



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

PROGRAMA DE POSGRADO EN BOTÁNICA

ANÁLISIS DE LAS HOJAS DE *Moringa oleifera* Lamarck SOBRE SU EFECTO EN EL ESTRÉS OXIDATIVO, METABOLISMO MUSCULAR Y FUNCIÓN MOTORA EN RATAS CON LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL

MÓNICA ELBA LÓPEZ HERNÁNDEZ

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019



Campus
Montecillo

"Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe, **Lic. Mónica Elba López Hernández**, alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Israel Castillo Juárez**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Análisis de las hojas de *Moringa oleifera* Lamarck sobre su efecto en el estrés oxidativo, metabolismo muscular y función motora en ratas con lesión traumática de médula espinal**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Campus Montecillos estado de México, a 05 de febrero de 2019

Lic. Mónica Elba López Hernández

Dr. Israel Castillo Juárez (Vo. Bo.)

La presente tesis, titulada: **ANÁLISIS DE LAS HOJAS DE *Moringa oleífera* Lamarck SOBRE SU EFECTO EN EL ESTRÉS OXIDATIVO, METABOLISMO MUSCULAR Y FUNCIÓN MOTORA EN RATAS CON LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL**, realizada por la alumna: Mónica Elba López Hernández, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS.

BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. ISRAEL CASTILLO JUÁREZ

ASESOR:



DR. RAMON MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

ASESOR:



DR. VÍCTOR FLORENTINO CONDE MARTÍNEZ

ASESOR:



DR. SERGIO TORRES CASTILLO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero 2019

ANÁLISIS DE LAS HOJAS DE *Moringa oleifera* Lamarck SOBRE SU EFECTO EN EL ESTRÉS OXIDATIVO, METABOLISMO MUSCULAR Y FUNCIÓN MOTORA EN RATAS CON LESIÓN TRAUMÁTICA DE MÉDULA ESPINAL

Mónica Elba López Hernández, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

En la lesión traumática de médula espinal (LTME) ocurre la oxidación de vainas de mielina y muerte neuronal, resultando en déficit funcional motor, sensitivo y autonómico. Las hojas de *Moringa oleifera* Lamarck (*M. oleifera*) tienen capacidad antioxidante por su contenido de metabolitos secundarios. **Objetivo:** Evaluar el efecto de *M. oleifera* sobre el estrés oxidativo, la función motora y de tejido de médula espinal en un modelo de LTME en ratas. **Método:** El trabajo se realizó en ratas, agrupadas en: 1) sanas, 2) LTME, 3) LTME tratadas con metilprednisolona y 4) LTME tratadas con extracto hidroalcohólico de las hojas *M. oleifera*. Se evaluaron los niveles de malondialdehído, radical hidroxilo, creatinina y lactato. La función motora se evaluó a través de la escala BBB durante dos meses, se tomó el peso de los animales y se extrajo el tejido de médula espinal al término del seguimiento para el análisis histológico. **Resultados:** Los niveles de malondialdehído fueron menores en los grupos 3 (0.02 ± 0.005) y 4 (0.02 ± 0.006) comparado con el grupo 2 (0.05 ± 0.02), en radical hidroxilo el 3 (0.06 ± 0.03) y 4 (0.06 ± 0.1) disminuyeron con respecto al 2 (0.16 ± 0.06) ($p < 0.05$). Los niveles de creatinina, no mostraron diferencias entre los grupos. El lactato aumentó en el grupo 3 (122.3 ± 49.27) con respecto al 1 (37.89 ± 12.71) ($p < 0.05$). El grupo 4 (10.2) mostró mayor recuperación motora comparada con los grupos 3 (7.9) y 2 (8.5) y el peso disminuyó en el grupo 4 (249.2 ± 11.97) comparado con el 3 (257.8 ± 10.91), 2 (260.5 ± 9.18) y 1 (267.2 ± 12.24) ($p < 0.05$). El tejido medular preservado en el grupo 4 (0.57 ± 0.09) fue mayor que el 3 (0.31 ± 0.06) y 2 (0.43 ± 0.10) y el área de materia blanca fue mayor en el grupo

4 (1.16 ± 0.19) comparado con 3 (0.44 ± 0.14) y 2 (0.70 ± 0.18). **Conclusión:** El efecto antioxidante de *M. oleifera* limita el estrés oxidativo y preserva una mayor cantidad de tejido medular, lo que se refleja en una significativa recuperación de la función motora, dejándola ver como una prometedora alternativa en la LTME.

Palabras clave: Estrés oxidativo, fitoterapia, tejido de médula espinal preservado, materia blanca preservada

ANALYSIS OF *Moringa oleifera* Lamarck LEAVES ON OXIDATIVE STRESS, MUSCLE METABOLISM AND MOTOR FUNCTION IN RATS WITH TRAUMATIC SPINAL CORD INJURY

Mónica Elba López Hernández, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

In traumatic spinal cord injury (TSCI), occur a myelin sheath oxidation and neuronal death, and leads to permanent motor, sensitive and autonomic deficit. *Moringa oleifera* Lamarck (*M. oleifera*) leaves exhibit antioxidant effect, valued for their rich secondary metabolites.

Objective: Was evaluated oxidative stress, motor impairment of hind limbs and spinal cord tissue preservation in rats with TSCI. **Method:** We used Long-Evans female rats randomized in: 1) Sham, 2) TSCI, 4) TSCI treated with metilprednisolone (MPSS) and 5) TSCI treated with *M. oleifera* hydroethanolic extract. **Objetivo:** Was performed malondialdehyde, hydroxyl radical, creatinine and lactate biochemical analyses and motor function evaluation through BBB scale before two months ago, finally take out spinal cord injury site for histological analyses. **Results:** In malondialdehyde was observed in group 3 (0.02 ± 0.005) and group 4 (0.02 ± 0.006) low levels compared with 2 (0.05 ± 0.02) ($p < 0.05$), a similar behavior for hydroxyl radical values were in group 3 (0.06 ± 0.03) and group 4 (0.06 ± 0.1) decrease levels respect than 2 (0.16 ± 0.06) ($p < 0.05$). In creatinine levels not show differences in all groups. In the lactate levels the group 3 (122.3 ± 49.27) was increase compared with 1 (37.89 ± 12.71) ($p < 0.05$). Respect to the BBB score the group 4 (10.2) improves motor recovery than group 3 (7.9) and 2 (8.5) and body weight was lower in group 4 (249.2 ± 11.97) than 3 (257.8 ± 10.91), 2 (260.5 ± 9.18) and 1 (267.2 ± 12.24) ($p < 0.05$). The amount of preserved spinal cord tissue was highest in group 4 (0.57 ± 0.09) than 3 (0.31 ± 0.06) and 2 (0.43 ± 0.10) ($p < 0.05$). The

preserved gray matter tissue was higher in 4 (1.16 ± 0.19) compared with 3 (0.44 ± 0.14) and 2 (0.70 ± 0.18). **Conclusion:** *M. oleifera* restricts lipoperoxidation and hydroxyl radical formation, protects spinal cord tissue and allow higher improvement motor function recovery. *M. oleifera* may be a promising alternative therapy to TSCI.

Keywords: Oxidative stress, phytotherapy, preserved spinal cord tissue, preserved gray matter tissue

AGRADECIMIENTOS

Primero a Dios por la oportunidad de vivir

A mis padres por amarme tanto, por la fortaleza eterna que siempre inyectan en mí y estar siempre al pie del cañón apoyándome

A Marcos mi amor por su hermosa existencia en mi vida, apoyo, amor y paciencia

A mi hermano Christian y mi Cynthia por alegrar mis días con su presencia

A toda mi familia de Pachuca por su apoyo moral

A mis amigos Sandra, Magaly, Humberto y Manuel, por su valioso apoyo académico y moral, siempre a mi rescate con amor y paciencia. Gracias por su amistad, por su tiempo, las preciosas y divertidas experiencias

A mi Consejero Dr. Israel, por su permanente disposición y apoyo incondicional, siempre con su singular carisma

A mis asesores el Dr. V. Conde y el Dr. M. Soto, por apoyarme con su amplia experiencia académica y brindarme las puertas abiertas de sus respectivos laboratorios para mis experimentos

A la Dra. Hermelinda y a su grandioso equipo de doctores (as), maestros (as), alumnos (as), por hacer posible esta tesis, su apoyo académico y técnico invaluable

Al Dr. Sergio por su sabiduría que a través de los años ha sido un pilar para mi formación académica y personal

A la Dra. Carmen Padrón por apoyarme con el material vegetal para esta investigación

Al Colegio de Postgraduados por brindarme la oportunidad de poder realizar mis estudios de Maestría

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento que me otorgó para realizar mis estudios de Maestría.

DEDICATORIA

A mi pedacito de cielo, que lo amo hasta las alturas...y a mi otro pedacito que viene en camino

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	viii
DEDICATORIA.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE CUADROS	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1. Lesión traumática de médula espinal (LTME).....	2
2.2. Epidemiología y etiología	2
2.3. Complicaciones	3
2.4. Fisiopatología.....	3
2.5. Tratamientos.....	6
2.5.1. Metilprednisolona succinato de sodio (MPSS).....	6
2.5.2 <i>Moringa oleifera</i> Lamarck.....	7
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
4. OBJETIVOS.....	14
4.1. <i>Objetivo general:</i>	14
4.2. <i>Objetivos específicos:</i>	14
5. HIPÓTESIS	15
6. JUSTIFICACIÓN.....	16
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
7.1. Tipo de estudio.....	17
7.2. Variables.....	17
7.2.1. Independientes: LTME, administración de MPSS, administración de <i>M. oleifera</i>	17
7.2.2. Dependientes: Niveles de malondialdehído, radical hidroxilo, óxido nítrico, creatinina, lactato, peso, puntuación de la evaluación funcional motora y cantidad de tejido preservado.....	17
7.3. Modelo experimental.....	18
7.4. Obtención del material vegetal.....	18

7.5. Obtención de los extractos.	19
7.6. Análisis fitoquímico.	19
7.6.1. Ácidos fenólicos totales.	19
7.6.2. Flavonoides totales.	20
7.6.3. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	21
7.6.3.1. Ácidos fenólicos	21
7.6.3.2. Flavonoides.....	21
7.7. Análisis antioxidante <i>in vitro</i>	22
7.7.1 Método DPPH•	22
7.8. Animales.....	22
7.9. Modelo de la LTME.....	23
7.10. Cuidados postoperatorios.	23
7.11. Administración de tratamiento.	24
7.12. Toma de muestras.....	24
7.13. Mediciones bioquímicas.....	24
7.13.1. Malondialdehído.	24
7.13.2. Radical OH	27
7.13.3. Proteínas.....	28
7.13.4. Creatinina.....	29
7.13.5. Lactato	29
7.13.6. Evaluación funcional	30
7.13.7. Análisis histológico.....	30
7.13.7.1. Tinción con Hematoxilina & Eosina:	31
7.13.7.2. Tinción de Klüver-Barrera:	31
7.14. Consideraciones éticas.	32
8. RESULTADOS	33
8.1. Análisis de fenoles y flavonoides totales	33
8.2. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	33
8.2.1. Ácidos fenólicos	33
8.2.2. Flavonoides	34
8.3. Capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	36

8.3.1. Radical DPPH	36
8.4. Efecto de la administración del extracto hidroalcohólico en el modelo de lesión traumática de médula espinal en rata	38
8.4.1. Evaluación bioquímica en tejido de médula espinal.....	38
8.4.1.1. Lipoperoxidación.....	38
8.4.1.2 Radical hidroxilo	39
8.4.2. Evaluación bioquímica de muestras de plasma sanguíneo	40
8.4.2.1. Creatinina	40
8.4.2.2. Lactato	41
8.4.3. Evaluación funcional motora	42
8.4.3.1. Prueba funcional BBB	43
8.4.4. Evaluación del peso	44
8.4.5. Evaluación histológica	45
8.4.5.1. Tejido de médula espinal preservado.....	45
8.4.5.2. Materia blanca preservada	46
9. DISCUSIÓN	47
10. CONCLUSIONES.....	54
12. LITERATURA CITADA	54
12. APÉNDICES	69
Apéndice A.....	69
Apéndice B.....	72
Apéndice C	78
Apéndice D.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumen de la formación de ERO:.....	5
Figura 2. Hojas, flores y frutos del árbol de <i>M. oleifera</i>	8
Figura 3. Principales ácidos fenólicos en las hojas de <i>M. oleifera</i>	9
Figura 4. Principales flavonoides en las hojas de <i>M. oleifera</i>	10
Figura 5. Grupos experimentales, variables y análisis estadístico.	18
Figura 6. Principio de reacción de ácido gálico con molibdeno.	20
Figura 7. Principio de reacción de malondialdehído.	26
Figura 8. Principio de reacción de radical OH.	28
Figura 9. Principio de reacción de creatinina.	29
Figura 10. Principio de reacción de lactato.	30
Figura 11. Cromatograma de ácidos fenólicos del extracto de <i>M. oleifera</i>	33
Figura 12. Cromatograma de flavonoides del extracto de <i>M. oleifera</i>	35
Figura 13. Curva de CI 50 de radical DPPH	37
Figura 14. Niveles de malondialdehído (MDA) en tejido de médula espinal.	38
Figura 15. Niveles de radical hidroxilo (radical OH) en tejido de médula espinal.	39
Figura 16. Niveles de creatinina en plasma.	40
Figura 17. Niveles de lactato en plasma.	41
Figura 18. Comportamiento de la función motora.	42
Figura 19. Fotografías de una rata representativa por grupo experimental.	43
Figura 20. Promedio del peso.	44
Figura 21. Área del tejido medular preservado mediante la tinción de Hematoxilina & Eosina.	45
Figura 22. Área de materia blanca preservada mediante la tinción de Klüver-Barrera.	46

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Contenido de ácidos fenólicos obtenidos por HPLC.....	34
Cuadro 2. Contenido de flavonoides obtenido por HPLC.....	35
Cuadro 3. Porcentaje inhibido del radical DPPH a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de <i>M. oleifera</i> al 70%	36

1. INTRODUCCIÓN

La lesión traumática de médula espinal (LTME) es un evento que en su fase aguda pone en riesgo la vida del paciente y crónicamente resulta en déficit motor, sensitivo y autonómico; generando alteraciones físicas, psicológicas y sociales, e impactando en la calidad de vida del paciente (Maldonado y Hook, 2014; Singh *et al.*, 2014).

En la LTME, después del impacto mecánico al tejido medular se desencadena una serie de reacciones bioquímicas que provocan estrés oxidativo y culminan en daño a las fibras nerviosas y/o muerte celular (Oyinbo, 2011), reflejándose en la pérdida de la función motora (parálisis), alteraciones músculo esqueléticas (atrofia y espasticidad), procesos favorecidos por la oxidación de proteínas, que en la fase crónica representan un reto para la rehabilitación del paciente (Pierre *et al.*, 2016). Se ha mostrado un contenido importante de fenoles y flavonoides en las hojas de *M. oleifera*, a los cuales se les atribuye la capacidad de donar electrones y neutralizar radicales libres (Singh *et al.*, 2014), así como regular la expresión genética de enzimas del sistema antioxidante endógeno (Liu *et al.*, 2015), y los beneficios como suplemento proteínico para la ganancia de peso en ganado animal (Pérez *et al.*, 2010; Martín *et al.*, 2013), para ser probado en la recuperación de la función motora. Actualmente no se cuenta con un tratamiento eficaz para la LTME y sin efectos deletéreos, en el presente trabajo se utilizó la fitoterapia a través de *M. oleifera* por su efecto antioxidante, nutricional, neuroprotector y antiinflamatorio, atribuido a la gran variedad de metabolitos secundarios que posee (Ijarotimi *et al.*, 2013; Abdull *et al.*, 2014; Giacoppo *et al.*, 2015; Leone *et al.*, 2015).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Lesión traumática de médula espinal (LTME)

La LTME es un trastorno en el sistema nervioso central (SNC), provocado por un traumatismo mecánico que afecta directamente al tejido medular, con repercusiones neurológicas irreversibles sobre la función motora, sensitiva y autonómica por debajo del nivel de lesión, disminuyendo la calidad de vida de los pacientes en esta condición patológica (Siebert *et al.*, 2015).

2.2. Epidemiología y etiología

A nivel mundial la prevalencia de la LTME es de entre 236 y 1,009 casos por millón de habitantes (Fatima *et al.*, 2015) y una incidencia de 15 a 40 casos por millón de habitantes por año (Singh *et al.*, 2014; Giacoppo *et al.*, 2015).

En la Ciudad de México se estima una incidencia de 18.6 casos por millón de habitantes por año (Pardini, 1998), afectando principalmente a hombres en edad productiva, entre los 15 y 35 años; con una causalidad relacionada principalmente con accidentes automovilísticos 47%, caídas 26%, actividades deportivas 12%, así como por intento de suicidio 8%, golpes 3%, violencia 2%, otros 1% (Estrada *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2014; Siebert *et al.*, 2015). Respecto al porcentaje del nivel de presentación de la LTME en Estados Unidos de América, es del 51% para la región cervical, 28% para la región torácica y 21% para la región lumbar (Singh *et al.*, 2014).

Los costos para el manejo del paciente con LTME son altos y generan una carga financiera en la esfera familiar y social, estos costos están relacionados a los cuidados a corto y largo plazo. De acuerdo a la causa, los costos de una LTME son de 3.48 billones por accidentes de vehículo, 1.81 billones por violencia, 1.28 billones por caídas, 694 millones por deporte y 472 millones por otras causas, con un total de costos de 7.736 billones (Sánchez *et al.*, 2010).

2.3. Complicaciones

La LTME es un evento traumático que genera alteraciones en el estado físico, psicológico y social, impactando en la calidad de vida del paciente (Maldonado y Hook, 2014; Singh *et al.*, 2014).

Los síntomas después de la LTME involucran pérdida de la función de las fibras nerviosas sensoriales y motoras, alteraciones urinarias, de defecación y sexuales, acompañado de complicaciones respiratorias, cardiovasculares, digestivas, úlceras por presión, infecciones del tracto urinario, síndromes de dolor, deformidades musculoesqueléticas (atrofia muscular y espasticidad), osteoporosis y fracturas (Quinzaños y Sahagún, 2015; Sezer *et al.*, 2015).

2.4. Fisiopatología

En la LTME el daño primario conduce a una hemorragia inmediata y muerte celular en el sitio de impacto, seguido de múltiples mecanismos secundarios de daño, de tipo vascular, bioquímico y celular que causan mayor pérdida de tejido y disfunción nerviosa,

dichos mecanismos representan un ciclo de propagación y son simultáneos (Sinescu *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2015; Yılmaz y Kaptanoğlu, 2015). Los daños secundarios representan un ciclo de propagación y son simultáneos, donde en la fase aguda, de segundos a minutos se presenta la hipotensión sistémica, “shock” espinal, vasoespasmo, isquemia, compromiso de la membrana plasmática y disturbios en la homeostásis iónica, así como cambios electrolíticos que involucran acumulación de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- intracelular y K^+ extracelular, edema y muerte celular por necrosis (Hall, 2011; Fatima *et al.*, 2015; Farooqui, 2018). La inflamación, excitotoxicidad e isquemia - reperfusión del tejido conllevan a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), en un tiempo de minutos a horas (Oyinbo, 2011; Czarska *et al.*, 2015; Mattucci *et al.*, 2018). Como resultado ocurre un cambio del metabolismo generando un medio ácido con acumulación de lactato, pérdida de adenosín trifosfato (ATP), disfunción celular y muerte celular (Torres *et al.*, 2009; Farooqui, 2018).

Entre las especies reactivas se encuentran radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^{\bullet}), óxido nítrico (NO^{\bullet}) y peroxinitrito (ONOO^-), con la capacidad de oxidar dañando sustratos lipídicos, proteicos y nucleicos, Figura 1 (Carocho y Ferreira, 2013). Cuando superan la capacidad de respuesta antioxidante alteran el equilibrio homeostático aconteciendo el estrés oxidativo, que provoca, entre otras cosas, fallo en el metabolismo energético, desmielinización y alteración en la conducción axonal (Oyinbo, 2011; Fatima *et al.*, 2015), así como pérdida de oligodendrocitos en el epicentro de la lesión, y apoptosis neuronal (Maldonado y Hook, 2014; Li y Leung, 2015). Por otra parte, también se ve afectado el metabolismo muscular por oxidación de proteínas, lo que provoca atrofia severa y espasticidad, que se refleja en la pérdida de motilidad; estos

mecanismos se presentan principalmente en la fase subaguda y crónica de la LTME (Pierre *et al.*, 2016; Otzel *et al.*, 2018).

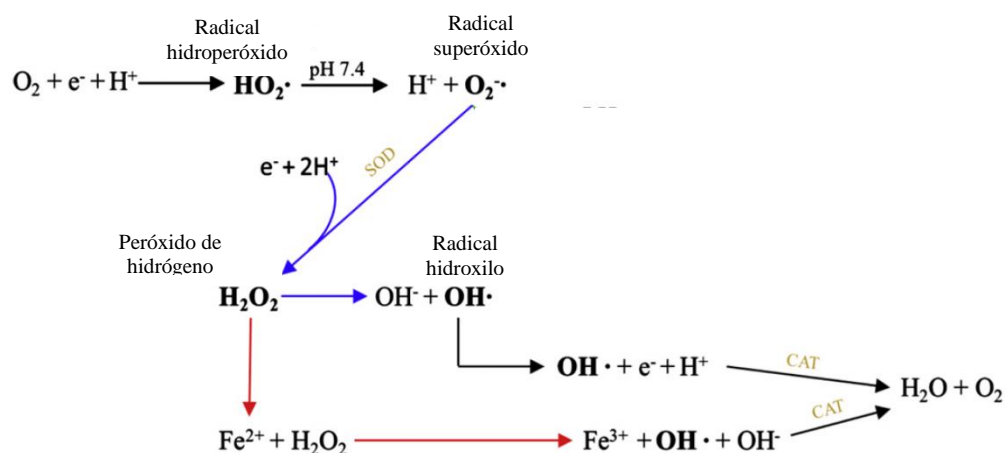


Figura 1. Resumen de la formación de ERO: El radical hidroperoxilo se disocia a un pH de 7 para formar anión superóxido, que puede ser desintoxicado a peróxido de hidrógeno a través de la reacción de dismutación con la enzima superóxido dismutasa a través de la reacción de Haber – Weiss (flechas azules) y finalmente a agua por la enzima catalasa. Si el peróxido de hidrógeno reacciona con hierro como el Fe^{2+} , la reacción de Fenton tiene lugar (flechas rojas), formando radical hidroxilo. Superóxido dismutasa (SOD); catalasa (CAT) (Modificado de Caroch y Ferreira, 2013).

2.5. Tratamientos

2.5.1. Metilprednisolona succinato de sodio (MPSS)

La MPSS es un fármaco de tipo glucocorticoide que se ha descrito ejerce efecto antiinflamatorio, antioxidante y neuroprotector, ya que inhibe la peroxidación lipídica, mantiene la barrera hematoencefálica, regula el metabolismo energético, mejora el flujo sanguíneo, inhibe la liberación de endorfinas y limita la respuesta inflamatoria (Bracken *et al.*, 1990; Bracken *et al.*, 1997). Se propuso como tratamiento de elección para la LTME, sin embargo, con el paso del tiempo su uso ha disminuido significativamente debido a daños secundarios potenciales como sangrado gastrointestinal y riesgo a infecciones por su efecto inmunosupresor, además que la recuperación de la función motora y sensitiva es ligeramente positiva (Evaniew *et al.*, 2016; Rogers y Todd, 2016). En años recientes se demostró su efecto antiapoptótico a través de la inhibición de muerte de oligodendrocitos vía receptor glucocorticoide y aumento la expresión de bcl-Xl en un modelo de ratas con LTME, mostrando una protección selectiva a células oligodendrocíticas sin afectar la sobrevivida neuronal (Lee *et al.*, 2008). *In vitro* se ha demostrado que ésta protección es a través de la unión de receptores glucocorticoides con STAT5, que subsecuentemente se une a la región de bcl-x y activa la expresión de bcl-X_L (Xu *et al.*, 2009).

Se han investigado otros agentes de tratamiento, entre los que se encuentran la hormona liberadora de tirotrópina, gangliosido GM1, nalaxona y tirilazad, que no obstante en estudios preclínicos en animales han mostrado efectos positivos, los ensayos en humanos no han mostrado un efecto terapéutico significativo (Hall y Springer, 2004; Rogers y Todd, 2016).

Debido a la complejidad de regular los mecanismos de daño, así como la baja capacidad de regeneración espontánea del SNC, actualmente no se cuenta con una estrategia terapéutica efectiva para restablecer la función neurológica normal en la LTME (Díaz *et al.*, 2002; Hall y Springer, 2004; Rogers y Todd, 2016).

2.5.2 *Moringa oleifera* Lamarck.

En años recientes la investigación en fitoterapia ha tomado auge en la LTME y se ha enfocado principalmente en plantas con compuestos activos con efecto neuroprotector (Sanli *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2016).

M. oleifera es un árbol (Figura 2) originario del norte de la India, de la familia Moringaceae; alcanza hasta 12 m de altura, sus hojas son compuestas y están dispuestas en grupos de foliolos, con cinco pares de foliolos acomodados sobre el pecíolo principal y un folíolo en la parte terminal. Las disposiciones de las hojas son del tipo alternas y tripinnadas, con una longitud de 30-70 cm. Tiene la versatilidad de desarrollarse en diferentes condiciones ambientales y de suelo, además crece excepcionalmente rápido, y en tres meses llega a alcanzar los 3 m de altura (Pérez *et al.*, 2010; Leone *et al.*, 2015).

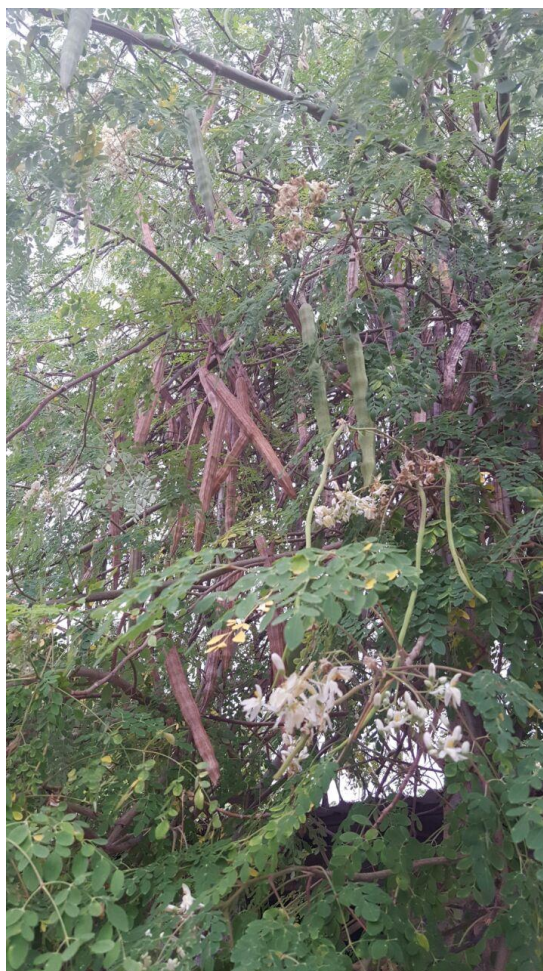


Figura 2. Hojas, flores y frutos del árbol de *M. oleifera* (Foto tomada por Dra. Carmen Padrón).

Posee propiedades medicinales y nutricionales asociadas a su efecto antiinflamatorio, anticancerígeno, antioxidante y neuroprotector, atribuido a su contenido de flavonoides, polifenoles, ácidos fenólicos, carotenoides, glucosinolatos e isotiocianatos (Ijarotimi *et al.*, 2013; Abdull *et al.*, 2014; Giacoppo *et al.*, 2014; Leone *et al.*, 2015) Figura 3 y Figura 4.

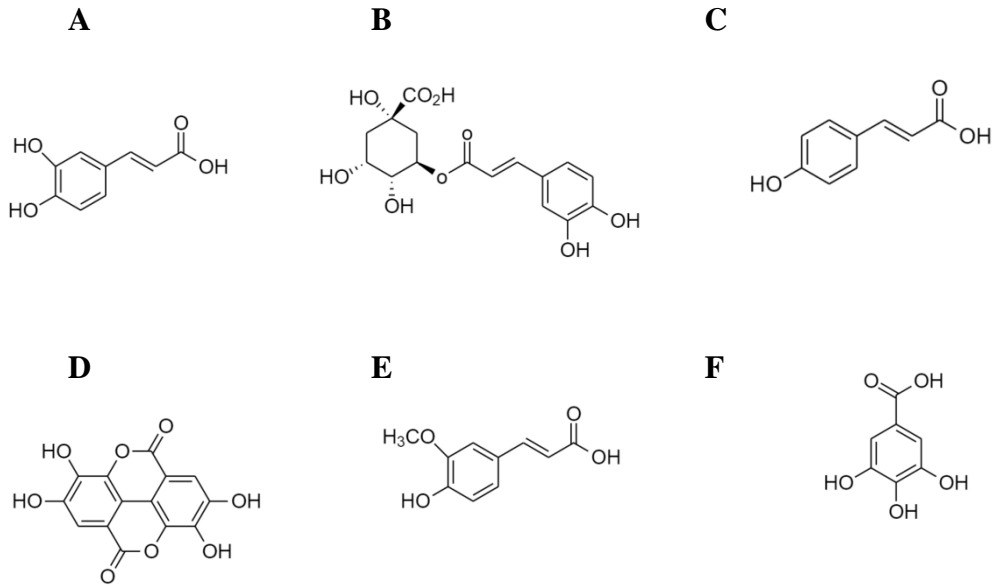


Figura 3. Principales ácidos fenólicos en las hojas de *M. oleifera*: A. Ácido caféico; B. Ácido clorogénico; C. Ácido p - cumárico; D. Ácido elágico; E. Ácido ferúlico; F. Ácido gálico.

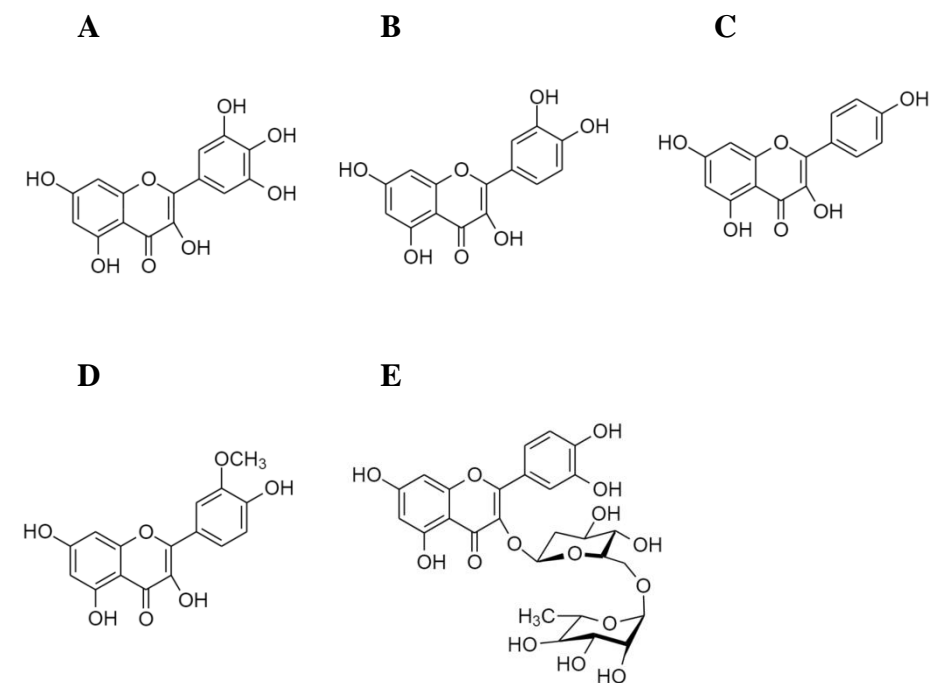


Figura 4. Principales flavonoides en las hojas de *M. oleifera*: A. Miricetina; B. Quercetina; C. Kaempferol; D. Isoramnetina; E. Rutina.

Se ha estudiado su efecto en diversas patologías del SNC. Por ejemplo, el extracto hidroalcohólico de las hojas favorece la actividad neurotrófica en cultivos de neuronas hipocampales evidenciado por la supervivencia celular, longitud, ramificación axonal y neurítica (Hannan *et al.*, 2014). En un modelo de accidente cerebrovascular en ratas administraron un extracto hidroalcohólico de hojas de *M. oleifera* vía oral y encontraron una disminución del área de infarto en la corteza cerebral y en el estriado, así como recuperación motora y sensitiva (Kirisattayakul *et al.*, 2013). Además, se ha probado su

efecto anticonvulsivo en un modelo en ratón, y mostró un efecto depresor en el sistema nervioso, sugiriendo que se debe a la estimulación de vías inhibitorias de GABA y glicina, o la inhibición de vías excitatorias como noradrenalina y acetilcolina, este es un efecto importante ya que estos neurotransmisores están implicados en la locomoción (Bakre *et al.*, 2013). En otros estudios de *M. oleifera* en el SNC se realizó una fórmula realizada con isotiocianatos de semillas de *M. oleifera* activados con la enzima mirosinasa de las semillas de *Sinapis alba* L. en un modelo de pretratamiento y tratamiento prolongado en la lesión medular, mostrando regular la expresión de iNOs y vías apoptóticas (Giacoppo *et al.*, 2015).

En un modelo de edema en pata en rata inducido por carragenina se ha evaluado su efecto antiinflamatorio a través de los niveles de histamina, sugiriendo que tiene actividad sobre la regulación de prostaglandinas (Adedapo *et al.*, 2015).

Todo lo anterior ha reflejado su capacidad antioxidante exógena, relacionado al contenido de flavonoides (glucosidos, quercetina), carotenoides (β -caroteno) y ácidos fenólicos (ácido gálico) (Sreelantha y Padma, 2009), demostrada al contrarrestar el estrés oxidativo en un modelo de hepatotoxicidad en ratas (Singh *et al.*, 2014), y por otro lado aumenta la actividad de antioxidantes endógenos como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión (Singh *et al.*, 2014; Lamou *et al.*, 2016).

M. oleifera ha demostrado en estudios *in vitro* que neutraliza y / o elimina radicales libres como $\text{NO}\cdot$ y $\text{O}_2\cdot^-$ (Sreelantha y Padma, 2009; Singh *et al.*, 2014; Adedapo *et al.*, 2015).

También se ha encontrado que el extracto acuoso de las hojas de *M. oleifera* tiene efecto antifatiga, al reducir las concentraciones de lactato en sangre en un modelo de nado forzado en ratas (Lamou *et al.*, 2016). Sumado a esto, su alto contenido proteico y de diversos aminoácidos como lisina y metionina, se ha relacionado con su capacidad nutritiva, reconocida en investigaciones previas (Thurber y Fahey 2009; Asiedu *et al.*, 2014; Nouman *et al.*, 2016), que es un elemento clave en la recuperación de enfermedades neurológicas (Planas, 2014).

Las hojas han sido utilizadas como forraje y suplemento proteínico para ganado vacuno de alta productividad favoreciendo la ganancia de peso (Pérez *et al.*, 2010; Martín *et al.*, 2013). Informes del aumento diario de peso al empleo de 40-50% de *M. oleifera* en la dieta para ganado de engorde ha sido de 1,200 g día⁻¹ y de 900 g día⁻¹ sin su utilización (Price, 2000).

Las propiedades de *M. oleifera* antes mencionadas podrían representar ser una opción viable para tratar la LTME en su fase crónica, interesante por su mecanismo antioxidante y su probable efecto sobre la regulación del metabolismo muscular.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la LTME después del daño primario (impacto mecánico en el tejido medular), se producen alteraciones vasculares y bioquímicas desencadenando mecanismos de daño donde la isquemia / reperfusión seguida al desacople mitocondrial, y la alteración de la polaridad de la membrana promueven la formación de especies reactivas de oxígeno sobrepasando los mecanismos de defensa antioxidantes, desencadenando el estrés oxidativo que daña moléculas (ácidos nucleicos, lípidos y proteínas), provoca muerte celular, pérdida de tejido medular y finalmente un déficit funcional motor, sensitivo y autonómico. Posterior al déficit motor, en el tejido muscular se altera el metabolismo de la síntesis y degradación de proteínas, siendo una limitante para la recuperación funcional motora en la cronicidad de esta patología.

El tratamiento de elección para esta condición patológica es el empleo de metilprednisolona, aunque actualmente su uso ha decrecido debido a la limitada efectividad observada sobre la recuperación funcional y a los efectos deletéreos que incrementan potencialmente la mortalidad.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

Evaluar el efecto de *M. oleifera* relacionado con el estrés oxidativo, metabolismo muscular y la función motora en un modelo de lesión traumática de médula espinal en ratas

4.2. Objetivos específicos:

- Caracterizar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *M. oleifera* por cromatografía de líquidos de alta resolución
- Evaluar el efecto antioxidante de *M. oleifera* sobre el estrés oxidativo a través de los niveles radical hidroxilo y malondialdehído en tejido de médula espinal en un modelo de lesión traumática de médula espinal en ratas
- Evaluar el efecto metabólico de *M. oleifera* sobre los niveles de creatinina y lactato en plasma en un modelo de lesión traumática de médula espinal en ratas
- Evaluar el efecto de *M. oleifera* sobre la función motora en un modelo de lesión traumática de médula espinal en ratas
- Evaluar el efecto de *M. oleifera* sobre el peso en un modelo de lesión traumática de médula espinal en ratas

- Medir el efecto de *M. oleifera* sobre el área de tejido medular preservado en un modelo de lesión traumática de médula espinal en ratas

5. HIPÓTESIS

Si *M. oleifera* activa el anabolismo proteico muscular y ejerce un efecto antioxidante a nivel medular en un modelo de ratas con lesión traumática de médula espinal, entonces aumentará la masa muscular de los miembros posteriores, limitará el estrés oxidativo, preservará el tejido medular y favorecerá la recuperación de la función motora.

6. JUSTIFICACIÓN

La LTME tiene una alta prevalencia (236 y 1,009 casos por millón de habitantes) y mortalidad (0 % - 60 %), se presenta principalmente en la población joven (15 – 35 años) que se encuentra en edad productiva. Actualmente no se cuenta con un tratamiento eficaz para la recuperación funcional y sin efectos deletéreos, de tal manera que el empleo y la corroboración científica de terapias alternativas como la fitoterapia son una buena opción. La utilización de *M. oleifera* en este tipo de padecimientos es interesante y viable por el contenido de compuestos activos que muestran actividad biológica en los sistemas antioxidantes endógenos y exógenos, como son su capacidad de contrarrestar el estrés oxidativo a través de la eliminación de ERO, también por su contenido de aminoácidos es relevante para mejorar el metabolismo muscular y recuperar la función motora, dejándolo ver como un posible tratamiento efectivo y con menos efectos secundarios en comparación con los medicamentos que actualmente se emplean.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio experimental, comparativo, prospectivo y longitudinal.

Universo de estudio: Se utilizaron ratas hembra adultas de la cepa Long-Evans, con un peso de 250 a 300 g, que conformaron 4 grupos de experimentación de 7 ratas cada uno para el análisis bioquímico y de 9 ratas cada grupo para la evaluación funcional motora, 64 animales en total (Figura 5).

Grupos experimentales: 1) ratas sanas, 2) ratas con LTME sin tratamiento, 3) ratas con LTME tratadas con MPSS, 4) ratas con LTME tratadas con *M. oleifera*.

7.2. Variables.

7.2.1. *Independientes*: LTME, administración de MPSS, administración de *M. oleifera*.

7.2.2. *Dependientes*: Niveles de malondialdehído, radical hidroxilo, óxido nítrico, creatinina, lactato, peso, puntuación de la evaluación funcional motora y cantidad de tejido preservado.

7.3. Modelo experimental.

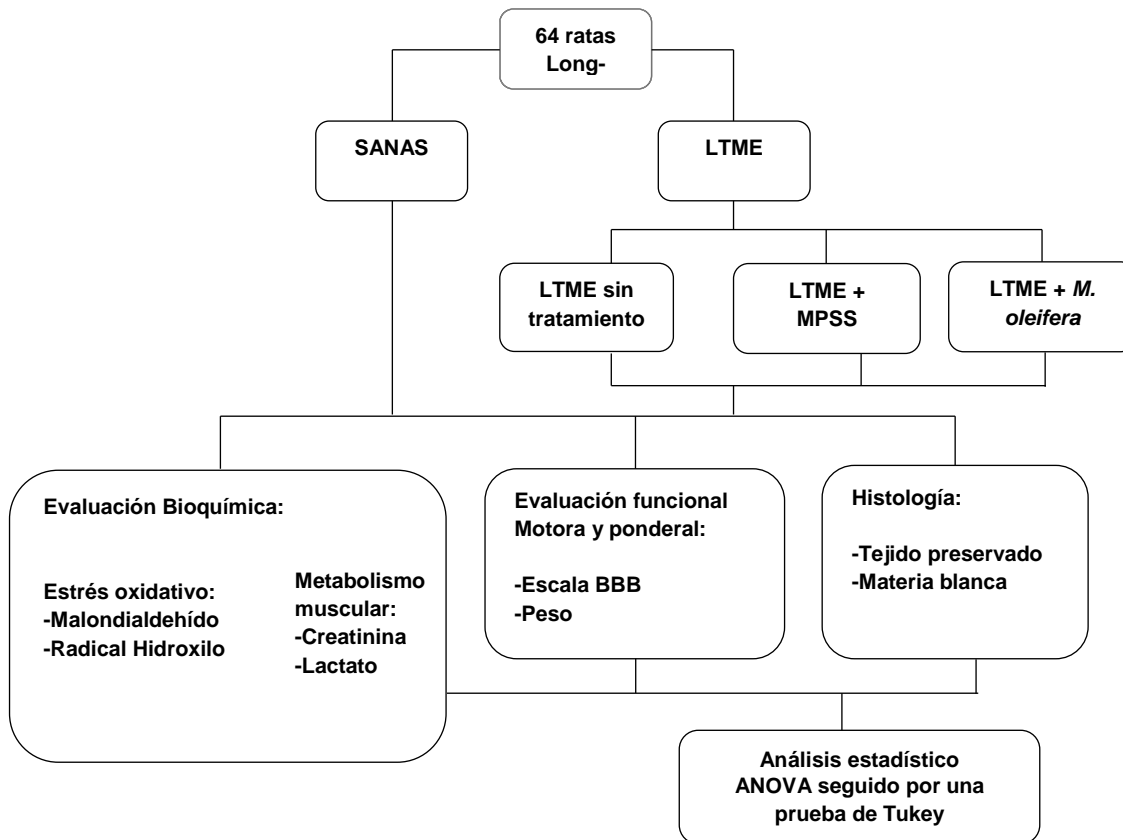


Figura 5. Grupos experimentales, variables y análisis estadístico. Evaluación bioquímica n= 7, evaluación funcional e histológica n= 9. LTME (lesión traumática de médula espinal); MPSS (metilprednisolona succinato de sodio); *M. oleifera* (*Moringa oleifera* Lam.); escala BBB (escala Baso, Beathie y Bresnahan); ANOVA (análisis de varianza).

7.4. Obtención del material vegetal

Se recolectaron las hojas de *M. oleifera* en el estado de Michoacán Municipio de Múgica, Ejido Nueva Italia, Rancho La Tierra Pura, Región Tierra Caliente del Estado. 19°01'67' 'N. 102°06 'O. Altitud 297 m. El material vegetal fue donado por la Dra.

Carmen Padrón. Las hojas frescas se dejaron secar a temperatura ambiente, bien ventiladas y protegidas de la luz. El material se pulverizó para homogeneizar el tamaño de la partícula.

Un espécimen tipo se procesó y se depositó como referencia en el Herbario CHAPA del COLPOS.

7.5. Obtención de los extractos.

Las hojas se secaron y se pulverizaron con un molino. Se usaron 400 g de material para la extracción por maceración discontinua con 4 Lt de etanol al 70 %. Cada 24 horas el material se filtró con papel Whatman # 1 y se adicionó más disolvente por 72 horas. El filtrado se evaporó en un rotaevaporador para concentrar el extracto. Se obtuvo el rendimiento y se almacenó en un frasco color ámbar a -20 °C para su posterior uso.

7.6. Análisis fitoquímico.

7.6.1. Ácidos fenólicos totales.

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu basado en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu que contiene complejos de ácido fosfomolibdico y fosfotúngstico susceptibles a oxidación, que a pH básico los compuestos fenólicos y otros agentes reductores a molibdeno forman complejos azules (Gülçin, 2012). Se realizó una curva de calibración usando una solución estándar de ácido gálico (0.0024 g 100 mL⁻¹ de agua destilada) Para la reacción se añadieron 5 µL del extracto hidroalcohólico, 495 µl de agua destilada, 25 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 975 µL de carbonato de sodio, se dejó 1 hora a temperatura ambiente en un cuarto oscuro y se midió espectrofotométricamente (Multiskan Thermoscientific) a 740 nm (Waterman., 1994).

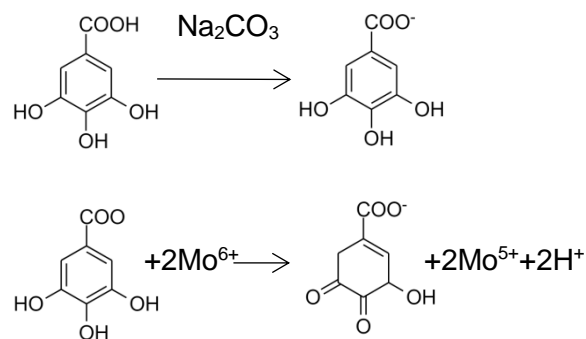


Figura 6. Principio de reacción de ácido gálico con molibdeno. Se muestra la desprotonación de los compuestos fenólicos del patrón ácido gálico en medio básico, generando los aniones fenolatos. Posteriormente ocurre una reacción de óxido reducción entre el anión fenolato y el reactivo de Folin, en la cual el molibdeno se reduce y el medio cambia de coloración amarillo a color azul (Tomado de Oliveira *et al.*, 2009).

7.6.2. Flavonoides totales.

Se determinó la presencia de flavonoides con el método colorimétrico con cloruro de aluminio, reacción basada en la formación de complejos ácidos estables con el grupo cetónico C-4 y el grupo hidroxilo C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles, y a través de grupos ortodihidroxilo en los anillos A o B de los flavonoides (Chang *et al.*, 2002, modificado por Palma, 2014). Se realizó una curva de calibración usando una solución estándar de quercetina ($0.0024 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ de metanol). Se añadieron $10 \mu\text{L}$ del extracto hidroalcohólico de *M. oleifera*, $990 \mu\text{L}$ de metanol al 80%, 2 mL de acetato de potasio al 1 M , 2 mL de cloruro de aluminio y se mantuvo la reacción a temperatura ambiente por 40 minutos para medir en un espectrofotómetro (Multiskan Thermoscientific) a 415 nm .

7.6.3. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

7.6.3.1. Ácidos fenólicos

Se utilizó una columna Nucleosil 100 A 125 x 4.0 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula), con una fase móvil de: (A) agua a pH de 2.5 con ácido trifluoracético y (B) acetonitrilo, con el siguiente gradiente: 0.10 min, A:B 85:15; 20 min, A:B 65:35 y 23 min, A:B 65:35. El flujo fue de 1 mL min^{-1} y una temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$. El equipo se calibró a una longitud de onda de 280 nm. El volumen de inyección fue de 20 μL . Para identificar los flavonoides presentes en los extractos se usaron estándares de los ácidos: gálico, vainillínico, cafeico, clorogénico, sirínico, *p*-hidroxibenzoico, ferúlico, *p*-cumárico adquiridos en Sigma-Aldrich.

7.6.3.2. Flavonoides

Se utilizó una columna C18 Hypersil ODS (125 mm x 4 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula), con una fase móvil de: (A) agua a pH de 2.5 con ácido trifluoracético y (B) acetonitrilo, con el gradiente: 0.10 min, A:B 85:15; 20 min, A:B 65:35 y 25 min, A:B 65:35. El flujo fue de 1 mL min^{-1} y una temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$. El equipo se calibró a las longitudes de onda de 254, 316 y 365 nm. El volumen de inyección fue de 20 μL . Para identificar los flavonoides presentes en los extractos se usaron estándares de rutina, hesperidina, miricetina, luteolina, floretina, kaempferol, quercetina, florizidina, naringenina y galangina adquiridos en Sigma-Aldrich.

7.7. Análisis antioxidante *in vitro*

7.7.1 Método DPPH•

Para evaluar la actividad del extracto se usó el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) en una solución metanólica. La reducción del DPPH• se monitorea por la disminución en la absorbancia a 517 nm (Lv *et al.*, 2018). En su forma de radical libre, absorbe y cuando se reduce por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del radical proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales (Gülçin, 2012).

Se preparó el reactivo de DPPH al 0.1 mM en 50 ml de metanol en condiciones de oscuridad y se usaron tres concentraciones del extracto de *M. oleifera* (1.0, 0.5 y 0.05 mg mL⁻¹) llevando a un volumen de 2.0 mL del reactivo en cada tubo de ensayo. Se dejó incubar durante 30 minutos en un cuarto oscuro y posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm.

7.8. Animales

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Long Evans con un peso de 250-300 g, bajo condiciones de temperatura y humedad controladas, alojadas individualmente por caja. Los animales fueron mantenidos en el bioterio de Proyecto Camina AC., de estancia con libre acceso a comida y agua. La manipulación de los mismos se realizó conforme la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM – 062 – ZOO – 1999).

7.9. Modelo de la LTME

Los animales fueron anestesiados con una solución de ketamina (77.5 mg kg^{-1}) y xilacina (12.5 mg kg^{-1}), se realizaron los procedimientos de asepsia y antisepsia sobre la región dorsal, para llevarse a cabo una incisión quirúrgica sobre la línea media posterior, se prosiguió a disecar los músculos paravertebrales y extirpar las apófisis espinosas de las vértebras torácicas 8 a la 10, posteriormente se efectuó una laminectomía sobre la vértebra torácica 9, dejando a ese nivel la médula espinal expuesta, donde se provocó la lesión por contusión de intensidad moderada, de acuerdo a un método estandarizado aplicado a nivel mundial, el cual consiste en inducir la LTME con el equipo New York University (Basso *et al.*, 1996), se confirmó la lesión por medio de la visualización de un hematoma en la región central del tejido medular. Se suturó la incisión quirúrgica de la fascia muscular y piel por planos y puntos separados.

7.10. Cuidados postoperatorios.

A los animales se les administró antibiótico (ampicilina) 20 U para cada rata vía intramuscular como única dosis después de la cirugía, con el fin de evitar infecciones después del trauma y paracetamol pediátrico en gotas administrado en los bebederos durante una semana. Se les realizó vaciamiento vesical e intestinal para evitar infecciones genitourinarias, así como el cuidado pertinente de las lesiones dérmicas.

7.11. Administración de tratamiento.

Se administró MPSS como control positivo a razón de 30 mg kg⁻¹ de peso vía intraperitoneal como única dosis a los 5 minutos después del trauma.

Se utilizó el extracto de las hojas de *M. oleifera* aplicado vía intraperitoneal a razón de 200 mg kg⁻¹ de peso a los 5min, 4 horas, 24 h y una dosis cada tercer día durante las siguientes 2 semanas posteriores a la LTME.

7.12. Toma de muestras.

Para el análisis bioquímico del estrés oxidativo, se extrajo el sitio de daño de la médula espinal y se homogeneizó con una solución isotónica al 0.9% de NaCl y se congelaron las muestras con nitrógeno líquido.

Se realizó la toma de muestra sanguínea por la vena caudal con tubos heparinizados, a las 24 h, 7 días, 30 días y 60 días después de la LTME.

Se extrajo el tejido medular a los dos meses y se mantuvieron en viales con paraformaldehído al 8 % para el análisis histológico.

7.13. Mediciones bioquímicas.

7.13.1. Malondialdehído.

La peroxidación lipídica es uno de los principales blancos durante el estrés oxidativo, donde las ERO atacan ácidos grasos poliinsaturados en membranas conduciendo a daño a la membrana celular y muerte celular. Uno de los marcadores que han sido identificados, es el

malondialdehído el cual es un subproducto de la peroxidación lipídica, que reacciona fácilmente con ácido tiobarbitúrico (TBA) formando un cromógeno, medible espectrofotométricamente (Figura 6). Para la técnica (Modificada de Ohkawa *et al.*, 1979; Hsu *et al.*, 2016) se añadirán en microtubos de 1 mL los siguientes reactivos:

1. 40 μ L de dodecil sulfato de sodio al 8.1 %
2. 300 μ L de ácido acético al 20 %
3. 300 μ L de TBA al 0.8 %
4. 140 μ L de agua destilada
5. 20 μ L de tejido de médula espinal homogeneizado
6. Agitar, tapar e incubar 1 h a 95 °C
7. Enfriar a chorro de agua y leer espectrofotométricamente a 532 nm

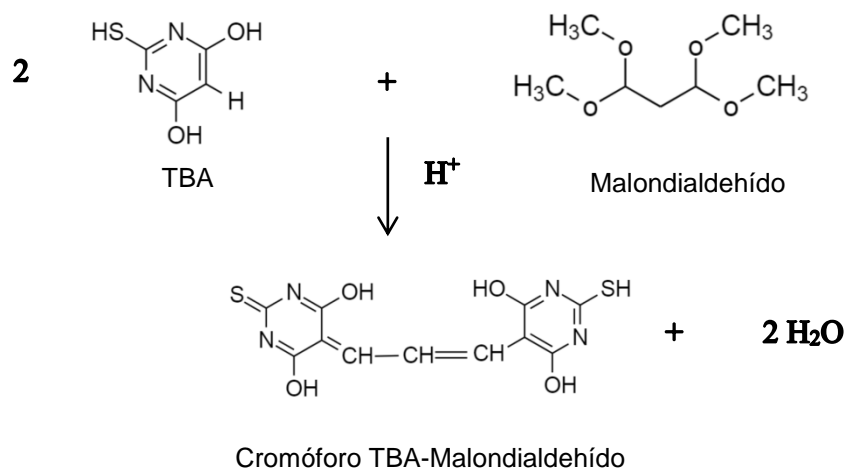


Figura 7. Principio de reacción de malondialdehído. La formación del aducto de dos moléculas de TBA con una molécula de malondialdehído se produce mediante atracción nucleofílica entre el carbono 5 del TBA y el carbono 1 de MDA, seguido de una deshidratación y otra reacción similar con la segunda molécula de TBA, lo que resulta en un pigmento rosa (Tomado y modificado de Ligor *et al.*, 2011).

7.13.2. Radical OH

El radical OH es una especie reactiva de oxígeno derivado de la reacción entre el peróxido de hidrógeno y metales de transición (reacción de Fenton) y es considerado el principal en iniciar la oxidación en cadena de los fosfolípidos poliinsaturados de la membrana plasmática de las células lo cual conduce a la alteración de su función (Ayala *et al.*, 2014).

Se medirán los niveles de radical hidroxilo por medio de la técnica de TBARS (substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) cuyo fundamento es la reacción de la muestra con ácido tiobarbitúrico en medio ácido, añadiendo un cromógeno que posteriormente se estima mediante absorbancia (Figura 2). Para la técnica (Rice-Evans y Diploc., 1991) se realizará el siguiente procedimiento:

1. 125 μ L desoxirribosa al 20 mM
2. 2.5 μ L EDTA al 20 mM y cloruro de Fe^{3+} al 10 mM (ajustar pH a 7.4)
3. 70 μ L de solución dulbecos
4. 25 μ L de tejido de médula espinal homogeneizado
5. Incubar a 37 °C con agitación durante 37 minutos
6. Interrumpir la reacción mediante centrifugación a 6, 577 g durante 3 minutos
7. Separar 150 μ L de sobrenadante a otro tubo y añadir 125 μ L de TBA al 1 % (preparado en una solución de 0.1 N de hidróxido de sodio)
8. Agitar los tubos y agregar 125 μ L de ácido tricloroacético, agitar de nuevo y calentar los microtubos a 100 °C durante 20 minutos

9. Limitar la reacción a chorro de agua

10. Medir la absorbancia a 532 nm

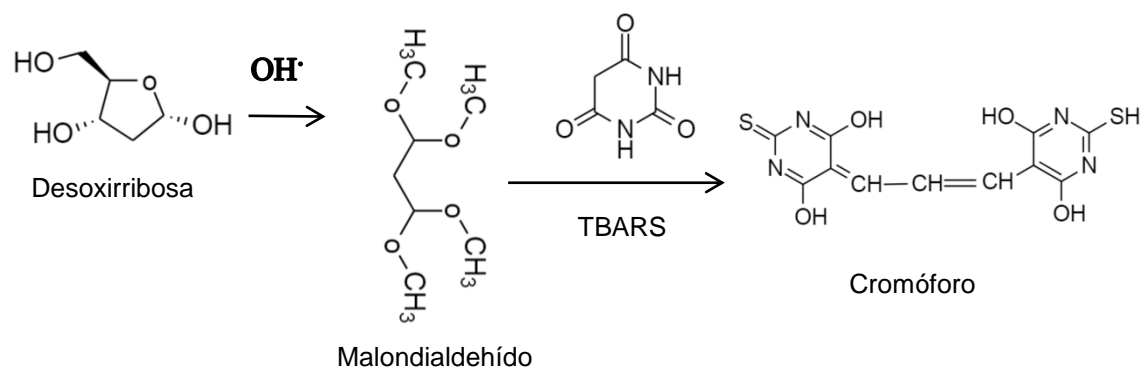


Figura 8. Principio de reacción de radical $\text{OH}\cdot$. La molécula 2-desoxirribosa reacciona con radical $\text{OH}\cdot$, a temperaturas altas y pH alcalino para producir TBARS que reaccionan con el TBA y formar un cromóforo rosa (Tomado y modificado de Rima y Assaker, 2012).

7.13.3. Proteínas

Se cuantificó el contenido de proteínas de las muestras de tejido de médula espinal y de plasma. El método se basa en la unión del químico azul de comassie G – 250 a las proteínas, formando un cromóforo cuantificable a una absorbancia de 595 nm (Brandford, 1976).

7.13.4. Creatinina

La creatinina es un compuesto orgánico generado a partir de la degradación de la creatina, componente de los músculos y puede ser transformada en Adenosín Trifosfato (ATP), fuente de energía para las células. Los niveles de creatinina dependen de la modificación de la masa muscular, varían poco y suelen ser muy estables en condiciones normales. En el presente estudio se pretende medir los niveles de creatinina a través de un método espectrofotométrico medible a 492 nm (Figura 3) (KIT SPINREACT No. Catalogo 1001111).

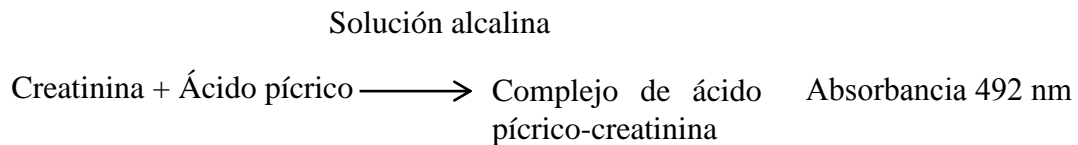


Figura 9. Principio de reacción de creatinina. La creatinina reacciona con picrato alcalino formando un cromóforo rojizo.

7.13.5. Lactato

Debido a que los niveles elevados de lactato están asociados primeramente con infartos al miocardio (mecanismo que implica procesos isquémicos), la magnitud del grado de incremento es utilizado para estimar la extensión de daño al músculo cardiaco. Los niveles altos de lactato también se han observado en enfermedades del hígado, enfermedades renales y en algunos casos de trauma en músculo esquelético, puesto que el lactato es un estereoisómero intermediario en el metabolismo. Método cuantificado colorimétricamente a 570 nm (Figura 3) (Kit Biovision No Catalogo K627-100).

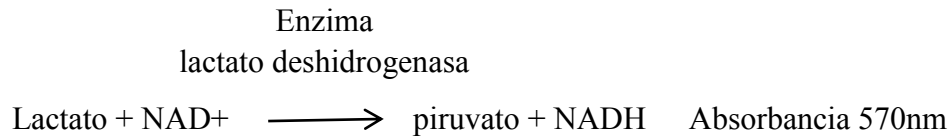


Figura 10. Principio de reacción de lactato. D-Lactato es oxidado por la enzima D-lactato deshidrogenasa lo cual genera productos colorimétricos.

7.13.6. Evaluación funcional

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

7.13.7. Análisis histológico.

A los 2 meses de evaluación funcional los animales se sometieron a una toracotomía bajo efecto anestésico y posteriormente se les aplicó heparina (1000 UI), para canular la aorta ascendente y perfundir vía intracardiaca primero con 100 mL de amortiguador de fosfatos, seguida de 200 mL de paraformaldehído amortiguado al 10 % con fosfatos. Al término de la perfusión se identificó el sitio de daño en la médula espinal y se extrajo tomando en cuenta 0.5 cm en dirección caudal y rostral respectivamente (aproximadamente

de 8 a 10 mm). Las muestras de tejido se mantuvieron incluidas en paraformaldehído hasta su posterior procesamiento.

Se realizó un procedimiento de deshidratación y posteriormente se utilizaron moldes de goma para incluir el tejido en parafina líquida, en posición vertical.

Una vez solidificados los cubos, se montaron en un micrótopo (Leica RM2125RT) y se hicieron cortes de 5µm de grosor hasta llegar al sitio de daño. Se seleccionaron las laminillas donde se ubicó el epicentro de la lesión. Se desparafinaron durante 20 minutos a 55 °C en la estufa.

7.13.7.1. Tinción con Hematoxilina & Eosina:

Se llevó a cabo un procedimiento de hidratación y de tinción con Hematoxilina de Harris & Eosina amarillenta de acuerdo con el método descrito por Luna, 1968. Se deshidrató y enseguida se montaron en las laminillas con resina sintética.

7.13.7.2. Tinción de Kliver-Barrera:

Calentar las laminillas previo a la hidratación seguido de la tinción con Luxol fast blue y Violeta de Cresio mediante el método descrito por Luna, 1968. Se deshidrató el tejido y enseguida se montaron en las laminillas con resina sintética.

Se tomaron fotografías con el microscopio (Leica MZ6) de 6 cortes por laminilla con el objetivo 4x y se calibró la imagen a 1mm con el programa Leica IM500. Para marcar el

área de daño y el área total se utilizó el software Fiji Image J. Posteriormente se realizó un análisis estadístico de ANOVA seguido de la prueba de Tukey con el programa Graph Pad Prism 5.0.

7.14. Consideraciones éticas.

Todos los procedimientos quirúrgicos y experimentales se realizaron con apego a la norma oficial mexicana para el uso de animales de laboratorio (NOM – 062 – ZOO – 1999) (Aluja, 2002) (Apéndice B), la Declaración Universal de los Derechos de los Animales (UNESCO, 1978) (Apéndice C) y las normas de la Ley General de Salud (1990) (Apéndice D) de acuerdo a las recomendaciones referentes al manejo de animales en proyectos de investigación y ciencia. Lo anterior consistió en evitar al máximo el sufrimiento de los animales incluidos en el estudio, tomando en cuenta la reducción del tamaño de muestra utilizada al mínimo necesario para el desarrollo de la investigación y cumpliendo con todas las características con las que debe contar un bioterio para realizar este tipo de experimentos.

8. RESULTADOS

8.1. Análisis de fenoles y flavonoides totales

En el análisis bioquímico se encontraron 6.5 mg Equivalentes al ácido gálico g⁻¹ peso seco de fenoles y 1.0 mg Equivalentes a quercetina g⁻¹ peso seco de flavonoides totales.

8.2. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

8.2.1. Ácidos fenólicos

Se analizó el contenido de ácidos fenólicos del extracto etanólico de las hojas de *M. oleifera*, mediante estándares de referencia. El análisis se realizó por triplicado, con un volumen de inyección de 20 µL (Figura 11 y Cuadro 1).

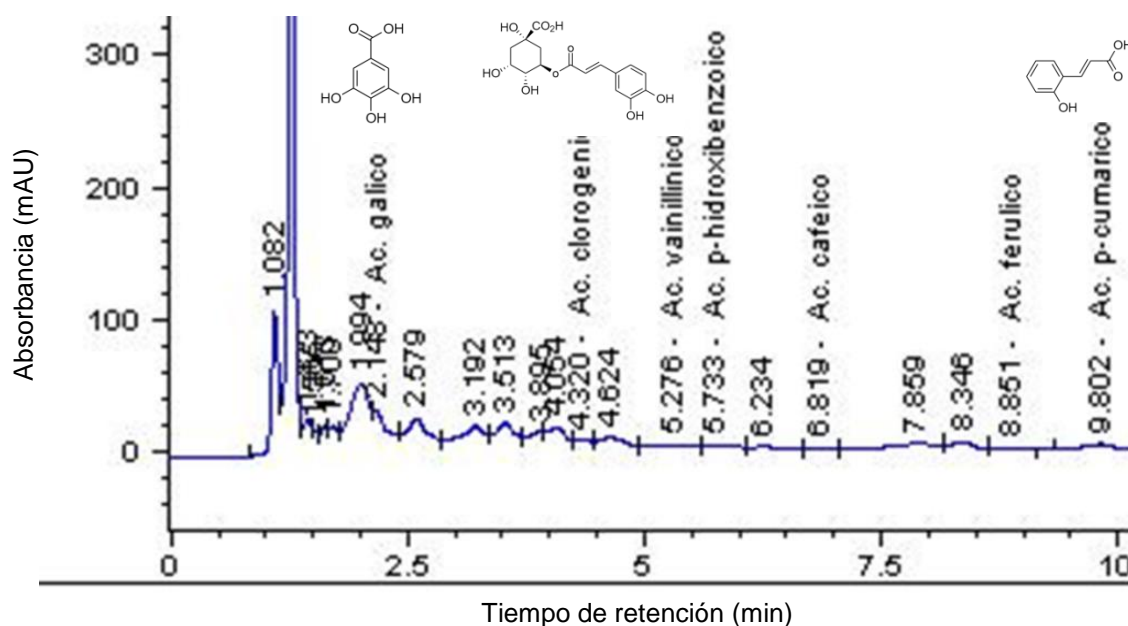


Figura 11. Cromatograma de ácidos fenólicos del extracto de *M. oleifera*. Se muestra la absorbancia y tiempo de retención con respecto a estándares de referencia.

Cuadro 1. Contenido de ácidos fenólicos obtenidos por HPLC.

Ácido fenólico	mg g⁻¹ peso seco
Gálico	0.841
Clorogénico	0.337
Siringico	0.099
p-hidroxibenzoico	0.146
Cafeico	0
Ferúlico	0.135
p-cumárico	0.660
Vainillínico	0

8.2.2. Flavonoides

Se analizó el contenido de flavonoides del extracto etanólico de las hojas de *M. oleifera*, mediante estándares de referencia. El análisis se realizó por triplicado, con un volumen de inyección de 20 μ L (Figura 12 y Cuadro 2).

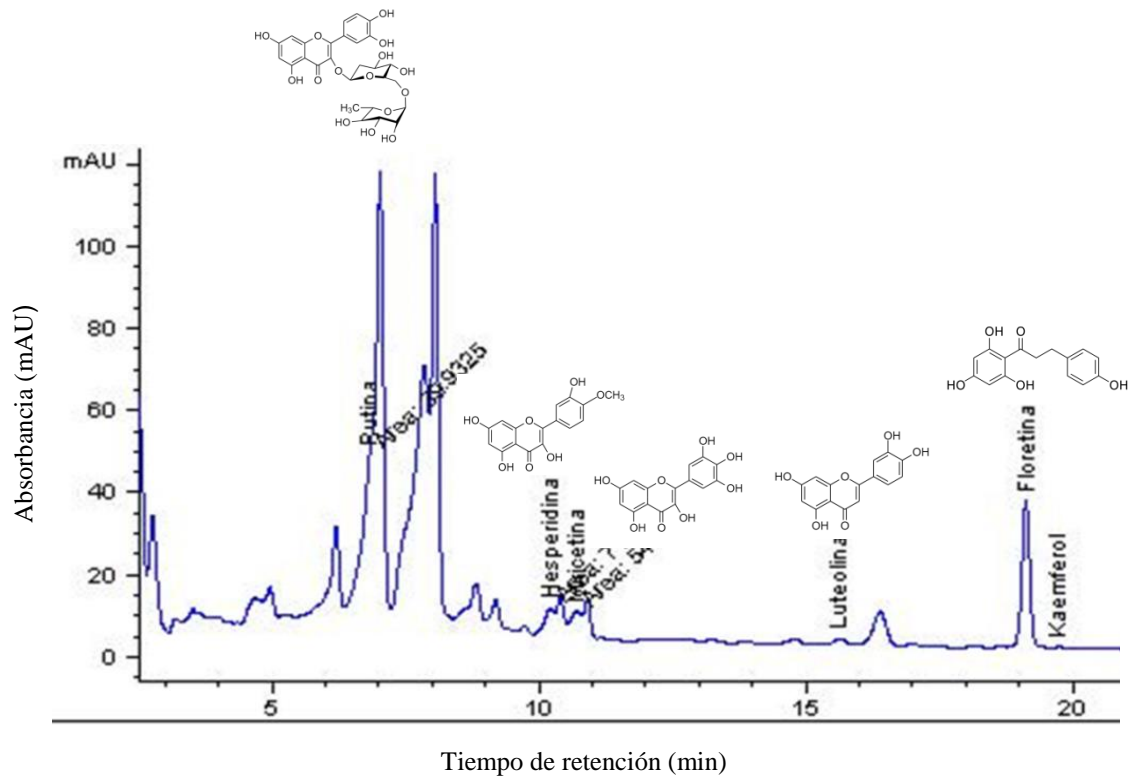


Figura 12. Cromatograma de flavonoides del extracto de *M. oleifera*. Se muestra la absorbancia y tiempo de retención con respecto a estándares de referencia

Cuadro 2. Contenido de flavonoides obtenido por HPLC.

Flavonoide	mg g ⁻¹ peso seco
Rutina	0.285
Hesperidina	89.617
Miricetina	0.931
Luteolina	2.017
Floretina	6.168
Kaempferol	1.381
Florizina	0
Quercetina	0
Maringenina	0

8.3. Capacidad antioxidante *in vitro*

8.3.1. Radical DPPH

Se analizó la capacidad antioxidante *in vitro* de tres concentraciones del extracto hidroalcohólico de *M. oleifera*; 0.05, 0.5 y 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (Cuadro 3) y mediante la siguiente fórmula se determinó el porcentaje de inhibición del radical DPPH:

$$\% \text{DPPH}_{\text{sc}} = \frac{(\text{Absorbancia control} - \text{Absorbancia muestra}) \times 100}{\text{Absorbancia control}}$$

Cuadro 3. Porcentaje inhibido del radical DPPH a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *M. oleifera* al 70%

Concentración muestra ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Absorbancia	Concentración de inhibición de DPPH	%Inhibido
0.05	0.459	0.061	43.88
0.5	0.080	0.010	90.22
1	0.127	0.016	84.47

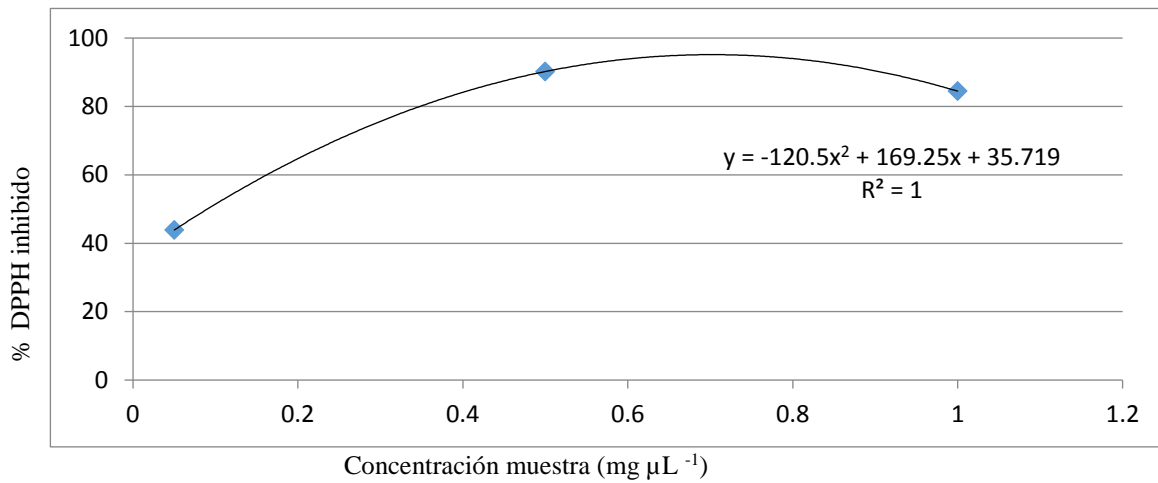


Figura 13. Curva de CI 50 de radical DPPH

A través de la ecuación de la curva se obtuvo la concentración media inhibitoria (CI50) de 0.09 mg μL⁻¹ del extracto hidroalcohólico de *M. oleifera* y un máximo porcentaje de inhibición de 90.22 a una concentración de 0.5 μL mL⁻¹ (Figura 13).

8.4. Efecto de la administración del extracto hidroalcohólico en el modelo de lesión traumática de médula espinal en rata

8.4.1. Evaluación bioquímica en tejido de médula espinal

8.4.1.1. Lipoperoxidación

En la Figura 14 se muestran los niveles de malondialdehído en tejido de médula espinal a las 24 horas después de la LTME de los grupos experimentales mostrando un aumento significativo del grupo de LTME (0.056 ± 0.020) con respecto a sanas (0.030 ± 0.003), MPSS (0.025 ± 0.005) y *M. oleifera* (0.024 ± 0.006) ($p < 0.05$).

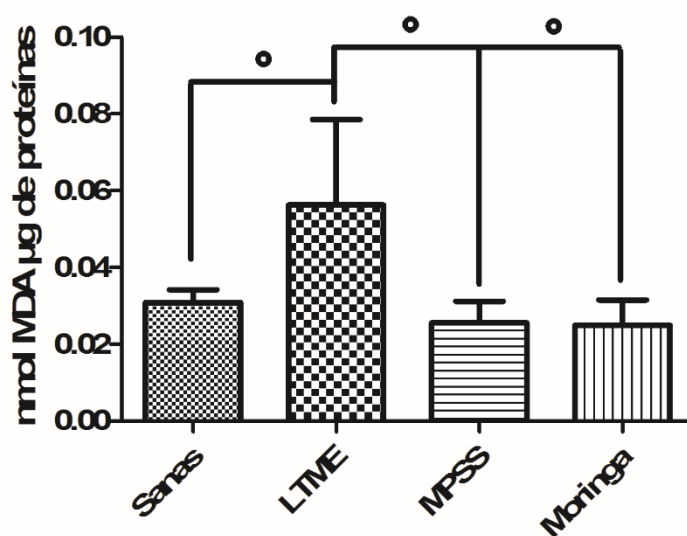


Figura 14. Representación del promedio \pm DE de los niveles de malondialdehído (MDA) en tejido de médula espinal a las 24 horas después de la LTME de los grupos de ratas sanas, LTME, MPSS y *M. oleifera* ($n=7$). ANOVA seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

8.4.1.2 Radical hidroxilo

En la Figura 15 se muestran los niveles de radical hidroxilo en tejido de médula espinal a las 24 horas después de la LTME, donde el grupo de LTME aumentó de manera significativa comparado con el grupo de sanas (0.05 ± 0.04), LTME (0.16 ± 0.06), MPSS (0.06 ± 0.03) y *M. oleifera* (0.06 ± 0.01) ($p < 0.05$).

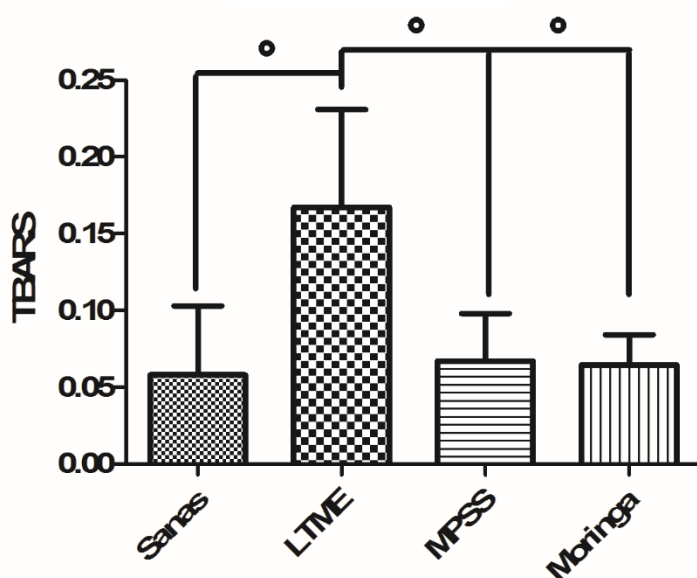


Figura 15. Representación del promedio \pm DE de los niveles de radical hidroxilo (radical OH) en tejido de médula espinal a las 24 horas después de la LTME de los grupos de ratas sanas, LTME, MPSS y *M. oleifera* (n=7). ANOVA seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

8.4.2. Evaluación bioquímica de muestras de plasma sanguíneo

8.4.2.1. Creatinina

En la Figura 16 se muestran los niveles de creatinina a las 24 horas, 7 días, 30 días y 60 días posterior a la LTME. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en ningún tiempo, sin embargo, al comparar el tiempo experimental de los 7 días ($p < 0.05$) con los tiempos de 24 horas, 30 días y 60 días tuvieron diferencia significativa.

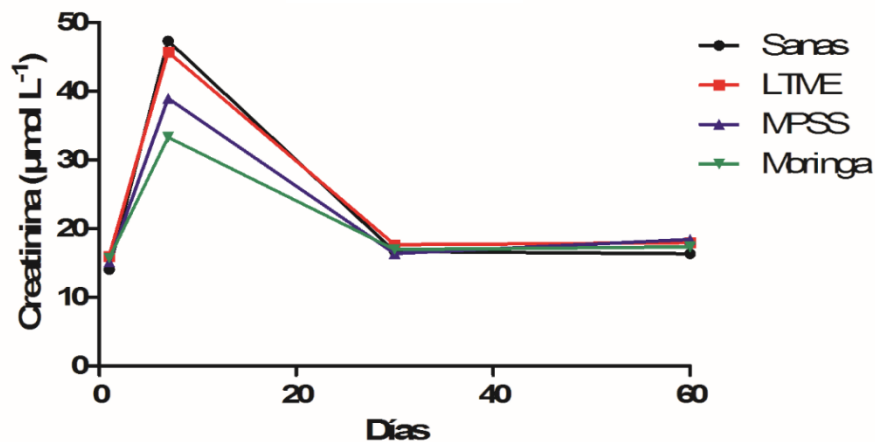


Figura 16. Niveles de creatinina en plasma a través de los dos meses de los grupos de ratas sanas, LTME, MPSS y *M. oleifera* (n=7). ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

8.4.2.2. Lactato

En la Figura 17 se muestran los niveles de lactato en plasma sanguíneo a las 24 h después de la LTME. Se observa una tendencia a aumentar en el grupo de LTME (70.67 ± 22.64), MPSS (122.3 ± 49.27) y *M. oleifera* (97.04 ± 37.75) en relación a las ratas sanas (37.89 ± 12.71). Y un aumento significativo en el grupo de MPSS (122.3 ± 49.27) con respecto al grupo de ratas sanas (37.89 ± 12.71) ($p < 0.05$).

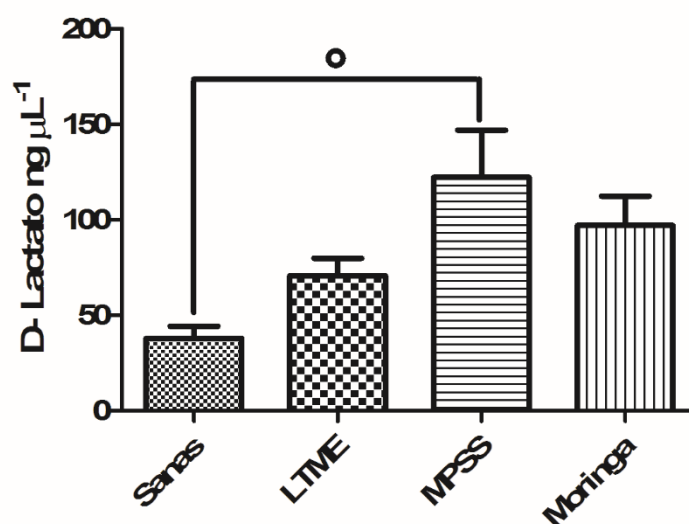


Figura 17. Niveles de lactato en plasma de los grupos de ratas sanas, LTME, MPSS y *M. oleifera* (n=7). ANOVA seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

8.4.3. Evaluación funcional motora

En la Figura 18 se observa el comportamiento de la evaluación motora a través de los dos meses de evaluación de los grupos experimentales. Se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo tratado con *M. oleifera* (10.90) y MPSS (7.96) a favor de la recuperación motora, aunque comparado con el grupo con LTME (8.54) este último tuvo mayor recuperación comparado con el grupo de MPSS.

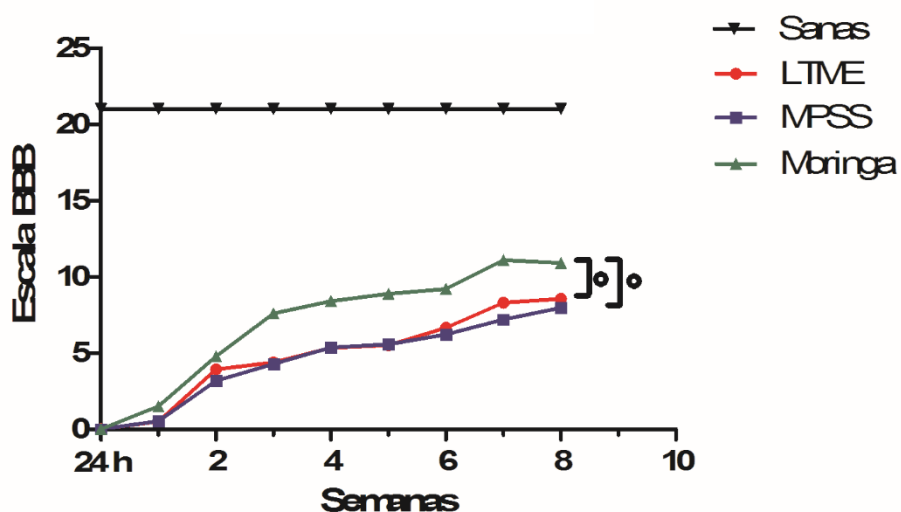


Figura 18. Se observa el valor promedio de la recuperación motora de los miembros posteriores de las ratas de los grupos experimentales durante las 8 semanas posterior a la LTME. Cada grupo conformado por una $n=9$, ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

8.4.3.1. Prueba funcional BBB

En la Figura 19 se muestran fotografías representativas de una rata representativa del puntaje de cada grupo experimental durante la evaluación con la escala BBB. Se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo tratado con *M. oleifera* (10.90) y MPSS (7.96) mejorando la recuperación motora comparado con el grupo de LTME (8.54).

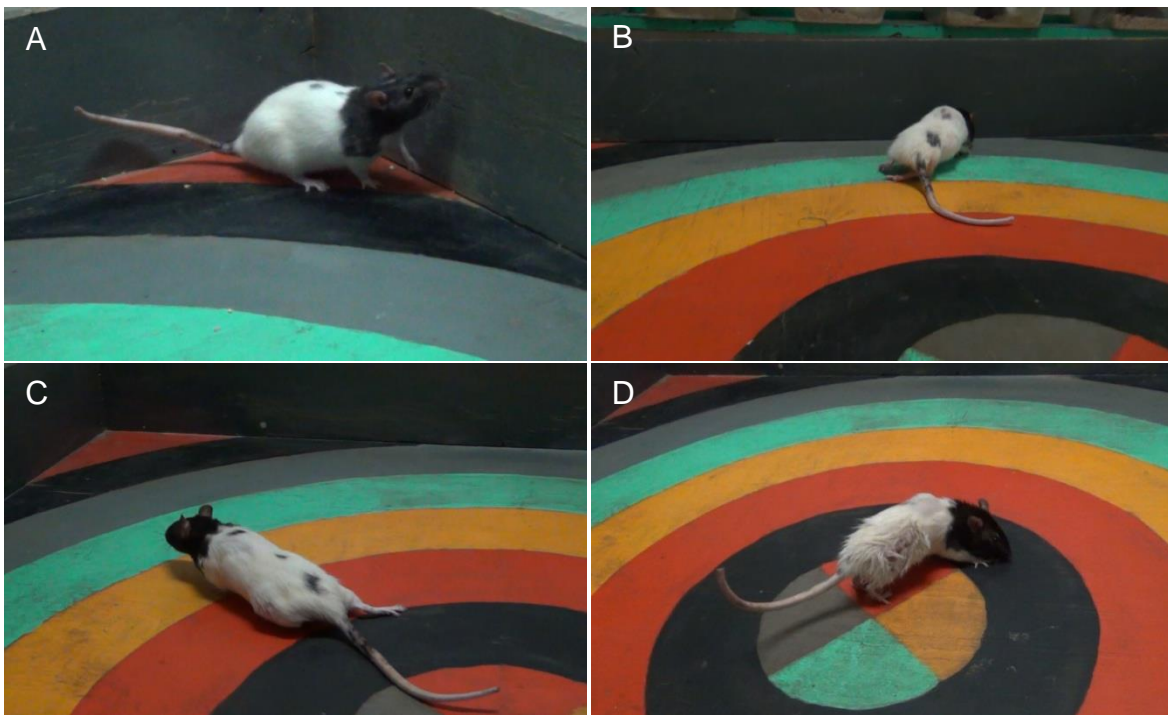


Figura 19. Fotografías de una rata representativa por grupo experimental reflejando el puntaje de la evaluación BBB, SANA (21), LTME (8.54), MPSS (7.96) y *M. oleifera* (10.90).

8.4.4. Evaluación del peso

Se muestra en la Figura 20 el comportamiento en general del peso de los animales de cada semana durante las 8 semanas, observando diferencias significativas ($p < 0.05$) del grupo de *M. oleifera* (249.2 ± 11.97) que disminuyó significativamente el peso con respecto al de MPSS (257.8 ± 10.91), LTME (260.5 ± 9.18) y sanas (267.2 ± 12.24), por otro lado el grupo de MPSS disminuyó con respecto al de ratas sanas.

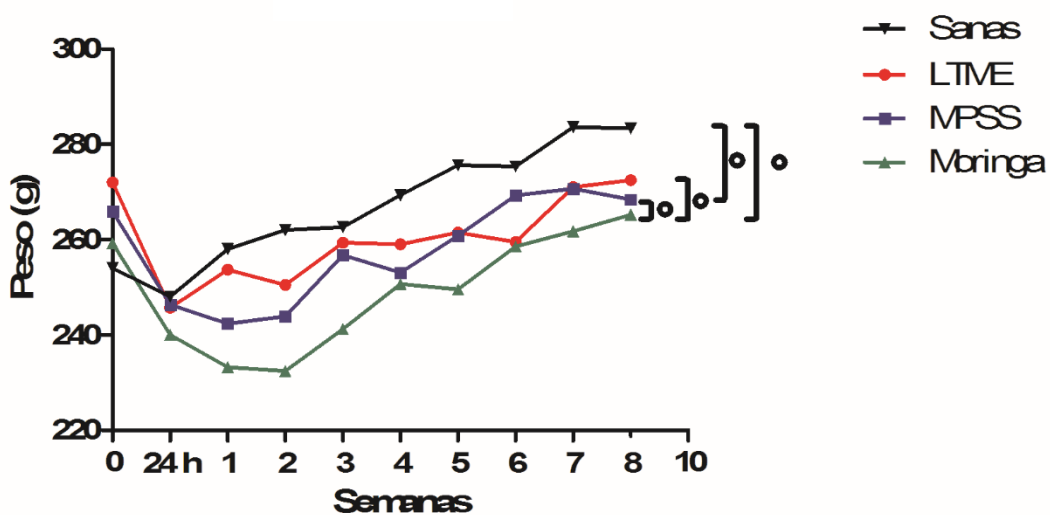


Figura 20. Se observa el valor promedio del peso de las ratas de los grupos experimentales de cada semana durante los dos meses ($n=9$). ANOVA de medidas repetidas seguida de la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

8.4.5. Evaluación histológica

8.4.5.1. Tejido de médula espinal preservado

En la Figura 21 observa el área del tejido medular preservado de los grupos experimentales, se obtuvieron diferencias significativas entre LTME (0.43 ± 0.10), MPSS (0.31 ± 0.06) y *M. oleifera* (0.57 ± 0.09) con respecto a sanas (3.42 ± 0.02) y el grupo de *M. oleifera* con respecto al grupo de MPSS ($p < 0.05$) a favor del aumento del área de tejido medular preservado.

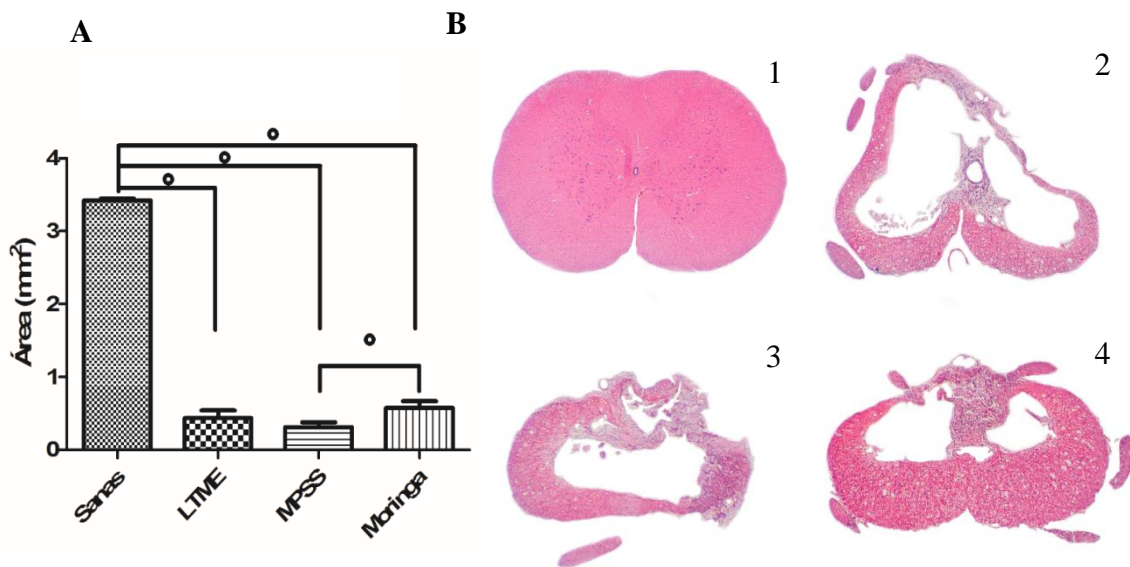


Figura 21. A. Se muestra el valor promedio \pm DE del área del tejido medular preservado mediante la tinción de Hematoxilina & Eosina de cada grupo experimental $n = 9$, al finalizar los dos meses de evaluación funcional; B. Se muestran fotografías representativas de los cortes histológicos de cada grupo experimental que muestra el tejido preservado: 1) Sana, 2) LTME, 3) MPSS, 4) *M. oleifera*. ANOVA seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

8.4.5.2. Materia blanca preservada

Se observa en la Figura 22 el área del tejido de la materia blanca que se preservó en los diferentes grupos de experimentación. Mostrando disminuir en los grupos experimentales comparado con las ratas sanas (2.25 ± 0.019), sin embargo el grupo de *M. oleifera* (1.16 ± 0.19) aumentó de manera significativa comparado con el grupo de MPSS (0.44 ± 0.14) y LTME (0.70 ± 0.18). El grupo de MPSS tuvo tendencias a disminuir comparado con el grupo de LTME ($p < 0.05$).

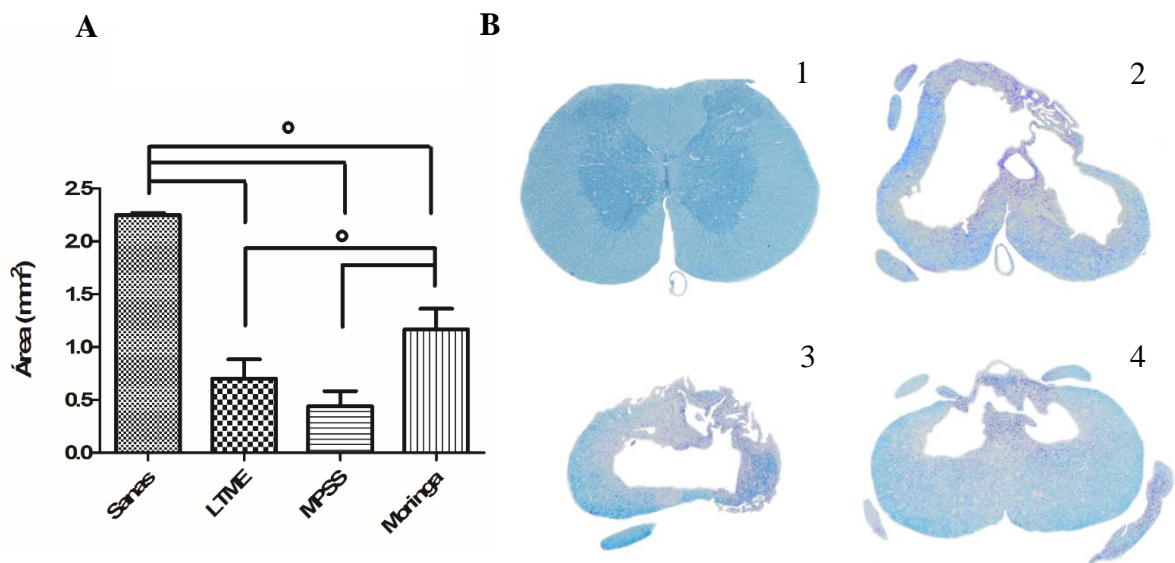


Figura 22. A. Se muestra el valor promedio \pm DE del área de materia blanca preservada mediante la tinción de Kliver-Barrera de cada grupo experimental $n=9$, al finalizar los dos meses de evaluación funcional; B. Se muestran fotografías representativas de los cortes histológicos de cada grupo experimental que muestra la materia blanca preservada: 1) Sana, 2) LTME, 3) MPSS, 4) *M. oleifera*. ANOVA seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

9. DISCUSIÓN

Las hojas de *M. oleifera* contienen una gran variedad de compuestos como ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides, glucosinolatos, isotiocianatos, taninos, vitaminas y proteínas; los cuales son de interés terapéutico y nutricional (Abdull *et al.*, 2014; Leone *et al.*, 2015).

Recientemente se ha demostrado que extractos de las hojas de *M. oleifera* tienen un impacto positivo en enfermedades neurodegenerativas. En particular los flavonoides como ácido gálico, rutina, luteolina, floretina, hesperidina y miricetina, los cuales ejercen un potente efecto en el sistema nervioso central, por diferentes mecanismos (Wu *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2015, Matias *et al.*, 2016, Jaeger *et al.*, 2017).

En el presente estudio se analizaron de manera preliminar los ácidos fenólicos y flavonoides en *M. oleifera*. Se observó que el contenido de ácidos fenólicos (6.5 mg g^{-1}) y flavonoides (1.0 mg g^{-1}), los cuales son menores comparado a lo reportado por Vongsak *et al.*, (2013) sobre ácidos fenólicos totales (53 mg g^{-1}) y flavonoides (0.251 mg g^{-1}). A pesar de realizar una metodología similar de extracción y medición que el autor, se ha reportado sobre la influencia de las condiciones climáticas, método de cultivo, etapa de crecimiento, altura de la planta, exposición a rayos UV, herbivoría y daños por agentes patógenos, los cuales influyen de manera directa en las concentraciones de metabolitos secundarios, en específico se ha observado en fenoles y flavonoides de las hojas de *M. oleifera* (Leone *et al.*, 2015; Cabrera *et al.*, 2017).

Para el caso del ácido ferúlico su concentración fue similar a estudios previos (0.128 mg g^{-1}) (Singh *et al.*, 2014). No obstante, la cantidad de ácido gálico (1.034 mg g^{-1}) y ácido clorogénico (0.489 mg g^{-1}) detectada fue menor a lo reportado (Singh *et al.*, 2014; Prakash

et al., 2007). Los compuestos ácido siríngico y el ácido *p*-cumárico no se ha detectado en extractos hidroalcohólicos de las hojas de *M. oleifera* (Zhang *et al.*, 2011). El ácido cafeico y vainillínico no se detectaron en este estudio, sin embargo, en otros estudios se han reportado 0.536 mg g⁻¹ peso seco de ácido cafeico (Zhang *et al.*, 2011) y 0.128 mg g⁻¹ peso seco de ácido ferúlico (Singh *et al.*, 2009). En el caso del ácido *p*-hidroxibenzoico no se tienen reportes de su presencia en *M. oleifera*.

Para el caso de los principales flavonoides se mencionan compuestos como la miricetina, quercetina y kaempferol son de los más abundantes en las hojas de *M. oleifera* (Leone *et al.*, 2015). Y se han encontrado en diferentes concentraciones, kaempferol (0.198 mg g⁻¹ peso seco) (Singh *et al.*, 2009), quercetina (0.807 mg g⁻¹ peso seco) (Siddhuraju y Becker, 2003) y kaempferol (0.198 mg g⁻¹ peso seco) en extractos acuosos. Por otro lado, la miricetina (5.804 mg g⁻¹ peso seco) se ha detectado en extractos metanólicos (Singh *et al.*, 2009) y referente al metabolito luteolina no hay reportes de su presencia en extractos hidroalcohólicos y no se ha detectado en extractos metanólicos (Coppin *et al.*, 2013). En otros estudios la rutina (1.674 mg g⁻¹ peso seco) (Zhang *et al.*, 2011) se ha encontrado en concentraciones más altas comparado con lo detectado en este estudio. De los compuestos en mayor concentración detectados en este estudio se encuentran la floretina y la hesperidina, los cuales no se han detectado en otros reportes sobre *M. oleifera*.

El efecto antiradical *in vitro* a bajas concentraciones se mostró semejante a lo reportado por Vongsak *et al.*, (2013) (CI 0.062 mg μL⁻¹), otorgado a la presencia de grupos hidroxilo de los diversos compuestos que donan electrones y neutralizan ERO (Singh *et al.*, 2014).

En el modelo animal de LTME, el extracto de *M. oleifera* mostró limitar el proceso de lipoperoxidación y los niveles de radical OH en tejido de médula espinal de la misma manera que MPSS. Por un lado, el efecto de MPSS sobre la limitación de la lipoperoxidación y la formación de radical OH es indirecto, lo hace promoviendo la síntesis de lipocortina el cual inhibe la activación de la fosfolipasa A2, la cual causa vasoconstricción, agrava el proceso isquémico, provoca la hidrólisis de fosfolípidos y favorece la producción de ERO. También ha demostrado inhibir citoquinas proinflamatorias, eicosanoides y COX 2 (Hall *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2008; Celik *et al.*, 2016). Sin embargo, MPSS tiene un efecto negativo sobre la regeneración axonal, y más recientemente, se ha investigado que promueve la atrofia del músculo esquelético lo cual repercute directamente sobre la recuperación funcional motora, y aunque en este estudio tiene un efecto significativo limitando la lipoperoxidación, mostró tendencia a disminuir la cantidad de tejido de médula espinal con respecto al grupo de LTME y de *M. oleifera*.

El extracto de *M. oleifera* se ha probado en diferentes condiciones patológicas como resistencia al nado forzado (Lamou *et al.*, 2016), disturbios del comportamiento (Otomoso *et al.*, 2018), hepatotoxicidad (Singh *et al.*, 2014) y en evento vascular cerebral (Kirisattayakul *et al.*, 2013) y se ha observado que limita la lipoperoxidación y aumenta la concentración de enzimas antioxidantes, los mecanismos de acción pueden ser muy diversos. Por un lado, *M. oleifera* posee compuestos neurotróficos promoviendo la plasticidad neuronal además de su efecto antiinflamatorio por la regulación de citoquinas proinflamatorias como IL - 1 β , IL 6 y TNF - α (Vasanth *et al.*, 2015; Waterman *et al.*, 2015), la presencia de compuestos como la rutina ha mostrado disminuir la expresión de la

proteína inflammasoma NLRP2 después de una lesión de médula espinal (Wu *et al.*, 2016). Lo cual favorece la recuperación motora.

En relación a los niveles de creatinina en plasma sanguíneo se observaron sin cambios en todos los grupos experimentales, aunque se observó una tendencia a aumentar a los 7 días. Por lo tanto se sugiere que los niveles de creatinina en plasma no son un parámetro de los cambios en la masa muscular posterior a la LTME. Comparado con reportes previos en pacientes con LTME mostrando niveles de creatinina en suero más bajos significativamente con respecto a pacientes sanos, los autores infieren este comportamiento como resultado de la atrofia muscular después de una LTME (Koçak *et al.*, 2005; Sepahpanah *et al.*, 2006). Sin embargo, en el modelo animal realizado en el presente trabajo no se encontró ningún cambio. Posiblemente debido al tiempo transcurrido tras la LTME, comparado con lo que se ha observado en los pacientes con LTME crónica (Koçak *et al.*, 2005; Sepahpanah *et al.*, 2006).

En procesos inflamatorios, de isquemia, y en lesiones como en el músculo esquelético, incrementa el metabolismo anaeróbico de la glucosa, y la liberación de protones por hidrólisis de ATP provocan la disminución del pH de los tejidos, generando mayor daño en las células y alteración en su función, dando lugar a la acidosis láctica (Chu *et al.*, 2014). En este estudio los niveles de lactato aumentaron significativamente en el grupo de MPSS comparado con el grupo de ratas sanas, mientras en el grupo de *M. oleifera* y el grupo de LTME se mostró una tendencia a aumentar con respecto al grupo de ratas sanas. Se sabe que los glucocorticoides, entre ellos la MPSS, ha mostrado generar atrofia muscular tras su administración aguda, ejerciendo una sobreexpresión de la enzima NF- κ B

kinasa inducible, asociada a generar catabolismo muscular y por lo tanto proteólisis (Fry *et al.*, 2016).

En relación con la evaluación funcional motora del grupo de *M. oleifera* con un puntaje de 10.90 en la escala BBB a los dos meses de evaluación mostró mayor recuperación comparado con respecto al grupo de LTME (8.54) y MPSS (7.96). Los animales del grupo de *M. oleifera* mostraron soporte del tren posterior ocasional o frecuentemente dando pasos apoyando la pata, sin coordinación de las patas anteriores con respecto a las posteriores, sin embargo algunos lograron levantar la cola, el cual es un signo relevante de equilibrio.

En el grupo de MPSS (7.96) se observó movilidad de tres articulaciones y arrastre con imposibilidad de soportar el tren posterior. Se mostró un comportamiento similar en el grupo de LTME (8.54) con la diferencia en algunos animales presentaron soporte del tren posterior por un instante y en algunos casos daban pasos. Entre ambos grupos no se encontraron diferencias significativas. Tal comportamiento se ha observado en otros estudios recientes (Pereira *et al.*, 2009; Farsi *et al.*, 2015).

En relación al peso, se observó una disminución de todos los grupos experimentales comparado con las ratas sanas. El grupo de *M. oleifera* fue el que más disminuyó de peso, dejando ver un comportamiento contrario a lo que se esperaba en esta investigación. Con el objetivo de mejorar el metabolismo muscular, se sustentó el efecto nutritivo por el alto contenido proteico y de aminoácidos de las hojas de *M. oleifera* (Thurber y Fahey 2009; Asiedu *et al.*, 2014; Nouman *et al.*, 2016) así como su uso de manera tradicional para combatir la desnutrición en personas (Gupta *et al.*, 2018), como forraje y suplemento proteínico para favorecer la ganancia de peso en ganado de engorde (Pérez *et al.*, 2010;

Martín *et al.*, 2013). En este estudio, posiblemente *M. oleifera* predominó su efecto antiinflamatorio, al favorecer la disminución de la obesidad neurogénica que se puede presentar posterior a una LTME, en donde ocurre una inflamación sistémica por liberación de citoquinas proinflamatorias y adiponectinas (Farkas *et al.*, 2018).

En el presente estudio el grupo de *M. oleifera* limitó la lipoperoxidación y la formación de radical OH, lo cual se reflejó en una mayor recuperación funcional motora, mayor área de tejido preservado y de materia blanca. Dicho efecto sobre la preservación de tejido de la médula espinal y mayor recuperación funcional motora, probablemente esté relacionado con la regulación de la glía reactiva, el cual es un mecanismo protector en fases subagudas de la LTME que aumenta la regulación de citoquinas proinflamatorias, TNF – α , TNF – β , pero implica daños colaterales e irreversibles en la cronicidad de la LTME, dejando a su paso una cicatriz glial, impidiendo la regeneración axonal y recuperación funcional (Jaeger *et al.*, 2017).

Sumado a su efecto antiapoptótico (Giacoppo *et al.*, 2015), podría favorecer la preservación de fibras nerviosas de tractos propioespinales, retículo espinales y rubro espinales, relacionadas con la reorganización de conexiones supra e infra espinales al sitio de daño.

Actualmente los flavonoides han captado atención en investigaciones de enfermedades neurológicas, ejerciendo efecto positivo sobre procesos de neuroinflamación, modulación de la neurotransmisión, plasticidad, a través del aumento de factores neurotróficos, aumento de la función sináptica, regulación de citoquinas proinflamatorias, regulación de astrogliosis y micorgliosis, aumento de la respuesta antioxidante y disminuir EROS (Matias *et al.*, 2016). Los metabolitos secundarios luteolina, rutina y kaempferol han

mostrado regular la glía reactiva, disminuir mediadores proinflamatorios y NF – KB (Spagnuolo *et al.*, 2018; Jaeger *et al.*, 2017). En otros estudios la floretina ha mostrado un efecto importante sobre la generación de la plasticidad disminuyendo GFAP y aumentando BDNF en cerebros de ratas con amnesia (Ghumatkar *et al.*, 2015).

Además se ha investigado que la floretina aumenta la regulación del factor Nrf2, relacionado con la expresión de enzimas antioxidantes, en un modelo de lesión por isquemia / reperfusión cerebral en ratas (Liu *et al.*, 2015).

La investigación sobre plantas medicinales que promuevan la recuperación de tejido muscular y neuroprotectoras, son importantes en el estudio de la LTME. En este trabajo el efecto de *M. oleifera* parece estar muy ligado a la preservación de fibras nerviosas y plasticidad, además de no mostrar efectos deletéreos comparado con los animales tratados con MPSS, que en este último caso, a pesar de su excelente efecto limitando la lipoperoxidación, parece promover el daño muscular y repercutir negativamente sobre la regeneración axonal.

10. CONCLUSIONES

El efecto de extractos de hojas de *Moringa oleifera* probados en un modelo animal con lesión traumática de médula espinal mostró limitar la lipoperoxidación y los niveles de radical hidroxilo de la misma manera que el grupo de metilprednisolona. El extracto de *Moringa oleifera* Lamarck mostró mejorar la función motora lo cual se reflejó en una mayor preservación de tejido y de sustancia blanca de médula espinal, aunque mostró disminuir el peso de los animales. En el presente trabajo se sustenta el uso de extractos de *M. oleifera* como una alternativa prometedora en el tratamiento de la lesión traumática de médula espinal.

11. LITERATURA CITADA

Abdull, A.F., Ibrahim, M.D., y Kntayya, S.B. (2014). Health benefits of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 15(20), 8571 - 8576.

Adedapo, A., Falayi O., y Oyagbemi, A.A. (2015). Evaluation of the analgesic, antiinflammatory, anti-oxidant, phytochemical and toxicological properties of the methanolic leaf extract of commercially processed *Moringa oleifera* in some laboratory animals. *Journal of Basic and clinical Physiology and Pharmacology*, 26(5), 491 - 499.

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

Asiedu, I.J., Frimpong, S., Awortw,e C., Antwi, D.A., y Nyarko, AK. (2014). Micro- and Macroelemental composition and safety evaluation of the nutraceutical *Moringa oleifera* leaves. *Journal of Toxicology*, 2014, 1 - 13.

Ayala, M.A., Muñoz, F., y Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1 - 31.

Bakre, A.G., Aderibigbe, A.O., y Ademowo, O.G. (2013). Studies on neuropharmacological profile of ethanol extract of *Moringa oleifera* leaves in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(3), 783 - 9.

Basso, D.M., Beattie, M.S., y Bresnahan, J.C. (1996). Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Experimental Neurology*, 139 (2), 244 - 56.

Bracken, M.B., Shepard, M.J., Collins, W.F., Holford, T.R., Youn,g W., Baskin, D.S., *et al.* (1990). A randomized controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal cord injury. *The New England Journal of Medicine*, 322(20), 1406 - 1411.

Bracken, M.B., Shepard, M.J., Holford, T.R., Leo – Summers, L., Aldrich ,E.F., Fazl, M., *et al.*, (1997). Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. *National Acute Spinal Cord Injury Study. JAMA*, 277(20), 597 - 604.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248 - 254.

Cabrera-Carrión JL., C. Jaramillo-Jaramillo, F. Dután-Torres, J. Cun-Carrión, PA. García, A. L. Rojas. (2017). Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam. En función de su edad y altura. *Bioagro*, 29, 53 - 60.

Carocho, M., y Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15 - 25.

Celik, H., M. Karatay, Y. Erdem, A. E. Yildirim, I. Sertbas, E. Karatay, H., y Kul, Y. (2016). The Biochemical, Histopathological and Clinical Comparison of the Neuroprotective Effects of Subcutaneous Adalimumab and Intravenous Methylprednisolone in an Experimental Compressive Spinal Cord Trauma Model. *Turkish Neurosurgery*, 26(4), 622 - 31.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., y Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178 - 182.

Chu, X.P., Grasing, K.A., y Wang, J.Q. (2014). Acid-sensing ion channels contribute to neurotoxicity. *Translational Stroke Research*, 5(1), 69 - 78.

Coppin, J.P., Xu Y., Chen, H. Pan M.H., Ho, C.T., Juliani R., Simon, J.E., y Wu, Q. (2013). Determination of flavonoids by LC/MS and anti-inflammatory activity in *Moringa oleifera*. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1892 - 1899.

Czerska, M., Mikołajewska, K., Zieliński, M., Gromadzińska, J., y Wąsowicz, W.. (2015). Today's oxidative stress markers. *Medycyna Pracy*, 66(3), 393 - 405.

Díaz, R.A., Guízar, S.G., y Ríos, C.C., (2002). Estrategias neuroprotectoras después de una lesión traumática de la médula espinal. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 40 (5), 437 - 455.

Estrada, M.S., Carreón, R.A., Parra, C.M., Ibarra, P.C., Velasquillo, M.C., Vacanti, C.A., et al., (2007). Lesión de médula espinal y medicina regenerativa', *Salud pública de México*, 49(6), 437- 444.

Evaniew, N., Belley-Côté, E.P., Fallah, N., Noonan, V.K., Rivers, C.S., y Dvorak, M.F. (2016). Methylprednisolone for the Treatment of Patients with Acute Spinal Cord Injuries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JOURNAL OF NEUROTRAUMA*, 33 (5), 468 - 481.

Farkas, G.J., Gorgey, A.S., Dolbow, D.R., Berg, A.S., y Gater, D.R. (2018). The influence of level of spinal cord injury on adipose tissue and its relationship to inflammatory adipokines and cardiometabolic profiles. *Journal of Spinal Cord Medicine*, 41(4), 407 - 415.

Farooqui, A. A. (2018). Chapter 4 - Molecular Aspects of Spinal Cord Injury. *Ischemic and Traumatic Brain and Spinal Cord Injuries*, 155 – 195, Ohio, United States: Academic press.

Farsi L, Zadeh, M.N., Afshari, K., Norouzi-Javidan, A., Ghajarzadeh, M., Naghshband, Z., y Keshavarz, M. (2015). Effects of Combining Methylprednisolone with Magnesium Sulfate on Neuropathic Pain and Functional Recovery Following Spinal Cord Injury in Male Rats. *Acta Medica Iranica*, 53(3), 149 - 157.

Fatima, G., Sharma, V.P., Das, S.K., Mahadi, A.A. (2015). Oxidative stress and antioxidative parameters in patients with spinal cord injury: implications in the pathogenesis of disease. *Spinal cord*, 53 (1), 3 - 6.

Fry, C.S., Nayeem, S.Z., Dillon, E.L., Sarkar, P.S., Tumurbaatar, B., Urban, R.J., Wright, T.J., Sheffield-Moore, M., Tilton, R.G., Choudhary, S. (2016). Glucocorticoids increase skeletal muscle NF- κ B inducing kinase (NIK): links to muscle atrophy. *Physiological Reports*, 4(21), 1 - 13.

Ghumatkar, P., Patil, S., Jain, P., Tambe, R., y Sathaye, S. (2015). Nootropic, neuroprotective and neurotrophic effects of phloretin in scopolamine induced amnesia in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 135, 182 - 191.

Giacoppo, S., Galuppo M., de Nicola, G.R., Iori, R., Bramanti, P., y Mazzon, E. (2015). 4(a-L-Rhamnosyloxy)-benzyl isothiocyanate, a bioactive phytochemical that attenuates secondary damage in an experimental model of spinal cord injury. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23, 80 - 88.

Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345 - 91.

Gupta, S., Jain, R., Kachhwaha, S., and Kothari, S. L. (2018). Nutritional and medicinal applications of *Moringa oleifera* Lam.—Review of current status and future possibilities. *Journal of Herbal Medicine*, 11, 1 - 11.

Hall, E. D. (2011). Antioxidant Therapies for Acute Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics*, 8(2), 152 - 167.

Hall E, Yonkers P, Taylor B, and Sun, F. (1995). Lack of Effect of Postinjury Treatment with Methylprednisolone or Tirilazad Mesylate on the Increase in Eicosanoid Levels in the Acutely Injured Cat Spinal Cord. *Journal of Neurotrauma*, 12(3), 245 - 256.

Hall, E.D., y Springer, J.E. (2004). Neuroprotection and Acute Spinal Cord Injury: A Reappraisal. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1(1), 80 - 100.

Hannan, M.A., Kang, J.Y., Mohibbullah, M, Hong, Y.K., Lee, H., Choi, J.S., *et al.*, (2014). *Moringa oleifera* with promising neuronal survival and neurite outgrowth promoting potentials. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(1), 142 - 150.

Hsu, K.C., Hsu P.F., Chen, Y.C., Lin, H.C., Huang, C.C., Chena, P.C., *et al.*, (2016). Oxidative stress during bacterial growth characterized through microdialysis sampling coupled with HPLC/fluorescence detection of malondialdehyde. *Journal of Chromatography B*, 1019, 112–116.

Ijarotimi, O.S., Adeoti, O.A., y Ariyo, O. (2013). Comparative study on nutrient composition, phytochemical, and functional characteristics of raw, germinated, and fermented *Moringa oleifera* seed flour. *Food Science & Nutrition*, 1 (6), 452 - 463.

Jaeger, B.N., Parylak, S.L., y Gage, F.H. (2018). Mechanisms of dietary flavonoid action in neuronal function and neuroinflammation. *Molecular Aspects of Medicine*, 61:50-62.

Kirisattayakul, W., Wattanathorn, J., y Tong-Un, T., Muchimapura S., Wannanon P., Jittiwat J. (2013). Cerebroprotective effect of *Moringa oleifera* against focal ischemic stroke induced by middle cerebral artery occlusion. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1 - 10.

Koçak, H., Öner-İyidoğan, Y., Gürdöl, F., Koçak, T., y Esin, D. (2005). The relation between serum MDA and cystatin C levels in chronic spinal cord injury patients. *Clinical Biochemistry*, 38(11), 1034 - 1037.

Lamou, B., Sotoing, G., Hamadou, A., Abene, Houlray J, Mey, M, *et al.* (2016). Antioxidant and antifatigue properties of the aqueous extract of *Moringa oleifera* in rats subjected to forced swimming endurance test. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1 - 9.

Lee, S., Park, S., Won, J., Lee, S.-R., Chang, K.T., y Hong, Y. (2015). The Incremental Induction of Neuroprotective Properties by Multiple Therapeutic Strategies for Primary and Secondary Neural Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 19657 - 19670.

Lee, JM, Yan, P, Xiao, Q, Chen, S, Lee, KY, Hsu, CY, *et al.*, (2008). Methylprednisolone protects oligodendrocytes but not neurons following spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 28(12), 3141-3149.

Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., y Bertoli, S. (2015). Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of *Moringa oleifera* Leaves: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6): 12791-12835.

Ley General de Salud de la República Mexicana. (1990). Título Séptimo: De la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación. Porrúa. 6^{ta} Edición. México D. F, 430 - 431.

Li, N., y Leung, G.K. (2015). Oligodendrocyte Precursor Cells in Spinal Cord Injury: A Review and Update. *Biomed Research International*, 2015, 1 - 20. DOI: 10.1155/2015/235195.

Ligor, M., Olszowy, P., y Buszewski, B. (2011). Application of medical and analytical methods in Lyme borreliosis monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(7), 2233 - 2248.

Liu, Y., Zhang, L., Liang, J. (2015). Activation of the Nrf2 defense pathway contributes to neuroprotective effects of phloretin on oxidative stress injury after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Journal of the Neurological Sciences*, 351(1-2), 88 - 92.

Luna, L. G. (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. (2a. ed.). New York: Blakiston Division, McGraw-Hill.

Lv, Y., Glahn, R. P., Hebb, R. L., y Rizvi, S. S. (2018). Physico-chemical properties, phytochemicals and DPPH radical scavenging activity of supercritical fluid extruded lentils. *LWT-Food Science and Technology*, 89, 315-321.

Maldonado S., y Hook M. A. (2014). Psychological stress as a modulator of functional recovery following spinal cord injury. *Frontiers in Neurology*, 5 (44), 1-9.

Martín C., Martín G., García A., Fernández T., Hernández E., Puls J. (2013). Potenciales aplicaciones de Moringa oleífera. Una revisión crítica. *Pastos y Forrajes*. 36(2), 137-149.

Matias, I., Buosi, A.S., y Gomes F.C.A. (2016). Functions of flavonoids in the central nervous system: Astrocytes as targets for natural compounds. *Neurochemistry International* 95, 85 - 91.

Mattucci, S., Speidel, J., Liu, J., Kwon, B. K., Tetzlaff, W., y Oxland, T. R. (2018). Basic biomechanics of spinal cord injury - How injuries happen in people and how animal models have informed our understanding. *Clinical Biomechanics*. DOI:10.1016/j.clinbiomech.2018.03.020

Nouman, W., Anwar, F., Gull T., Newton, A., Rosa, E., y Domínguez-Perles, R. (2016). Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm's leaves from seven cultivars of Moringa oleífera Lam. *Industrial Crops and Products*, 83, 166–176. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.12.032.

Ohkawa, H., Ohishi, N., y Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351 - 358.

Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Goulart, Marília O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., y Trevisan, M. T. S. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32(3), 689-702.

Omotoso, G.O., Gbadamosi, I.T., Olajide, O.J., Dada-Habeeb, S.O., Arogundade, TT., y Yawson, E.O. (2018). Moringa oleifera phytochemicals protect the brain against experimental nicotine-induced neurobehavioral disturbances and cerebellar degeneration. *Pathophysiology*. 25(1), 57 - 62.

Otzel, D., Lee, J., Ye, F., Borst, S., y Yarrow, J. (2018). Activity-Based Physical Rehabilitation with Adjuvant Testosterone to Promote Neuromuscular Recovery after Spinal Cord Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 4 – 36.

Oyinbo, C.A. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 71(2), 281 - 299.

Palma T.M. (2014). Cuantificación de flavonoides y carotenoides en variedades de caléndula (*Caléndula officinalis* L.) y descriptores varietales. Tesis. Colegio de Postgraduados. Fisiología vegetal. 148.

Pardini, C.M. (1998). Epidemiología de la lesión medular traumática en el Distrito Federal. Tesis doctoral, Secretaría de Salubridad y Asistencia, México.

Pereira, J. E., Costa, L. M., Cabrita, A. M., Couto, P. A., Filipe, V. M., Magalhães, L. G., et al. (2009). Methylprednisolone fails to improve functional and histological outcome following spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology*, 220(1), 71 - 81.

Pérez, A., Sánchez, T., Armengol, N., Reyes, F. (2010). Características y potencialidades de *Moringa oleífera*, Lamark. Una alternativa para la alimentación animal. *Pastos y Forrajes*, 33(4), 1 - 16.

Pierre, N., Appriou, Z., Gratas-Delamarche, A., Derbré, F. (2016). From physical inactivity to immobilization: Dissecting the role of oxidative stress in skeletal muscle insulin resistance and atrophy. *Free Radical Biology and Medicine*. 98, 197 - 207.

Planas, V.M. (2014). Nutritional and metabolic aspects of neurological diseases. *Nutrición Hospitalaria*, 29 (2), 3 - 12.

Prakash, D., Suri, S., Upadhyay, G., y Singh, B.N. (2007). Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 58(1), 18 - 28.

Price, M.L. (2000). The Moringa tree. Educational Concerns for Hunger Organization (ECHO). Technical Note. 1985

Quinzaños-Fresnedo, J., y Sahagún-Olmos, R.C. (2015). Micro ARN y su papel en la fisiopatología de la lesión medular; un paso más hacia la medicina neuroregenerativa. *Cirugía y cirujanos*, 83(5), 442 - 447.

Rice-Evans, C.A., y Diploc, A.T. (1991). Techniques in free radical research. Capítulo 3. The detection and characterization of free radicals species, 3.4.2 deoxyribose assay for detection of hydroxyl radical production in cellular systems. Elsevier.

Rima, J., y Assaker, K. (2012). Remediation of 4-nonylphenol in aqueous solution by using free radicals generated by the oxidative reactions. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(6), 2038 - 2043.

Rogers, W.K., y Todd, M. (2016). Acute spinal cord injury. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 30 (1), 27 - 39.

Sánchez, R.P.N., Hernández, W.J., Peralta, V.J., Rojano, M.D., Castañeda, M.R. (2010). Evaluación de la actividad y participación del paciente con lesión medular a través de un cuestionario basado en la CIF (Clasificación Internacional del Funcionamiento, de la Discapacidad y de la Salud) en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR). *Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación*, 22 (4), 113 - 117.

Sanli, A.M., Turkoglu, E., Serbes, G., Sargon, M.F., Besalti, O., Kilinc, K., *et al.*, (2012). Effect of curcumin on lipid peroxidation, early ultrastructural findings and neurological recovery after experimental spinal cord contusion injury in rats. *Turkish Neurosurgery*, 22(2), 189 - 95.

Sepahpanah, F., Burns, S. P., McKnight, B., y Yang, C. C. (2006). Role of Creatinine Clearance as a Screening Test in Persons With Spinal Cord Injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 87(4), 524 - 528.

Sezer, N., Akkuş S., y Uğurlu, F.G. (2015). Chronic complications of spinal cord injury. *World Journal of Orthopedics*, 6(1), 24 - 33.

Siddhuraju, P., y K. Becker. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick

tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2144 - 2155.

Siebert, J.R., Eade, A.M., y Osterhout, D.J. (2015). Biomaterial Approaches to Enhancing Neurorestoration after Spinal Cord Injury: Strategies for Overcoming Inherent Biological Obstacles. *BioMed Research International*, 2015, 1-20.

Sinescu, C., Popa, F., Grigorean, V.T., Onose, G., Sandu, A., y Popescu, M., *et al.*, (2010). Molecular basis of vascular events following spinal cord injury. *Journal of Medicine and Life*, 3(3), 254 - 261.

Singh, A., Tetreault, L., Kalsi - Ryan, S., Nouri, A., y Fehlings, M.G. (2014). Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clinical Epidemiology*, 6, 309 - 331.

Singh, B.N., B.R. Singh, R.L. Singh, D. Prakash, R. Dhakarey, G. Upadhyay, H.B Singh (2009) Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1109 - 1116.

Singh D, Vrat P, Prakash V, Shyam R. (2014). Evaluation of antioxidant and hepatoprotective activities of *Moringa oleifera* Lam. Leaves in carbon tetrachloride-intoxicated rats. *Antioxidants*, 3(3), 569 - 591.

Spagnuolo, C., Moccia, S., y Russo, G.L. (2018). Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 153, 105 - 115.

Sreelatha, S., y Padma P.R. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of Moringa oleifera leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 303 - 11.

Thurber, M.D., y Fahey, J.W. (2009). Adoption of Moringa oleifera to combat under-nutrition viewed through the lens of the “Diffusion of Innovations” theory. *Ecology of Food and Nutrition*, 48(3), 212 - 225.

Torres, S., Salgado - Ceballos, H., Guizar - Sahagún, G., Torres, J.L., Orozco - Suarez, S., Diaz-Ruiz, A., *et al.*, (2009). Deleterious versus neuroprotective effect of metabolic inhibition after traumatic spinal cord injury. *Spinal Cord*, 47 (10), 745 - 750.

UNESCO. (1978). Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura.

Vasanth, K., Minakshi, G.C., Ilango, K., Kumar, R.M., Agrawal, A., Dubey, G.P. (2015). Moringa oleifera attenuates the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide stimulated human monocytic cell line. *Industrial Crops and Products*, 77, 44 - 50.

Vongsak, B. Sithisarn, P. Mangmool, S. Thongpraditchote, S. Wongkrajang, Y. Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of Moringa oleifera Leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crop Product*. 44, 566–571.

Waterman, P.G. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. *Blackwell Scientific Publications: Oxford*, 280.

Waterman, C., Rojas-Silva, P., Tumer, T.B., Kuhn, P., Richard, A.J., Wicks, S., *et al.*, (2015). Isothiocyanate-rich *Moringa oleifera* extract reduces weight gain, insulin resistance, and hepatic gluconeogenesis in mice. *Molecular Nutritional & Food Research*, 59(6),1013-24.

Wu, J., Maoqiang, L., Fan, H., Zhenyu, B., Qifang, H., Xuepeng, W., y Liulong., Z. (2016). Rutin attenuates neuroinflammation in spinal cord injury rats. *Journal of surgical research*, 203(2), 331 -337.

Xu, J., Chen, S., Chen, H., Xiao, Q., Hsu, C.Y., Michael, D., *et al.*, (2009). STAT5 Mediates anti-apoptotic effects of methylprednisolone on oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience*, 29(7), 2022 - 2026.

Yılmaz, T., y Kaptanoğlu E. (2015). Current and future medical therapeutic strategies for the functional repair of spinal cord injury. *World Journal of Orthopedics*, 6(1), 42 - 55.

Zhang, M., S.N. Hettiarachchy, R. Horax, A. Kannan, M.D.A. Praisoody, A. Muhundan, C.R. Mallangi (2011) Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa*, *Centella asiatica*, *Moringa oleifera* and *Murraya koenigii* leaves. *J. Journal of Medicinal Plants Research*, 5(30) , 6672 - 6680.

Zhang, Q., Yang, H., An, J., Zhang, R., Chen, B., Hao, D.J. (2016). Therapeutic Effects of Traditional Chinese Medicine on Spinal Cord Injury: A Promising Supplementary Treatment in Future. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 2016, 1 – 18.

12. APÉNDICES

Apéndice A

Escala BBB

0 = Sin movimiento observable en las extremidades posteriores

1 = Ligero movimiento de 1 ó 2 articulaciones, generalmente cadera y/o rodilla

2 = Movimiento extenso en 1 sola articulación o extenso movimiento en 1 articulación y movimiento discreto en otra

3 = Movimiento extenso en 2 articulaciones

4 = Ligero movimiento de las 3 articulaciones de la extremidad

5 = Ligero movimiento de 2 articulaciones y movimiento extenso de la tercera

6 = Movimiento extenso de 2 articulaciones y movimiento discreto de la tercera

7 = Movimiento extenso de las 3 articulaciones de las extremidades posteriores

8 = Arrastre con incapacidad para soportar el tren posterior o colocar la planta de la pata

9 = Colocación de la planta de la pata con soporte del tren posterior por un instante o soporte del tren posterior ocasional, frecuente o consistentemente sin apoyar la planta al caminar

10 = Soporte ocasional del tren posterior dando algunos pasos. No hay coordinación de las extremidades anteriores con las posteriores

11 = Soporte del tren posterior ocasional o frecuentemente dando pasos apoyando la planta. No hay coordinación de las extremidades anteriores con las posteriores

12 = Soporte del tren posterior ocasional o frecuentemente dando pasos apoyando la planta. Coordinación ocasional de las extremidades anteriores con las posteriores

13 = Soporte del tren posterior frecuente u ocasionalmente dando pasos apoyando la planta. Coordinación frecuente de las extremidades anteriores con las posteriores

14 = Soporte consistente del tren posterior dando pasos con la planta de la pata, coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores y colocación de la pata durante la locomoción predominantemente rotada (interna o externamente) al hacer contacto inicial con la superficie así como poco antes de terminar o pasos plantares frecuentes, coordinación consistente de los miembros anteriores y posteriores y soporte de peso ocasional en la superficie dorsal de la pata

15 = Soporte del tren posterior consistente y coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores sin apoyo del todo correcto durante el avance del miembro hacia delante. Colocación de la planta predominantemente paralela al cuerpo al contacto inicial

16 = Pasos plantares consistentes y coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores durante la marcha y colocación adecuada frecuentemente durante el avance del miembro hacia adelante. Colocación predominante de la pata en paralelo al contacto inicial y rotada al terminar

17 = Pasos plantares consistentes y coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores durante la marcha y frecuente colocación correcta durante el avance del miembro hacia delante. Colocación de la planta predominantemente en paralelo al contacto inicial y al finalizar

18 = Pasos plantares consistentes y coordinación consistente de las extremidades anteriores con las posteriores durante la marcha y apoyo correcto consistentemente durante el avance del miembro hacia delante. Colocación de la pata en paralelo al contacto inicial y rotado al término

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

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

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

Ocasional < 6 = 50 %, frecuentemente: entre el 51 y 94 % y consistentemente: 95-100 %

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

Apéndice B

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

4.2. Responsables del cumplimiento de esta Norma en la institución.

4.2.1. Todos los bioterios independientemente de su tipo tienen que designar como personas encargadas del cumplimiento de la Norma a:

- a) Un Médico Veterinario responsable, que estará adscrito tiempo completo o tiempo parcial dependiendo del tamaño y las necesidades del bioterio.
- b) Un responsable administrativo que será el director o la persona que éste designe para estos fines.

La institución debe asegurar los servicios médicos veterinarios a cualquier hora del día y de la semana para garantizar la salud y bienestar de los animales.

4.3.2. Usuarios dentro de la institución.

Es una obligación de la institución donde se realiza investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza, con animales de laboratorio, asegurar que el personal profesional, técnico y estudiantil, esté capacitado para realizar los procedimientos con animales de laboratorio.

4.4. Obtención de animales.

Todos los animales deben adquirirse conforme a los preceptos jurídicos aplicables tanto a las instituciones como a los particulares que reciben o negocian con animales. Se debe promover invariablemente que todas las transacciones que involucren la adquisición de animales se conduzcan legalmente.

4.5.2. Se debe llenar un formato que contenga la siguiente información:

- a) Nombre, dirección y razón social del proveedor.
- b) Número de expediente que se otorga por la notificación de aviso de funcionamiento.
- c) Especie animal a la que se refiere el certificado.
- d) Raza, cepa.
- e) Cantidad total de animales.
- f) Sexo, indicando la cantidad de cada uno.
- g) Fecha de nacimiento, cuando se conozca.
- h) Pruebas de laboratorio y/o gabinete, incluyendo fecha de la última realización para determinar el estado microbiológico cuando se requiera.
- i) Nombre y firma del Médico Veterinario Zootecnista certificado en animales de laboratorio que avala el certificado.

4.5.3. Salud animal.

- a) Todas las instituciones donde se alojen animales de laboratorio con fines de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas y enseñanza, deberán implantar programas sanitarios para la prevención de enfermedades.
- b) Las cajas y jaulas se mantendrán limpias, secas y en condiciones ambientales aceptables.

- c) Todos los días se observarán los animales para detectar cambios de comportamiento, enfermedades, heridas o muerte.
- d) El agua suministrada a los animales debe ser potable y a libre acceso.

4.6. Identificación y registro.

Toda operación de un bioterio debe contar con registros diversos para el adecuado control de sus poblaciones animales, ya sean colonias de producción o bien de animales bajo experimentación. Estos sistemas incluyen desde tarjetas de jaulas individuales o colectivas, hasta hojas clínicas o impresos de computadora que auxilien al veterinario o investigador en dicha tarea.

4.7. Alimento.

El alimento para todas las especies debe cumplir con las siguientes características:

- a) Debe estar libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes.
- b) Debe estar dentro de su periodo de caducidad.
- c) Almacenado en bodegas o cuartos desinfectados, secos y ventilados, sobre tarimas o en contenedores.

5. Animales que comprende esta Norma

5.1. Roedores: Rata, ratón, cobayo, hámster y jerbo.

5.1.1. Confinamiento o encierro primario. El equipo para alojar a los animales debe estar diseñado para facilitar el bienestar del animal, satisfacer las necesidades de la investigación y reducir o eliminar las variables experimentales, por lo cual el equipo para confinar al animal o encierro primario debe:

- a) Proporcionar el espacio adecuado que permita movimientos y adopciones de las posturas normales de la especie.

- b) Ser cerrado a prueba de escape y proteger al animal de amenazas externas.
- c) Ser adecuado en ventilación y conforme a las necesidades biológicas de la especie.

5.1.1.1. Los confinamientos o encierros primarios deben tener las siguientes características; aun cuando en condiciones experimentales pueden variar, previa autorización del Comité.

- a) Satisfacer las necesidades fisiológicas (alimentación, defecación, micción u otros) y conductuales de los animales, permitiendo los movimientos normales y ajustes posturales característicos de la especie.
- b) Cuando esté indicado, deberá favorecer la reproducción y la crianza.
- c) Permitir las interacciones sociales entre los individuos de la especie, el establecimiento de jerarquías y las conductas de escape.
- d) Brindar una ventilación e iluminación adecuadas.
- e) Favorecer que los animales se mantengan limpios y secos.
- f) Ser seguras, impidiendo el escape de los animales o el entrapamiento de sus extremidades.
- g) Deben tener bordes y aristas redondeadas.
- h) El diseño debe facilitar la limpieza y saneamientos rutinarios y también las faenas de cambio, llenado y suministro de agua y alimento.
- i) Permitir la observación de los animales.
- j) Los materiales para la construcción de las jaulas deben ser resistentes, durables e impermeables.
- k) Deben mantenerse en buenas condiciones de uso.
- l) Se recomienda alojar a los roedores en jaulas con piso sólido y material de lecho

5.1.2. Salud animal.

a) Cada una de estas especies se alojará en cuartos separados de otras especies o de animales con diferente condición microbiológica. Cuando se cuente con sistemas de aislamiento, podrán alojarse en el mismo cuarto.

b) Los roedores deben estar libres de las enfermedades zoonóticas y parásitos externos, a menos que el procedimiento experimental aprobado por el Comité indique lo contrario. En este caso, el bioterio debe contar con las medidas sanitarias y de control que asegure el control absoluto de los animales en experimentación (escape, contacto con roedores silvestres, eliminación de cadáveres u otros), así como protección del personal en contacto con los animales, sus partes o sus desechos.

5.1.3. Manejo.

5.1.3.1. Alimentación y provisión de agua.

a) El alimento debe proporcionarse a libre acceso o en forma restringida dependiendo de las necesidades de la cepa y de los procedimientos experimentales.

5.1.4. Cama y nido.

Los roedores alojados en cajas con piso sólido deben tener el material de cama suficiente que garantice la absorción de su orina, excremento y desperdicio de agua, favorecer su aislamiento térmico y construcción de nido.

Los materiales de cama deben seleccionarse por su suavidad, capacidad de absorción, laxitud, ausencia de polvo y fragmentación, así como por la constancia de su calidad, neutralidad química, inercia nutricional y carencia de palatabilidad.

5.1.5. Agrupamiento de animales.

Con excepción de las indicaciones justificadas ante el Comité, los roedores deben alojarse en grupos, cuyo tamaño estará limitado. En ratones y cobayos no deben alojarse más de un macho con una hembra o varias hembras en reproducción.

5.4.10. Toma de muestras y manipulación.

Para la toma de muestras sanguíneas se requiere tranquilizar al animal. Dependiendo de la especie y talla del animal, éstas pueden ser tomadas por la vena radial, la caudal, la femoral, la safena o bien por punción yugular.

5.4.12. Eutanasia.

La selección del método o forma de eutanasia y el agente que será utilizado necesita ser tomado en consideración de acuerdo con la naturaleza y requerimientos del estudio experimental, aprobado por el Comité.

8. Técnicas experimentales

8.1. Analgesia y anestesia. Cualquier procedimiento que cause mayor dolor o molestia en los animales, que la producida por inyección o marcaje en orejas, requerirá el uso de tranquilizantes, analgésicos o anestésicos. Si es necesario efectuar un procedimiento doloroso sin el uso de anestesia, analgésico o tranquilizante. La elección del fármaco a utilizar debe ser responsabilidad del investigador y la dosis dependerá de la especie, cepa o raza, edad, porcentaje de grasa en el cuerpo y condición del animal.

El animal debe de ser manejado siempre con cuidado pero con firmeza, procurando la seguridad del personal que lo manipula. Se debe evitar la lucha y el estrés en todo

momento, ya que la excitación prolongada puede alterar la circulación y el estado metabólico del animal e inducir un estado de choque.

Previo a la anestesia los animales deben someterse a un periodo de ayuno suficiente para vaciar estómago, con el fin de prevenir la regurgitación o aspiración del contenido gástrico.

Además de las consideraciones mencionadas en la elección del anestésico o analgésico, se deben contemplar que sustancias como la ketamina pueden utilizarse en combinación con agentes relajantes musculares que potencialicen su acción y optimicen su efecto como los tranquilizantes que producen analgesia y sedación.

9.5.3.2.4. Se acepta el uso de dislocadores mecánicos.

9.5.3.3. Decapitación. La decapitación es una técnica para la eutanasia de roedores y conejos pequeños, que se realiza con un aparato especialmente diseñado para este propósito llamado guillotina. Es un medio para obtener tejidos y fluidos corporales libre de contaminación química y/o tejido cerebral íntegro.

Apéndice C

UNESCO, Declaración Universal de los Derechos de los Animales.

Artículo 2.

C) Todo animal tiene derecho a la atención, a los cuidados y a la protección del hombre.

Artículo 3.

a) Ningún Animal será sometido a malos tratos ni a actos crueles.

b) Si es necesaria la muerte de un Animal, ésta debe de ser instantánea, indolora y no generadora de angustia.

Artículo 8.

- a) La experimentación animal que implique un sufrimiento físico o psicológico es incompatible con los derechos del animal, tanto si se trata de experimentos médicos, científicos, comerciales, como toda otra forma de experimentación.
- b) Las técnicas alternativas deben ser utilizadas y desarrolladas.

Artículo 13

- a) Un Animal muerto debe ser tratado con respeto.

Apéndice D

Reglamento de la Ley General de la Salud en el Título séptimo De la Investigación que incluya a la utilización de animales de experimentación.

Artículo 121.- En las investigaciones experimentales con animales, referidas a la salud humana, se deberán llenar los requisitos que establezcan las normas de las propias instituciones de salud, autorizadas por la Secretaría y satisfacer lo señalado en este capítulo.

Artículo 122.- Las investigaciones se diseñarán a modo de evitar al máximo el sufrimiento de los animales.

Artículo 123.- Cuando sea necesario sacrificar a un animal de experimentación, se empleará un procedimiento que asegure en lo posible su muerte sin sufrimiento.

Artículo 124.- Los bioterios deberán estar de acuerdo con la especie, conformación corporal, hábitos, preferencias posturales y características locomotoras de los animales,

para proporcionarles comodidad, excepto cuando las variables experimentales justifiquen otras situaciones.

Artículo 125.- Los bioterios de producción o mantenimiento crónico serán supervisados por profesionales calificados y componente en la materia deberán permitir el crecimiento, maduración, reproducción y comportamiento normal de los animales, de conformidad con las normas que la propia institución emita.

Artículo 126.- El titular de la institución de salud en donde se realice investigación a la que se refiere este capítulo, deberá establecer y vigilar el cumplimiento de las medidas de seguridad para el cuidado y manejo de los animales (Apéndice C) (Ley General de Salud, 1983).