiendo la posterior reparación por mecanismos regenerativos (42).

La inflamación es una respuesta normal ante una lesión. Incluye fases tales como: la lesión inicial, una fase vascular con vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, la cual consecuentemente desarrolla edema, y una fase celular caracterizada por la migración de células polimorfonucleares (neutrófilos) y eosinófilos, y posteriormente macrófagos y monocitos. Luego viene una fase de cicatrización, con la activación de los fibroblastos y el depósito de colágeno y mucopolisacáridos, causando la reparación del tejido lesionado.

En un evento de inflamación existe una gran complejidad de elementos mediadores de la misma, que se involucran en el proceso fisiopatológico del dolor.

1.4.1 Clasificación

Desde el punto de vista temporal, los procesos inflamatorios se clasifican en agudos y crónicos.

1.4.1.1 Inflamación Aguda

Los procesos de tipo agudo consisten en una respuesta inmediata que se produce frente al agente nocivo, se caracteriza por un aumento del flujo sanguíneo, alteración de la permeabilidad de la microvasculatura y migración de leucocitos hasta el foco de la lesión.

La inflamación aguda consta de dos fases. La primera fase va desde el momento en que se inicia la inflamación hasta aproximadamente una hora después. Se produce una vasoconstricción momentánea, seguida de vasodilatación con un incremento del flujo sanguíneo (hiperemia) y enrojecimiento de la zona (eritema).

En esta primera fase juegan un papel determinante los mastocitos que se encuentran principalmente en el tejido conectivo, rodeando a vasos sanguíneos, linfáticos y terminaciones nerviosas periféricas. Estos contienen gránulos basófilos donde se almacena histamina, serotonina y heparina entre otras sustancias, que se liberan de forma rápida por exocitosis al medio extracelular como respuesta a estímulos flogógenos ya sean nerviosos o químicos (1).

La histamina ejerce una amplia variedad de efectos sobre distintos procesos fisiológicos. A través de la interacción con dos subtipos de receptores conocidos como H1 y H2 provoca la extravasación de líquido y proteínas plasmáticas, con formación de edema, estimula intensamente terminaciones nerviosas sensoriales provocando sensación de prurito y de dolor (43). Desde los mastocitos también se libera serotonina (5-HT), amplifica la acción vasoconstrictora de noradrenalina (NA), angiotensina II y prostaglandina F₂α (PGF₂α) e induce dolor en las terminaciones sensoriales, por lo que a los 10 minutos de comenzar la inflamación ya se produce un edema cuantificable.

El fluido extravascular, conocido como trasudado, está formado por agua y electrolitos, y es dependiente de los mediadores liberados inicialmente y de forma rápida, especialmente la histamina (43, 44). Los factores lisosómicos liberados desde células afectadas por la respuesta inflamatoria son capaces de aumentar la permeabilidad vascular a concentraciones muy bajas así como de liberar histamina desde los mastocitos (45, 46).

De manera gradual van filtrándose hacia el tejido inflamado otros componentes proteicos de bajo peso molecular, como el factor XII de la coagulación, que al entrar en contacto con el colágeno tisular inicia una cascada de señales, a través de las cuales linfocitos y macrófagos activados sintetizan cininas, entre las que se destacan bradicinina y calidina. Las cininas inducen vasodilatación incrementando la permeabilidad vascular, la activación de los nociceptores polimodales C y las síntesis de prostaglandinas y en los macrófagos inducen la síntesis del factor de necrosis tumoral α (TNF α) y la interleucina 1 (IL-1).

Los cambios que se producen en el flujo sanguíneo inducen la síntesis de factores relajantes vasculares por parte de las células endoteliales, así como especies reactivas al oxígeno (47), entre ellas el óxido nítrico (NO). Todas ellas activan mecanismos específicos que controlan el tono vascular favoreciendo la vasodilatación. La síntesis de NO está determinada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), que presenta dos isoformas: la constitutiva, cNOS y la isoforma inducible iNOS, expresada como respuesta a estímulos inflamatorios, produciendo grandes cantidades de NO (48).

Otro mecanismo iniciador y amplificador de la inflamación es el formado por proteínas del sistema de complemento. Se activa desde el inicio de la respuesta inflamatoria por diferentes vías (vía clásica, vía de la lecitina o vía alterna), al fragmentarse en dos moléculas por procesos proteolíticos en cascada. Nueve son las proteínas que integran este sistema presente en el suero sanguíneo, de C1 hasta C9.

La segunda fase de la inflamación se inicia aproximadamente dos horas después de la acción del agente flogógeno. Histológicamente puede observarse alteraciones vasculares, edema e infiltración de neutrófilos (44). Esta segunda fase se caracteriza por un aumento de los niveles de eicosanoides que son un conjunto de sustancias sintetizadas a partir del ácido araquidónico (AA) que se

ingiere con la dieta y es almacenado formando parte de los fosfolípidos de la membrana celular, siendo muy pequeña la concentración de AA libre en la célula.

La enzima responsable de la síntesis de eicosanoides es la COX, que actúa una vez que se ha liberado el AA desde la membrana mediante la acción de fosfolipasa A2, oxidando el AA y transformándolo en PGG2 seguido de reducción de la misma obteniéndose un endoperóxido inestable PGH2. PGH2 sirve de sustrato para la enzima PG sintasa, la cual es responsable de la producción de las 5 PGs bioactivas principales generadas *in vivo*: PGE2, PGF2 α , PGD2, PGI2 (prostaciclina) y TXA2 (tromboxano). Las PGs son producidas por una gran cantidad de células y actúan localmente de manera autocrina o yuxtacrina, produciendo diversos efectos farmacológicos modulando varios sistemas fisiológicos.

1.4.1.2 Inflamación Crónica

La inflamación crónica, considera una duración prolongada (semanas o meses) de inflamación en la que se pueden observar simultáneamente signos de inflamación activa, de destrucción tisular y de intentos de curación. Puede surgir como cuadro evolutivo a partir de una inflamación aguda o iniciarse como un evento insidioso y a menudo asintomático (por ejemplo, artritis reumatoide, aterosclerosis, tuberculosis y neumopatías crónicas). También se puede observar en infecciones persistentes producidas por ciertos microorganismos, en la exposición prolongada a agentes potencialmente tóxicos y de autoinmunidad (por ejemplo, artritis reumatoide y lupus eritematoso).

Así como en la inflamación aguda el neutrófilo es la célula más importante y predominante, en la inflamación crónica, la figura central es el macrófago, en especial, por la gran cantidad de sustancias biológicamente activas, que puede secretar. Los macrófagos son activados mediante células T activadas y por estímulos no inmunológicos como endotoxina y otros mediadores químicos.

La resolución de la inflamación es un proceso activo controlado por mediadores endógenos, que suprimen la expresión de genes proinflamatorios y señales celulares. También se induce la apoptosis de las células inflamatorias y la fagocitosis, crucial para llegar a la resolución final con éxito.

1.4.2 Mediadores de la inflamación

En un evento de inflamación existe una gran complejidad de elementos mediadores de la misma y que se involucran en el proceso fisiopatológico del dolor. Los mediadores de la inflamación, son sustancias químicas, que pueden ser pequeñas moléculas de lípidos, aminoácidos y proteínas, que llevan la información específica hacia las células lesionadas y de esta manera regulan la respuesta vascular a la agresión o daño tisular, entre los que destacan:

- a) Los radicales de oxígeno y los metabolitos citotóxicos para fibroblastos y células parenquimatosas.
- b) Las citocinas tienen un gran espectro de pirógenos endógenos causando fiebre, factor de necrosis tumoral, factores que intervienen en la inflamación crónica.
- c) El sistema de complemento que desarrolla actividades proinflamatorias.
- d) Las cininas como bradicinina y precalicreína que sensibilizan terminales nerviosas produciendo dolor.
- e) Las aminas vasoactivas, histamina y serotonina, favorecen el incremento de permeabilidad vascular, producidas en plaquetas, mastocitos y basófilos.
- f) La vía de la lipooxigenasa involucra la conversión del ácido araquidónico en varios hidroperóxidos favorecedores del dolor y la inflamación (49).

Existe un gran número de fármacos que tienen la capacidad de actuar ya sea a nivel periférico y/o central para bloquear o inhibir todos o algunos de los factores involucrados en la producción de los mediadores de la inflamación, por lo

cual se enfatiza su importancia como blancos terapéuticos para regular la evolución de la respuesta inflamatoria (50).

1.4.3 Inflamación neurogénica

El término "inflamación neurogénica" se usa para describir el control de la inflamación por mecanismos derivados del sistema nervioso. Así, la inflamación neurogénica incluye una serie de respuestas inflamatorias vasculares y no vasculares, desencadenadas por la estimulación de neuronas sensoriales.

Las neuronas activadas por estímulos nocivos liberan neuropéptidos inflamatorios como la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) desde las fibras nerviosas periféricas, principalmente por reflejos de la raíz dorsal (51, 52). A su vez, estos neuropéptidos inducen la liberación de histamina de los mastocitos adyacentes y la histamina evoca la liberación de SP y CGRP; por lo tanto, se establece un enlace bidireccional entre la histamina y los neuropéptidos en la inflamación neurogénica, lo que sugiere que estas neuronas no solo transmiten información aferente a la médula espinal, sino que tienen una función eferente (53).

También es el resultado de la estimulación de sensibilidad a la capsaicina, de las fibras C neuronales por factores tales como 5-HT, histamina y leucotrienos, así como por cambios en el pH, temperaturas extremas y por lesión mecánica (54).

Los neuropéptidos y los mediadores liberados posteriormente actúan sobre la vasculatura causando edema local, hiperemia y eritema que se extiende más allá del sitio de estimulación. Tales mediadores también atraen y activan las células inmunes innatas (mastocitos, células dendríticas) y las células inmunes adaptativas (linfocitos T). Estos signos inflamatorios dependen de la función y la integridad de los sistemas nerviosos sensoriales periféricos.

A la inflamación neurogénica se le considera como una respuesta protectora, que facilita la curación fisiológica de heridas y la defensa inmune contra los patógenos mediante la activación y el reclutamiento de células inmunes. Cuando es excesiva y prolongada, también juega un papel importante en la fisiopatología, y tal vez etiología, de diversas enfermedades inmunes.

1.5 Modelo de inflamación subplantar inducida por carragenina

Uno de los principales modelos experimentales de que se dispone para estimar la inflamación y cambios de permeabilidad vascular inducidos por sustancias irritantes en la rata, en fase aguda, es el modelo de edema subplantar. Este modelo permite cuantificar, de una manera fácil y reproducible, dos de los parámetros más característicos de la inflamación como son el edema y la extravasación de plasma al inducir una inflamación aguda localizada en la pata del animal tras la administración de carragenina por vía subplantar (55).

La carragenina es una mezcla de polisacáridos sulfatados extraídos de algas marinas rojas *Rhodophyceae* (Figura 8). Se ocupa como agente espesante y emulsificante. Es soluble en solventes polares. La podemos encontrar en dos formas: kappa y lambda. La dosis para producir el efecto inflamatorio agudo varía entre 0.05 y 0.1 mL de una suspensión de carragenina en solución salina al 1%, aunque se puede obtener variabilidad de un experimento a otro en función de la dosis y el tipo de carragenina utilizada. La inyección de esta sustancia genera una reacción inflamatoria tiempo-dependiente.

El edema subplantar inducido por carragenina en ratas, se caracteriza por una fase temprana (0-1 h), la cual es provocada por la liberación de histamina, 5 - hidroxitriptamina y bradicinina y es seguida de una fase tardía (1-6 h) sostenida principalmente por las PGs y NO (56, 57).

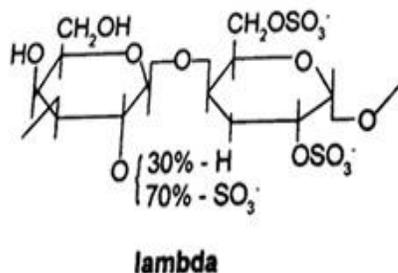


Figura 8. Estructura Química de λ -Carragenina.

La carragenina es un agente gelificante que se obtiene de algunas algas de varias familias de Rhodophyceae (algas rojas). Modificada de Badui, 2006 (58).

Los niveles de COX2 se ven incrementados por la reacción inflamatoria producida por la CRG y por consiguiente, hay un aumento de las PGs que incrementan la formación de edema y filtración leucocitaria al promover el flujo sanguíneo de la región inflamada. El modelo de inflamación aguda por la inyección subplantar de CRG en ratas exhibe patrones distintos en la expresión local y sistémica de diversas citocinas inflamatorias (59).

La respuesta inflamatoria producida por este modelo es usualmente cuantificada por el aumento en el tamaño de la pata (provocado por el edema) que es máxima alrededor de las 5 horas después de la inyección de carragenina y puede ser modulada por los inhibidores de moléculas específicas dentro de la cascada inflamatoria (55).

La inhibición de la inflamación inducida por la administración subplantar de carragenina, ha demostrado ser altamente predictiva de la actividad de los fármacos en las enfermedades inflamatorias de humanos y las dosis de los AINES en este modelo están bien correlacionadas con las dosis efectivas en los humanos.

1.6 Fármacos Anti-inflamatorios

Los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) son un grupo de agentes con estructuras químicas diversas, pero cuyos efectos terapéuticos son similares ya que reducen la inflamación, el dolor y la fiebre.

No producen depresión respiratoria y no inducen tolerancia ni dependencia física. Su eficacia analgésica es limitada (efecto techo) y no dosis dependiente (el incremento de la dosis puede prolongar el efecto, pero no produce más analgesia y aumenta la incidencia de efectos secundarios). Son efectivos para el tratamiento del dolor leve-moderado, y en algunos casos pueden controlar el dolor intenso del componente inflamatorio, postquirúrgico y cólico (50, 60).

Los fármacos que están dentro de este grupo difieren en su farmacocinética, aunque su farmacodinamia es muy similar. Estos medicamentos poseen un mecanismo de acción periférico sobre el proceso inflamatorio y también un mecanismo central aminorando la transmisión del impulso doloroso.

Los AINES actúan sobre las reacciones inflamatorias reduciendo la síntesis de: PGs, leucotrienos, radicales superóxido, enzimas lisosómicas e inhibiendo las funciones enzimáticas de la membrana celular, la agregación y adhesión de los neutrófilos y la función linfocitaria (61).

1.6.1 Mecanismo de acción periférico

Los AINES son agentes con efectos anti-inflamatorios y analgésicos. Su efecto terapéutico principalmente se debe a su capacidad para inhibir la biosíntesis de prostaglandinas, actuando sobre las enzimas conocidas como ciclooxigenasas (COX) (62), que facilitan el paso del ácido araquidónico (Figura 9) a endoperóxido PGG₂ disminuyendo de esta forma la síntesis de prostaglandinas

y tromboxanos, resultado de dicha acción: la reducción de la concentración tisular de compuestos capaces de sensibilizar o activar los nociceptores periféricos (63).

Existen dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2). La COX-1 es una forma constitutiva con funciones fisiológicas en la homeostasis normal (es la responsable de la producción fisiológica de prostaglandinas), estando implicada en procesos protectores gástricos, renales etc., y la COX-2 es inducida por la respuesta inflamatoria, por citocinas, mitógenos y endotoxinas y es la responsable de la elevada producción de prostaglandinas durante la inflamación (63).

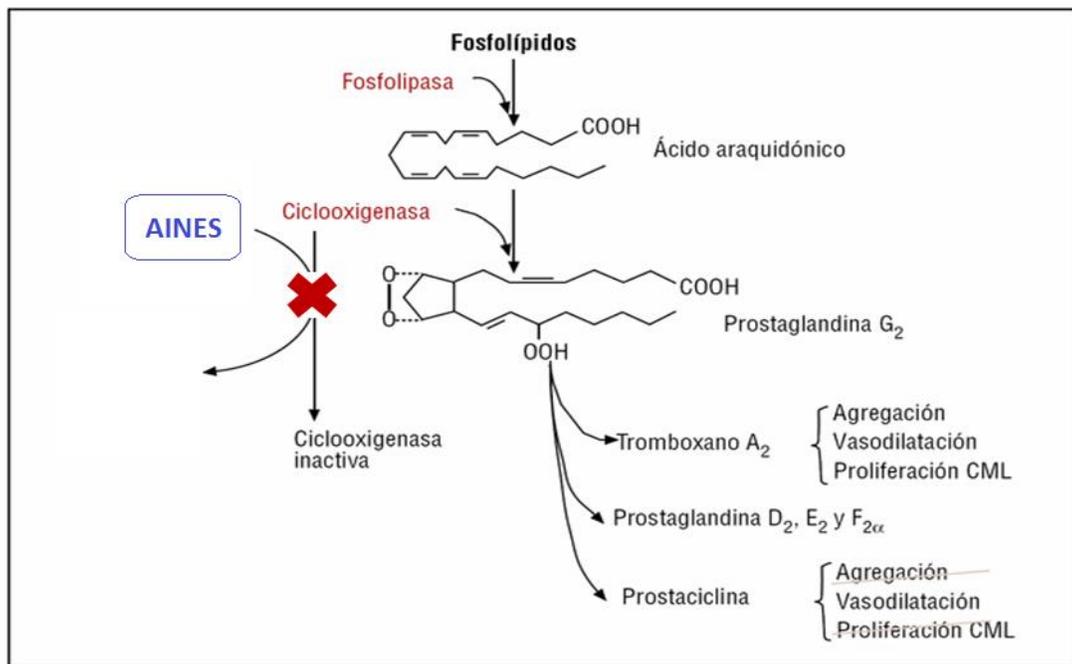


Figura 9. Mecanismo de acción de los AINES.

Los AINES inhiben a las enzimas ciclooxigenasas disminuyendo la biosíntesis de las prostaglandinas. Modificada de Goodman & Gilman's, 2003 (61)

1.6.2 Mecanismo de acción central

La COX1 y COX2 tienen una expresión basal en el sistema nervioso central. En los ganglios raquídeos, la COX1 y COX2 se expresa en los cuerpos de neuronas aferentes primarias encargadas de llevar mensajes dolorosos de la periferia hasta el asta dorsal de la médula espinal. Así mismo, existe expresión de las COX en las neuronas intrínsecas de la ME, principalmente en el asta dorsal (64). Los AINES también poseen un efecto inhibitorio de la COX a nivel del sistema nervioso central reduciendo la formación de prostaglandinas en la médula espinal y en el cerebro disminuyendo los procesos de sensibilización de las neuronas medulares y supramedulares (65, 66).

Los AINES, como el paracetamol, metamizol, ketoprofeno y diclofenaco producen analgesia por vía central, cuyo mecanismo sugiere que el proceso inflamatorio y del dolor están mediados por segundos mensajeros dentro de las neuronas como el AMPc y GMPc. Recientemente, también se ha propuesto la existencia de mecanismos analgésicos de acción central independientes de su acción anti-inflamatoria periférica inhibiendo la actividad nerviosa inducida por aminoácidos excitadores (glutamato) o taquicinas (sustancia P) (67).

Al parecer, la COX-2 también participa como un gen temprano de respuesta inmediata en el desarrollo de ciertos cambios a largo plazo de la respuesta neuronal que resultan de impulsos aferentes nocivos breves. Los valores iniciales de la expresión de COX-2 dependen de la activación de receptores espinales glutámicos tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) dando como resultado una despolarización parcial con activación neuronal y mediando la plasticidad neuronal a largo plazo (68, 69). Este efecto implica una acción inhibitoria sobre los mecanismos del óxido nítrico espinal, por lo que los AINES mediante una acción análoga pueden actuar como inhibidores del NMDA reduciendo los fenómenos de hiperalgesia mediados por estos receptores (50, 70).

1.7 Naproxeno

1.7.1 Propiedades físicas y químicas

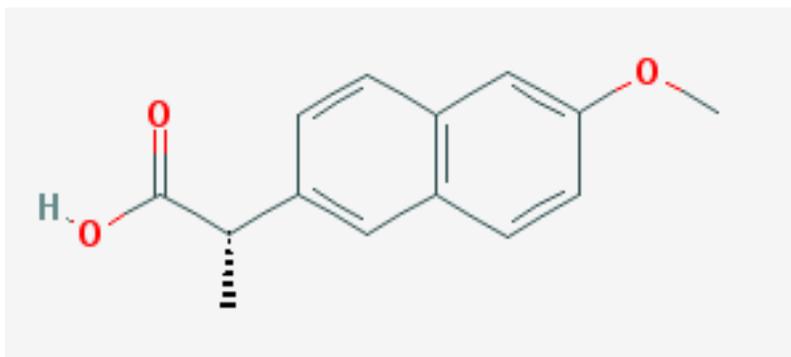


Figura 10. Estructura química del naproxeno.

El naproxeno es un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo derivado del ácido propiónico.
Tomada de PubChem (71).

Nombre químico: Ácido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico

Fórmula molecular: C₁₄H₁₄O₃

Peso molecular: 230.26

Punto de fusión: 153 °C

pKa: 4.15 (ácido débil)

Características: El naproxeno es un polvo cristalino blanco o ligeramente cremoso, soluble en agua y metanol, ligeramente soluble en etanol, en acetona y prácticamente insoluble en cloroformo y tolueno.

El naproxeno es un AINE de uso general y de los más tolerados, no deprime el sistema nervioso central, por no ser narcótico ni inductor del metabolismo enzimático. Es empleado en el dolor suave a moderado, la fiebre, la inflamación y la rigidez provocado por afecciones como la osteoartritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, lesiones, calambres menstruales, tendinitis, bursitis y en el tratamiento de la dismenorrea primaria.

Dentro de sus efectos adversos están las complicaciones gastrointestinales (de las más comunes), sin embargo, también puede ocurrir disfunción renal y reacciones por hipersensibilidad.

1.7.2 Características farmacocinéticas

Se absorbe rápida y completamente en el tracto gastrointestinal, con una biodisponibilidad *in vivo* del 95%. Los niveles plasmáticos máximos se observan 2-4 horas post-administración. Tiene una vida media de 12-15 horas. Se une en un 99% a las proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina. Su depuración es de 0.13 mL/min/kg. Se metaboliza completamente en el hígado a 6-O dimetilnaproxeno (6-DMN), se elimina aproximadamente el 95% de la dosis de naproxeno por la orina: naproxeno inactivado (65%) y como 6-DMN (30%). La excreción renal tiene correlación estrecha con la disminución de las concentraciones plasmáticas. Con las heces se excreta tan sólo el 3% o menos. Atraviesa la barrera placentaria y la hematoencefálica (72).

1.8 Alteraciones farmacocinéticas después de LTME

La farmacocinética estudia el paso de los fármacos a través del organismo en función del tiempo y de la dosis, siendo uno de sus objetivos describir los fenómenos relacionados con la absorción, la distribución, el metabolismo y la eliminación del fármaco. La administración de un fármaco tiene por objetivo la obtención de un efecto terapéutico y se infiere que la respuesta farmacológica está estrechamente relacionada con las concentraciones plasmáticas del fármaco. Por lo que cambios en las concentraciones plasmáticas producirán cambios en la respuesta farmacológica.

Después del choque medular se generan diversos cambios hemodinámicos, por lo que se genera la redistribución de la sangre hacia órganos vitales, principalmente al corazón y cerebro, sacrificando la distribución de la misma hacia otras regiones u órganos, como el tracto gastrointestinal, piel, músculo esquelético, hígado y bazo (30). Estos cambios hemodinámicos en el flujo sanguíneo microvascular órgano-específico, así como alteraciones en la presión arterial, podrían estar relacionados con las alteraciones farmacocinéticas de diversos fármacos después de la LTME (73, 74).

Estudios farmacocinéticos en humanos y en modelos animales con LTME han reportado que existe una marcada alteración en los procesos fisiológicos y por lo tanto, cambios en la disposición del fármaco, ya sean administrados por vía oral, intramuscular o intravenosa. Estas alteraciones dependen principalmente de la característica de la lesión (intensidad, nivel y tiempo posterior a la lesión), así como de las propiedades farmacológicas de los fármacos y de la vía de administración (73, 75).

Existe evidencia de que la farmacocinética de diversos fármacos tales como paracetamol(76, 77), teofilina(78), gentamicina(79), amikacina(80) y lorazepam(81) está alterada en personas con lesión medular. Sin embargo, las alteraciones de

los procesos farmacocinéticos dependen también en gran medida de las características físico-químicas de los fármacos y la ruta de administración(82), ya que no todas las moléculas se ven afectadas debido a la presencia de la lesión medular.

Las alteraciones fisiológicas y metabólicas así como el tiempo transcurrido después de una lesión medular influyen significativamente en la absorción, la distribución, el metabolismo y la eliminación de diversos fármacos, afectando la farmacocinética de los fármacos empleados en esta población y de esta forma modifican su efecto terapéutico.

Absorción: La vía de administración de los fármacos es crucial en las personas con lesión medular. La administración oral presenta ciertas desventajas en pacientes con LM debido a que estos presentan una disminución en el vaciamiento gástrico y la motilidad del tracto gastrointestinal, por lo que la absorción de los fármacos se ve afectada aumentando el tiempo necesario para obtener la concentración máxima del fármaco en sangre y por consiguiente llegar a su sitio de acción y producir el efecto deseado (83). Otras rutas de administración como la intramuscular y la transdérmica también presentan anomalías en la absorción debido a la baja irrigación microvascular hacia la dermis y los músculos. Por lo que la ruta más viable para estos pacientes es la intravenosa, ya que la totalidad del fármaco se administra directamente al torrente sanguíneo.

Distribución: Los pacientes con LM pueden desarrollar hipoalbuminemia (84, 85), los bajos niveles de albúmina en sangre afectan directamente a fármacos que se unen en gran porcentaje a las proteínas plasmáticas alterando su distribución, por lo que aumenta su volumen de distribución y por consiguiente su depuración. En cambio, fármacos con baja unión a proteínas no se verán afectados.

Metabolismo: Posterior a la lesión medular se presenta un flujo microvascular hepático disminuido, se presentan también afecciones en la expresión genética de los hepatocitos y en el metabolismo de las catecolaminas(86). Esta disminución en el flujo sanguíneo hepático afectará a los fármacos de alta extracción hepática (cuyo metabolismo depende directamente del flujo sanguíneo) incrementando su biodisponibilidad presentando mayores niveles en sangre del fármaco debido a la disminución del aclaramiento metabólico hepático. Sin embargo, los fármacos de baja extracción hepática (cuya eliminación depende solamente de la función del hepatocito) no se observará modificada su eliminación.

Eliminación: La excreción por vía renal es la más importante para la adecuada eliminación de los fármacos, pero personas con LM a menudo presentan disminución en la función renal, lo que propicia se presente toxicidad debido a la administración de los fármacos. La alteración fisiología de estos pacientes prolonga la vida media de la mayoría de los fármacos debido al retardo en la depuración renal (87).

Debido a la presencia de procesos farmacocinéticos alterados después de la lesión de la médula espinal es necesario considerar diversos factores (propios de la lesión como el nivel y el tiempo posterior a esta, así como las características intrínsecas de la molécula) para determinar las dosis y los intervalos de dosificación de los fármacos, con el fin de asegurar el efecto terapéutico deseado y disminuir la toxicidad.

2 JUSTIFICACIÓN

La lesión traumática de la médula espinal ocurre mayoritariamente en adultos jóvenes. Suele producir discapacidad severa y permanente por pérdida funcional extensa desde el sitio de la lesión hacia abajo. Existe predisposición de por vida a numerosas complicaciones; entre éstas destaca la susceptibilidad a infecciones. La información sobre la respuesta inflamatoria posterior a una LTME en estas personas es limitada. Se desconoce, entre otros, la diferencia en la respuesta inflamatoria que se produce en territorios intactos vs. paralizados, incluso se desconoce si la respuesta a un anti-inflamatorio varía de acuerdo al estatus neurológico. Por lo que con este estudio se pretende dar respuesta a esas dudas, con el fin de que el conocimiento generado sea útil para optimizar tratamientos preventivos y curativos que mejoren la calidad de vida de estas personas.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- ¿Cuál es el efecto de la LTME sobre la respuesta inflamatoria inducida por carragenina en extremidades paralizadas e íntegras? ¿Cómo influye el tiempo post-lesión?
- ¿La LTME modifica la cinética del naproxeno aplicado por vía intravenosa?
- ¿La lesión traumática de la médula espinal modifica el efecto anti-inflamatorio del naproxeno?
- ¿El efecto anti-inflamatorio del naproxeno difiere en zonas paralizadas vs. íntegras?

4 HIPÓTESIS

La respuesta inflamatoria periférica inducida por carragenina después de LTME será menor en extremidades paralizadas vs. íntegras y en la etapa aguda vs. subaguda.

La LTME producirá alteraciones en la farmacocinética y en el efecto anti-inflamatorio del naproxeno administrado por vía intravenosa en ratas con lesión en T9.

5 OBJETIVOS

5.1 General

Caracterizar la influencia de la LTME en la etapa aguda y subaguda sobre la inflamación periférica inducida y, determinar el efecto de dicha lesión sobre la farmacocinética y el efecto anti-inflamatorio del naproxeno administrado por vía intravenosa en ratas con lesión en T9.

5.2 Particulares

- Evaluar el curso temporal de la respuesta inflamatoria periférica inducida por carragenina en ratas con LTME en T9.
- Comparar la respuesta inflamatoria periférica entre extremidades paralizadas e íntegras.
- Revalidar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de naproxeno en plasma de rata en base a la NOM 177-SSA1-2013.
- Determinar el efecto de la lesión medular en la etapa aguda y subaguda sobre la farmacocinética del naproxeno tras una administración intravenosa (IV).
- Evaluar el efecto anti-inflamatorio del naproxeno IV en las extremidades paralizadas e íntegras de ratas con LTME en la etapa aguda y subaguda.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de 10 a 12 semanas de edad, y de 250-280g de peso, manteniéndolas en condiciones óptimas de bioterio. Los animales fueron facilitados por el bioterio institucional. Los animales fueron alimentados con alimento estándar para ratas y agua *ad libitum* hasta el día de la experimentación. Los animales fueron distribuidos por grupos: experimental y tratamiento administrado, con una n= 6-7. El tamaño de muestra para los grupos se calculó por análisis de potencia(88).

6.1.1 Anestesia

Con el propósito de anestésiar a las ratas durante el tiempo necesario para realizar la cirugía, se les administró 0.5 mL de una mezcla de clorhidrato de ketamina (80 mg/kg) y clorhidrato de xilacina (8 mg/kg) vía intramuscular. Se utilizó la prueba del reflejo corneal y la presencia de la acción de retirada de la pata ante un estímulo doloroso en la extremidad posterior, para garantizar que la anestesia fuera adecuada.

Durante el proceso de canulación de la vena femoral y la arteria caudal para la administración del fármaco intravenoso y la toma de muestras de sangre, respectivamente, las ratas estuvieron anestesiadas durante este proceso por medio de inhalación ligera de éter etílico.

6.1.2 Cirugía simulada, Sham

Los grupos testigo o sham se sometieron a una cirugía de lesión simulada en T9. Una vez anestesiada la rata, se procedió a afeitar el pelo en la zona de interés, posteriormente, bajo condiciones asépticas se hizo una incisión en la piel con el bisturí y se disecaron los músculos paravertebrales hasta exponer láminas vertebrales a nivel de la torácica 9, luego se procedió a suturar por planos; no se realizó la laminectomía.

6.1.3 Lesión medular a nivel de T9

Para producir la lesión traumática de la médula espinal, los animales fueron sometidos de forma aséptica a una laminectomía a nivel de la vértebra torácica 9, manteniendo las meninges intactas, para posteriormente producir la lesión medular por el método de contusión siguiendo la técnica de Allen modificado para ratas (89, 90). Para lo cual, se utilizó el impactador diseñado por la Universidad de Nueva York. En forma resumida, sobre el saco dural expuesto se dejó caer un cilindro de acero inoxidable de 10 gr de peso de una altura de 50 mm, para producir una lesión de intensidad severa en la médula espinal (91). El impacto fue confirmado mediante la presencia de un hematoma central a nivel de la zona lesionada de interés. Finalmente, se suturó por planos la herida quirúrgica.

6.1.4 Cuidados post-cirugía

Al terminar el procedimiento quirúrgico, las ratas se dejaron en recuperación, colocadas en cajas individuales con camas de aserrín estéril, en una habitación limpia, en un ciclo de luz / oscuridad de 12 h, y bajo atmósfera controlada de temperatura y de humedad. Los animales fueron alimentados con comida estándar para ratas y agua libitum.

Posteriormente se les dio los cuidados post-operatorios que consistieron en el vaciamiento manual por presión de la vejiga urinaria realizado dos veces al día. Para prevenir el dolor y la automutilación(92), se les administró oralmente paracetamol (Bristol-Myers Squibb, México) a todos los animales utilizados en el estudio. Los animales a corto plazo recibieron una dosis única de 30 mg/kg cuando se recuperaron de la anestesia, mientras que los animales evaluados a 15 días recibieron la misma dosis cada 12 h, durante 1 semana. Como profiláctico para infecciones, los animales recibieron vía oral, 10 mg/kg de enrofloxacin (Parfarm, México) cada 24 h para los animales a largo plazo, comenzando el día de la cirugía y durante 7 días consecutivos a partir de entonces.

La eutanasia se realizó: 1) al final de un experimento; 2) en el caso de complicaciones potencialmente mortales como neumonía, urosepsis severa y evisceración abdominal por autofagia, y 3) en el caso de complicaciones que interfieren con las evaluaciones, particularmente en el caso de la autofagia de las extremidades. La eutanasia se realizó por medio de una sobredosis de pentobarbital sódico (63 mg) administrado intraperitoneal.

6.2 Evaluación de la Respuesta Inflamatoria

6.2.1 Inducción de la respuesta inflamatoria

Para los estudios de inflamación se utilizó el modelo de inflamación inducida por carragenina, un método que se utiliza ampliamente en la evaluación de nuevos fármacos analgésicos y anti-inflamatorios. La inyección de carragenina, un mucopolisacárido sulfatado extraído del alga marina *Rhodophyceae*, produce localmente edema.

Previamente al estudio, se realizó la estandarización del método para inducir la respuesta inflamatoria en ambas extremidades en un pequeño grupo de ratas, y posteriormente se determinó la respuesta inflamatoria a los 1 y 15 días posteriores a la cirugía tanto para los animales experimentales (LTME) (n=6-7) como los testigos (sham) (n=6-7), siendo estos distribuidos aleatoriamente. Las mediciones del volumen de la extremidad anterior (superior) y posterior (inferior) se realizaron en el mismo animal.

Se evaluó la respuesta inflamatoria por efecto de la carragenina así como la acción anti-inflamatoria del Naproxeno en presencia y ausencia de la LTME.

6.2.1.1 Preparación de Carragenina 2%

Se preparó una solución de λ -carragenina al 2% (marca Fluka®) de la siguiente manera: se pesaron 100 mg de carragenina y se colocan en un frasco pequeño, se adicionaron 5 mL de solución salina fisiológica. Esta solución se preparó un día antes de ser utilizada y se mantuvo en refrigeración, antes de usarse se colocó durante 5 min en un sonicador ultrasónico.

6.2.2 Cuantificación de la respuesta inflamatoria

Para medir la inflamación inducida por acción de la carragenina se empleó un pletismómetro (marca Ugo Basile®, Italia) (56), a través del cual permite la medición de pequeños cambios en el volumen de la pata (resolución 0.01 mL). El aparato consta de un soporte en el que se sostienen un contenedor con líquido (solución para pletismómetro) y dos contenedores cilíndricos pequeños también con esta solución, interconectados entre sí. En uno de estos cilindros se encuentra inmerso un sensor electrónico que detecta los cambios en la elevación del líquido y, en el otro, se lleva a cabo la inmersión de la pata a probar. El sensor se encuentra acoplado a un registrador que especifica la magnitud del

desplazamiento del líquido, como indicador del volumen de la pata. Los cambios en el volumen de la pata traducen, de manera cuantitativa, la magnitud del edema inducido por la respuesta inflamatoria.

La prueba se llevó a cabo de la siguiente manera: primero se realizó una medición basal del volumen correspondiente a cada una de las patas, después se inyectaron 100 µL de carragenina al 2% (o el mismo volumen de vehículo, solución salina) en la almohadilla plantar de la pata tanto delantera como trasera, y se llevó a cabo una nueva medición (tiempo 0). A partir de este registro, se realizaron mediciones a la 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas posteriores. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Los resultados se analizaron como el cambio del volumen correspondiente de la pata en mL, utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta \text{Volumen pata} = V_t - V_b$$

Donde:

V_t = volumen de la pata a un tiempo x.

V_b = volumen basal (antes de la aplicación de la carragenina o vehículo)

6.2.2.1 Preparación de la solución para el Pletismómetro

La solución para el pletismómetro consiste en una solución conductora preparada de la siguiente manera: se pesaron 144 mg de NaCl, se colocaron en un matraz aforado de 250 mL, se adicionaron 1 mL de ornano y se llevó al aforo con agua destilada. Esta solución se preparó un día antes de ser utilizada y se mantuvo a temperatura ambiente.

6.3 Método Analítico para la cuantificación de naproxeno por HPLC

Se revalidó el método analítico por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (por sus siglas en inglés, HPLC) para la identificación y cuantificación de naproxeno bajo las condiciones de trabajo descritas en la Tabla 2, utilizando como estándar interno diclofenaco, conforme a los parámetros especificados en la NOM-177-SSA1-2013: selectividad, linealidad, exactitud, precisión, estabilidad de la muestra, límite de cuantificación y límite de detección (93).

6.3.1 Equipo y condiciones cromatográficas

El sistema de cromatografía que se utilizó se compuso de una bomba Waters 510 HPLC y un inyector con loop 20 μ L. La separación de los fármacos se llevó a cabo mediante una columna marca Phenomenex® C18 de fase reversa de 4.6 mm de diámetro por 100 mm de longitud y 3 μ m de tamaño de partícula como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla de metanol y buffer de fosfato de sodio monohidratado 70:30 (v/v). La velocidad de flujo fue constante de 1.0 mL/min y la presión de trabajo de 3000 \pm 100 psi. La detección se efectuó a una longitud de onda de 275 nm usando un detector ultravioleta (UV) Waters 486. Las señales cromatográficas se registraron por medio de un registrador marca Varian 4270, con un tiempo de corrida aproximado de 6 minutos.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas del método para la determinación simultánea de los fármacos.

Detector	UV
Longitud de onda	275nm
Columna	C18; 4.6 x 100 mm; 3 µm
Fase móvil (v/v)	70% Metanol 30% Fosfato de sodio monohidratado 0.01M pH 3
Presión	3000 ±100 psi
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Tiempo de Corrida	6 min
Tiempo de Retención	2.8 min aprox. Naproxeno 5.5 min aprox. Estándar Interno (Diclofenaco)
Procesamiento de las Muestras	100 µL plasma + 50 µL EI (50 µg/mL) + 850 µL MeOH Se agita por 5 min Se centrifuga por 10 min a 9000 rpm

6.3.2 Soluciones para el análisis por HPLC

6.3.2.1 Preparación del buffer de fosfato de sodio 0.01M

Se pesan 1.3780 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), se disuelven en 500 mL de agua desionizada, se ajusta el pH a 3 con HCl y se lleva a un volumen final de 1 L en un matraz aforado.

6.3.2.2 Preparación de la fase móvil

En un matraz aforado de 1L, se colocaron 700 mL de metanol y 300 mL de buffer de fosfato de sodio 0.01M. Esta solución se filtró al vacío a través de un filtro con tamaño de poro de 45 µm, se colocó en un frasco de vidrio y se sonicó durante 5 minutos.

6.3.2.3 Preparación del Estándar Interno (EI)

Se preparó una solución de diclofenaco sódico de 50 µg/mL de concentración, para ello se pesaron 2.5 mg de diclofenaco y se disolvieron con fase móvil en un matraz aforado de 50 mL.

6.3.2.4 Preparación de soluciones estándar de Naproxeno

6.3.2.4.1 Solución de Naproxeno 100 µg/mL

Se preparó una solución de naproxeno sódico de 100 µg/mL de concentración, para ello se pesaron 5 mg de Naproxeno y se disolvieron en 1 mL de agua en un matraz aforado de 50 mL, una vez disuelto se llevó al aforo con fase móvil.

6.3.2.4.2 Solución de Naproxeno 10 µg/mL

Se preparó una solución de naproxeno sódico de 10 µg/mL de concentración, para ello se tomaron 5 mL de la solución de naproxeno 100 µg/mL y se llevó al aforo con fase móvil en un matraz volumétrico de 50 mL.

6.3.3 Procedimiento para el análisis de muestras de plasma de rata para la revalidación del método analítico.

6.3.3.1 Selectividad

Se demostró la selectividad del método para cuantificar el fármaco de interés en presencia de otros componentes que pudieran estar presentes en la muestra biológica. Se determinó la respuesta del analito en muestras de plasma

de ratas no tratadas con ninguna fármaco de interés, muestras de plasma adicionadas con EI y muestras de plasma adicionadas con EI y naproxeno, así con una muestra de plasma de rata tratada proveniente de una cinética, esto con el fin de detectar cualquier interferencia de la matriz biológica.

En ninguno de los casos debía existir interferencia en las señales cromatográficas de los analitos de interés ni la presencia de otros compuestos ajenos al estudio.

6.3.3.2 Curva de Calibración

Se prepararon curvas de calibración dentro de un margen de concentraciones de 0.5 a 12.0 µg/mL de naproxeno. Para evaluar la linealidad del método se evaluaron por sextuplicado las muestras de plasma de rata que contenían el fármaco de interés a seis diferentes concentraciones. Para ello se utilizaron tubos eppendorf de 1.5 mL de capacidad a los cuales se les adicionó 100 µL de plasma de rata (matriz biológica), 50 µL de EI y un volumen correspondiente de las soluciones de naproxeno (10 y 100 µg/mL) para obtener seis puntos que conformaran la curva de calibración (C1-C6) con las siguientes concentraciones de naproxeno: 0.5, 1, 2, 4, 8 y 12 µg/mL (Tabla 3).

Se preparó adicionalmente una muestra blanco (BM), que contiene solo matriz biológica, sin analito ni EI, y una muestra cero (C0), que contiene matriz biológica y EI.

Tabla 3. Curva de calibración para la determinación de naproxeno en plasma de rata.

Etiqueta	Concentración Naproxeno (µg/mL)	Volumen NPX 10 µg/mL (µL)	Volumen NPX 100 µg/mL (µL)	Volumen EI 50 µg/mL (µL)	Volumen Plasma (µL)	Volumen de Metanol (µL)
BM	---	---	---	---	100	900
C0	0.0	---	---	50	100	850
C1	0.5	50	---	50	100	800
C2	1.0	100	---	50	100	750
C3	2.0	---	20	50	100	830
C4	4.0	---	40	50	100	810
C5	8.0	---	80	50	100	770
C6	12.0	---	120	50	100	730

Para la evaluación de la linealidad en el sistema, se utilizó 100 µL de agua desionizada en lugar del plasma de rata.

6.3.3.3 Precisión y Exactitud

Para evaluar la precisión y exactitud del método se prepararon controles que estuvieran dentro de las concentraciones de la curva de calibración correspondientes a una concentración baja, media y alta (Tabla 4).

Se calculó el promedio del porcentaje de recuperación y el % CV con respecto a la cantidad nominal en cada punto, el cual no debe ser mayor a 15 %.

Tabla 4. Puntos Controles para determinar la precisión y exactitud del método.

Etiqueta	Concentración Naproxeno (µg/mL)	Volumen NPX 10 µg/mL (µL)	Volumen NPX 100 µg/mL (µL)	Volumen EI 50 µg/mL (µL)	Volumen Plasma (µL)	Volumen de Metanol (µL)
M1	0.8	80	---	50	100	770
M2	3.0	---	30	50	100	820
M3	10.0	---	100	50	100	750

6.3.3.3.1 Análisis intra-día (Repetibilidad)

Se prepararon controles por sextuplicado en un mismo día, las señales se interpolaron en la curva de calibración obtenida en el día del análisis, para de este modo determinar la cantidad cuantificada y el porcentaje de recuperación.

6.3.3.3.2 Análisis inter-día (Reproducibilidad)

Se prepararon controles por duplicado durante 3 días subsecuentes, se determinó la cantidad cuantificada de fármaco por interpolación en la curva de calibración de cada día del análisis.

6.3.3.4 Límite inferior de Cuantificación (LIC)

El límite inferior de cuantificación corresponde a la concentración más baja dentro de la curva de calibración, la cual corresponde a 0.5 µg/mL (C1). A la cual también se le evaluó la precisión y exactitud intra-día e inter-día de este punto, como se describió anteriormente.

6.3.3.5 Límite de Detección (LD)

Se analizaron dos concentraciones menores a la concentración más baja de la curva de calibración, las cuales fueron 0.3 y 0.1 µg/mL. Se prepararon por triplicado dichas concentraciones a partir de la solución de naproxeno 10 µg/mL y se determinó la precisión y exactitud.

La concentración de su señal cromatográfica debe ser tres veces mayor al ruido.

6.4 Estudio Farmacocinético del Naproxeno

El estudio farmacocinético del naproxeno se realizó 1 y 15 días después de la cirugía de los grupos experimental y sham.

6.4.1 Administración del fármaco

La administración de naproxeno sódico a una dosis de 10 mg/kg de peso (o el mismo volumen de vehículo, agua inyectable estéril) se realizó por vía intravenosa a través de la vena femoral, para lo cual se colocó previamente un catéter de polietileno (PE-50) de 0.58 mm de diámetro interno, mediante la inserción directa de éste en la vena y sujetado adecuadamente.

6.4.1.1 Preparación de la dosis de naproxeno

Se pesaron 20 mg de naproxeno sódico y se disolvieron en 1 mL de agua inyectable estéril, obteniendo una concentración de 20 mg/mL y a las ratas se les administró una dosis de 10 mg/kg de peso. Esta solución se preparó al instante de ser utilizada.

6.4.2 Toma de muestras

Para la obtención de las muestras de sangre, se colocó un catéter de polietileno (PE-10) de 0.28 mm de diámetro interno unido a otro catéter (PE-50) de 0.58 mm, mediante la inserción directa de éste en la arteria caudal, localizada en la cola de la rata, el cual se mantuvo heparinizado durante el estudio farmacocinético.

Las muestras sanguíneas que se tomaron fueron de un volumen de 200 μL , se realizó una toma basal y posterior a la administración del fármaco o vehículo del mismo, se tomaron los siguientes tiempos de muestreo: 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360 minutos a través de la cánula en la arteria caudal. Las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL de capacidad previamente heparinizados.

Con el fin de mantener el volumen sanguíneo circundante se reemplazaba con solución salina fisiológica el mismo volumen de líquido extraído durante cada tiempo de muestreo.

6.4.3 Análisis de muestras

Una vez obtenidas las muestras sanguíneas, éstas fueron centrifugadas de manera inmediata para la obtención del plasma durante 10 min a 9000 rpm, con el fin de obtener 100 μL de plasma. Las muestras se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día de su análisis.

La cantidad de fármaco presente en cada una de las muestras obtenidas durante la cinética, se procesaron de la siguiente manera: una vez descongeladas las muestras de plasma, se les adicionó 50 μL de EI (diclofenaco) y 850 μL del extrayente (metanol). Se agitaron en vortex durante 5 min y fueron centrifugadas a 9000 rpm durante 10 minutos, del sobrenadante obtenido se inyectaron 100 μL en

el equipo cromatográfico y se determinó la cantidad de fármaco presente por medio del procedimiento analítico previamente descrito.

6.4.4 Determinación de los parámetros farmacocinéticos

Se realizó la cuantificación cromatográfica del fármaco en plasma de las muestras obtenidas y con la integración de los datos se construyó el perfil farmacocinético para realizar el análisis de los parámetros farmacocinéticos del naproxeno.

Los cursos temporales se graficaron y se estimaron por un modelo no compartamental los siguientes parámetros farmacocinéticos como ABC_{0-t} , $ABC_{0-\infty}$, el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), la depuración (Cl) y el volumen de distribución aparente (Vd), mediante el programa Win NONLIN versión 2.0, conforme a las siguientes ecuaciones:

$$ABC_{0-\infty} = ABC_{0-t} + C_{last} / \lambda$$

$$t_{1/2} = \ln 2 / \lambda$$

$$Vd = D / ABC_{0-\infty} * \lambda$$

$$Cl = D / ABC_{0-\infty}$$

Donde:

ABC_{0-t} = Área bajo la curva hasta el último tiempo de muestreo

$ABC_{0-\infty}$ = Área bajo la curva desde la administración del fármaco extrapolada al infinito

C_{last} = Concentración sanguínea del fármaco en el último punto experimental

λ = constante de eliminación del fármaco

D = Dosis del fármaco administrado

6.5 Evaluación del efecto anti-inflamatorio de Naproxeno

Se evaluó el efecto anti-inflamatorio producido por la administración de naproxeno sódico a una dosis de 10 mg/kg por vía intravenosa a través de la vena femoral (ver apartado 6.4.1 Administración del fármaco), en ratas sham y con LTME.

Para ello, se realizó la prueba de edema inducido por la administración subplantar de carragenina 2%, previamente descrito (ver apartado 6.2.1 Inducción de la respuesta inflamatoria), con la administración casi simultánea del fármaco anti-inflamatorio.

Posteriormente, se realizaron las mediciones del volumen de las patas de la rata en el pletismómetro, siguiendo el procedimiento previamente descrito (ver apartado 6.2.2 Cuantificación de la respuesta inflamatoria).

6.6 Análisis Estadístico

Los datos se trazaron en curvas a partir de registros obtenidos en el pletismómetro durante seis horas después de la inyección de CRG. El área bajo la curva (ABC) se calculó mediante el método de los trapezoides para un análisis estadístico adicional.

Las comparaciones de los cambios en el volumen de la pata correspondientes a los datos trazados en curvas se analizaron usando la prueba de ANOVA 2 vías de medidas repetidas seguida de la prueba de Bonferroni.

Los valores de ABC entre los grupos de animales se compararon mediante la prueba de la t de Student o mediante una ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey, según el número de grupos incluidos en la comparación.

Las comparaciones de los parámetros farmacocinéticos se determinaron mediante una prueba de t de Student entre el grupo lesionado con su respectivo grupo control.

Los análisis estadísticos y el cálculo del ABC se realizaron con Prism V5. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

6.7 Aspectos Éticos

El Comité de Ética en Investigación del Centro de Investigación Proyecto Camina aprobó este estudio. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de animales utilizados, evitarles sufrimiento innecesario, así como proporcionarles las condiciones ambientales idóneas, para finalmente sacrificarlos sin sufrimiento alguno.

Los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía del Instituto Nacional de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y a los estatutos de la Ley General de Salud, contenidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidados y usos de los animales de laboratorio (94).

7 RESULTADOS

7.1 Modelo de Inflamación subplantar inducida por carragenina

La inflamación provocada por la carragenina (CRG) preparada al 2% administrada de forma subplantar, en la pata superior e inferior del animal, mostró diferencia significativa comparada con la administración de solución salina.

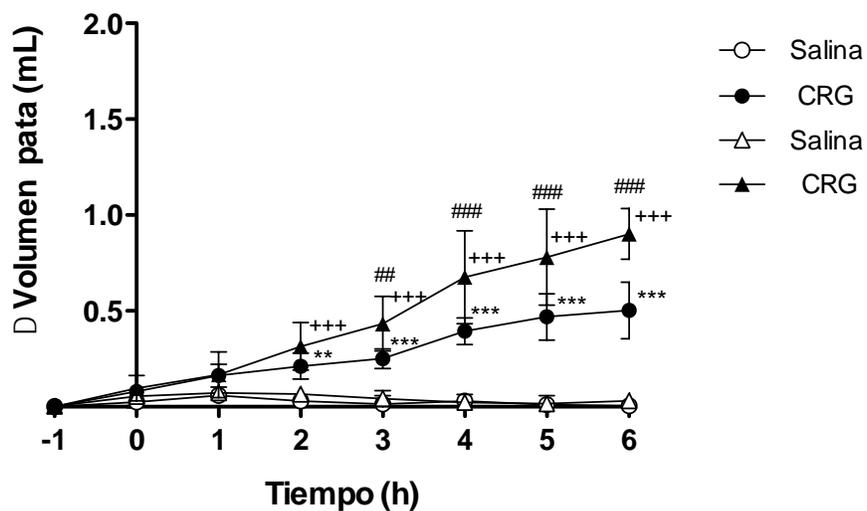
Desde la primera hora posterior a la inyección de carragenina en las ratas sham se observó el hinchamiento de las patas y este aumentó cada hora, alcanzando el máximo al final del estudio (6 horas después de la inyección). Después de la inyección de solución salina, los cambios de volumen de ambas patas fueron mínimos. Esta diferencia de volumen entre salina y CRG es significativa en cada tiempo de registro, excepto en los registros anteriores a 1h (Figura 11 A).

Se encontró que el edema máximo observado en la pata fue a las 6 h después de la inyección de carragenina, tanto en la pata superior (130%) como en la pata inferior (70%) de la rata sham con respecto a la medida basal de las patas.

El área bajo la curva (ABC) de las gráficas obtenidas del registro del cambio de volumen de las patas con respecto al curso temporal de la inyección subplantar de carragenina, se tomó como medida de la respuesta inflamatoria producida.

El ABC del cambio de volumen (Δ) de las extremidades superiores e inferiores comparado con su respectivo grupo control administrado con solución salina, mostraron diferencias significativas entre los grupos (promedio (intervalo de confianza al 95% (IC)): para la extremidades superior, 1.82 (1.46 a 2.17) y 0.21 (0.12 a 0.30) ($p < 0.001$); para la extremidades inferior, 2.92 (2.29 a 3.55) y 0.32 (0.22 a 0.42) ($p < 0.001$), así mismo al comparar entre los grupos de carragenina de ambas extremidades, 1.82 (1.46 a 2.17) y 2.92 (2.29 a 3.55) ($p < 0.001$), (Figura 11 B).

A



B

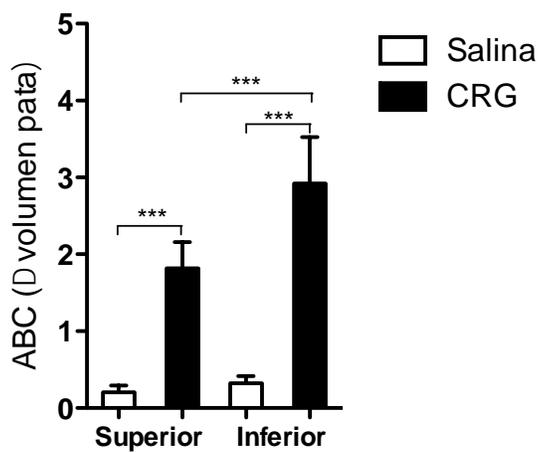


Figura 11. Efecto de la inyección de carragenina y solución salina en las patas de ratas sham.

A. Círculos: extremidad superior, Cuadrados: extremidad inferior. B. ABC obtenida durante la prueba de CRG. Análisis Estadístico: (A) ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni, (B) ABC: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. ***, $p < 0.001$.

No se encontraron diferencias significativas en el ABC de la inyección de solución salina realizada a uno y quince días después de la lesión sham, en la extremidad inferior y superior (Tabla 5).

Tabla 5. Áreas bajo la curva de la respuesta inflamatoria inducida por la inyección de carragenina subplantar.

Días Post Cirugía	Extremidad superior				Extremidad inferior			
	Sham		LTME		Sham		LTME	
	Salina	CRG	Salina	CRG	Salina	CRG	Salina	CRG
1	0.21 ± 0.08	1.82 ± 0.34	0.24 ± 0.08	0.73 ± 0.14	0.32 ± 0.10	2.92 ± 0.60	0.39 ± 0.22	0.63 ± 0.31
15	0.28 ± 0.15	1.79 ± 0.78	0.24 ± 0.09	2.50 ± 0.65	0.34 ± 0.19	3.73 ± 0.57	0.42 ± 0.32	1.90 ± 0.37

Los resultados se muestran como el promedio ± la desviación estándar (DE) obtenida.

7.2 Influencia de la LTME sobre la respuesta inflamatoria

7.2.1 Efecto de la lesión medular en la etapa aguda sobre la respuesta inflamatoria local inducida por carragenina

En los grupos correspondientes a 1 día posterior a la cirugía (etapa aguda), tanto la extremidad superior (Figura 12 A, B) como en la inferior (Figura 12 C, D) los animales con lesión medular mostraron una notable ausencia de la respuesta inflamatoria con respecto a las ratas sham al ser administradas con carragenina subplantar, (promedio (IC 95%)) de grupos con LTME y sham, 0.73 (0.60 a 0.85) y 1.82 (1.46 a 2.17) ($p < 0.001$), para la extremidad superior; 0.63 (0.35 a 0.91) y 2.92 (2.29 a 3.55) ($p < 0.001$), para la extremidad inferior.

1 día post-cirugía

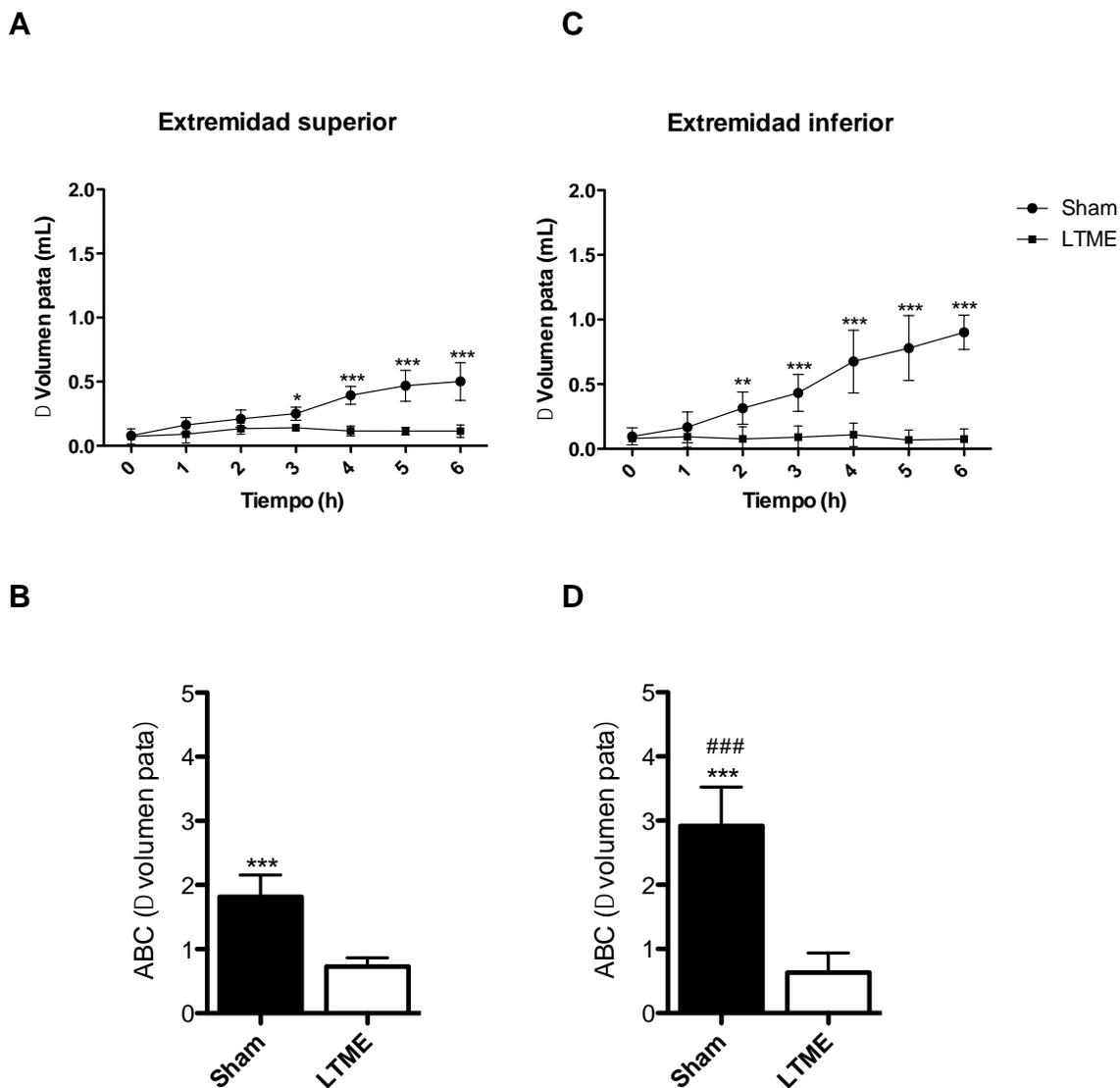


Figura 12. Curso temporal del cambio de volumen de la pata después de la inyección de carragenina en ratas con 1 día post-cirugía.

Cada punto representa la media \pm DE para $n=6-7$ animales. *Análisis Estadístico:* **(A, C)** ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni, **(B, D)** ABC: Student *t* test. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$, * vs. sham en el mismo sitio, # vs. extremidad superior mismo grupo, ### $p<0.001$.

7.2.2 Efecto de la lesión medular en la etapa subaguda sobre la respuesta inflamatoria local inducida por carragenina

En la etapa subaguda (grupos de 15 días posteriores a la cirugía), la inflamación presente por efecto de la carragenina en la extremidad superior en las ratas lesionadas y sham no presentó diferencias significativa entre ellas, al comparar los valores del ABC de los animales: (promedio (IC 95%), 2.50 (1.82 a 3.18) para LTME y 1.79 (0.97 a 2.60) para sham, (Figura 13 A, B), restableciéndose por completo la respuesta inflamatoria en esta región.

En la extremidad inferior la inflamación observada fue significativamente menor en la lesión medular con respecto a las ratas sham (promedio (IC 95%)), 1.90 (1.51 a 2.29) y 3.73 (3.12 a 4.33) ($p < 0.001$), (Figura 13 C, D), restableciéndose aproximadamente un 51%.

15 días post-cirugía

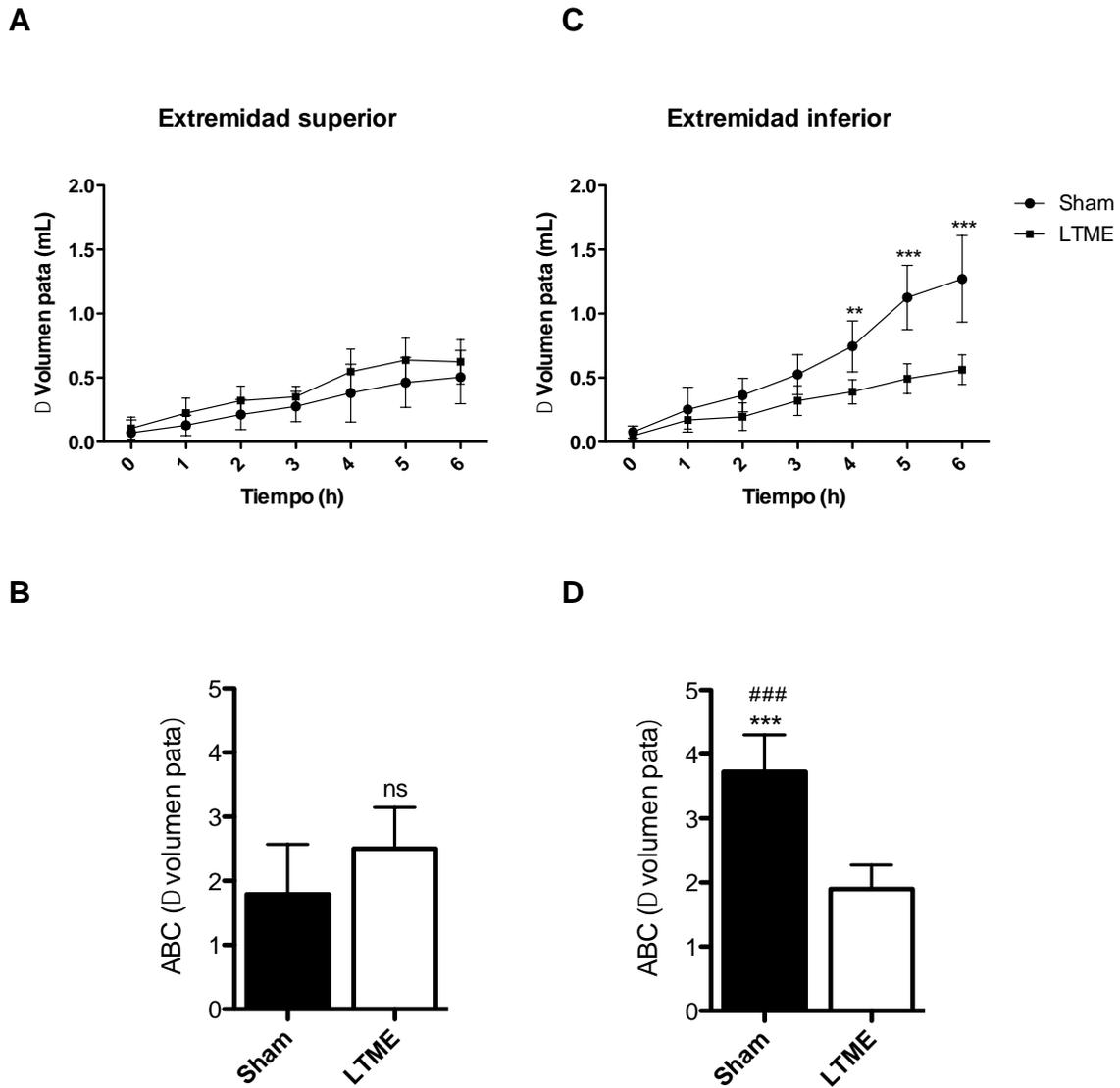


Figura 13. Curso temporal del cambio de volumen de la pata posterior a la inyección de carragenina en ratas 15 días post-cirugía.

Cada punto representa la media \pm DE para $n=6-7$ animales. *Análisis Estadístico:* **(A, C)** ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni, **(B, D)** ABC: Student *t* test. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, * vs. sham en el mismo sitio, # vs. extremidad superior mismo grupo, ### $p < 0.001$, ns: no significativo.

7.2.3 Efecto del tiempo post-lesión medular en la respuesta inflamatoria local

No se encontraron diferencias significativas en el ABC del cambio de volumen de la pata (Δ) entre uno y quince días después de la lesión medular posterior a la inyección de solución salina en extremidades superiores e inferiores.

Se comparó la respuesta inflamatoria a la inyección de carragenina entre 1 y 15 días después de la lesión medular, las ratas lesionadas mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) tanto para las extremidades superiores (Figura 14 A) como para las inferiores (Figura 14 B).

Mientras que en las ratas sham no hubo diferencia entre 1 y 15 días después de la cirugía en extremidades superiores (Figura 14 A), y en las inferiores (Figura 14 B), la diferencia entre ambos períodos fue significativa ($p < 0.05$).

Para comparar las diferencias en la respuesta inflamatoria a la carragenina entre las extremidades superiores y las extremidades inferiores de las ratas lesionadas, los datos registrados se convirtieron en porcentaje de inflamación tomando como referencia las respuestas obtenidas en las ratas sham correspondientes. Solo se observó diferencia significativa entre la inflamación de las extremidades superiores a los 15 días, en comparación con los otros tres grupos de variables ($p < 0.001$) (Figura 15).

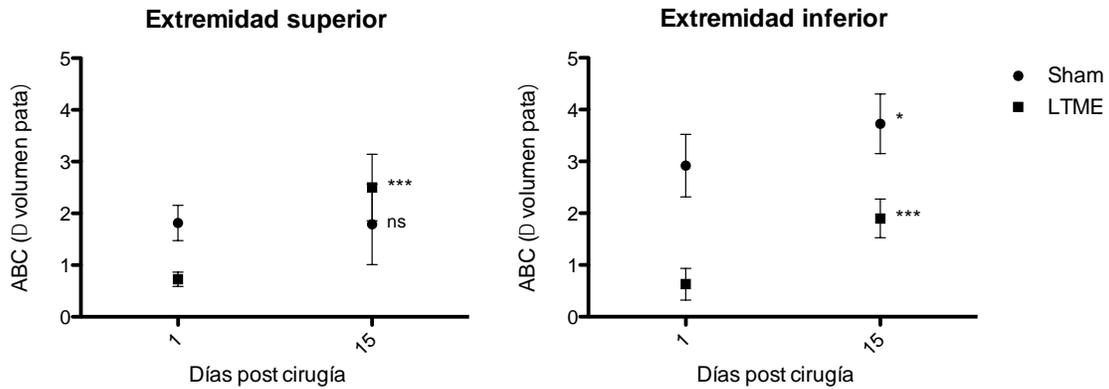


Figura 14. Comparación de la inflamación producida en las extremidades entre 1 y 15 días post-cirugía.

Cada punto representa la media \pm DE del área bajo la curva (ABC) de animales con cirugía sham y LTME. *Análisis Estadístico:* ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, ns: no significativo.

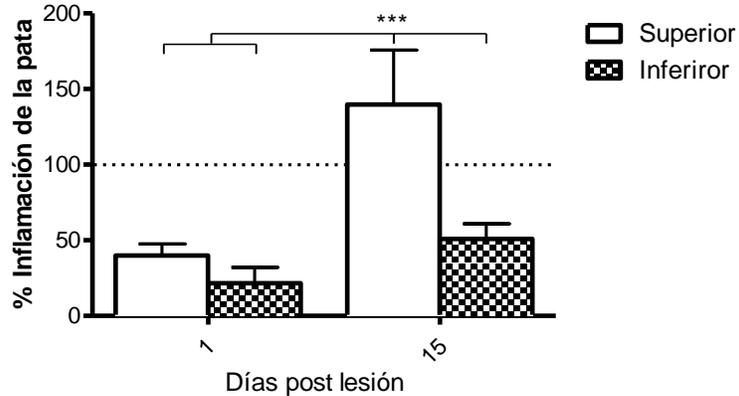


Figura 15. Comparación de la inflamación producida por CRG entre las extremidades superiores e inferiores de las ratas lesionadas.

Los datos representan la media \pm DE del porcentaje de inflamación estimado considerando como 100% el volumen de la pata de las ratas con lesión simulada por separado, para las extremidades superiores e inferiores en cada período posterior a la cirugía. *Análisis Estadístico:* ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. ***, $p < 0.001$.

7.3 Revalidación del Método Analítico para la Cuantificación del Naproxeno

7.3.1 Selectividad

El método analítico por HPLC para la detección y cuantificación de naproxeno en plasma mostró ser selectivo, ya que al comparar los cromatogramas de la muestra blanco de plasma (Figura 16 A), plasma enriquecido con estándar interno (diclofenaco) (Figura 16 B), plasma enriquecido con naproxeno y estándar interno (Figura 16 C), y una muestra obtenida de una rata de experimentación (Figura 16 D). Las respuestas obtenidas presentadas como picos cromatográficos se observaron con una resolución adecuada, bien definidos y no se traslapaban entre ellos por lo que no se encontró ninguna interferencia en su cuantificación.

En primer lugar, aparece el frente de solvente, seguido por el pico cromatográfico correspondiente al naproxeno, con un tiempo de retención de 2.8 min. y finalmente el pico del estándar interno (diclofenaco) a los 5.5 min. obteniendo un tiempo de corrida aproximado de 6 minutos.

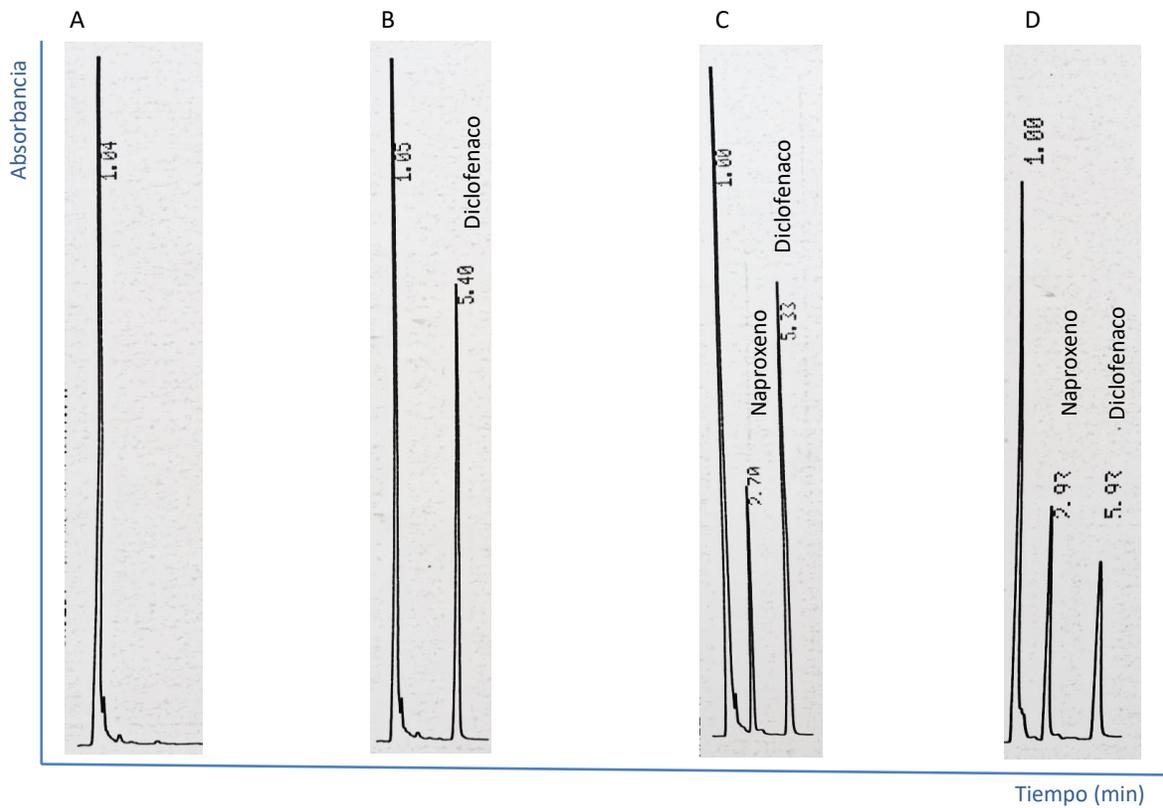


Figura 16. Cromatogramas representativos.

A, muestra blanco de plasma; **B**, plasma enriquecido con EI; **C**, plasma enriquecido con NPX + EI; **D**, muestra de plasma de rata de experimentación.

7.3.2 Curvas de Calibración

Los resultados de las seis curvas de calibración para el naproxeno se presentan en la Tabla 6. Los datos representan la relación de áreas entre el analito y el estándar interno, para cada concentración de naproxeno y el promedio obtenido de las mismas.

Se analizaron 6 niveles de concentración de naproxeno para determinar el coeficiente de determinación y la ecuación de la recta correspondiente (Figura 17). El método resultó ser lineal en el intervalo de concentraciones establecido para la cuantificación de 0.5 a 12 µg/mL de naproxeno con una $r^2=0.9999$, y un coeficiente de variación de menos del 5 % en cada punto de la curva, cumpliendo con lo establecido en la NOM-177-SSA1-2013.

Tabla 6. Curva de calibración del método para naproxeno.

NPX (µg/mL)	Relación NPX/EI						PROM	% CV
	1	2	3	4	5	6		
0.5	0.152	0.143	0.136	0.142	0.144	0.141	0.143 ± 0.005	3.718
1.0	0.270	0.277	0.279	0.271	0.280	0.264	0.273 ± 0.006	2.282
2.0	0.532	0.536	0.548	0.520	0.525	0.542	0.534 ± 0.010	1.914
4.0	1.054	1.053	1.008	0.962	1.066	1.049	1.032 ± 0.040	3.842
8.0	2.086	2.121	2.098	2.064	2.047	2.097	2.085 ± 0.027	1.270
12.0	3.100	3.067	3.161	3.094	3.063	3.063	3.091 ± 0.038	1.232
r²	1.0000	0.9995	0.9996	0.9993	0.9999	0.9997	0.9999	

Los resultados se muestran como el promedio ± la desviación estándar (DE) obtenida.

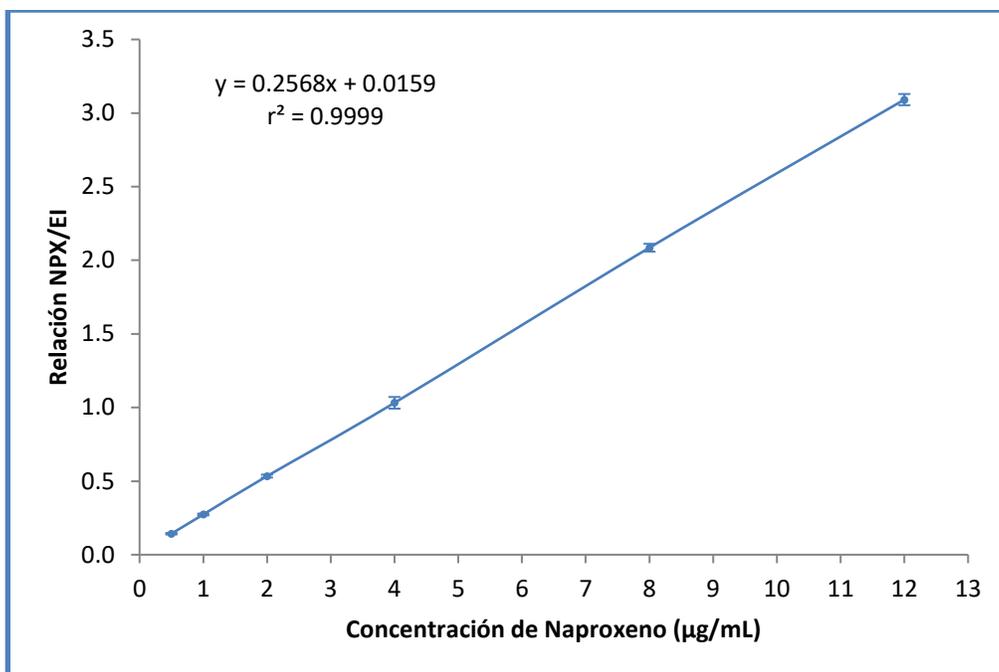


Figura 17. Curva de calibración para la determinación de NPX en plasma de rata.

Cada punto representa el promedio de 6 determinaciones \pm DE.

7.3.3 Precisión y Exactitud

Los resultados de la precisión y la exactitud del método analítico para la cuantificación de naproxeno se muestran en el análisis realizado intra-día (Tabla 7) e inter-día (Tabla 8).

El método fue exacto y preciso en el análisis intra-día e inter-día de las muestras controles de concentración alta (10 µg/mL), media (3.0 µg/mL) y baja (0.8 µg/mL), obteniendo coeficientes de variación menores al 5% y los porcentajes de recuperación o exactitud fueron mayores al 95% con respecto a la concentración adicionada de naproxeno, cuyos valores están dentro del establecido de 85 -115 %.

Tabla 7. Precisión y exactitud intra-día para la determinación de NPX.

Conc. Adicionada NPX (µg/mL)	Concentración Recuperada NPX (µg/mL)						PROM	% CV	% Recup.
	1	2	3	4	5	6			
0.8	0.757	0.776	0.769	0.769	0.791	0.743	0.767 ± 0.016	2.143	95.918
3.0	2.918	2.987	2.987	2.987	2.934	2.987	2.967 ± 0.032	1.069	98.887
10.0	9.877	9.877	9.941	9.978	9.994	10.157	9.971 ± 0.103	1.037	99.708

Los resultados se muestran como el promedio ± la desviación estándar (DE) obtenida.

Tabla 8. Precisión y exactitud inter-día para la determinación de NPX.

Conc. Adicionada NPX (µg/mL)	Concentración Recuperada NPX (µg/mL)						PROM	% CV	% Recup.
	Día								
	1	2	3						
0.8	0.757	0.776	0.846	0.843	0.770	0.784	0.796 ± 0.038	4.817	99.507
3.0	2.918	2.987	3.031	2.967	3.103	3.050	3.009 ± 0.065	2.174	100.312
10.0	9.877	9.877	9.903	10.462	10.204	9.676	10.00 ± 0.283	2.826	99.999

Los resultados se muestran como el promedio ± la desviación estándar (DE) obtenida.

7.3.4 Límite Inferior de Cuantificación

El límite inferior de cuantificación del método se estableció como la concentración más baja dentro de la curva, de 0.5 µg/mL de naproxeno. Se analizó por quintuplicado, mostrando exactitud y precisión en el análisis intra-día e inter-día con coeficientes de variación menores al 20% y porcentajes de recuperación entre 80-120%, como lo establece la norma (Tabla 9).

Tabla 9. Determinación del límite de cuantificación de NPX.

Conc. Adicionada NPX (µg/mL)	Concentración Recuperada NPX (µg/mL)						PROM	% CV	% Recup.
	Repetibilidad (intra-día)								
0.5	1	2	3	4	5	6	0.471 ± 0.016	3.491	94.172
	0.501	0.467	0.462	0.477	0.462	0.457			
	Reproducibilidad (inter-día)								
	1	2	3				0.494 ± 0.036	7.211	98.747
	0.501	0.467	0.523	0.546	0.470	0.456			

Los resultados se muestran como el promedio ± la desviación estándar (DE) obtenida.

7.3.5 Límite de Detección

Para establecer el límite de detección se analizaron por triplicado concentraciones menores al LIC siendo estas de 0.3 y 0.1 µg/mL. En ambos casos se logró detectar el naproxeno en el sistema cromatográfico, con CVs menores al 20% y porcentajes de recuperación entre 80-120% mostrando precisión y exactitud conforme a la norma (Tabla 10).

Tabla 10. Determinación del límite de detección de NPX.

Conc. Adicionada NPX (µg/mL)	Concentración Recuperada NPX (µg/mL)					
	1	2	3	PROM	% CV	% Recup.
0.3	0.281	0.340	0.316	0.312 ± 0.030	9.560	104.106
0.1	0.098	0.133	0.097	0.109 ± 0.020	18.606	109.308

Los resultados se muestran como el promedio ± la desviación estándar (DE) obtenida.

7.4 Efecto de la LTME sobre la farmacocinética del naproxeno

Una vez validado el método analítico para cuantificar el naproxeno en plasma de rata, se realizó el estudio farmacocinético con el fin de determinar la influencia de la lesión medular a nivel T9 y, en la etapa aguda y sub aguda (1 y 15 días después de la cirugía, respectivamente) de los grupos experimental y sham como testigo.

Las muestras de plasma obtenidas fueron procesadas y analizadas de acuerdo al método establecido para la cuantificación de naproxeno en plasma, una vez obtenidas las concentraciones en plasma para cada tiempo de muestreo se construyó el perfil farmacocinético y se estimaron los parámetros farmacocinéticos.

7.4.1 Perfiles y parámetros farmacocinéticos de los grupos controles

Se compararon los perfiles farmacocinéticos obtenidos de las ratas de los grupos controles a un día y a 15 días. Como se observa en la Figura 18 no hubo diferencias en los perfiles de ambos grupos y, al calcular y comparar los parámetros farmacocinéticos de ambos grupos controles no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados (Tabla 11).

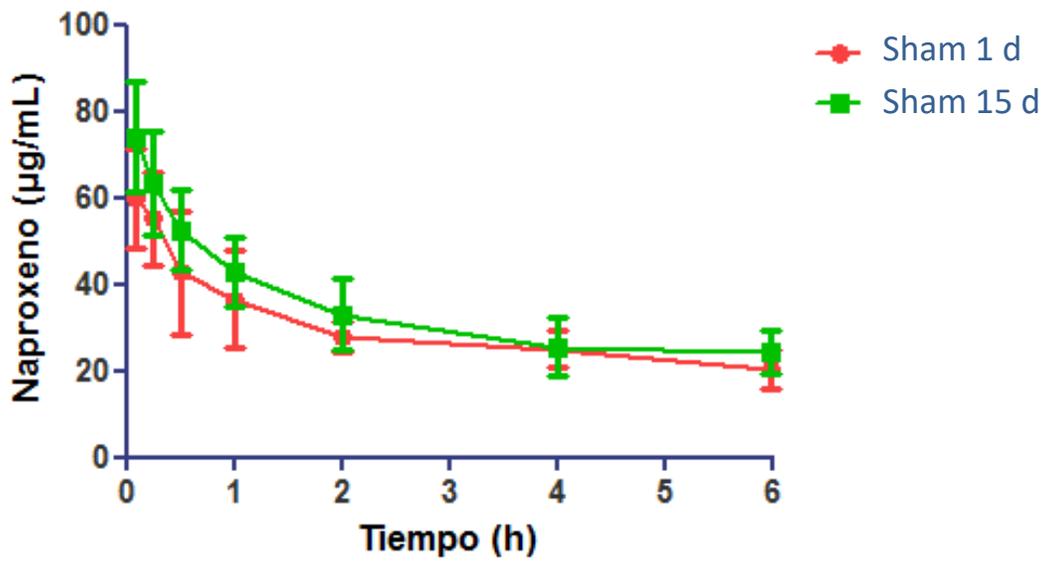


Figura 18. Concentraciones plasmáticas promedio de naproxeno en plasma de rata sham a 1 y 15 días post-cirugía.

Cada punto representa el promedio \pm DE de 6 ratas.

Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos controles para el naproxeno.

Parámetro	Grupo	
	Sham 1 d	Sham 15 d
λ Lambda _z (h ⁻¹)	0.13 \pm 0.05	0.15 \pm 0.06
t _{1/2} (h)	5.85 \pm 2.15	5.12 \pm 1.85
Vd (L/kg)	0.24 \pm 0.05	0.19 \pm 0.03
Cl (L/h kg)	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
ABC _{0-t} (µg/mL*h)	176.60 \pm 26.95	202.30 \pm 39.53
ABC _{0-∞} (µg/mL*h)	351.08 \pm 81.08	389.55 \pm 122.93

Los datos representan la media \pm DE.

7.4.2 Efecto de la lesión medular en la etapa aguda sobre la farmacocinética de NPX

Para determinar el efecto de la lesión medular sobre la farmacocinética del naproxeno en una etapa aguda de la lesión, se compararon los perfiles farmacocinéticos obtenidos de las ratas de los grupos control y lesión a un día posterior a la cirugía correspondiente. Como se observa en la Figura 19 no hubo diferencias en los perfiles (concentración del fármaco vs tiempo) de ambos grupos y, al calcular y comparar los parámetros farmacocinéticos de ambos grupos no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados (Tabla 12).

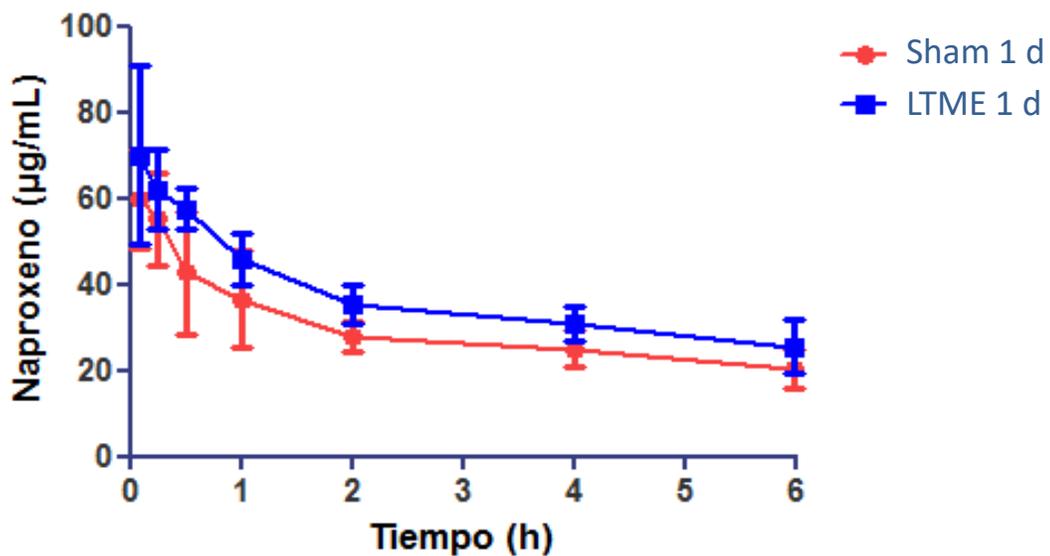


Figura 19. Concentraciones plasmáticas promedio de naproxeno en el plasma de rata con lesión medular en la etapa aguda (1 día post-cirugía).

Cada punto representa el promedio \pm DE de 6 ratas.

Tabla 12. Parámetros farmacocinéticos para el naproxeno después de una lesión medular en la etapa aguda.

Parámetro	Grupo	
	Sham 1 d	LTME 1 d
λ Lambda _z (h ⁻¹)	0.13 ± 0.05	0.12 ± 0.05
t _{1/2} (h)	5.85 ± 2.15	6.99 ± 3.59
Vd (L/kg)	0.24 ± 0.05	0.20 ± 0.02
Cl (L/h kg)	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01
ABC _{0-t} (µg/mL*h)	176.60 ± 26.95	211.30 ± 32.26
ABC _{0-∞} (µg/mL*h)	351.08 ± 81.08	493.40 ± 211.78

Los datos representan la media ± DE.

7.4.3 Efecto de la lesión medular en la etapa subaguda sobre la farmacocinética de NPX

Para determinar el efecto de la lesión medular sobre la farmacocinética del naproxeno en una etapa subaguda de la lesión, se compararon los perfiles farmacocinéticos obtenidos de las ratas de los grupos control y lesión a 15 días posteriores a la cirugía correspondiente. Como se observa en la Figura 20, se observan diferencias en los perfiles (concentración del fármaco vs tiempo) de ambos grupos.

Al comparar los parámetros farmacocinéticos de ambos grupos se observaron diferencias significas en los parámetros del volumen de distribución, depuración y en el área bajo la curva, de 0 a t y la extrapolada al infinito (Tabla 13).

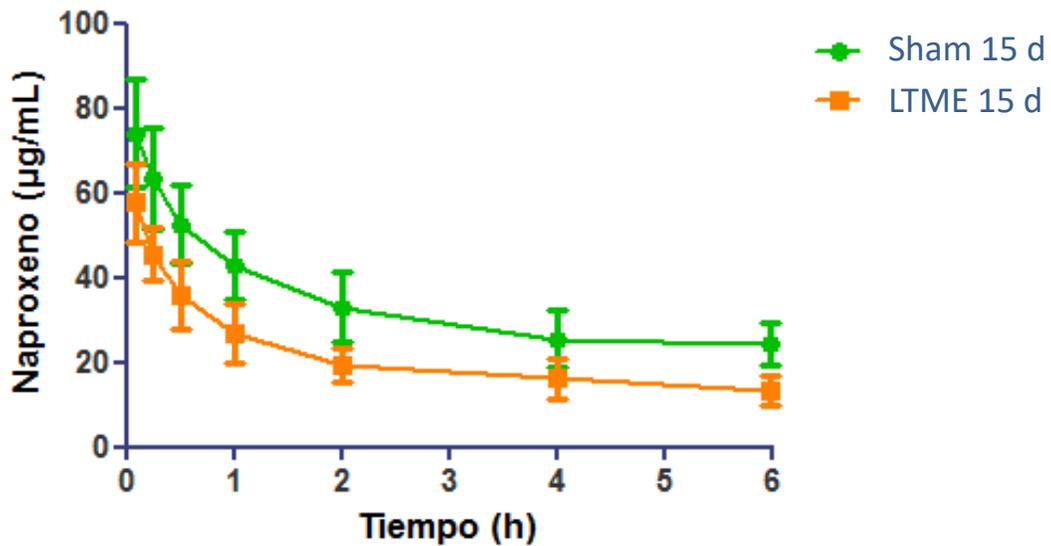


Figura 20. Concentraciones plasmáticas promedio de naproxeno en plasma de rata con lesión medular en la etapa subaguda (15 días post-cirugía).

Cada punto representa el promedio \pm DE de 6 ratas.

Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos para el naproxeno después de una lesión medular en la etapa subaguda.

Parámetro	Grupo	
	Sham 15 d	LTME 15 d
λ Lambda_z (h^{-1})	0.15 \pm 0.06	0.15 \pm 0.05
$t_{1/2}$ (h)	5.12 \pm 1.85	5.16 \pm 1.89
Vd (L/kg)	0.19 \pm 0.03	0.34 \pm 0.10 *
Cl (L/h kg)	0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01 *
ABC _{0-t} (µg/mL*h)	202.30 \pm 39.53	127.60 \pm 27.86 *
ABC _{0-∞} (µg/mL*h)	389.55 \pm 122.93	225.63 \pm 62.65 *

Los datos representan la media \pm DE.

7.4.4 Efecto del tiempo post-lesión sobre la farmacocinética del naproxeno

Para determinar el efecto del tiempo posterior a una lesión medular sobre la farmacocinética del naproxeno. Se compararon los perfiles farmacocinéticos obtenidos de las ratas de los grupos lesión un día y lesión a 15 días posteriores a la cirugía correspondiente, como se observa en la Figura 21, desde el segundo tiempo de muestreo se observan diferencias en el perfil (concentración del fármaco vs tiempo) de ambos grupos y esta diferencia de concentración continúa siendo evidente hasta el final del muestreo.

Al realizar la comparación de los parámetros farmacocinéticos de ambos grupos se observaron diferencias significativas en los parámetros del volumen de distribución y depuración, éstos aumentaron con respecto de uno a 15 días después de la lesión medular y por consiguiente los parámetros que describen la biodisponibilidad del fármaco como área bajo la curva, de 0 a t y la extrapolada al infinito, disminuyeron con respecto al tiempo de lesión (Tabla 14).

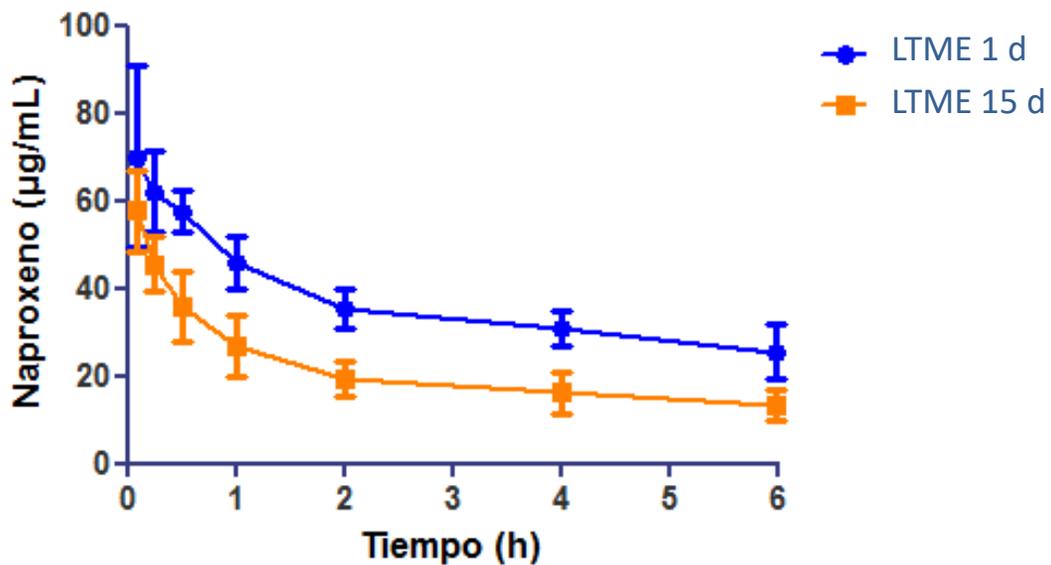


Figura 21. Concentraciones plasmáticas promedio de naproxeno en plasma de rata con lesión medular a 1 y 15 días post-cirugía.

Cada punto representa el promedio \pm DE de 6 ratas.

Tabla 14. Parámetros farmacocinéticos para el naproxeno después de una lesión medular en T9.

Parámetro	Grupo	
	LTME 1 d	LTME 15 d
λ Lambda_z (h^{-1})	0.12 \pm 0.05	0.15 \pm 0.05
$t_{1/2}$ (h)	6.99 \pm 3.59	5.16 \pm 1.89
Vd (L/kg)	0.20 \pm 0.02	0.34 \pm 0.10 *
Cl (L/h kg)	0.02 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01 *
ABC _{0-t} ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$)	211.30 \pm 32.26	127.60 \pm 27.86 *
ABC _{0-∞} ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$)	493.40 \pm 211.78	225.63 \pm 62.65 *

Los datos representan la media \pm DE.

Tabla 15. Resumen de los parámetros farmacocinéticos del NPX en todos los grupos experimentales.

GRUPO	Parámetro FC					
	λ Lambda_z (h ⁻¹)	t ½ (h)	Vd (L/kg)	Cl (L/h kg)	ABC _{0-t} (µg/mL*h)	ABC _{0-∞} (µg/mL*h)
Sham 1d	0.13 ±	5.85 ±	0.24 ±	0.03 ±	176.60 ±	351.08 ±
	0.05	2.15	0.05	0.01	26.95	81.08
LTME 1d	0.12 ±	6.99 ±	0.20 ±	0.02 ±	211.30 ±	493.40 ±
	0.05	3.59	0.02	0.01	32.26	211.78
Sham 15d	0.15 ±	5.12 ±	0.19 ±	0.03 ±	202.30 ±	389.55 ±
	0.06	1.85	0.03	0.01	39.53	122.93
LTME 15d	0.15 ±	5.16 ±	0.34 ±	0.05 ±	127.60 ±	225.63 ±
	0.05	1.89	0.10 +&#	0.01 &#	27.86 &#	62.65 #

Análisis Estadístico: ANOVA prueba Tukey. +, diferencia significativa con respecto al grupo sham 1d; &, diferencia significativa con respecto al grupo LTME 1d; #, diferencia significativa con respecto al grupo sham 15d; (p<0.05). Los datos representan la media ± DE obtenida.

7.5 Efecto anti-inflamatorio del Naproxeno

7.5.1 Efecto anti-inflamatorio de la administración de Naproxeno IV en ratas con cirugía sham

En el efecto anti-inflamatorio de la dosis de naproxeno que se administró, en los grupos sham correspondientes a 1 (Figura 22 A) y 15 (Figura 22 B) días post-cirugía se observa una disminución significativa en el cambio de volumen de las extremidades registradas durante las 6 horas de experimentación.

Al evaluar el efecto de la respuesta al naproxeno, se determinó que a 1 día posterior a la lesión, la inflamación disminuyó en alrededor de un 45% en la extremidad superior: (promedio (IC 95%)) entre los grupos administrados con NPX y el vehículo (Veh), 1.00 (0.72 a 1.28) y 1.82 (1.46 a 2.17) ($p < 0.001$); y 66% en la e inferior: (promedio (IC 95%)) entre los grupos NPX y Veh, 0.98 (0.65 a 1.31) y 2.92 (2.29 a 3.55) ($p < 0.0001$), (Figura 23 A).

La misma tendencia se pudo observar en las ratas de 15 días después de la lesión (Figura 23 B), tomando como respuesta inflamatoria máxima (100%) la obtenida con la administración del vehículo (agua inyectable). La administración de naproxeno disminuyó un 36% la inflamación en la extremidad superior, siendo este cambio no significativo con el obtenido por el vehículo: (promedio (IC 95%)) entre los grupos NPX y Veh, 1.15 (0.76 a 1.53) y 1.79 (0.97 a 2.60). Por otra parte en la extremidad inferior la respuesta inflamatoria disminuyó un 65%: (promedio (IC 95%)) en grupos de NPX y Veh, 1.32 (0.86 a 1.78) y 3.73 (3.12 a 4.33), ($p < 0.001$).

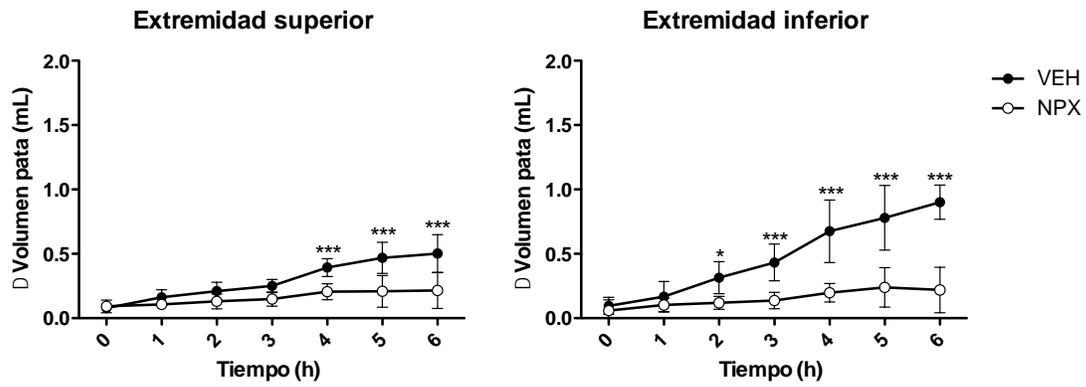
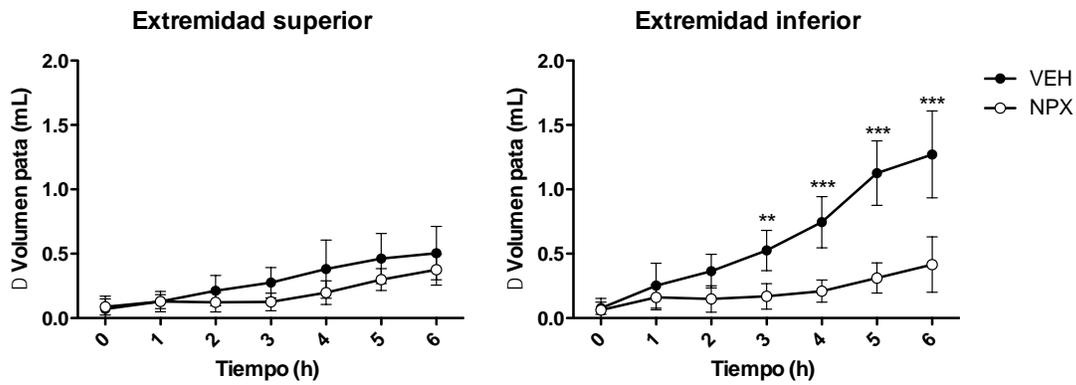
A**1 día post-cirugía****B****15 días post-cirugía**

Figura 22. Efecto anti-inflamatorio del naproxeno después de la inyección de carragenina en ratas sham.

Cada punto representa la media \pm DE para $n=6-7$ animales. *Análisis Estadístico*: ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

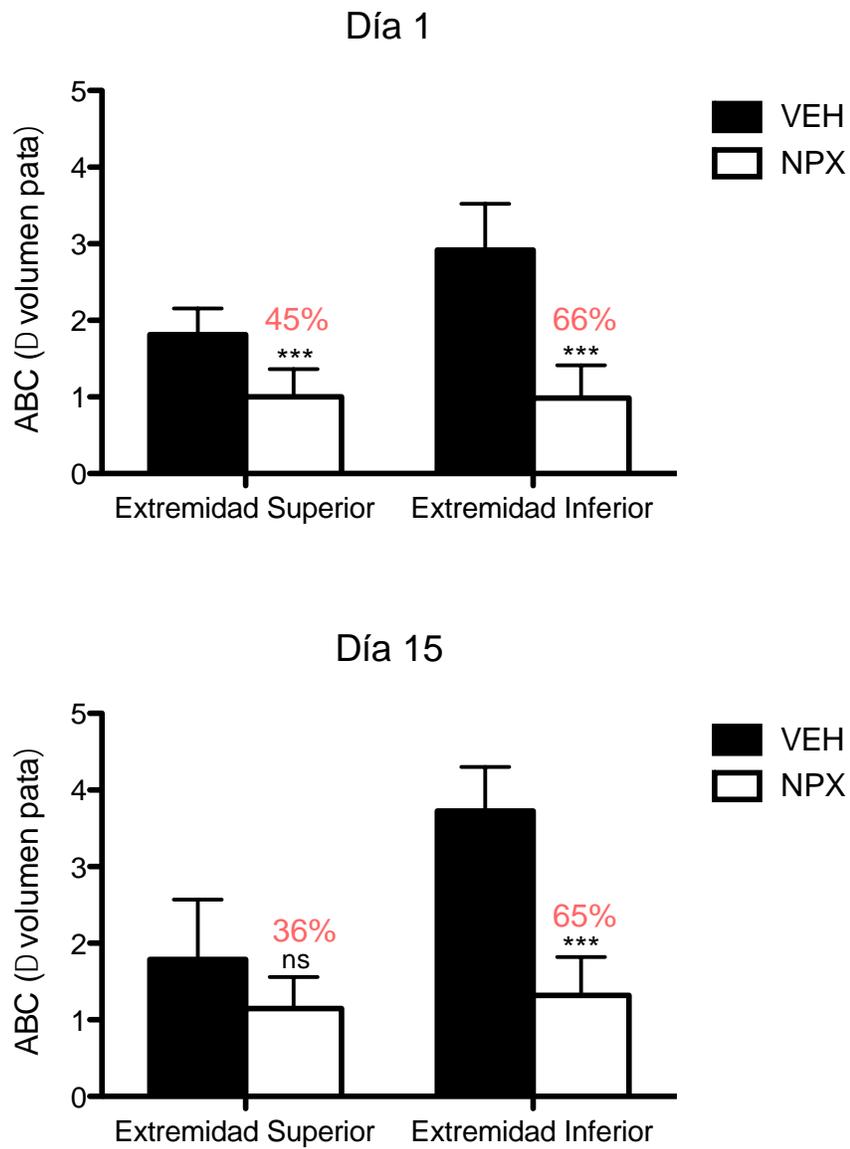


Figura 23. Efecto anti-inflamatorio del naproxeno en ratas sham.

Los datos representan la media \pm DE. *Análisis Estadístico*: Student *t* test, *** $p < 0.001$, ns: no significativo.

7.5.2 Influencia de la LTME sobre el efecto anti-inflamatorio del Naproxeno

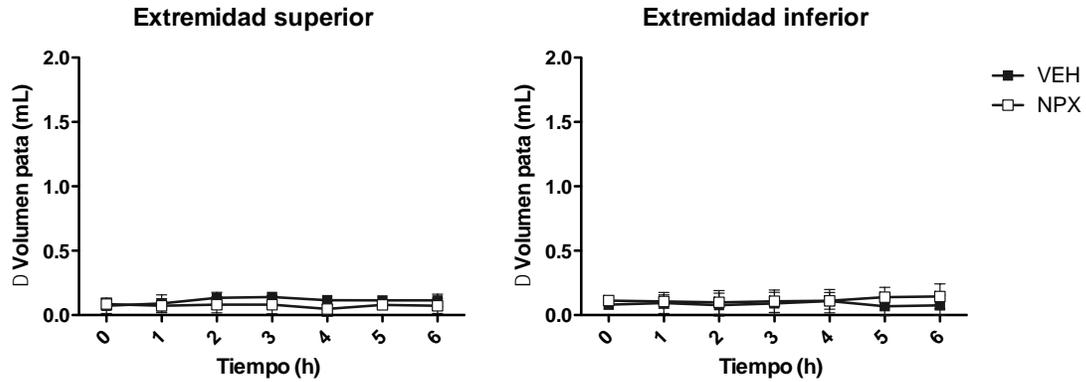
En los grupos con LTME 1 día posterior a la lesión, se observa una ausencia de inflamación en ambas extremidades debido a la administración de carragenina, por lo que es evidente que no hubo efecto anti-inflamatorio observable debido al naproxeno (Figura 24 A), por lo que no hubo diferencias significativa en el volumen de ambas extremidades con la respuesta obtenida con la administración del vehículo: (promedio (IC 95%)) en grupos de NPX y Veh, 0.50 (0.29 a 0.70) y 0.73 (0.60 a 0.85), para la extremidad superior; 0.76 (0.48 a 1.04) y 0.63 (0.35 a 0.91), para la extremidad inferior, (Figura 25 A).

A los 15 días posteriores a la LTME, se recupera la respuesta inflamatoria en la extremidad superior y se observa el efecto anti-inflamatorio de la dosis de naproxeno que se administró (Figura 24 B), disminuyendo el volumen de la pata aproximadamente el 33% con respecto a la administración del vehículo: (promedio (IC 95%)) entre el grupo de NPX y Veh, 1.67 (1.42 a 1.91) y 2.50 (1.82 a 3.18) ($p < 0.01$). En la extremidad inferior, el efecto anti-inflamatorio fue ausente, ya que al comparar el efecto de la administración de NPX con respecto a la del vehículo no mostró diferencia significativa, (promedio (IC 95%)), 1.94 (1.51 a 2.37) y 1.90 (1.51 a 2.29), (Figura 25 B).

En la Tabla 15 se muestran las áreas bajo la curva calculadas de los cursos temporales evaluados del volumen de la pata de la rata, en la repuesta a la administración de naproxeno IV.

A

1 día post-cirugía



B

15 días post-cirugía

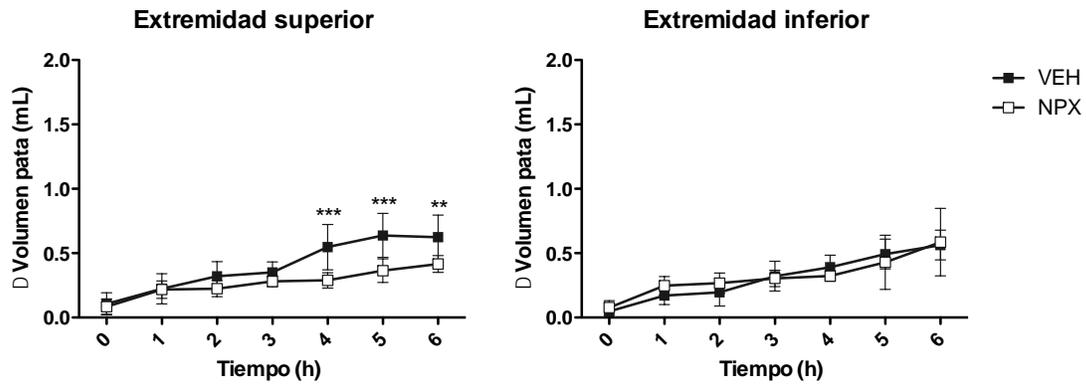


Figura 24. Efecto anti-inflamatorio del naproxeno después de la inyección de carragenina en ratas LTME.

Cada punto representa la media \pm DE para $n=6-7$ animales. *Análisis Estadístico*: ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni. ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

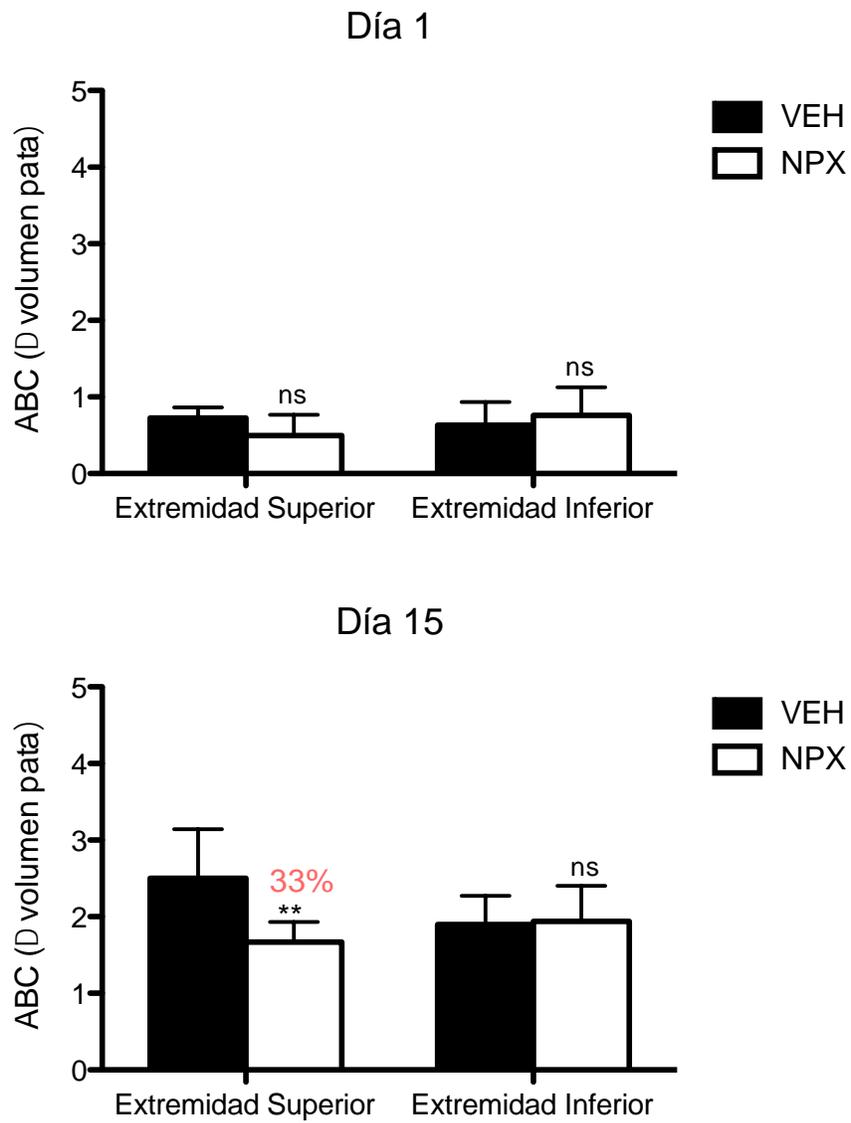


Figura 25. Efecto anti-inflamatorio en ratas con lesión medular.

Los datos representan la media \pm DE. *Análisis Estadístico*: Student *t* test, $**p < 0.01$, ns: no significativo.

Tabla 16. Áreas bajo la curva del volumen de la respuesta anti-inflamatoria por efecto de la administración de naproxeno.

Días Post Cirugía	Extremidad superior				Extremidad inferior			
	Sham		LTME		Sham		LTME	
	VEH	NPX	VEH	NPX	VEH	NPX	VEH	NPX
1	1.82 ± 0.34	1.00 ± 0.36	0.73 ± 0.14	0.50 ± 0.27	2.92 ± 0.60	0.98 ± 0.43	0.63 ± 0.31	0.76 ± 0.36
15	1.79 ± 0.78	1.15 ± 0.41	2.50 ± 0.65	1.67 ± 0.26	3.73 ± 0.57	1.32 ± 0.50	1.90 ± 0.37	1.94 ± 0.46

Los resultados se muestran como el promedio ± la desviación estándar (DE) obtenida.

8 DISCUSIÓN

Las personas con lesión medular son más susceptibles a padecer procesos infecciosos en comparación con la población general. Es bien sabido que después de una lesión en la médula espinal se desencadena una serie de alteraciones y/o desregulaciones en diversos sistemas del organismo que pueden persistir a través del estado agudo, sub-agudo y en algunos casos crónicos (32).

Cabe destacar el síndrome de deficiencia inmune inducido por daño en la médula espinal (SCI-IDS, por sus siglas en inglés) (35, 36, 95), con lo cual se incrementa la incidencia y severidad de las infecciones sistémicas, como neumonía, infecciones urinarias, infecciones en la piel y/o problemas de cicatrización de heridas, disminuyendo la calidad de vida y aumentando la morbilidad en estas personas (33, 96-99).

La inflamación local es de las primeras respuestas que el cuerpo tiene para enfrentar cualquier agente patógeno, sea bacteriano o viral. Notablemente existen pocos estudios que evalúen la respuesta inflamatoria local en presencia de una lesión medular y que a su vez hayan demostrado diferencias entre la inflamación periférica ocurrida por debajo del nivel de la lesión como por arriba de éste, y si estas diferencias se mantienen en los días post-lesión.

Como antecedentes de este estudio se encuentran los trabajos realizados por Macneil, *et al.* (2001), quienes mediante un modelo animal de LM demostraron que las citocinas producidas en respuesta a un estímulo inflamatorio e inmune se alteran después de una LM, y estos cambios ocasionan una mayor susceptibilidad al establecimiento de infecciones de úlceras por presión, así como una mayor probabilidad de shock séptico en el caso de infecciones más graves (100), y más reciente el trabajo realizado por Marbourg, *et al.* (2017), donde mediante técnicas de imagen en vivo probaron que la LM afecta el reclutamiento de leucocitos, principalmente macrófagos, a sitios de inflamación cutánea esenciales para la cicatrización de heridas (101).

Por lo anterior, esta investigación se realizó con el objetivo de conocer los procesos fisiopatológicos de la inflamación local en un modelo animal con lesión medular y con ello poder brindar información que en última instancia ayude a desarrollar estrategias para mejorar la calidad de vida de personas con LTME.

8.1 Sobre el diseño experimental de este trabajo

Debido a la gran variabilidad interindividual que se observa en humanos con lesión medular, el uso de modelos en animales ha sido un recurso útil para identificar los procesos fisiopatológicos involucrados en este tipo de lesión y realizar pruebas terapéuticas preclínicas.

Usar el modelo de contusión para producir la lesión traumática en la médula espinal de los animales fue de gran importancia para el desarrollo de este estudio, ya que imita las características clínicas e histopatológicas de la lesión medular más frecuente en humanos, la cual es ocasionada por fractura, laceración y/o luxación de la columna vertebral. Así mismo, utilizar la cirugía simulada (sham) en lugar de realizar una laminectomía, se justifica en estudios previos donde se ha observado que la laminectomía puede causar una lesión mínima a la médula espinal (102).

Presumimos que evaluar la respuesta inflamatoria con ayuda de modelos animales, permitirá extrapolar el conocimiento generado a humanos con lesión medular.

El modelo animal de inflamación provocada por la administración de carragenina de forma subplantar, tanto en la pata anterior como posterior, permitió evaluar la respuesta inflamatoria periférica bajo dos condiciones: áreas paralizadas y áreas con integridad neurológica.

La inflamación inducida por carragenina en la pata de la rata representa un modelo clásico de formación de edema e hiperalgesia bien estudiado (103), e

implica mecanismos neurogénicos y no neurogénicos. En el edema subplantar por carragenina, la reacción inflamatoria está condicionada por la liberación de histamina, bradicinina y serotonina, y por la desgranulación de los mastocitos, conocida como la primera fase de la inflamación (hasta 2 h) y en una fase posterior (2-5 h), los neutrófilos migran al sitio de inflamación, se generan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y esta sostenida principalmente por la presencia de las prostaglandinas (PGE1 y PGE2, PGF2) (104).

La respuesta vascular máxima que se llega a observar, en diversos estudios previamente publicados, ocurre aproximadamente a las 4 horas de la administración de carragenina (104). El método del pletismómetro induce inflamación local aguda altamente reproducible y es empleado comúnmente para medir el edema de la pata en modelos de inflamación para evaluar diversos fármacos analgésicos y antiinflamatorios (56, 103).

En estudios diversos previos existe la controversia en cuanto a la dosis administrada y el tipo de CRG utilizada para provocar un edema subplantar en la rata (56, 59, 104). En nuestro diseño experimental, la administración de carragenina λ preparada al 2% confirmó que produce una respuesta inflamatoria aumentando significativamente el volumen de la pata en ratas con cirugía sham comparada con la administración de su vehículo (solución salina). Definiendo que 100 μ L de carragenina λ al 2% intraplantarmente en la pata de la rata produce una respuesta inflamatoria cuantificable para la evaluación y el desarrollo de este estudio. El máximo nivel de edema observado fue alcanzado entre las 5-6 horas posteriores a la administración de CRG, lo que permite afirmar que nuestros resultados son similares a los obtenidos por otros autores (104, 105) y coincide con la fase mediada por prostaglandinas.

Presentar los datos obtenidos como el cambio de volumen de la pata de los animales registrados durante el transcurso del desafío inflamatorio por CRG, permitió visualizar el incremento gradual del volumen de las patas debido a la inflamación con respecto al volumen basal. El cálculo del área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales de la inflamación de los diferentes grupos

experimentales implicados en el estudio, se realizó con el fin de determinar un valor integral y cuantificable de la respuesta inflamatoria producida durante las 6 horas, lo que permitió realizar el análisis comparativo de los mismos.

Con respecto al tiempo posterior a la LM, en este trabajo evaluamos un desafío proinflamatorio en dos fases consecutivas y diferenciables: 1) una etapa temprana donde el animal experimental presenta arreflexia/hiporreflexia (choque espinal), donde ocurren cambios sistémicos propios de una condición crítica y donde predomina el proceso de daño secundario en la médula espinal, y 2) una etapa intermedia donde los reflejos han regresado (incluso en forma de hiperreflexia), donde los cambios sistémicos tienden a estabilizarse y la médula espinal muestra signos de remodelación (106).

8.2 Influencia de la LTME en la etapa aguda sobre la respuesta inflamatoria

En este trabajo, utilizando el método del pletismómetro para medir la inflamación inducida por CRG en ratas con lesión medular, los resultados indican que las alteraciones en la respuesta inflamatoria cambian dependiendo de la integridad neurológica de la región analizada y del tiempo transcurrido después de la lesión (ver Figura 12).

Es notable el hecho que a un día después de la lesión (en la etapa aguda), las ratas que fueron inyectadas con carragenina presentaron nula reacción inflamatoria tanto en las extremidades paralizadas como en las íntegras. De hecho la respuesta fue similar a la observada cuando solo se les administró solución salina bajo la misma condición experimental.

Las personas con LTME, a menudo se encuentran en un estado inflamatorio perpetuo de bajo grado (107), que se eleva cuando otras complicaciones de salud y/o trastornos asociados están presentes.

La respuesta inflamatoria local casi nula a la inyección de CRG observada un día después de la LTME era un resultado esperado como un posible escenario en áreas por debajo del sitio de la lesión (100, 101), pero dicha supresión inflamatoria en la región neurológicamente intacta fue un hallazgo inesperado. Por consiguiente, la incapacidad de las ratas con lesión aguda para generar una respuesta inflamatoria, independientemente del estado neurológico del tejido sometido al desafío inflamatorio, sugiere que podrían estar implicados tanto los mecanismos locales como los sistémicos.

La lesión medular, especialmente en la fase de choque medular, induce una disfunción autonómica a una escala sistémica que altera la homeostasis en el flujo sanguíneo y puede conducir a una deficiencia en la circulación microvascular de la piel y de otros órganos (30, 108) lo que pudiera explicar, al menos en parte, nuestras observaciones (34).

Se sabe que la microcirculación desempeña un papel importante para generar las respuestas inflamatorias. Por lo tanto, las alteraciones en la microcirculación sanguínea pueden dar como resultado respuestas inflamatorias defectuosas (109). Adicionalmente, en lesiones tempranas altas o bajas de la médula espinal, el flujo microvascular sanguíneo disminuye significativamente como consecuencia del aumento de la resistencia vascular periférica en la piel de las extremidades anteriores (30). Finalmente, la participación de mecanismos sistémicos, como la hipovolemia y la elevación del cortisol sérico (100, 110), no pueden descartarse.

Es posible que la supresión temprana de la reacción inflamatoria, tanto por debajo como por encima del nivel de la lesión en la etapa aguda, pueda resultar de una supresión inmune sistémica, lo que probablemente refleja una combinación de diversos mecanismos como:

- la elevación de las hormonas de estrés durante la lesión aguda con efecto anti-inflamatorio (110, 111),
- existen funciones inmunes celulares y humorales deficientes (97, 112, 113),
- se presenta la supresión de respuestas inmunes innatas y adaptativas (36),

- existe una desregulación de la influencia autonómica y neuroendocrina en la función inmune
- la depleción de catecolaminas y norepinefrina, y la actividad de glucocorticoides suprime la inmunidad adaptativa al inhibir la expresión de MHC II (97).

Se ha descrito que el SCI-IDS ocurre en etapas tempranas (24 h) y es más pronunciada durante la primera semana después de la lesión (36), es causada por la desregulación del sistema nervioso simpático y la disfunción de los órganos inmunitarios, entre otros (29, 110, 114), así como por la disreflexia autonómica (34, 115), y el incremento de células mieloides supresoras después de la LM (116).

La falta de respuesta inflamatoria en estadios agudos que nosotros observamos, es consistente con los resultados publicados recientemente por Marbourg *et al.* (2017), que informaron de una reducción significativa en la infiltración subcutánea de macrófagos después de la inyección local de un agente nocivo (adyuvante de Freund), esto por debajo del nivel de la lesión, en ratones con sección aguda de la médula espinal a nivel torácico alto (101). También con los datos reportados por Riegger *et al.* (2007), donde la lesión medular induce inmunosupresión, siendo más evidente en los días 1 a 3 posteriores a la lesión, lo cual fue atribuido a una reducción en el patrón de expresión MHC clase II, que es responsable de la presentación de patógenos (36).

8.3 Influencia de la LTME en la etapa subaguda sobre la respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria local que se observó 15 días posteriores a la LM por encima del nivel de la lesión, fue similar a la obtenida en la misma región de ratas con cirugía sham, mientras que en extremidades paralizadas, la restauración de la respuesta inflamatoria fue de aproximadamente 50% respecto a la

inflamación mostrada en la misma extremidad en las ratas sham (ver Figura 13). Debido a los distintos patrones de la respuesta inflamatoria entre las extremidades intactas y paralizadas en la etapa subaguda, el estado neurológico parece ser crucial para el establecimiento de la inflamación local. Así también, estos resultados comparados con los observados en la fase aguda, revelan la importancia del tiempo transcurrido después de la lesión en la respuesta inflamatoria inducida.

En la región intacta, la respuesta inflamatoria a la inyección de carragenina se restablece, posiblemente debido a que mecanismos como la microcirculación cutánea alterada (30, 108), y el dominio del efecto antiinflamatorio sistémico(100) ya no se producen en esta etapa. Por otro lado, en las regiones paralizadas, donde la respuesta inflamatoria permanece disminuida significativamente, las vías autonómicas centrales que regulan las funciones inmunológicas/inflamatorias permanecen interrumpidas.

Además, una disminución en la respuesta celular (macrófagos, células NK, linfocitos T y B) y en la respuesta humoral (IL-1B, TNF α , IL-6) pueden estar implicados como mediadores inflamatorios (11, 117, 118). Rigger *et al.* (2007), encontró que al final de la etapa subaguda (día 7) entrando en etapas más crónicas (día 14) de la lesión, varias células y mediadores analizados se recuperaron hasta niveles casi del testigo (36).

El sistema nervioso simpático se extiende a lo largo de la médula espinal lumbar, pero dado que el nivel neurológico de la lesión utilizado en el presente estudio fue a T9, se podría suponer que la inflamación inducida localmente no se vería afectada significativamente, ya que la señalización simpática de los principales órganos linfoides, como el bazo, no se vería afectada. El desequilibrio en la respuesta inflamatoria no sólo es responsable de la predisposición a infecciones también, la inflamación local (al interior de la médula en la zona de lesión y segmentos adyacentes) ha sido asociada con daño medular secundario debido a la expresión de enzimas oxidativas, proteasas, citocinas proinflamatorias y otros mecanismos considerados dañinos (119).

Después de una lesión por contusión a la médula espinal aumenta la excitabilidad intrínseca de las neuronas involucradas en las vías del dolor e inflamación, lo que contribuye a la sensibilización central días después del daño. Un aumento en el calcio intracelular reduce el umbral de la célula para el disparo, el sustrato para la sensibilización central y las vías en la médula espinal son más sensibles a los estímulos (120). Lo anterior podría ser una posible explicación para la restauración de la respuesta inflamatoria observada en la etapa subaguda de las ratas con lesión, como resultado de la neuroplasticidad que se produce en el SNC (69).

La participación de mecanismos neurogénicos en las alteraciones tardías que observamos es otra posible explicación, particularmente en relación con la liberación de neuropéptidos como la SP y CGRP de las fibras nerviosas periféricas de neuronas sensoriales aferentes primarias, principalmente por reflejos de la raíz dorsal, los cuales actúan sobre los vasos sanguíneos cercanos ocasionando vasodilatación y extravasación plasmática (51, 52). Se ha demostrado que la inflamación neurogénica ocurre después de un insulto inflamatorio local debido a potenciales de acción conducidos antidrómicamente hacia la periferia (45, 46, 52) y que involucra la activación del cotransportador $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ (121). La LM, por ende, interrumpe la señalización antidrómica y por lo tanto, podría afectar la respuesta neurogénica.

Así, una respuesta disminuida de la inflamación neurogénica podría estar involucrada en la falta de respuesta inflamatoria, especialmente en la región paralizada. La sustancia P, en sí misma, no es un potente agente inflamatorio, pero en presencia de células apropiadas atraídas por un irritante como el carragenano, este neuropéptido puede estimular la liberación de varios mediadores inflamatorios, que a su vez producen una respuesta inflamatoria (122).

Los mecanismos que explican cómo LM altera la inflamación en etapas subagudas no se estudiaron en este trabajo, pero se pueden considerar varias

posibilidades. La interrupción de la función sensorial, que podría ser un mecanismo neuronal involucrado, el cual se pudiera probar en estudios futuros, al cortar las raíces dorsales sensoriales. Se sabe que la estimulación perjudicial de los nervios sensoriales produce la liberación local de neuropéptidos y otros mediadores que pueden causar vasodilatación e incrementar la permeabilidad capilar que conduce a signos inmediatos de inflamación(51) y también puede modificar la función inmunológica(123). Este proceso, conocido como inflamación neurogénica, puede ser modulado por fibras nerviosas simpáticas postganglionares(45).

Presumiblemente, como es el caso con los anestésicos locales, la lesión medular atenúa la inflamación neurogénica al limitar la liberación local y el transporte axonal de mediadores de la inflamación. Otros posibles mecanismos que podrían estar implicados en la respuesta inflamatoria atenuada en la etapa subaguda son: la disminución de las células inflamatorias locales y así como de citoquinas mediadoras de la función inmune (100, 101), la deficiencia en la circulación microvascular inducida por la disfunción autonómica(108) y la remodelación morfo-funcional de la vasculatura periférica(124, 125).

8.4 Acerca de la región o el nivel de la lesión medular

Los resultados de este estudio indican que en la etapa aguda de la lesión medular la inflamación periférica prácticamente se suprime tanto por arriba como por debajo del nivel de la lesión (T9), donde los efectos observados probablemente se deben al dominio de los mecanismos de bloqueo de la inflamación sistémica sobre la regional. Y al examinar esta misma respuesta en un intervalo más largo de 15 días posteriores a la lesión, la respuesta inflamatoria se recupera.

Cada vez existe más evidencia que sugiere que la alteración de la función inmune después de la LM depende del nivel de la lesión, siendo más grave cuanto

más cefálica (99, 110). Algunos estudios sugieren que la naturaleza del SCI-IDS puede depender del nivel de la lesión, presumiblemente por la descentralización de la actividad simpática que ocurre luego de una lesión a nivel medio torácico o superior de la ME (126). Aunque las consecuencias de la descentralización simpática (nivel de la lesión) con el estado inmunológico no se han dilucidado por completo, los estudios sugieren que mientras más extensa sea dicha descentralización o desconexión, mayor será el grado de disfunción inmune (97, 99, 110, 112, 115). Esto no quiere decir que en lesiones bajas no se presente el problema, pues precisamente el SCI-IDS como tal, se describió a partir de estudios en animales sometidos a LTME a nivel T8 (36), coincidiendo con el nivel de la lesión evaluado en este estudio.

Las lesiones de la médula espinal interrumpen las vías autonómicas centrales que regulan la función inmunitaria y endocrina. La mayoría de la inervación simpática del bazo se deriva de los niveles medio-torácicos, por lo que la lesión en esta región o por encima de ella dará como resultado la pérdida del control supraespinal y una actividad simpática descentralizada en este órgano de regulación inmunitaria (126). La disfunción significativa del bazo está presente después de una LM torácica alta (sección T3), mientras que la LM torácica inferior (sección T9) conserva la mayor parte de la función esplénica (110, 115).

El daño a nivel cervical o torácico alto puede dañar estas vías, lo que alteraría el control descendente de las neuronas simpáticas preganglionares por debajo de la lesión; como resultado, el control simpático de los tejidos linfoides periféricos no estaría regulada por el control supraespinal. De manera similar, la lesión a niveles torácicos medios dañaría algunas neuronas simpáticas preganglionares directamente. La comunicación periferia-cerebro se ve seriamente afectada debido a que las vías descendentes y ascendentes se ven afectadas por LM (29). Por lo tanto, los nervios en segmentos por debajo del sitio de la lesión a menudo pierden el control apropiado de la médula y el cerebro.

La disfunción simpática puede contribuir en gran medida a la supresión inmune en personas con LM, dejando al SCI-IDS que aumenta la susceptibilidad a la infección dependiendo del nivel de la lesión (99). La disfunción del sistema nervioso simpático después de una lesión medular puede ocurrir por daño físico de las proyecciones simpáticas al ganglio simpático o por alteración del control supraespinal a través del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA). Tal influencia puede conducir a una producción excesiva de glucocorticoides de la glándula suprarrenal que causa niveles circulantes elevados y una mayor influencia inmunosupresora. Se han demostrado niveles elevados de cortisol, estimulados por la ACTH plasmática elevada, en humanos después de una LM y también que dichos niveles permanecen elevados durante 3 meses después de la lesión (127), por lo que la participación de mecanismos como la elevación del cortisol sérico (128) no debe descartarse.

Dado el nivel neurológico de lesión utilizado en el presente estudio (T9), se podría suponer que la inflamación inducida localmente no se vería afectada significativamente ya que la entrada simpática de los principales órganos linfoides no se vería afectada. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la inmunodepresión sistémica asociada al bloqueo de la entrada simpática a los principales órganos linfoides no es un requisito previo para la inflamación alterada en regiones por debajo del sitio de la lesión.

8.5 Influencia de la LTME sobre la farmacocinética del naproxeno

Una vez evaluado el efecto de la LTME sobre la respuesta inflamatoria en ambos estadios posteriores a la lesión, se evaluó el efecto de la administración de un agente anti-inflamatorio, el cual es ampliamente utilizado en la terapia clínica, teniendo como antecedente que la LTME modifica la farmacocinética de diversos fármacos (75). A diferencia del trabajo realizado por García-López *et al.* (2007), donde analizó la farmacocinética del naproxeno utilizando una dosis de 6 mg kg^{-1} 24 horas después de una contusión severa en T9, no encontrando diferencias en

la disposición del fármaco en la etapa aguda de la LM, para este estudio fue necesario confirmar si a la dosis establecida en el diseño experimental (10 mg kg^{-1}) esta ausencia de cambios en la farmacocinética del NPX persistía en un estado subagudo de la LM (15 días después de la LM). Estas modificaciones en la farmacocinética muchas veces dependen de una serie de factores como las características fisicoquímicas del fármaco, de la vía de administración, del nivel de la lesión y del tiempo transcurrido posterior a la lesión(82).

Para este propósito se realizó la validación conforme a la NOM-177 de un método analítico que permitiera cuantificar la concentración de naproxeno en las muestras de plasma de las ratas en cuestión, con el fin de obtener una correcta interpretación de los perfiles farmacocinéticos.

El método analítico por HPLC para la detección y cuantificación de naproxeno en plasma mostró ser selectivo y lineal en el intervalo de concentraciones establecido para la cuantificación de 0.5 a $12 \mu\text{g/mL}$ de naproxeno con un coeficiente de determinación de $r^2=0.9999$, así mismo mostró ser exacto y preciso en el análisis intra-día e inter-día de las muestras controles de concentración alta ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), media ($3.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) y baja ($0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$), obteniendo coeficientes de variación menores al 15% y porcentajes de recuperación de casi el 100% con respecto a la concentración adicionada de naproxeno.

El límite inferior de cuantificación del método establecido a una concentración de $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de naproxeno, mostró exactitud y precisión en el análisis intra-día e inter-día con coeficientes de variación menores al 20% y con porcentajes de recuperación entre el 80-120% respectivamente, como lo establece la norma. Para establecer el límite de detección se probaron concentraciones menores al LIC siendo éstas de 0.3 y $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, donde sólo la primera concentración cumplió con precisión y exactitud. Por lo que las condiciones y parámetros evaluados para el método analítico fueron los idóneos y confiables para cumplir con este objetivo.

Para determinar el efecto de la LTME en la etapa aguda (1 día post-cirugía) y subaguda (15 días post-cirugía) sobre la farmacocinética del naproxeno después de la administración intravenosa de 10 mg kg^{-1} , se utilizaron grupos testigos a los cuales se les realizó cirugía sham y a los grupos experimentales se les produjo una LTME a nivel de T9.

Al comparar los valores obtenidos de los parámetros farmacocinéticos de los grupos controles sham a 1 y 15 días posteriores a la cirugía, no se encontraron diferencias significativas, lo cual indica que nuestras condiciones experimentales de trabajo para este experimento fueron las adecuadas para el estudio que realizamos y no discreparon de lo reportado con anterioridad (129).

La farmacocinética del naproxeno a 1 día posterior a la LM comparado con el obtenido por su respectivo grupo control no mostró ningún cambio en los parámetros farmacocinéticos que se evaluaron. Por lo que a esta condición (etapa aguda), no se ve alterado el comportamiento farmacocinético del naproxeno debido a la presencia de la lesión, resultados que coinciden con estudios previamente publicados, utilizando un experimento similar (75, 130).

En el caso de los grupos correspondientes a 15 días posteriores a la LM, los parámetros como: volumen de distribución (V_d), depuración (Cl), y biodisponibilidad (ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$) mostraron diferencias significativas al realizar el análisis estadístico ($p < 0.05$), siendo éstos comparados con su respectivo grupo sham de 15 días. Por otro lado, cuando estos parámetros fueron comparados con el grupo correspondiente a la lesión de 1 día, se obtuvo la misma significancia al cambio ($p < 0.05$), lo que habla de un efecto debido al tiempo transcurrido después de una LM.

Es destacable la variación en el volumen de distribución, el cual al estar directamente o inversamente relacionado con otros parámetros farmacocinéticos afectó por consiguiente éstos mostrando diferencia significativa. El aumento en el V_d , por efecto de la lesión a 15 días, impacto directamente a la depuración del fármaco observándose un aumento de dicho parámetro (Cl) y por ende,

repercutiendo en la biodisponibilidad o permanencia del fármaco en la sangre, la cual disminuyó. No obstante, con el aumento en el Vd, la disminución del ABC y el aumento en la CI observado en nuestros resultados, no mostró una disminución significativa en la constante de eliminación (k_e o λ_{Lambdaz}) como era de esperarse.

Se ha publicado que la distribución del naproxeno en el organismo, está distribuido en una mayor proporción en fluidos extracelulares y no se limita solo al plasma en el cual está unido a un 99% a proteínas (130). Esta particularidad del fármaco, pudiera haber sido notada claramente en el aumento del Vd tanto a las 24 horas como a los 15 días de la lesión, sin embargo solo fue observado en el grupo de los 15 días. Esto puede ser explicado en parte, por el hecho que si bien a las 24 horas posteriores a la LM, durante el choque espinal, existe un volumen de circulación y un gasto cardíaco bajo, que contribuyen de manera importante para disminuir el flujo sanguíneo a órganos y tejidos (16, 30, 31), y que éstas condiciones están implicadas en la distribución de fármacos, también existen mecanismos compensatorios que tratan de llevar nuevamente el organismo dañado a condiciones de homeostasis, que pudieron no evidenciar un cambio significativo en el Vd del naproxeno a las 24 h posterior a la lesión. En tanto a los 15 días posteriores a la lesión los cambios en el volumen de circulación sanguíneo y gasto cardíaco son diferentes.

El volumen de distribución depende, entre otros factores, de diversas características fisicoquímicas que condicionan el paso del fármaco a través de las membranas, como la integridad de las mismas, la cantidad de proteínas plasmáticas, el peso del individuo, la proporción de agua por kilogramo de peso (unidad de superficie corporal) y el estado de hidratación (131).

Especialmente, las proteínas plasmáticas son un factor importante para la distribución de los fármacos y más para aquellos que se unen en gran porcentaje a ellas, siendo la albúmina la más abundante y con gran capacidad de fijación de sustancias exógenas. Dentro de los factores que pudieran disminuir la cantidad de albúmina plasmática se encuentran una cirugía, la edad, la desnutrición grave, etc.

Debido a que las ratas fueron sometidas a una cirugía para provocar la lesión, así como también algunas presentaron cierto grado de desnutrición y/o deshidratación debido al estado de desinterés que presentaban, las ratas tuvieron una considerable variación de peso corporal en el proceso, tanto a las 24 h después de la LM siendo más evidente en las ratas con 15 días posteriores a la LM (ver anexo 1).

Siendo el naproxeno un ácido débil ($pK_a=4.15$) y que se une altamente a proteínas plasmáticas (99%) (72), niveles bajos de éstas en la sangre ocasionarían más fármaco libre, y por lo tanto, se estaría distribuyendo con mayor facilidad hacia otros compartimientos. Para descartar esta suposición se cuantificaron los niveles de proteínas totales (ver anexo 2) y de albúmina (ver anexo 3) en plasma, los resultados que se obtuvieron no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

Otra causa posible de este aumento del V_d a los 15 días de la LM, es debido a que posterior a una lesión medular suceden cambios anatómicos y fisiológicos, como una inestabilidad hemodinámica, cambios en el tono vascular y/o lo que se conoce como shock distributivo. En el shock distributivo, el tono vascular se pierde por diferentes causas, y el efecto es una hipovolemia relativa (pérdida o disminución del volumen sanguíneo). El perfil hemodinámico habitualmente incluye un gasto cardiaco normal o aumentado, resistencia vascular sistémica disminuida y presión de llenado ventricular izquierdo normal o disminuida.

La lesión también ocasiona la disrupción de ciertas barreras, lo que facilitaría que el fármaco se distribuya libremente hacia otros espacios, como por ejemplo, hacia el tercer espacio (espacio intersticial), el cual se produce después de un traumatismo o de isquemia y representa el secuestro del líquido extracelular. El desplazamiento de líquidos hacia el tercer espacio, donde el incremento de la permeabilidad capilar da lugar a una pérdida de proteínas y líquidos desde el espacio extravascular hacia el espacio intersticial.

8.6 Influencia de la LTME sobre el efecto anti-inflamatorio del naproxeno

Teniendo en cuenta que la velocidad de eliminación del naproxeno no se alteraba significativamente debido a la presencia de la lesión medular, ni en etapa aguda o subaguda, se evaluó su farmacodinamia (el efecto anti-inflamatorio).

En las ratas sin lesión (sham), el efecto anti-inflamatorio del naproxeno después de la inyección de carragenina se observó en ambas extremidades tanto en los grupos 1 y 15 días posteriores a la cirugía. En las extremidades superiores la inflamación disminuyó alrededor del 35-45% con respecto a la administración del vehículo del naproxeno. Mientras en las extremidades inferiores, el efecto anti-inflamatorio del naproxeno fue de más del 60% con respecto al vehículo. Aunque en la literatura no existen indicios al respecto, nos atrevemos a especular que las diferencias en la respuesta inflamatoria y por lo tanto en la respuesta anti-inflamatoria del naproxeno observada entre ambas extremidades son debido a una distinción morfo-anatómica de las patas de la rata en su capacidad de distensibilidad de las fascias entre las extremidades anteriores y posteriores. Estos datos sirvieron para tener una referencia del efecto del naproxeno en la disminución del volumen de la pata (ver Figura 23).

Sin embargo, no se pudo determinar el efecto anti-inflamatorio del naproxeno en las ratas con lesión en etapa aguda, ya que la respuesta inflamatoria en ambas extremidades fue suprimida debido a la lesión, y por lo tanto, no se observaron diferencias con las ratas lesionadas administradas con el vehículo.

En la etapa subaguda de la lesión, al reestablecerse diferencialmente la respuesta inflamatoria entre ambas extremidades, se observó un efecto anti-inflamatorio parcial del naproxeno. En el caso de la extremidad anterior, la disminución de la inflamación fue de aproximadamente 30% con respecto al vehículo, similar al efecto presentado en las ratas sham en el mismo sitio. Mientras que en la extremidad posterior o paralizada, aunque se restableció la respuesta inflamatoria de manera parcial, la administración de naproxeno no mostró tener

efecto en esta región, y no hubo diferencia con la respuesta obtenida por la administración del vehículo (ver Figura 25).

Los diferentes cambios en el flujo vascular en ambas extremidades fluctúan en los días posteriores a la lesión (30), lo que pudiera estar ocasionando que el fármaco no esté llegando a ejercer su acción en las extremidades posteriores (inferiores). Sugiriendo que, se presenta más un dominio de los mecanismos de bloqueo de la inflamación por acción del naproxeno actuando a nivel central, en la médula espinal, que hacia la inflamación periférica, ocurrida en la extremidad posterior.

El naproxeno ejerce su acción anti-inflamatoria mediante la inhibición de las enzimas COXs, siendo la COX-2 una enzima constitutiva del cerebro y de la médula espinal, está relacionada con la transmisión nerviosa del dolor e involucrada en los procesos de inflamación(65, 66). Por lo que en este sentido la inhibición de la COX da como resultado una disminución en la producción de las PGs en el sitio de inflamación local, pero posiblemente con mayor influencia a nivel espinal en ratas con LM.

8.7 Implicaciones clínicas del estudio

El impacto de la LTME en las respuestas inflamatorias locales es un tema crítico que requiere mayor investigación, teniendo en cuenta que las personas con este tipo de lesión muestran una mayor susceptibilidad a infecciones de diversas índoles, así como a complicaciones localizadas como las úlceras por presión e infecciones de la piel, asociadas a una mala defensa del huésped y la deficiente reparación de los tejidos. Es ampliamente aceptado que la inflamación es una respuesta biológica protectora clave del cuerpo contra los patógenos y otros insultos. Los principales propósitos de la inflamación son eliminar el agente causal del daño, eliminar restos de células y tejidos dañados y promover la reparación de los tejidos. La respuesta inflamatoria inicial es también un factor crítico en el

reclutamiento y activación de células inmunocompetentes, así como para proporcionar las condiciones para la reparación de los tejidos (42).

En el entorno clínico, los trastornos de la piel y los tejidos subcutáneos son relativamente frecuentes en esta población; lo cual afecta negativamente la calidad de vida y pueden llevar a complicaciones sistémicas graves (132). Nuestros resultados contribuyen a comprender las características de las respuestas locales alteradas debido a un desafío proinflamatorio en diferentes etapas después de la LTME. Podría predecirse que las respuestas inflamatorias atenuadas darán lugar a una mayor susceptibilidad a las infecciones y retrasarán la cicatrización de la herida en personas con LM (101, 132).

Por otro lado, la terapia farmacología con AINES es muy frecuente, pero se desconocía si el efecto farmacológico era afectado por la lesión y dependía del estado de inervación en donde se producía la inflamación posterior a un daño o insulto tisular. En este estudio descubrimos que un AINES de uso frecuente (naproxeno) tiene un efecto anti-inflamatorio selectivo hacia regiones que no son afectadas directamente por el nivel de la LM.

Por lo anterior, estos hallazgos podrían servir como base para realizar una adecuada farmacoterapia en esta población en particular, tomando en consideración las diversas variables que se analizaron en este estudio como el estado de inervación de la zona estudiada, el nivel y el tiempo transcurrido posterior a la lesión, todo esto con el fin de proponer consideraciones clínicas así como un apropiado manejo farmacológico de las diversas complicaciones que subyacen a LTME.

9 CONCLUSIONES

- El método utilizado para inducir inflamación periférica por inyección de carragenina funcionó adecuadamente para cumplir con los objetivos del estudio.
- En la etapa aguda de la LTME (1 d):
 - La respuesta inflamatoria inducida en la extremidad íntegra disminuye significativamente al comparar con sham.
 - La respuesta inflamatoria inducida en la extremidad paralizada no se presenta.
- En la etapa subaguda de la LTME (15 d):
 - La respuesta inflamatoria inducida en la extremidad íntegra es similar a la producida en sham.
 - La respuesta inflamatoria inducida en la extremidad paralizada es significativamente menor al comparar con sham y con la extremidad íntegra de la rata lesionada.
- La respuesta inflamatoria inducida en la etapa aguda de la lesión es significativamente menor a la inducida en la etapa subaguda, en ambas extremidades, siendo más evidente en la extremidad paralizada.
- La LTME no modifica la farmacocinética del naproxeno aplicado por vía intravenosa en etapa aguda.
- En la etapa subaguda se modifican los parámetros farmacocinéticos de biodisponibilidad (ABC t), distribución (Vd) y depuración (Cl) en ratas con LTME comparada con su testigo sham.

- En la etapa aguda de la LTME, no se observó el efecto anti-inflamatorio del naproxeno debido a la ausencia de inflamación en ambas extremidades.
- En la etapa subaguda de LTME, el efecto anti-inflamatorio fue significativo en la extremidad íntegra y ausente en la extremidad paralizada.
- La reacción inflamatoria inducida después de una LTME experimental, está significativamente influenciada tanto por el estado neurológico de la región expuesta al desafío inflamatorio como por el tiempo transcurrido después de la lesión.

10 PERSPECTIVAS

En el presente estudio, hemos investigado el efecto neto de LTME en la respuesta inflamatoria local a un desafío proinflamatorio. No obstante, los mecanismos precisos detrás de estos resultados no fueron estudiados. Sin embargo, se necesitan estudios mecanísticos más profundos para una mejor comprensión de cómo la LTME tanto a niveles altos como bajos de la médula espinal modifican las respuestas inflamatorias. Además, nuestras observaciones se limitaron a 15 días después de la lesión. En futuros estudios, sería interesante preguntar qué sucede en las etapas crónicas, cuando la lesión tiende a estabilizarse.

11 BIBLIOGRAFÍA

1. Guyton AC, Hall JE, Guyton AC. Tratado de Fisiología Médica: Elsevier Brasil; 2006.
2. NINDS. National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Lesión de la Médula Espinal: Esperanza en la investigación. Publicación de National Institutes of Health (NIH), abril 2005, No. 05-160s.
3. Thibodeau G, Patton K. Anatomy & Physiology, ed 9, St. Louis; 1993.
4. Spalteholz W, Tortella E, Pedrals S. Atlas de Anatomía Humana, Tomo II. Versión española Editorial Labor. 1975.
5. Devivo M. Epidemiology of traumatic spinal cord injury: trends and future implications. *Spinal Cord*. 2012;50(5):365.
6. INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). "Estadísticas a propósito del día internacional de las personas con discapacidad" 2015. [Available from: <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/discapacidad0.pdf>.
7. White NH, Black NH. Spinal cord injury (SCI) facts and figures at a glance. National Spinal Cord Injury Statistical Center. 2016.
8. Kirshblum SC, Burns SP, Biering-Sorensen F, Donovan W, Graves DE, Jha A, *et al*. International Standards for neurological classification of spinal cord injury (revised 2011). *The Journal of Spinal Cord Medicine*. 2011;34(6):535-46.
9. Hausmann ON. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2003;41(7):369-78.
10. Genovese T, Mazzon E, Esposito E, Muià C, Di Paola R, Di Bella P, *et al*. Role of endogenous glutathione in the secondary damage in experimental spinal cord injury in mice. *Neuroscience Letters*. 2007;423(1):41-6.
11. Yang L, Jones NR, Blumbergs PC, Van Den Heuvel C, Moore EJ, Manavis J, *et al*. Severity-dependent expression of pro-inflammatory cytokines in traumatic spinal cord injury in the rat. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2005;12(3):276-84.

12. David S, López-Vales R, Yong VW. Harmful and beneficial effects of inflammation after spinal cord injury: potential therapeutic implications. *Handbook of Clinical Neurology*. 2012; 109: 485-502.
13. Zeidman SM, Ling GS-F, Ducker TB, Ellenbogen RG. Clinical applications of pharmacologic therapies for spinal cord injury. *Journal of Spinal Disorders*. 1996;9(5):367-80.
14. Plaza VB, Pacheco BM, Aguilar CM, Valenzuela JF, Pérez JJZ. Lesión de la médula espinal. actualización bibliográfica: fisiopatología y tratamiento inicial. *Coluna/Columna*. 2012;11(1):73-6.
15. Dusart I, Schwab M. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*. 1994;6(5):712-24.
16. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of Neurosurgery*. 1991;75(1):15-26.
17. 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 Research*. 1997;765(2):283-90.
18. Lee Y, Shih K, Bao P, Ghirnikar R, Eng L. Cytokine chemokine expression in contused rat spinal cord. *Neurochemistry International*. 2000;36(4-5):417-25.
19. Hulsebosch CE. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Advances in Physiology Education*. 2002;26(4):238-55.
20. Young W, Koreh I. Potassium and calcium changes in injured spinal cords. *Brain Research*. 1986;365(1):42-53.
21. Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *The American Journal of Pathology*. 1982;107(3):395-418.
22. Lotan M, Solomon A, Ben-Bassat S, Schwartz M. Cytokines modulate the inflammatory response and change permissiveness to neuronal adhesion in injured mammalian central nervous system. *Experimental Neurology*. 1994;126(2):284-90.

23. Bartholdi D, Schwab ME. Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: An in situ hybridization study. *European Journal of Neuroscience*. 1997;9(7):1422-38.
24. Nieto-Sampedro M. Reparación del trauma medular. *Boletín de la Sociedad Española Neurociencia*. 2001;12:2-15.
25. Caballero Chacón S, Nieto-Sampedro M. Fisiopatología de la lesión medular. Revisión de Literatura. *Veterinaria México*. 2005;36(1).
26. Popovich PG, Wei P, Stokes BT. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *Journal of Comparative Neurology*. 1997;377(3):443-64.
27. Mietto BS, Mostacada K, Martinez AMB. Neurotrauma and inflammation: CNS and PNS responses. *Mediators of Inflammation*. 2015.
28. Guizar-Sahagun G, Castaneda-Hernandez G, Garcia-Lopez P, Franco-Bourland R, Grijalva I, Madrazo I. Pathophysiological mechanisms involved in systemic and metabolic alterations secondary to spinal cord injury. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 1998;41:237-40.
29. Sun X, Jones ZB, Chen XM, Zhou L, So KF, Ren Y. Multiple organ dysfunction and systemic inflammation after spinal cord injury: a complex relationship. *Journal of Neuroinflammation*. 2016;13(1):260.
30. Guizar-Sahagun G, Velasco-Hernandez L, Martinez-Cruz A, Castaneda-Hernandez G, Bravo G, Rojas G, *et al.* Systemic microcirculation after complete high and low thoracic spinal cord section in rats. *Journal of Neurotrauma*. 2004;21(11):1614-23.
31. Bravo G, Guizar-Sahagun G, Ibarra A, Centurion D, Villalon CM. Cardiovascular alterations after spinal cord injury: an overview. *Current Medicinal Chemistry Cardiovascular and Hematological Agents*. 2004;2(2):133-48.
32. Privat A. Pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine*. 2005;189(6):1109-17.
33. Soden RJ, Walsh J, Middleton JW, Craven ML, Rutkowski SB, Yeo JD. Causes of death after spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2000;38(10):604-10.

34. Walters ET. How is chronic pain related to sympathetic dysfunction and autonomic dysreflexia following spinal cord injury? *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2018;209:79-89.
35. Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nature Reviews Neuroscience*. 2005;6(10):775-86.
36. Riegger T, Conrad S, Liu K, Schluesener HJ, Adibzadeh M, Schwab JM. Spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS). *The European Journal of Neuroscience*. 2007;25(6):1743-7.
37. Furlan JC, Krassioukov AV, Fehlings MG. Hematologic abnormalities within the first week after acute isolated traumatic cervical spinal cord injury: a case-control cohort study. *Spine*. 2006;31(23):2674-83.
38. Kesani AK, Urquhart JC, Bedard N, Leelapattana P, Siddiqi F, Gurr KR, *et al*. Systemic inflammatory response syndrome in patients with spinal cord injury: does its presence at admission affect patient outcomes? *Clinical Article. Journal of Neurosurgery Spine*. 2014;21(2):296-302.
39. Gris D, Hamilton EF, Weaver LC. The systemic inflammatory response after spinal cord injury damages lungs and kidneys. *Experimental Neurology*. 2008;211(1):259-70.
40. Bao F, Omana V, Brown A, Weaver LC. The systemic inflammatory response after spinal cord injury in the rat is decreased by alpha4beta1 integrin blockade. *Journal of Neurotrauma*. 2012;29(8):1626-37.
41. Bao F, Bailey CS, Gurr KR, Bailey SI, Rosas-Arellano MP, Dekaban GA, *et al*. Increased oxidative activity in human blood neutrophils and monocytes after spinal cord injury. *Experimental Neurology*. 2009;215(2):308-16.
42. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research Europäische Chirurgische Forschung Recherches Chirurgicales Europeennes*. 2012;49(1):35-43.
43. Al-Haboubi HA, Zeitlin IJ. Re-appraisal of the role of histamine in carrageenan-induced paw oedema. *European Journal of Pharmacology*. 1983;88(2-3):169-76.

44. Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *The Journal of Pathology*. 1971;104(1):15-29.
45. Basbaum AI, Levine JD. The contribution of the nervous system to inflammation and inflammatory disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1991;69(5):647-51.
46. Levine JD, Dardick SJ, Basbaum AI, Scipio E. Reflex neurogenic inflammation. I. Contribution of the peripheral nervous system to spatially remote inflammatory responses that follow injury. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 1985;5(5):1380-6.
47. Khattab MM. TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: a key role for superoxide anion. *European Journal of Pharmacology*. 2006;548(1-3):167-73.
48. Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, *et al*. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British Journal of Pharmacology*. 1996;118(4):829-38.
49. Moalem G, Tracey DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Research Reviews*. 2006;51(2):240-64.
50. Rivera-Ordoñez A. AINES: Su mecanismo de acción en el sistema nervioso central. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 2006;29(1):36-40.
51. Chiu IM, von Hehn CA, Woolf CJ. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nature Neuroscience*. 2012;15(8):1063-7.
52. Lin Q, Wu J, Willis WD. Dorsal root reflexes and cutaneous neurogenic inflammation after intradermal injection of capsaicin in rats. *Journal of Neurophysiology*. 1999;82(5):2602-11.
53. Sluka K, Willis W, Westlund K, editors. *The role of dorsal root reflexes in neurogenic inflammation*. Pain Forum; 1995: Elsevier.
54. Geppetti P, Nassini R, Materazzi S, Benemei S. The concept of neurogenic inflammation. *British Journal Urology International*. 2008;101, 3:2-6.

55. Winyard PG, Willoughby DA. *Inflammation Protocols*: Springer; 2003.
56. Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, *et al.* Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*. 2004;142(2):331-8.
57. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P, Salzman AL, Szabo C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radical Biology & Medicine*. 1998;24(3):450-9.
58. Badui Dergal S. *Química de los Alimentos*. Cuarta Edición ed: Pearson Educación, México,; 2006.
59. Annamalai P, Thangam EB. Local and Systemic Profiles of Inflammatory Cytokines in Carrageenan-induced Paw Inflammation in Rats. *Immunological Investigations*. 2017;46(3):274-83.
60. Valdivieso Serna A. Dolor agudo, analgesia y sedación en el niño (IIIa): farmacocinética y farmacodinámica de los analgésicos opioides. *Anales Españoles de Pediatría*. 1998;48(4):429-40.
61. Jackson Roberts II y Morrow J. Analgésicos-Antipiréticos y Antiinflamatorios, y Fármacos Antigotosos. In: Hardman JyL, LE., editor. *Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la Terapéutica*. 10a. Edición ed: McGraw-Hill Interamericana; 2003. p. 1:697-702.
62. Dwivedi AK, Gurjar V, Kumar S, Singh N. Molecular basis for nonspecificity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Drug Discovery Today*. 2015;20(7):863-73.
63. Ortiz-Pereda V, López M, Arroita A, Aguilera L, Azkue J, Torre-Mollinedo F, *et al.* Antiinflamatorios no esteroideos y paracetamol en el tratamiento del dolor. *Gaceta Médica de Bilbao*. 2007;104(4):148-55.
64. Vanegas H, Schaible H-G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Progress in Neurobiology*. 2001;64(4):327-63.
65. Jurna I, Brune K. Central effect of the non-steroid anti-inflammatory agents, indometacin, ibuprofen, and diclofenac, determined in C fibre-evoked activity in single neurones of the rat thalamus. *Pain*. 1990;41(1):71-80.

66. Björkman R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 1995;39(s103):7-44.
67. Gebhart G, McCormack K. *Neuronal Plasticity: Implications for Pain Therapy: Meeting: International Congress on Inflammation*: Adis International; 1994.
68. Kaufmann WE, Andreasson KI, Isakson PC, Worley PF. Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins*. 1997;54(3):601-24.
69. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science (New York, NY)*. 2000;288(5472):1765-8.
70. Jenkins CA, Bruera E. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as adjuvant analgesics in cancer patients. *Palliative Medicine*. 1999;13(3):183-96.
71. Information NCfB. Naproxen: PubChem Compound Database; CID=156391; [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/156391> - section=2D-Structure.
72. Davies NM, Anderson KE. Clinical pharmacokinetics of naproxen. *Clinical Pharmacokinetics*. 1997;32(4):268-93.
73. Cruz-Antonio L, Arauz J, Franco-Bourland RE, Guizar-Sahagun G, Castaneda-Hernandez G. Contrasting effects of cord injury on intravenous and oral pharmacokinetics of diclofenac: a drug with intermediate hepatic extraction. *Spinal Cord*. 2012;50(8):632-5.
74. Vertiz-Hernandez A, Castaneda-Hernandez G, Martinez-Cruz A, Cruz-Antonio L, Grijalva I, Guizar-Sahagun G. L-arginine reverses alterations in drug disposition induced by spinal cord injury by increasing hepatic blood flow. *Journal of Neurotrauma*. 2007;24(12):1855-62.
75. Garcia-Lopez P, Martinez-Cruz A, Guizar-Sahagun G, Castaneda-Hernandez G. Acute spinal cord injury changes the disposition of some, but not all drugs given intravenously. *Spinal Cord*. 2007;45(9):603-8.
76. Garcia-Lopez P, Perez-Urizar J, Ibarra A, Grijalva I, Madrazo I, Flores-Murrieta F, *et al*. Comparison between Sprague-Dawley and Wistar rats as an experimental model of pharmacokinetic alterations induced by spinal cord injury. *Archives of Medical Research*. 1996;27(4):453-7.

77. García-López P, Pérez-Urizar J, Ibarra A, Guízar-Sahagún G, Flores-Murrieta F, Grijalva I, *et al.* An experimental model for the study of pharmacokinetic alterations induced by spinal cord injury in the rat. *Pharmacy and Pharmacology Communications*. 1995;1(3):133-5.
78. Segal JL, Smith CM, Gordon SK, Eltorai IM. Theophylline pharmacokinetics in paraplegic subjects. *Clinical Pharmacy*. 1985;4(4):448-51.
79. Segal JL, Gray DR, Gordon SK, Eltorai IM, Khonsari F, Patel J. Gentamicin disposition kinetics in humans with spinal cord injury. *Paraplegia*. 1985;23(1):47-55.
80. Segal JL, Brunnemann SR, Gordon SK, Eltorai IM. Amikacin pharmacokinetics in patients with spinal cord injury. *Pharmacotherapy*. 1988;8(2):79-81.
81. Segal JL, Brunnemann SR, Eltorai IM, Vulpe M. Decreased systemic clearance of lorazepam in humans with spinal cord injury. *Journal of Clinical Pharmacology*. 1991;31(7):651-6.
82. Cruz-Antonio L, Flores-Murrieta FJ, García-López P, Guízar-Sahagún G, Castañeda-Hernández G. Understanding drug disposition alterations induced by acute spinal cord injury: role of injury level and route of administration for agents submitted to extensive liver metabolism. *Journal of Neurotrauma*. 2006;23(1):75-85.
83. Halstead LS, Feldman S, Claus-Walker J, Patel VC. Drug absorption in spinal cord injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 1985;66(5):298-301.
84. Lipetz J, Kirshblum S, O'Connor K, Voorman S, Johnston M. Anemia and serum protein deficiencies in patients with traumatic spinal cord injury. *The Journal of Spinal Cord Medicine*. 1997;20(3):335-40.
85. Frisbie J. Anemia and hypoalbuminemia of chronic spinal cord injury: prevalence and prognostic significance. *Spinal Cord*. 2010;48(7):566.
86. Bauman W, Spungen A. Metabolic changes in persons after spinal cord injury. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*. 2000;11(1):109-40.
87. Mestre H, Alkon T, Salazar S, Ibarra A. Spinal cord injury sequelae alter drug pharmacokinetics: an overview. *Spinal Cord*. 2011;49(9):955.

88. Charan J, Kantharia N. How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*. 2013;4(4):303.
89. Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I, Franco-Bourland R, Salgado-Ceballos H, Ibarra A, *et al.* Neuroprotection of completely lacerated spinal cord of adult rats by homotopic and heterotopic transplantation. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 1994;7(2):61-70.
90. Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: a preliminary report. *Journal of The American Medical Association*. 1911;57(11):878-80.
91. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Experimental Neurology*. 1996;139(2):244-56.
92. Young W. MASCIS spinal cord contusion model. *Animal Models of Acute Neurological Injuries*: Springer; 2009. p. 411-21.
93. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. México: Diario Oficial de la Federación. 2013.
94. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México: Diario Oficial de la Federación. 1999.
95. Riegger T, Conrad S, Schluesener HJ, Kaps HP, Badke A, Baron C, *et al.* Immune depression syndrome following human spinal cord injury (SCI): a pilot study. *Neuroscience*. 2009;158(3):1194-9.
96. Cotton BA, Pryor JP, Chinwalla I, Wiebe DJ, Reilly PM, Schwab CW. Respiratory complications and mortality risk associated with thoracic spine injury. *The Journal of Trauma*. 2005;59(6):1400-7.
97. Held KS, Steward O, Blanc C, Lane TE. Impaired immune responses following spinal cord injury lead to reduced ability to control viral infection. *Experimental Neurology*. 2010;226(1):242-53.

98. Chaudhry R, Madden-Fuentes RJ, Ortiz TK, Balsara Z, Tang Y, Nseyo U, *et al.* Inflammatory response to *Escherichia coli* urinary tract infection in the neurogenic bladder of the spinal cord injured host. *The Journal of Urology*. 2014;191(5):1454-61.
99. Brommer B, Engel O, Kopp MA, Watzlawick R, Muller S, Pruss H, *et al.* Spinal cord injury-induced immune deficiency syndrome enhances infection susceptibility dependent on lesion level. *Brain : A Journal of Neurology*. 2016;139:692-707.
100. Macneil BJ, Nance DM. Skin inflammation and immunity after spinal cord injury. *Neuroimmune Biology*. 2001;1:459-73.
101. Marbourg JM, Bratasz A, Mo X, Popovich PG. Spinal Cord Injury Suppresses Cutaneous Inflammation: Implications for Peripheral Wound Healing. *Journal of Neurotrauma*. 2017;34(6):1149-55.
102. Franco-Bourland RE, Guizar-Sahagun G, Quintana-Armenta A, Reyes-Alva HJ, Martinez-Cruz A, Madrazo I. Superparamagnetic beads for estimation of spinal subarachnoid space permeability in rats. *Journal of Neuroscience Methods*. 2013;219(2):271-5.
103. Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)*. 2003;225:115-21.
104. Guay J, Bateman K, Gordon R, Mancini J, Riendeau D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(23):24866-72.
105. Bignotto L, Rocha J, Sepodes B, Eduardo-Figueira M, Pinto R, Chaud M, *et al.* Anti-inflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw oedema and hepatic ischaemia-reperfusion in the rat. *The British Journal of Nutrition*. 2009;102(1):126-33.
106. Ditunno J, Little J, Tessler A, Burns A. Spinal shock revisited: a four-phase model. *Spinal Cord*. 2004;42(7):383.
107. Hulsebosch CE. Gliopathy ensures persistent inflammation and chronic pain after spinal cord injury. *Experimental Neurology*. 2008;214(1):6-9.
108. Frisbie JH. Microvascular instability in tetraplegic patients: preliminary observations. *Spinal Cord*. 2004;42(5):290-3.

109. Granger DN, Senchenkova E, editors. Inflammation and the Microcirculation. Colloquium series on integrated systems physiology: from molecule to function; 2010: Morgan & Claypool Life Sciences.
110. Lucin KM, Sanders VM, Jones TB, Malarkey WB, Popovich PG. Impaired antibody synthesis after spinal cord injury is level dependent and is due to sympathetic nervous system dysregulation. *Experimental Neurology*. 2007;207(1):75-84.
111. Igarashi H, Medina KL, Yokota T, Rossi MI, Sakaguchi N, Comp PC, *et al*. Early lymphoid progenitors in mouse and man are highly sensitive to glucocorticoids. *International immunology*. 2005;17(5):501-11.
112. Oropallo MA, Held KS, Goenka R, Ahmad SA, O'Neill PJ, Steward O, *et al*. Chronic spinal cord injury impairs primary antibody responses but spares existing humoral immunity in mice. *Journal of Immunology*. 2012;188(11):5257-66.
113. Zha J, Smith A, Andreansky S, Bracchi-Ricard V, Bethea JR. Chronic thoracic spinal cord injury impairs CD8+ T-cell function by up-regulating programmed cell death-1 expression. *Journal of Neuroinflammation*. 2014;11:65.
114. Kopp MA, Druschel C, Meisel C, Liebscher T, Prilipp E, Watzlawick R, *et al*. The SCIentinel study--prospective multicenter study to define the spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS)--study protocol and interim feasibility data. *BioMed Central Neurology*. 2013;13:168.
115. Zhang Y, Guan Z, Reader B, Shawler T, Mandrekar-Colucci S, Huang K, *et al*. Autonomic dysreflexia causes chronic immune suppression after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : The Official Journal of The Society for Neuroscience*. 2013;33(32):12970-81.
116. Wang L, Yu WB, Tao LY, Xu Q. Myeloid-derived suppressor cells mediate immune suppression in spinal cord injury. *Journal of Neuroimmunology*. 2016;290:96-102.
117. Klusman I, Schwab ME. Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Research*. 1997;762(1-2):173-84.
118. Nakamura M, Houghtling RA, MacArthur L, Bayer BM, Bregman BS. Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord. *Experimental Neurology*. 2003;184(1):313-25.

119. Beattie MS. Inflammation and apoptosis: linked therapeutic targets in spinal cord injury. *Trends in Molecular Medicine*. 2004;10(12):580-3.
120. Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*. 2006;52(1):77-92.
121. Valencia-de Ita S, Lawand NB, Lin Q, Castaneda-Hernandez G, Willis WD. Role of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in the development of capsaicin-induced neurogenic inflammation. *Journal of Neurophysiology*. 2006;95(6):3553-61.
122. Gilligan JP, Lovato SJ, Erion MD, Jeng AY. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. *Inflammation*. 1994;18(3):285-92.
123. Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* (New York, NY). 1988;241(4870):1218-21.
124. West C, Alyahya A, Laher I, Krassioukov A. Peripheral vascular function in spinal cord injury: a systematic review. *Spinal Cord*. 2013;51(1):10.
125. Phillips A, Matin N, Frias B, Zheng M, Jia M, West C, *et al.* Rigid and remodelled: cerebrovascular structure and function after experimental high-thoracic spinal cord transection. *The Journal of Physiology*. 2016;594(6):1677-88.
126. Cano G, Sved AF, Rinaman L, Rabin BS, Card JP. Characterization of the central nervous system innervation of the rat spleen using viral transneuronal tracing. *The Journal of Comparative Neurology*. 2001;439(1):1-18.
127. Campagnolo DI, Bartlett JA, Chatterton R, Jr., Keller SE. Adrenal and pituitary hormone patterns after spinal cord injury. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. 1999;78(4):361-6.
128. Lerch JK, Puga DA, Bloom O, Popovich PG. Glucocorticoids and macrophage migration inhibitory factor (MIF) are neuroendocrine modulators of inflammation and neuropathic pain after spinal cord injury. *Seminars in Immunology*. 2014;26(5):409-14.
129. Josa M, Urizar J, Rapado J, Dios-Viéitez C, Castañeda-Hernández G, Flores-Murrieta F, *et al.* Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of antipyretic and anti-inflammatory effects of naproxen in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;297(1):198-205.

130. Runkel R, Chaplin M, Boost G, Segre E, Forchielli E. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of naproxen in various laboratory animals and human subjects. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1972;61(5):703-8.
131. Goodman Gilman A, Hardman JG, Limbird LW. *Goodman & Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*: McGraw-Hill; 2003.
132. Backhaus M, Citak M, Tilkorn DJ, Meindl R, Schildhauer TA, Fehmer T. Pressure sores significantly increase the risk of developing a Fournier's gangrene in patients with spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2011;49(11):1143-6.

12 ANEXOS

Anexo 1: Variación del peso corporal de la rata

Durante todo el proceso experimental de la evaluación de la farmacocinética de naproxeno, las ratas se pesaron antes de realizarse la cirugía correspondiente (sham o LTME) y, uno o 15 días posteriores cuando se utilizaron dichas ratas.

Se calculó la diferencia entre el peso inicial y el peso final de la rata en experimentación de cada uno de los grupos, así como su promedio.

Resultados

En la Figura 26 se observa la variación del peso corporal de las ratas de los grupos experimentales, donde se observó una disminución en el peso de las ratas sometidas a LTME, siendo más evidente en las ratas de 15 post-lesión.

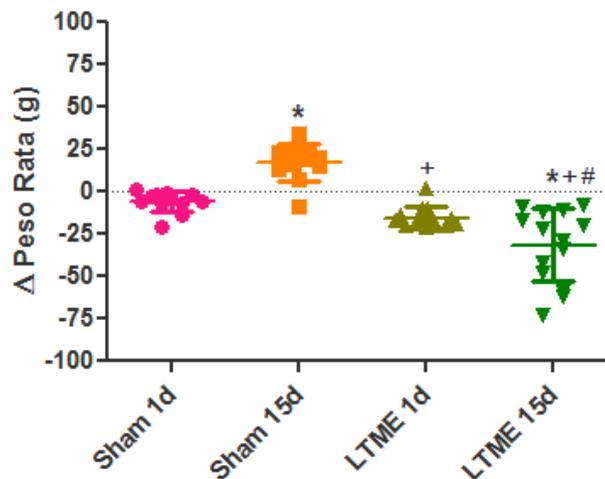


Figura 26. Variación del peso corporal en los grupos experimentales.

Análisis Estadístico: ANOVA prueba Tukey. *con respecto a sham 1 d, +con respecto a sham 15 d, #con respecto a LTME 1 d, ($p < 0.05$).

Anexo 2: Cuantificación de las proteínas plasmáticas totales

Se realizó la determinación de proteínas plasmáticas totales por el método de Bradford en 100 μ L de plasma obtenido de ratas sham y con LTME de los diferentes grupos experimentales.

Método de Bradford

El método de Bradford para la determinación de proteínas se basa en la unión del colorante azul de Coomassie G-250 a las proteínas. El colorante en solución ácida existe en dos formas, una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible de 1-15 μ g.

Preparación del Reactivo de Bradford

El reactivo de Bradford se preparó de la siguiente manera: en un matraz volumétrico de 1 L se colocaron 100 mL de ácido fosfórico al 85%, 50 mL de alcohol etílico 96% y 100 mg de azul de Coomassie G-250, y se llevó al aforo con agua destilada. Esta solución se preparó un día antes de ser utilizada y se mantuvo a temperatura ambiente guardada en oscuridad.

Curva de calibración

Se preparó una curva de calibración utilizando albúmina bovina sérica (1 mg/mL), se colocaron 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, y 90 μ L de albúmina en tubos de ensayo pequeños, se llevaron a un volumen de 100 μ L con agua destilada y se adicionaron 2.4 mL del reactivo de Bradford, se agitó durante 30 segundos en vortex. Las absorbancias de las muestras se leyeron a 595 nm en un espectrofotómetro.

Se preparó la muestra blanco con 100 μ L de agua destilada más 2.4 mL de reactivo de Bradford y la absorbancia obtenida se restó a las absorbancias de las muestras.

Manejo de las muestras de plasma de ratas

Se colocaron 100 μ L de plasma de rata en un tubo de ensayo por duplicado y se llevó a 1 mL con agua destilada, es decir se agregan 900 μ L. Se toman alícuotas de 20 μ L de la dilución anterior y se agregan 80 μ L de agua, teniendo un volumen final de 100 μ L. Se añade 2.4 mL de reactivo de Bradford y se agita durante 30 segundos en vortex, se leen las absorbancia a 595 nm.

Resultados

En la Figura 27 se muestra la cuantificación de las proteínas totales de las ratas de los grupos experimentales, donde no se observaron cambios drásticos en la concentración de PT entre los grupos.

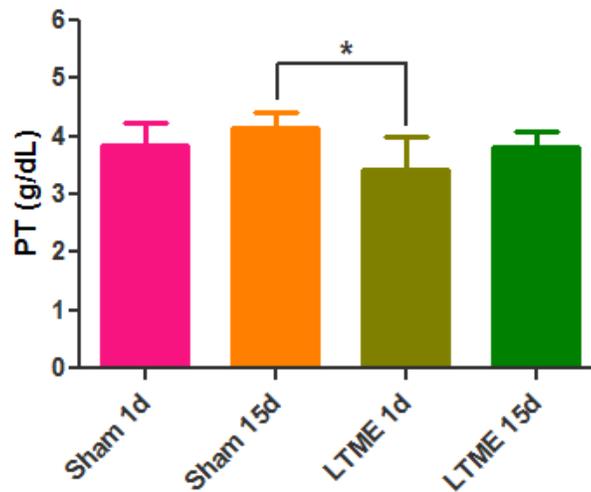


Figura 27. Cuantificación de las proteínas plasmáticas totales en los grupos experimentales.

Los datos representan la media \pm DE *Análisis Estadístico*: ANOVA prueba Tukey, * $p < 0.05$.

Anexo 3: Cuantificación de la albúmina plasmática

Se realizó la determinación de la albúmina plasmática por el método de verde de bromocresol (VBC) en 5 μ L de plasma obtenido de ratas sham y con LTME de los diferentes grupos experimentales.

Método verde de bromocresol

La albúmina se combina con el VDB a pH ligeramente ácido, produciendo un cambio de color del indicador, de amarillo verdoso a verde azulado proporcional a la concentración de albúmina presente en la muestra. Este método es sensible a 1 g/dL.

Reactivos

Se utilizaron los reactivos correspondientes al kit de determinación cuantitativa de albúmina (marca SPINREACT). Solución de verde de bromocresol pH 4.2 (0.12 mmol/L) y calibrador primario de albúmina (5 g/dL). Se mantienen a 2-8°C, protegidos de la luz.

Procedimiento

Se colocaron 5 μ L del calibrador de albúmina en tubos de ensayo pequeños por duplicado, y se adicionaron 1 mL de verde de bromocresol (patrón), se agitó durante 30 segundos en vortex y se incubó 5 min a 37°C. De la misma manera se prepararon las muestras por duplicado con 5 μ L de plasma de rata. Se preparó la muestra blanco con 1 mL de verde de bromocresol.

Se leyeron las absorbancias del patrón y la muestra a 630 nm, frente al blanco de reactivo, con un espectrofotómetro. El color es estable 1 hora a temperatura ambiente.

Cálculos

$$\frac{abs\ Muestra - abs\ Blanco}{abs\ Patrón - abs\ Blanco} \times 5\ (Conc\ Patrón) = g/dL\ de\ Albúmina$$

Factor de conversión: g/dL x 144.9 = μ mol/L

Resultados

En la Figura 28 se muestra la cuantificación de la albúmina en las ratas de los grupos experimentales, donde no se observaron cambios significativos en la concentración de ALB entre los grupos.

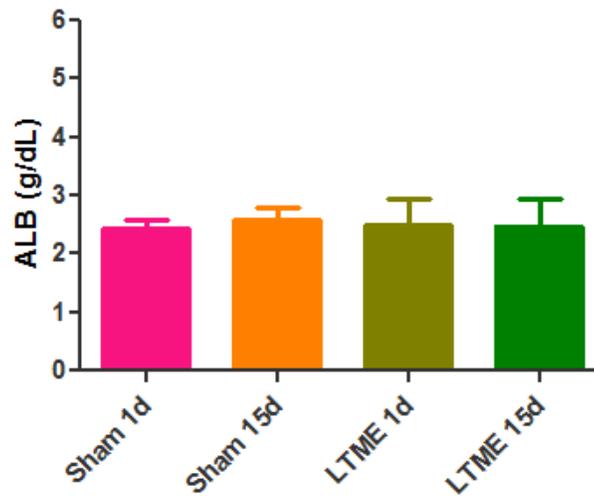


Figura 28. Cuantificación de la albúmina plasmática en los grupos experimentales.

Los datos representan la media \pm DE. *Análisis Estadístico*: ANOVA prueba Tukey, *p<0.05.