

Efecto del tratamiento con tamoxifeno y resveratrol en la locomoción de la rata después de daño cerebral penetrante en la corteza motora primaria

V. M. José¹, J. T. Guillen¹, M. A. García¹, N. E. Franco^{2*}.

¹Departamento de Electrónica, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jal., México

²Departamento de Farmacobiología, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jal., México

victorjose.298@gmail.com, lizzafranco@gmail.com

Resumen— Los traumas por lesión cerebral penetrante pueden variar desde un daño mínimo, generar defectos cognitivos y motores o incluso causar la muerte, lo que nos lleva a plantear un posible tratamiento. Entre estas alternativas encontramos al tamoxifeno y resveratrol que tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias anti-apoptóticas y anti-mutagénicas promoviendo así un posible efecto neuroprotector [1-3]. Sin embargo, el resveratrol tiene baja estabilidad química y rápido metabolismo. Esto hace necesario plantear una estrategia para estabilizar la molécula y facilitar su paso por la barrera hematoencefálica, obteniendo efectos terapéuticos más efectivos. Planteamos una estrategia de tratamiento con tamoxifeno durante el periodo agudo del daño (0-2 post-lesión) y con resveratrol en la fase crónica (3-21 post-lesión), utilizando micropartículas lipídicas como vehículo de administración para el resveratrol y evaluando el efecto del tratamiento conjunto en la actividad locomotora después del daño en corteza motora mediante análisis de la locomoción a los 7, 14, 21 y 28 días post-lesión.

Palabras clave—**Tamoxifeno, resveratrol, locomoción, sistema nervioso central.**

I. INTRODUCCIÓN

Los traumas por lesión cerebral penetrante pueden variar desde un daño mínimo, defectos cognitivos, motores y en algunos casos la muerte [4, 5]. Dicha lesión cerebral ocurre cuando una fuerza impacta en la cabeza con una energía lo suficientemente alta como para romper las meninges y penetrar hasta el cerebro [6]. Después de la lesión física se produce una compleja serie de eventos a nivel celular y molecular que ocurren en la proximidad de la lesión, estos son: hemorragia, ruptura de la barrera hematoencefálica, edema, daño axonal, desequilibrio iónico, estrés oxidativo, inflamación y muerte neuronal [7]. Estos eventos llevan a la activación de las células gliales, microglia y astrocitos principalmente, los cuales forman una barrera física denominada cicatriz glial que impide la conexión adecuada de axones en la zona que lo rodea al núcleo de la lesión (zona de penumbra), lo que conlleva a una degradación de las neuronas en la fase aguda desencadenando apoptosis neuronal en la fase crónica [8].

Cuando la lesión ocurre en el área correspondiente a las funciones motoras (corteza motora), se disminuye la capacidad para realizar ciertas tareas con precisión como son disminución en la velocidad, longitud de la zancada, cadencia, aceleración lineal, apertura angular [9]. Este tipo de modelos de daño nos llevan a profundizar en el estudio

de un tratamiento oportuno para disminuir la degradación neuronal generada después de la lesión.

El tamoxifeno un fármaco no esteroideo indicado principalmente para el tratamiento de cáncer de mama [10], sin embargo demostró tener efectos neuroprotectores disminuyendo la inflamación, la gliosis reactiva y la apoptosis neuronal [1], el daño excitotóxico y oxidativo [11], mejora la recuperación funcional del aparato locomotor después de una lesión en sistema nervioso central [12] y previene la desmielinización después de daño en médula espinal [13].

El resveratrol es una fitoalexina polifenólica que se encuentra en las raíces, tallos y cáscara de la uva, así como en el vino tinto y otras bayas. Ha demostrado tener propiedades farmacológicas, que incluyen capacidad antioxidante, actividad antiinflamatoria y anti-mutagénica, así como efectos anticancerígenos [3, 14]. En sistema nervioso el resveratrol, tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anti-apoptóticas, promoviendo así un efecto neuroprotector [2, 3]. Sin embargo se metaboliza en poco tiempo lo cual disminuye su biodisponibilidad y su vida media plasmática es de 8 a 14 min y una degradación casi total a los 60 min [15], lo que se traduce en niveles bajos de resveratrol en el cerebro. Un método que ha demostrado ser eficiente para aumentar la biodisponibilidad del resveratrol y pueda observarse un efecto terapéutico por más tiempo es mediante la creación de micropartículas lipídicas sólidas, las cuales tienen la capacidad de unirse al resveratrol debido a la alta lipofilia [16].

Las propiedades del tamoxifeno y resveratrol nos llevan a plantear un tratamiento con tamoxifeno durante el periodo agudo del daño (0-2 dpl) y con resveratrol en la fase crónica (3-21 dpl), utilizando micropartículas lipídicas sólidas como vehículo de administración para el resveratrol, para favorecer la recuperación de la corteza motora y su función después de lesión cerebral penetrante.

II. METODOLOGÍA

A. Procedimiento experimental

Se utilizaron 12 ratas macho adultas de 250 a 300 g de la cepa wistar, a las cuales se les realizó lesión cerebral penetrante en la corteza motora primaria del hemisferio derecho, que concierne al control motor de la extremidad posterior izquierda (1 mm medio-lateral, de -0.5mm a

0.5mm antero-posterior y 3mm dorso-ventral con respecto a Bregma Fig. 1). Se evaluaron durante 28 días post-lesión (dpl) y se dividieron en 3 grupos (4 animales por grupo).

1. **Testigo**: se les realizó lesión cerebral penetrante y se les administró solución vehículo, vía I.P, del 0-2 días post-lesión.
2. Tamoxifeno + resveratrol con cetil-palmitato (**TAM+RES/CP**): se les realizó cirugía de lesión cerebral penetrante, se administró tamoxifeno (1mg/kg), del día 0-2 y resveratrol (125 mg/kg), con cetil palmitato como vehículo del día 3 a 21.
3. Tamoxifeno + resveratrol con PBS (**TAM+RES/PBS**): cirugía de lesión cerebral penetrante, se administró tamoxifeno (1mg/kg), del día 0-2 y resveratrol (125mg/kg), con tampón de fosfatos (PBS) como vehículo del día 3 a 21 días post-lesión.

B. Análisis cinemático

El análisis cinemático de la locomoción nos permite saber si el tratamiento que se está aplicando tiene algún efecto positivo en la recuperación de la función motora. Debido a la zona donde se realizó la lesión se observó un mayor daño en los miembros posterior de la rata durante las fases de la marcha (traslado y apoyo), principalmente en el lado izquierdo por ser la zona contralateral al daño en corteza cerebral.

Previo al daño cerebral, las ratas se entrenaron para caminar (10 min por 5 días) a través de un túnel de acrílico de 100 cm de largo por 10 cm de alto y 9 cm de ancho.

Se empleó un sistema de video, constituido por tres cámaras de video a una resolución 640 x 480 píxeles y 90 cuadros por segundo, localizadas a lo largo del túnel de acrílico que se mencionó antes. Las ratas fueron rasuradas previamente para ser marcadas en cada una de los puntos de interés (fig.1.C), con el fin de obtener los ángulos durante la marcha, del ángulo interno cadera, el ángulo de la articulación femorotibial-femoropatelar, y la tibio-tarsiana.

Mediante las cámaras se adquieren videos de la locomoción en cinco momentos, antes de la lesión (basal) y a los 7, 14, 21 y 28 dpl. Estos videos se procesan mediante el software rat walk tracker creado por el cuerpo académico de inteligencia computacional (UDG-CA-893), en el cual se trabaja cuadro por cuadro marcando un punto en cada uno de los puntos observados en la rata. Una vez marcados los cuadros requeridos se crea un archivo con las coordenadas de cada uno de los puntos marcados en su cuadro correspondiente.

Con las coordenadas de cada articulación de interés, se abren los datos en Matlab para graficarlas y generar la trayectoria del movimiento de la rata. Para encontrar la distancia de la zancada, se mide la distancia en pixeles desde el inicio de la fase de traslado hasta el final de la fase de apoyo en cada una de las zancadas y se convierte a

centímetros conociendo el factor de conversión en cada una de las cámaras.

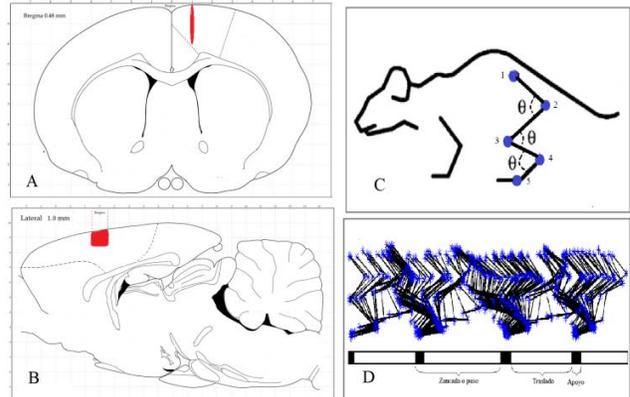


Fig. 1: A: Vista sagital de la zona de daño en corteza motora. B: Vista coronal de la zona de daño. C: Representación de las marcas colocadas en la rata, cresta iliaca (1), articulación coxofemoral (2), articulación femorotibial-femoropatelar (3), hueso tarso(4), articulación metatarsofalángica (5). D: Trayectoria de la rata durante marcha, mostrando las fases de traslado y apoyo.

III. RESULTADOS

Método de análisis cinemático

Los resultados obtenidos mediante el método de análisis cinemático nos permitió obtener una base de datos con las coordenadas de las trayectorias de 12 ratas durante la locomoción en estado normal y con anomalías posterior al daño cerebral, logrando destacar patrones anormales y de recuperación particulares de cada grupo.

Análisis cualitativo de la locomoción

En las figuras 1 y 2 se muestran las características de la marcha en el estado basal y post-lesión de los tres grupos evaluados.

A los 7 días después de la lesión se observa en la articulación tibio-tarsiana y de la rodilla una disminución del ángulo de apertura durante la fase de balanceo produciendo una disminución de la longitud de la zancada en los 3 grupos de estudio, siendo el grupo testigo el más afectado. Este efecto se ve principalmente en la extremidad izquierda, y por su parte la extremidad derecha intenta compensar este movimiento reduciendo la zona de apoyo de la extremidad principalmente con los metatarsos y se aumenta el ángulo de apertura en la articulación de la rodilla. El grupo TAM+RES/CP tuvo un mejor desempeño en la marcha ya que observamos mayor apertura de la articulación de rodilla y una mayor velocidad al realizar los pasos después de la lesión.

A los 14 y 21 dpl distinguimos una gran diferencia entre el grupo testigo respecto a los grupos TAM+RES/CP y TAM+RES/PBS, esto debido principalmente a la falta de coordinación de las articulaciones en el miembro posterior izquierdo, se contempla también una mayor recuperación de

los grupos TAM+RES/CP y TAM+RES/PBS con un aumento en la longitud de la zancada respecto a los 7 días post-lesión. El grupo TAM+RES/CP sigue presentando una mayor apertura angular en la articulación metatarsiana, sin embargo, el grupo TAM+RES/PBS tiene una mejor coordinación de los pasos a los 21 dpl. Hasta este punto podemos destacar una considerable restauración de la locomoción de las ratas de manera cualitativa en los grupos TAM+RES/CP y TAM+RES/PBS.

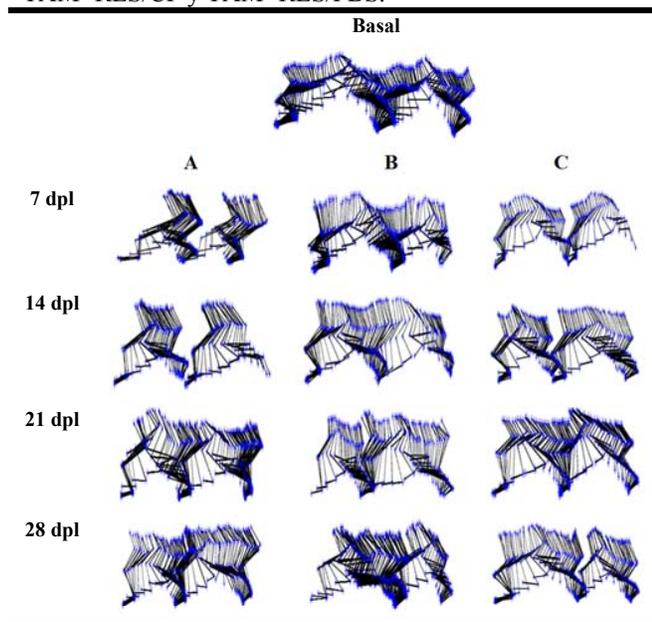


Fig. 1: Evolución de la locomoción de rata en el lado izquierdo. A. grupo testigo; B: grupo TAM+RES/PBS; C: grupo TAM+RES/CP.

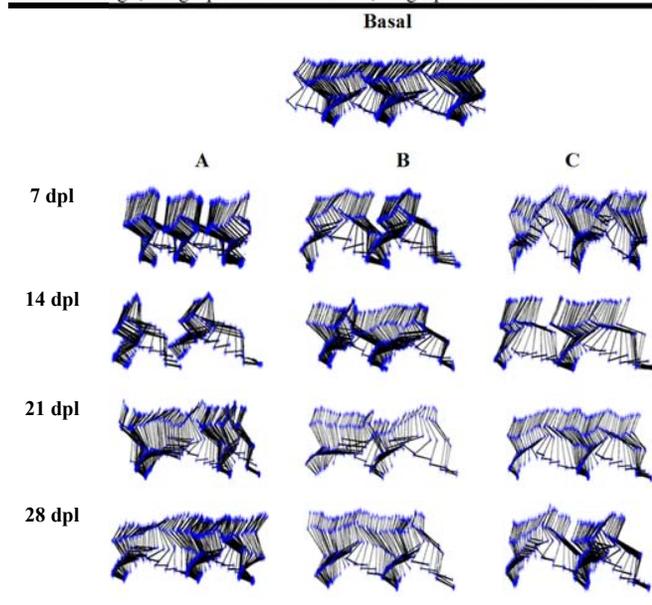


Fig. 2: Evolución de la locomoción de rata lado derecho. A. grupo testigo; B: grupo TAM+RES/PBS; C: grupo TAM+RES/CP.

Por último, en los 28 dpl notamos una recuperación casi completa de la extremidad derecha en los tres grupos de estudio, no obstante, en la extremidad izquierda seguimos observando una disminución de la apertura angular en las articulaciones de rodilla y tobillo. El grupo TAM+RES/PBS muestra una mejor coordinación de las articulaciones, sin embargo, el grupo TAM+RES/CP tiene una mayor velocidad al momento de realizar los pasos. La distancia de la zancada aumenta respecto a los 3 tiempos anteriores y tenemos una recuperación en los tres grupos con un mejor resultado en el grupo TAM+RES/CP.

B. Longitud de la zancada

En las tablas 1 y 2 podemos observar que en el grupo testigo disminuye la distancia de la zancada a los 7 dpl en la extremidad izquierda y después conforme pasa el tiempo va recuperando la distancia del paso, mientras que la extremidad derecha a los 7 días se ve un aumento de la distancia el cual disminuye y aumenta sin un patrón hasta los 28 días donde observamos una amplitud similar a estado basal.

DISTANCIA PROMEDIO DE LA ZANCADA, EXTREMIDAD IZQUIERDA

	Basal	7 dpl	14 dpl	21dpl	28dpl
Testigo	7.65	6.65	7.72	8.10	9.28
TAM+RES/PBS	6.57	7.80	7.13	8.00	8.63
TAM+RES/CP	6.87	6.47	7.50	7.94	9.01

TABLA I. Distancia promedio de las zancadas de la extremidad posterior izquierda por grupo en su estado basal y post-lesión (centímetros).

DISTANCIA PROMEDIO DE LA ZANCADA, EXTREMIDAD DERECHA

	Basal	7 dpl	14 dpl	21dpl	28dpl
Testigo	6.88	8.32	6.11	8.90	7.48
TAM+RES/PBS	7.34	6.80	6.43	7.01	7.43
TAM+RES/CP	7.02	6.79	7.99	7.36	9.32

TABLA 2. Distancia promedio de las zancadas de la extremidad posterior derecha, por grupo en los diferentes tiempos de estudio (centímetros).

En el grupo TAM+RES/PBS la extremidad izquierda de las ratas muestran un aumento en la distancia de la zancada desde los 7 dpl con tendencia a seguir aumentando en los días posteriores destacando un efecto benéfico gracias al tratamiento, en su extremidad derecha vemos el caso contrario, después de los 7 dpl disminuye la distancias respecto al estado basal y permanece con esta amplitud hasta los 28 dpl.

El tratamiento de TAM+RES/CP mostró una disminución muy baja de la distancia de la zancada tanto en la extremidad izquierda como derecha con una tendencia a incrementar en los días posteriores.

IV. DISCUSIÓN

El modelo de daño en la corteza motora primaria de la rata nos mostró que la lesión afecta la actividad motora en la marcha de la rata desde el primer día de la lesión hasta los 21 y 28 dpl, momento en el que observamos que hay una recuperación parcial espontánea en esta conducta motora. Por lo que se tendría que efectuar una lesión más severa o cambiar la especie de estudio.

La lesión se hizo en la corteza motora primaria del hemisferio derecho del cerebro, por lo que la extremidad posterior izquierda es la que muestra mayor afectación durante la marcha. Sin embargo, como la marcha depende de ambas extremidades, también se presentan efectos negativos en la extremidad posterior derecha.

Este tipo de anomalías mostradas después del daño fueron posibles de observar con ayuda del método de análisis cinemático. Se pretende presentar en posteriores estudios los resultados obtenidos en relación a las curvas angulares de cada articulación así como la correlación de las curvas, existente después de la lesión, con y sin tratamiento.

Este método de adquisición de videos nos ayudó en gran medida para este estudio sin embargo hay diferentes deficiencias que se deben corregir en posteriores trabajos como lo son: una marcación más adecuada que solucione posiblemente el efecto del movimiento de la piel durante la marcha, buscar un color de marcación que permita realizar un procesamiento de imágenes sin que los colores de la piel de la rata o del fondo de la cámara influyan. La posibilidad de reducir el error de paralaje en las cámaras.

Por otro lado el tratamiento con tamoxifeno y resveratrol reflejó efecto neuroprotector desde los 7 dpl donde observamos recuperación en el patrón de la conducta motora en varios parámetros como se describió en el apartado anterior, en los grupos TAM+RES/CP y TAM+RES/PBS.

El tratamiento con tamoxifeno y resveratrol utilizando el cetil palmitato como vehículo fue diferente en comparación al que utilizo solo PBS como vehículo, de esto deducimos que logro estabilizar la molécula de resveratrol y así tener un efecto terapéutico mayor ante la lesión cerebral que se produjo. Las gráficas de comparación muestran que conforme avanza el tiempo del estudio, la marcha normal de las ratas se restituye de manera significativa a comparación de los primeros días de post-lesión.

Destacamos de igual manera que en el resto de los grupos si existe una mejoría ante los eventos ocasionados por la lesión penetrante, sin embargo como ya mencionamos, el que ofrece mejores resultados es el grupo TAM+RES/CP, podemos mencionar que el tratamiento conjunto logró detener la degeneración de células logrando así restituir las funciones motoras muy similares a las que existían antes de la lesión.

La distancia de las zancadas en los grupos TAM+RES/PBS y TAM+RES/CP tuvieron una disminución

menor con respecto al grupo testigo, destacando un efecto neuroprotector, de igual manera se observa un mejor resultado con la solución de micro partículas de resveratrol con cetil palmitato.

V. CONCLUSIÓN

La administración del resveratrol con cetil palmitato y tamoxifeno nos confirmó que se puede restituir casi en su totalidad la marcha normal de las ratas con lesión cerebral penetrante en la corteza motora primaria. No obstante, a futuro se puede proponer un estudio morfológico del tejido neuronal para identificar cuál fue el impacto a nivel celular que se llevó a cabo con este tratamiento y proveer de más información acerca de su uso. También se proyecta la implementación de otros métodos de grabación donde solucionemos los errores encontrados.

RECONOCIMIENTOS

El autor Victor M. José Ochoa, agradece la dirección de este proyecto a la Dra. Nancy E. Franco Rodríguez, así como la asesoría y motivación aportada por parte del Dr. José T. Guillen Bonilla y del Dr. Mario A. García Ramírez.

BIBLIOGRAFÍA

- Colon, J.M., et al., Tamoxifen Administration Immediately or 24 Hours after Spinal Cord Injury Improves Locomotor Recovery and Reduces Secondary Damage in Female Rats. *J Neurotrauma*, 2016. 33(18): p. 1696-708.
- López-Miranda, V., et al., Resveratrol: un polifenol neuroprotector de la dieta mediterránea. *Revista de Neurología*, 2012. 54(6): p. 349-356.
- Markus, M.A. and B.J. Morris, Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clin Interv Aging*, 2008. 3(2): p. 331-9. <https://doi.org/10.2147/CIA.S3506>
- Carron, S.F., D.S. Alwis, and R. Rajan, Traumatic Brain Injury and Neuronal Functionality Changes in Sensory Cortex. *Front Syst Neurosci*, 2016. 10: p. 47. 10.3389/fnsys.2016.00047
- Zacks, J.M., et al., Effects of penetrating traumatic brain injury on event segmentation and memory. *Cortex*, 2016. 74: p. 233-46. 10.1016/j.cortex.2015.11.002
- Cernak, I., et al., A novel mouse model of penetrating brain injury. *Front Neurol*, 2014. 5: p. 209. 10.3389/fneur.2014.00209
- García, M.G., et al., Mecanismos celulares y moleculares de la enfermedad cerebrovascular isquémica. *Rev Cubana Med*, 2004. 43(4): p. 4.
- Fernández-Gómez, F., et al., Farmacología de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo. *Rev Neurol*, 2008. 47: p. 253-60.
- Hollman, J.H., E.M. McDade, and R.C. Petersen, Normative spatiotemporal gait parameters in older adults. *Gait Posture*, 2011. 34(1): p. 111-8. 10.1016/j.gaitpost.2011.03.024
- Paruthiyil, S., et al., Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res*, 2004. 64(1): p. 423-8. 10.1158/0008-5472
- Osuka, K., et al., Tamoxifen inhibits nitrotyrosine formation after reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurochem*, 2001. 76(6): p. 1842-50. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00198.x>
- Mosquera, L., et al., Tamoxifen and estradiol improved locomotor function and increased spared tissue in rats after spinal cord injury: their antioxidant effect and role of estrogen receptor alpha. *Brain Res*, 2014. 1561: p. 11-22. 10.1016/j.brainres.2014.03.002
- de la Torre Valdovinos, B., et al., Tamoxifen Promotes Axonal Preservation and Gait Locomotion Recovery after Spinal Cord Injury in Cats. *J Vet Med*, 2016. 2016: p. 9561968. 10.1155/2016/9561968
- Chow, H.H., et al., Resveratrol modulates drug- and carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010. 3(9): p. 1168-75. doi: 10.1158/1940-6207.
- Asensi, M., et al., Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002. 33(3): p. 387-398.
- Neves, A.R., J.F. Queiroz, and S. Reis, Brain-targeted delivery of resveratrol using solid lipid nanoparticles functionalized with apolipoprotein E. *J Nanobiotechnology*, 2016. 14: p. 27.