

11261  
6  
20j

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

TRASPLANTES A LA MEDULA ESPINAL  
POSTRAUMATICA COMO MODELO DE  
NEUROPROTECCION

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS  
BIOMICAS PRESENTA: GABRIEL GUIZAR SAHAGUN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F. 1992



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

I-	RESUMEN GENERAL	1
II-	INTRODUCCION	4
III-	ANTECEDENTES	5
	A Antecedentes históricos sobre regeneración y plasticidad del sistema nervioso.	5
	B Fisiopatología de la lesión medular.	9
	1 Lesión primaria y lesión secundaria.	9
	2 Obstáculos para la regeneración medular.	14
	3 Aspectos inmunológicos de la lesión medular.	17
	C Modelos experimentales de lesión medular.	18
	D Trasplantes a la médula espinal.	22
IV	TRABAJO DE INVESTIGACION	
	A Planteamiento del problema	28
	B Hipótesis	29
	C Objetivos	30
	D Material y Métodos.	31
	E Resultados.	38
	F Discusión.	59
	G Conclusiones.	66
V	PERSPECTIVAS DE INVESTIGACION A FUTURO	67
VI	REFERENCIAS	68

## ABREVIATURAS Y DEFINICIONES OPERACIONALES

- BHE = barrera hemato encefálica  
LMC = laceración medular completa  
LTME = lesión traumática de la médula espinal  
ME = médula espinal  
SNC = sistema nervioso central  
SNP = sistema nervioso periférico  
SI = sistema inmune

AUTOFAGIA: lesión corporal provocada por el propio sujeto experimental, empleando para ello su aparato masticatorio. Dicha lesión se localiza generalmente en las extremidades posteriores y/o en la pared abdominal.

EVIDENCIA HISTOLOGICA DE VIABILIDAD CELULAR: Contorno celular uniforme, con citoplasma teñido de manera homogénea y núcleos sin picnosis, cariorexis o cariólisis. Así como, ausencia de reacción inflamatoria aguda o crónica.

FUNCION SEGMENTARIA DE LA MEDULA ESPINAL: Actividad nerviosa de tipo somático o autonómico, que resulta de la integración de reflejos a nivel de la ME y que persiste en ausencia de conexiones cefálicas respecto al sitio de la lesión.

NEUROPROTECCION: Connota el efecto de cualquier manipulación o substancia que evite o disminuya la destrucción progresiva del parénquima del SNC después de una lesión, valorable histológica y/o funcionalmente.

PERDIDA DE PESO SEVERA: Disminución del peso corporal de más del 30% en una semana, respecto al control intacto.

## I- RESUMEN GENERAL

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) en los seres humanos se acompaña de un alto índice de morbi-mortalidad y suele dejar graves secuelas neurológicas. Ello ha conllevado al desarrollo de diferentes modelos experimentales de lesión medular. Estos modelos animales han sido de gran utilidad para un mejor entendimiento sobre la fisiopatología de la lesión, así como para estudiar los fenómenos de neurodegeneración-regeneración y neuroplasticidad. Finalmente los modelos experimentales han permitido evaluar diferentes estrategias terapéuticas.

En los mamíferos adultos, a diferencia de lo que ocurre en algunos vertebrados inferiores, no existe regeneración (recrecimiento y conectividad apropiada) de los axones centrales cuando éstos son dañados. Sin embargo, se acepta que bajo algunas condiciones, en especial, en los casos en que las lesiones son parciales, puede haber crecimiento colateral desde los axones preservados (neuroplasticidad), y que esta plasticidad podría subyacer a la recuperación funcional parcial observada.

Después de producir una lesión medular mecánica (lesión primaria), en adición al daño traumático per se, se desencadena una cascada de mecanismos autodestructivos (lesión secundaria) que contribuyen a una mayor destrucción del parénquima medular; finalmente, persiste un proceso tardío, denominado neurodegenerativo crónico, con la posible participación de una respuesta deletérea autoinmune.

El modelo experimental de LTME más empleado para probar el

posible efecto benéfico de trasplantes a la médula espinal (ME) es la laceración parcial, ya que al extraer un fragmento de ME se produce un espacio que permite retener el implante; adicionalmente, dado que la lesión medular es parcial, la supervivencia del animal habitualmente no se ve severamente afectada. Bajo estas condiciones de lesión y trasplante, se ha logrado viabilidad, maduración e integración del tejido trasplantado con el hospedero, así como mejoría en algunas de las funciones alteradas. La laceración medular completa (LMC) es un procedimiento poco empleado porque se acompaña de una alta incidencia de morbi-mortalidad de los animales.

En el presente estudio se evaluó el efecto neuroprotector de trasplantes colocados en la zona de lesión inmediatamente después de una LMC en la región torácica baja en ratas adultas. En el primer experimento se probaron implantes de tejido fetal homotópico alogénico y/o xenogénico (humano). Las ratas que recibieron trasplante sobrevivieron significativamente más tiempo y presentaron menos complicaciones que las ratas no trasplantadas. En el estudio histológico se observó que en los animales trasplantados, el grado de destrucción del parénquima medular del hospedero era menor respecto al observado en las ratas que no recibieron trasplante.

Para reiterar esta observación y evaluar el posible efecto neuroprotector de otros implantes, se llevó a cabo un estudio adicional. Empleando el mismo modelo de lesión, además de trasplantar tejido fetal homotópico alogénico, se autoinjertó

nervio periférico o tejido adiposo; como control se implantó esponja de fibrina (Gelfoam) o se dejó el espacio sin trasplante. La destrucción del parénquima medular del hospedero se evaluó mediante morfometría. Las ratas implantadas con alguno de los tejidos mostraron significativamente menor destrucción del parénquima medular al compararlas con las ratas no implantadas. La destrucción observada en las ratas implantadas con Gelfoam, aunque fue menor que en las ratas no implantadas, no fue significativa. El efecto benéfico del tejido trasplantado pudiera deberse a su acción como un "amortiguador" de las sustancias neurotóxicas liberadas en la zona de lesión, o bien, a su capacidad neurotrófica sobre las neuronas contiguas del hospedero.

## II- INTRODUCCION

La LTME ha captado el interés de diferentes disciplinas científicas y asistenciales, ya que dicha lesión en los seres humanos representa un problema socioeconómico de gran magnitud. Su manejo integral es muy complejo por lo que requiere de la intervención de un grupo multidisciplinario y de tecnología especializada, desde el momento del accidente hasta que el individuo es rehabilitado, generalmente con graves secuelas neurológicas permanentes (14, 66, 183).

En la antigüedad y hasta mediados de los años cuarenta, la mayoría de los pacientes con LTME morían durante las primeras horas como resultado del trauma inicial, o en las siguientes semanas, a consecuencia de infecciones y otras complicaciones (96). Después de la segunda guerra mundial, gracias a los múltiples avances en cuidados intensivos, farmacología, cirugía, rehabilitación, etc., se mejoró notablemente la posibilidad de sobrevivir. Sin embargo, la incidencia de morbi-mortalidad sigue siendo considerablemente elevada, aún en los centros de atención especializados en este tipo de lesión (14, 183).

De igual manera, la sección medular completa experimental en mamíferos adultos, no sólo se asocia con paraplejía, sino que también involucra la alteración de varias funciones somáticas y autonómicas que pueden ocasionar la muerte del animal en los primeros días o semanas subsecuentes a la lesión (49).



### III- ANTECEDENTES

#### A) Antecedentes históricos sobre regeneración y plasticidad del sistema nervioso.

Los fundamentos iniciales para el conocimiento del que disponemos en la actualidad sobre la regeneración del sistema nervioso central (SNC), fueron establecidos por Santiago Ramón y Cajal a principios de este siglo. Este investigador cortó la ME de mamíferos inferiores y observó que algunos axones empezaban a regenerar, sin embargo, dicho proceso se detenía después de las primeras dos semanas de la lesión (152). Pasaron varias décadas antes de que el tema se reinvestigara seriamente. Así, Sugar y Gerard (180) confirmaron los hallazgos de Ramón y Cajal. Windle (199, 200) luego de confirmar dichas observaciones, propuso que el proceso abortivo del crecimiento axonal pudiera deberse a la barrera mecánica que representaba la cicatriz fibrogliol reactiva a la lesión, y empleando diferentes sustancias como esteroides, hormonas y pirógenas, lograron que la cicatriz se hiciera más delgada y laxa, así como, que los axones crecieran durante más tiempo y una mayor longitud, sin embargo, no se consiguió recuperación funcional. El concepto de barrera mecánica para la regeneración prevalece hasta nuestros días, aunque no como única causa (ver adelante).

Al principio de la década de los cincuenta, Edds describió el fenómeno de crecimiento nervioso colateral (55). Este investigador seccionó parcialmente las fibras que inervaban un músculo esquelético y observó que de las fibras intactas crecían

prolongaciones preterminales en dirección al músculo denervado. Dichas prolongaciones permitían la restauración parcial del peso y la fuerza del músculo previamente denervado. Con este experimento se demostraba un principio fundamental de la neurobiología: la neuroplasticidad. Weddell (193) demostró un fenómeno idéntico en nervios sensitivos: después de seccionar un nervio cutáneo en el conejo, el área de anestesia se reducía con el paso del tiempo; la mejoría funcional se debía al crecimiento de nuevas fibras nerviosas procedentes de los nervios intactos de la piel circundante. De manera similar, se demostró en los ganglios simpáticos del gato, crecimiento y recuperación funcional dependiente de las colaterales neoformadas desde las fibras nerviosas residuales del nervio preganglionar (79, 110, 136, 197). Es importante dejar claro que son dos procesos diferentes el crecimiento calateral axónico y la regeneración de un axón terminal, ya que el primero resulta del crecimiento de un axón intacto, mientras que el segundo resulta del crecimiento de un axón lesionado.

El crecimiento colateral axónico parecía ser una propiedad inherente al sistema nervioso periférico (SNP), hasta que Liu y Chambers (121) demostraron que los axones de la ME podían ser estimulados para emitir prolongaciones colaterales. Ellos seccionaron varias raíces dorsales o la vía corticoespinal de manera unilateral; varios meses después seccionaron las raíces restantes del mismo lado, al igual que sus equivalentes contralaterales; 2 semanas después, empleando tinciones para identificar fibras degeneradas, observaron que el lado denervado

crónicamente se tenía más intensa y extensamente que el lado control, lo cual interpretaron como reinervación colateral del lado denervado crónicamente. Con este estudio se modificó el concepto que se tenía sobre la organización del SNC, al demostrar por primera vez plasticidad anatómica en dicho sistema. Estos hallazgos se han verificado por Goldberger y Murray entre otros (74, 137). La interpretación de los hallazgos de Liu y Chambers podría dejar dudas por haber empleado un método indirecto, sin embargo, Raisman (150) confirmó el crecimiento colateral en el SNC empleando microscopía electrónica cuantitativa en sus estudios de plasticidad en el núcleo septal del conejo.

En las últimas décadas, la neuroplasticidad ha sido objeto de múltiples estudios. En la actualidad, el término "neuroplasticidad" se usa para describir los principios asociados tanto con la reorganización neuronal que se presenta después del daño al sistema nervioso, como con la nueva organización neuronal creada por un factor inductor del ambiente externo. La primera, se conoce como plasticidad estructural, se relaciona con fenómenos de regeneración y de degeneración, y se enfoca a los mecanismos que inducen, guían y sostienen los cambios; la segunda, se conoce como plasticidad sináptica, se relaciona con el aprendizaje y con la memoria, y se enfoca más a los estímulos que inician los cambios, así como a los efectos fisiológicos y funcionales de éstos (29, 68, 104, 177).

Aún falta mucho por determinar con precisión el efecto funcional de la plasticidad estructural. En algunos casos, como en lesiones parciales de la vía piramidal, se ha demostrado que la

plasticidad estructural explica un cierto grado de recuperación funcional (106, 136); en otros, como sucede en los pacientes con enfermedad de Alzheimer, el crecimiento colateral axónico en torno a las placas cerebrales de amiloide, la plasticidad parece tener efectos deletéreos en algunas funciones cerebrales (42).

Los trasplantes al SNC pueden modificar los fenómenos de plasticidad espontánea por diversos mecanismos como: reemplazamiento de neuronas (24, 52, 196), guía y soporte trófico para el crecimiento y conectividad axonal (2, 24, 196), competencia entre prolongaciones del trasplante y del hospedero por ocupar sitios denervados disponibles para formar nuevas sinapsis (91), etc.

La inducción y soporte del crecimiento y conectividad neuronal han sido motivo de múltiples estudios. Desde principios de siglo se propuso la "hipótesis neurotrófica" que suponía la existencia de sustancias producidas por las estructuras blanco que atraían las fibras nerviosas (80, 89, 178). Al principio de los cuarenta, Weiss (194, 195) demostró que la orientación del crecimiento axonal después de una lesión de nervio periférico estaba dada por las bandas de Bungner constituidas por células de Schwann. A fines de los años cincuenta y principio de los sesenta, Levi-Montalcini y cols. (115, 116) aislaron y purificaron el primer factor neurotrófico, una proteína encontrada en las glándulas salivales del ratón y en el veneno de algunas serpientes y que llamaron "factor de crecimiento nervioso". Desde entonces se han hecho grandes progresos en la identificación, aislamiento y

purificación de moléculas solubles con efecto neurotrófico. Dichas moléculas son particularmente abundantes durante el desarrollo, en tejidos denervados y en las células gliales. Funcionalmente son promotores de supervivencia, crecimiento, guía y conectividad de las neuronas (4, 7, 13, 22, 41, 63, 71, 128, 159, 162, 187). No solo los factores neurotróficos solubles participan en los fenómenos de crecimiento y conectividad neuronal, también juegan un papel importante las moléculas de adherencia neural presentes en el cono de crecimiento (109, 114, 120, 141, 192), así como la matriz extracelular (4, 35, 118, 174, 179, 206).

## **B) Fisiopatología de la lesión medular.**

### **1. Lesión primaria y lesión secundaria.**

Después de producir una LTME, el daño no queda confinado exclusivamente al sitio de la lesión original, al paso del tiempo también se produce destrucción del parénquima medular contiguo, así como destrucción o atrofia de algunas neuronas distantes a la zona de lesión (61, 62, 75, 101, 102, 185).

El período de latencia relativamente largo entre el momento de la lesión y el desarrollo de necrosis máxima, permite diferenciar los eventos de la LTME en "primarios" y "secundarios". Los eventos primarios son el resultado directo del trauma inicial y varían de acuerdo al tipo e intensidad del mismo, mientras que la lesión secundaria es la producida por una secuencia de eventos deletéreos que siguen a la lesión primaria y que conllevan a un grado mucho mayor de necrosis parenquimal (75, 102).

Diferentes grupos de investigadores han generado datos sugiriendo

diversos mecanismos "secundarios" como responsables del daño final en la LTME. Probablemente la desregulación iónica sea el mecanismo de lesión secundaria más temprano, que obedece a la perturbación inicial de las membranas de las células dañadas, inducido por el evento traumático primario (9, 11, 90, 113, 166, 209). A medida que el tiempo transcurre, se desencadenan otros mecanismos deletéreos, entre los que se pueden destacar: liberación de neurotransmisores con efecto tóxico, producción de radicales libres y peroxidación de lípidos, isquemia, liberación de enzimas líticas y acidosis entre otros (ver referencias adelante).

#### Desregulación iónica

Como consecuencia del trauma inicial, las células de la sustancia gris y muchos axones de la sustancia blanca pierden el control de la regulación iónica y osmótica. Por tal motivo se inicia un intenso movimiento iónico que está determinado por sus gradientes de concentración y de carga; entre otras alteraciones a nivel intracelular, ocurre un incremento de los iones de sodio y calcio, con una disminución concomitante de los iones de potasio y magnesio. Al verse alterado el gradiente iónico, cesa rápidamente la conducción de impulsos nerviosos y se favorece la formación de edema (113, 209).

El incremento intracelular descontrolado del calcio iónico libre (ver adelante), desencadena mecanismos de lesión que pueden llevar a la muerte celular por diversos mecanismos incluyendo: inhibición de las funciones mitocondriales, depleción de ATP por

activación de ATPasa, activación de proteasas y fosfolipasas con el consiguiente catabolismo de proteínas y lípidos estructurales e inhibición del metabolismo celular (9, 90, 166).

Los neurofilamentos constituyen la parte fundamental del citoesqueleto axonal ya que mantienen el calibre y la longitud del axón y participan en el transporte rápido (54, 111, 112, 167). Las proteasas neutras activadas por calcio, producen una proteólisis masiva de los neurofilamentos, que puede llevar a la pérdida de soporte estructural con colapso progresivo y fragmentación del axón, todo lo cual ocurre durante las primeras horas o días subsiguientes a la lesión (10, 12, 90, 166, 167). El calcio-libre intracelular también activa proteasas y fosfolipasas que a su vez encuentran como sustratos los componentes de la mielina y pueden, en el mismo lapso, producir una desmielinización completa en el área de la lesión (10, 11, 90).

La disminución intracelular del magnesio iónico es directamente proporcional a la severidad de la lesión y su baja concentración altera actividades enzimáticas, disminuye la producción de energía y la síntesis proteínica, además de que incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática (113).

### Excitotoxicidad

Algunos aminoácidos excitatorios como el glutamato y el aspartato participan en parte en el daño neuronal secundario (58, 145, 204). Dichos aminoácidos en condiciones normales se encuentran almacenados en las neuronas para ser utilizados como neurotransmisores. Sin embargo, después del trauma se liberan en

grandes cantidades al espacio extracelular como resultado de la lesión directa de la membrana celular que los contiene, o bien, como resultado de la isquemia (172). Los aminoácidos extracelulares libres producen extensa excitación de las neuronas viables, en parte por permeación membranaral de calcio a nivel de los receptores correspondientes (134). El efecto tóxico de dichos aminoácidos se conoce como excitotoxicidad.

#### Neurotoxicidad por radicales libres y peroxidación de lípidos

Después de una lesión neurológica aguda se producen abundantes radicales libres en la zona de lesión, originados principalmente en la respiración mitocondrial, en la isquemia-reperfusión, por la conversión irreversible de deshidrogenasa de xantina a oxidasa de xantina, en la auto-oxidación de catecolaminas, en la cascada del ácido araquidónico y como producto de los neutrófilos activados (84, 97).

El SNC puede ser particularmente susceptible al daño inducido por radicales libres por varias razones. Los lípidos de membrana son especialmente ricos en colesterol y ácidos grasos poli-insaturados, los cuales son blanco de compuestos activos de oxígeno (radicales libres de oxígeno y peróxido de hidrógeno) (6). El SNC es pobre en actividad de catalasa y de glutatión peroxidasa y tiene una cantidad moderada de superóxido dismutasa (enzima que destruye al ión superóxido); es rico en hierro y el hierro es el principal inductor de la producción de radicales libres en lesiones del SNC. El ácido ascórbico se encuentra en altas concentraciones tanto en la sustancia gris como en la blanca y aunque funciona como antioxidante cuando se presenta



solo y en altas concentraciones; en presencia del hierro y del cobre liberados por la extravasación de sangre después del trauma, el ácido ascórbico produce grandes cantidades de radicales libres (5). Las neuronas contienen un gran número de lisosomas, cuyas membranas son dañadas por los radicales libres, dando por resultado la liberación de enzimas hidrolíticas dentro del citoplasma de las propias neuronas (57, 83, 208).

Tanto en lesiones medulares como cerebrales se ha demostrado incremento en la producción de malondialdehído (producto de la lipoperoxidación). En ambas lesiones se ha demostrado destrucción del colesterol extraíble y consumo de los principales antioxidantes (ácido ascórbico y alfa tocoferol) (6, 148), así como inhibición de la actividad de la ATPasa sodio-potasio dependiente, siendo ésta una de las manifestaciones tempranas de la peroxidación de lípidos (37).

Con el uso temprano de atrapadores de radicales libres (como la metilprednisolona) después de una lesión medular, se observa mejor evolución funcional tanto en animales de experimentación (6, 163), como en humanos (28, 85).

### Isquemia

La isquemia que se presenta después de la LTME desempeña un papel importante en el desarrollo de la lesión secundaria. Los valores del flujo sanguíneo inicialmente permanecen en un rango normal y alcanzan su nivel crítico en la región central entre una y tres horas post-lesión; en la sustancia blanca el nivel crítico se alcanza más tardíamente. El grado de isquemia es directamente

proporcional a la intensidad de la lesión e inversamente a la extensión de la recuperación funcional (8).

Entre los mecanismos descritos dentro de la fisiopatología de la isquemia, diferentes autores destacan (53, 72, 76, 82, 95, 161, 207):

1- La acción directa del traumatismo sobre los vasos sanguíneos.  
2- La hipotensión arterial sistémica ocasionada por disminución de la actividad simpática y predominio de la actividad parasimpática.

3- La vasoconstricción local por:

a. Espasmo del músculo liso arteriolar como probable consecuencia de la elevación de los niveles de calcio intracelular.

b. Elevación de metabolitos vasoactivos derivados del ácido araquidónico (ej. prostaglandinas F2 o TXA2).

c. Producción de radicales libres y peroxidación de lípidos vasculares.

4- Microtrombosis por adherencia plaquetaria a las paredes vasculares alteradas, lo cual pudiera también estar determinado por un desbalance entre tromboxano y prostaciclina.

## 2. Obstáculos para la regeneración medular.

Es bien sabido que en los mamíferos adultos las neuronas no tienen la potencialidad para dividirse (151, 152) y que los axones centrales lesionados no se regeneran de manera apropiada para permitir el restablecimiento funcional (16, 17, 59, 81, 101, 176). Las manifestaciones clínicas más aparentes asociadas a la pérdida local de neuronas y al daño de las vías intersegmentarias

en el área de la lesión, son la parálisis flácida y las alteraciones de la sensibilidad confinadas a los miotomos y dermatomos correspondientes, mientras que la pérdida funcional extensa por abajo del nivel de la lesión, se explica por la regeneración inapropiada de las vías largas tanto ascendentes (aférentes) como descendentes (eferentes), las cuales no logran crecer ni tampoco establecer las conexiones apropiadas (190, 201, 202). Esto es un problema multifactorial, en el que participan: 1- la formación de la cicatriz fibroglial con efecto de barrera física para el crecimiento axonal (122, 155, 199, 200); 2- la inhibición del cono de crecimiento axonal por contacto con proteínas presentes en la membrana de los oligodendrocitos maduros y en su producto: la mielina central (36, 164, 168, 169) o por una fracción de proteoglicanos presente en la membrana de la microglia activada (27), 3- la respuesta inmune contra antígenos del propio SNC (ver adelante).

La incapacidad para la regeneración medular en los mamíferos adultos, contrasta con la extensa capacidad regenerativa del SNP de los mismos, así como de la ME de algunos vertebrados inferiores (124).

La diferencia en la capacidad de regeneración entre el SNC y el SNP, antiguamente se atribuía a una incapacidad primaria de las neuronas centrales para crecer sus axones. Ramón y Cajal sugirió que tal diferencia radicaba en las células gliales y no en las neuronas, al observar que las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales regeneran sus axones únicamente donde existen

células de Schwann, no así, donde tales células son reemplazadas por oligodendrocitos al entrar a la ME (152). Demostraciones más recientes del crecimiento de los axones del SNC dentro de injertos de nervio periférico (2, 15, 50, 103, 156, 157, 165), confirman que las neuronas maduras del SNC retienen considerable potencialidad para su elongación, siempre y cuando exista un microambiente favorable en la zona de la lesión, en este caso, propiciado por las células de Schwann y el tejido conjuntivo neural periférico.

Los estudios sobre las estrategias que utilizan los vertebrados inferiores para regenerar sus axones medulares después de una lesión, han definido considerablemente la interacción celular que contribuye a los procesos de crecimiento axonal y recuperación funcional. En tales vertebrados el proceso de reparación se inicia por multiplicación de células mesenquimatosas poco diferenciadas que llenan el espacio creado por la sección medular. Las células ependimarias del canal central, proliferan a partir de ambos muñones medulares y migran dentro del mesénquima hasta reunirse y formar un puente que une ambos muñones. Hasta entonces se inicia la elongación axonal. La mayoría de los axones crecen en sentido longitudinal, aparentemente guiados por la superficie de las células ependimarias y de otras células gliales como los astrocitos. Cabe mencionar que la recuperación funcional ocurre en ausencia de restitución anatómica normal, pues muchas de las terminaciones de los axones regenerados son aberrantes y no llegan a hacer conexiones con las células blanco originales. Sin embargo, la recuperación funcional se explica por la

regeneración axonal, pues en caso de volver a seccionar la ME en el mismo sitio o en otro más cefálico, la función ganada se pierde de nueva cuenta (133, 170, 173, 205).

### 3. Aspectos inmunológicos de la lesión medular.

En los vertebrados superiores y particularmente en los mamíferos, el SNC está considerado como un sitio "privilegiado inmunológicamente", pues sus antígenos quedan secuestrados del sistema inmune (SI) por la barrera hemato encefálica (BHE) y por la ausencia de drenaje linfático parenquimal, por lo que se considera que los componentes del SNC se encuentran relativamente aislados del SI (87, 108).

Después de una lesión del SNC, puede desencadenarse una respuesta autoinmune contra los componentes normales del tejido nervioso. Uno de los primeros eventos es la ruptura de la BHE, lo que permite un estrecho contacto entre el SI y el SNC. Los astrocitos, después de la lesión neural, expresan en su superficie sustancias del complejo principal de histocompatibilidad y son capaces de presentar antígenos a linfocitos T activados, mostrando con esto su capacidad de mediar lisis en células blanco (19, 198), por lo que se consideran bajo estas condiciones, células coadyuvantes del SI. La respuesta inmune humoral también participa en el daño al propio SNC; se han detectado autoanticuerpos contra el sistema nervioso en el suero de pacientes a diferentes tiempos después de una LTME (135), también se han identificado complejos inmunes recubriendo a las vainas de mielina en el área de lesión medular en conejos (143), así como astrocitos positivos a IgM o a IgG a diferentes tiempos después

de una LTME en ratas (19). Por otro lado, las células cebadas y los macrófagos activados reclutados en la zona de lesión, secretan proteasas mielinolíticas que contribuyen de manera importante a la desmielinización (26, 147, 181, 198). Se piensa que los fenómenos inmunológicos descritos pueden estar en relación con el proceso de degeneración progresiva observada en los estadios ulteriores a la LTME.

### C) Modelos experimentales de lesión medular.

Para entender mejor la naturaleza y los aspectos fisiopatológicos que intervienen en la evolución del trauma medular, así como para evaluar diversos tipos de tratamiento, se han desarrollado diferentes modelos experimentales de lesión, los cuales ofrecen la oportunidad de obtener lesiones medulares de intensidad y características con un rango de variabilidad relativamente constante, en condiciones controladas. En términos generales, existen tres modelos experimentales para inducir trauma medular: lesión tipo contusión-compresión, corte limpio con cuchillo y lesión tipo laceración. Cada modelo tiene muchas variantes y en la literatura existen abundantes reportes en cuanto a técnica, objetivos, ventajas y desventajas, posibilidades y limitaciones, uso racional, histopatología, contribuciones conceptuales, consideraciones clínicas, críticas, etc. (para revisión: 47, 48). A continuación se destacan los aspectos fundamentales de cada uno de los tipos de lesión medular experimental.

La lesión tipo contusión-compresión se considera actualmente el modelo experimental que reproduce más fielmente lo que sucede en

la mayoría de los casos de LTME en humanos. Esta técnica fue desarrollada originalmente por Allen en 1911 (3) con el objeto de inducir un trauma medular de manera cuantitativa, sin incidir directamente sobre los axones de la sustancia blanca o las neuronas de la sustancia gris. Para producir este tipo de lesión, se expone la ME a través de una laminectomía y conservando las meninges íntegras se deja caer sobre la ME un cilindro de un peso conocido desde una altura predeterminada, a través de un tubo guía. Existe una relación directa entre la fuerza del impacto y la intensidad del trauma. Ventajas: 1) se puede cuantificar el umbral (fuerza necesaria para producir paraplejía permanente), 2) al preservar la integridad de las meninges se evita la penetración de tejido conectivo laxo y de líquido intersticial. Limitaciones: 1) hay una considerable variabilidad entre la cantidad de sustancia gris y sustancia blanca destruida, así como, frecuente lateralización (derecha-izquierda) del impacto, 2) al momento de la lesión es difícil predecir cuáles serán los axones que finalmente degeneren y cuáles los que se preserven, 3) los axones preservados pueden ser identificados erróneamente como axones regenerados. Contribuciones conceptuales: 1) la importancia de la lesión secundaria (autodestructiva), 2) la progresión o la regresión en función del tiempo y de la intensidad del trauma (umbral y subumbral), 3) alteración de sustancias gris y blanca.

El modelo de lesión "Corte limpio con cuchillo" se ha usado principalmente con el objeto de investigar aspectos relacionados con la regeneración axonal y con la cicatriz fibrogliosa, más que la relación entre el grado de lesión y la paraplejía, pues se ha

demostrado que únicamente la sección bilateral completa produce paraplejía. En este modelo, la lesión primaria es más importante y determinante de la evolución que la secundaria. Técnica: se expone la ME mediante laminectomía, se cortan longitudinalmente las meninges y se corta la ME en el plano transversal, de acuerdo a la profundidad de este último corte se puede producir sección de vias y fascículos de manera selectiva, hemisección parcial uni o bilateral y sección bilateral completa. Ventajas: 1) la extensión de la lesión puede ser visualizada directamente durante la cirugía, 2) la hemorragia puede ser detectada y controlada de inmediato, 3) el modelo proporciona una preparación bien controlada para estudios de regeneración axonal. Limitaciones: 1) por ser una lesión abierta, permite la penetración de tejido conectivo laxo y de líquido tisular, 2) el uso de electrocoagulación para controlar la hemorragia, agrega variables independientes al experimento, 3) al momento de cortar, algunos axones pueden ser desplazados y permanecer íntegros, tales fibras pueden ser identificadas erróneamente como axones regenerados. Contribuciones conceptuales: 1) la causa de la paraplejía es el corte de los axones de los tractos largos, más que el corte de todos los axones en todos los tractos, 2) Distinción clara entre paraplejía transitoria y permanente, 3) aunque con el modelo no se ha logrado demostrar regeneración de axones seccionados, se ha demostrado el crecimiento de colaterales axónicas.

La lesión tipo laceración combina características de los dos modelos de lesión anteriores. Técnica: se expone la ME, se inciden las meninges longitudinalmente y con cuchillo o tijeras



se corta la ME en 2 puntos y se extrae tejido medular dejando una cavidad que puede ser de tamaño variable. El objeto es producir una lesión con ablación de tejido neural en la región. Este modelo puede simular la situación de algunas fracturas en humanos con penetración de fragmentos vertebrales a la ME; es útil para estudiar varios aspectos del trauma tales como la lesión primaria directa, primaria indirecta, secundaria y la degeneración progresiva, así como la interacción entre ellas que resulta en la degeneración gradual de los axones preservados (si es el caso). Es el modelo que más se ha empleado para investigación con trasplantes a la ME, ya que la cavidad creada da cabida y retención a los tejidos trasplantados. Ventajas: 1) se puede obtener paraplejía permanente después de lesiones parciales, lo que permite estudiar el destino del sistema axonal preservado; 2) la extensión de la lesión y la cantidad de tejido preservado pueden definirse en términos anatómicos, lo que permite clasificar las lesiones en umbral, subumbral y supraumbral; 3) puede ser usado para analizar la naturaleza de las condiciones patológicas secundarias y su interacción con el tejido medular contiguo a la lesión. Limitaciones: 1) es una lesión abierta, con sus implicaciones quirúrgicas; 2) se produce abundante hemorragia; 3) los animales con una lesión parcial extensa o total, muestran paraplejía permanente y sobre todo una sobrevida muy corta. Contribuciones Conceptuales: 1) explica en términos histopatológicos el por qué, bajo ciertas condiciones de trauma, un animal desarrolla paraplejía y no bajo otras condiciones; 2) si bien la sección completa del sistema axonal de tractos largos

es la base de la paraplejía permanente, no necesariamente tal corte debe ser hecho en el momento del trauma, ya que puede ser producto de un proceso degenerativo gradual en un período de tiempo; 3) la fase de paraplejía transitoria tiene importancia clínica, dado que cualquier medida terapéutica debe instaurarse antes de que los cambios secundarios y degenerativos la conviertan en permanente; 4) no necesariamente deben preservarse la mayoría de los axones para una recuperación motora útil (56, 201), y al menos en la rata y en el gato, no se requiere de los axones corticoespinales para lograr dicha recuperación, es suficiente con preservar algunos axones de la vía reticuloespinal y posiblemente vestibuloespinal (138). Las consideraciones anteriores están basadas fundamentalmente en lesiones parciales, el modelo de laceración total ha sido muy poco empleado por sus efectos devastadores.

#### **D) Trasplantes a la médula espinal.**

Una alternativa para estimular la regeneración de la ME lesionada es el uso de trasplantes neurales (186). Para este propósito se han diseñado básicamente tres estrategias de trasplante:

a) Trasplante a la zona de lesión, esperando que funcione como puente o relevo entre las estructuras suprasedimentarias y la ME caudal. Se ha demostrado que el injerto de segmentos de nervio periférico en zonas de lesión de la ME, apoya el crecimiento de axones de neuronas centrales al proveer un microambiente favorable para la regeneración, pero dichos axones son incapaces de continuar su crecimiento más allá de 1 a 2 mm al retornar a la

ME. Además; no forman sinapsis apropiadas que permitan la recuperación de funciones perdidas (1, 156-158).

Otros intentos para formar puentes o relevos en la zona de lesión medular se han hecho implantando tejido fetal del SNC. Para este propósito se han diseñado múltiples estrategias. El tipo de lesión que mas se ha utilizado es la laceración aguda parcial (20, 86, 94, 98, 184) o completa (34, 46, 69, 144, 180), aunque también se han empleado lesiones crónicas (93, 182). Para el implante se han usado tanto tejido homotópico (20, 69, 93, 94, 98, 182), como heterotópico (18, 69, 86, 98). Uno de los parámetros de evaluación más constante es en relación a la sobrevivencia, crecimiento e integración del implante con el hospedero. En términos generales, los tejidos trasplantados muestran una mayor tasa de viabilidad cuando son implantados en lesiones agudas parciales o en lesiones crónicas y pobre o nula viabilidad en lesiones agudas completas. Tienen mayor capacidad de crecimiento los tejidos de origen cerebral (heterotópicos) que los de ME (homotópicos). Se integran mejor al hospedero después de lesiones parciales agudas al comparar con lesiones crónicas, donde la integración es parcialmente obstaculizada por la cicatriz fibrogliosa; en lesiones agudas completas no se ha reportado integración injerto-hospedero. Los trasplantes de tejido fetal, a excepción de los colocados en la cavidad de una lesión aguda completa, son substrato adecuado para el crecimiento de axones centrales (69, 86, 93) o periféricos (94, 98) y sus neuronas pueden hacer sinapsis con neuronas del hospedero o viceversa. También se ha demostrado que son capaces de evitar la muerte

retrograda de neuronas axotomizadas (30, 99). Desde el punto de vista funcional, en adultos se ha reportado disminución leve del deficit funcional motor (20, 21, 182), mientras que en neonatos, los trasplantes pueden favorecer una recuperación motora mayor y más rápida (107). Recientemente se ha demostrado que los bioimplantes de matriz colágena colocados en la cavidad creada después de una laceración medular completa, favorecen la regeneración de axones centrales a través de la zona de lesión. Dichos implantes se han probado solos (70, 127), en combinación con tejido fetal (69) y asociados a transposición de epiplón (51).

b) trasplante de motoneuronas a la zona de lesión para reinervar músculos segmentarios. Recientemente se ha demostrado que las motoneuronas embrionarias trasplantadas al SNC adulto son capaces de diferenciarse y de migrar (52), reinervan segmentos de nervio periférico implantados en la ME en una posición adyacente a dichas neuronas (38), además, reinervan músculo esquelético cuando se implanta en la ME una preparación de nervio periférico unido al músculo (139, 171).

c) trasplante de neuronas monoaminérgicas para restaurar circuitos suprasegmentarios perdidos. Empleando el modelo de sección medular completa o inyectando neurotóxicos específicos para neuronas monoaminérgicas, no se logra reinervación espontánea por dichas neuronas en la porción caudal a la lesión. Con el empleo de trasplantes de tejido fetal obtenido de núcleos del tallo cerebral ricos en neuronas monoaminérgicas, colocados en posición caudal a la zona de lesión, se ha demostrado que las neuronas

implantadas sobreviven, crecen y hacen sinapsis con neuronas del hospedero, así mismo, mantienen la expresión de sus neurotransmisores (23, 39, 40, 140, 142, 149). Funcionalmente se ha demostrado reforzamiento de los reflejos flexores en las patas posteriores de ratas (33) y se estudian otros posibles efectos en funciones autonómicas y somáticas (39).

Se han propuesto diferentes mecanismos de interacción de los trasplantes neurales con el hospedero para explicar la recuperación neurológica en modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas, particularmente trasplantando sustancia nigra y/o estriado fetal al estriado lesionado de animales adultos (24, 41, 191). Los principales mecanismos propuestos son: 1- Restauración de circuitos neuronales dañados, 2- disponibilidad de neurotransmisores para operar circuitos preexistentes, 3- estimulación de la revascularización, 4- remoción de sustancias tóxicas y 5- promoción de supervivencia y crecimiento neuronal por interacción trófica injerto-hospedero.

A diferencia de los resultados obtenidos en el encéfalo, la ME ha sido considerada por muchos como una de las estructuras del SNC más difíciles para llevar a cabo trasplantes exitosos desde el punto de vista funcional, debido a sus peculiaridades anatómicas, especialmente al predominio de axones largos (45, 62, 123).

En relación al tejido nervioso inmaduro como injerto, particularmente las células gliales, producen factores tróficos y matriz extracelular que juegan un papel muy importante durante el desarrollo y ofrecen un microambiente favorable para la

regeneración neural, cuando se colocan en un sitio contiguo al de lesión del SNC adulto (4, 7, 60, 73, 119, 176); el período óptimo para su obtención y trasplante es el estadio de desarrollo en el cual las neuronas se multiplican y migran (43, 191). Resulta también de interés la observación de que los oligodendrocitos inmaduros (obtenidos mediante cultivo o disociación de SNC de ratas o ratones neonatales o fetales), mantienen su capacidad de remielinizar axones centrales, cuando son implantados en áreas de ME desmielinizada por la aplicación de tóxicos desmielinizantes como la lisolecitina o el bromuro de etidio; dichas células no solo mielinizan en el sitio donde son implantadas, sino que además son capaces de migrar y mielinizar a distancia (25, 77). Esta capacidad de remielinización pudiera ser útil en esclerosis múltiple y en otras enfermedades desmielinizantes (88, 125).

#### Inmunología de los trasplantes neurales

Tradicionalmente se ha considerado que el SNC es un sitio "privilegiado inmunológicamente" (ver argumentos en la sección III.B-3). Desde hace mucho tiempo se sabe que los injertos no autólogos colocados en el SNC, sobreviven mejor que los injertos colocados en la periferia. Sin embargo, tal privilegio dista mucho de ser absoluto en lo que se refiere a la ausencia de rechazo de los trasplantes neurales. Los receptores de trasplante, aún siendo de la misma cepa, pueden tener una respuesta alta o baja a los antígenos del donador; bajo condiciones similares de trasplante, los que muestran una alta respuesta inmunológica rechazan el tejido injertado, mientras que

en los poco reactivos, el tejido sobrevive mucho tiempo (129); este fenómeno se ha denominado "estatus de respuesta"; y aun cuando no se tiene una explicación convincente de dicho fenómeno, se utiliza como el argumento principal para el empleo de inmunosupresores en los neurotrasplantes clínicos de tipo alogénico.

La velocidad con que se vasculariza el injerto y el tiempo que permanece abierta la BHE, parecen ser determinantes en la generación de la respuesta inmune y en la capacidad de sobrevida del injerto (31). En animales que han sido sensibilizados previamente a antígenos del donador, los injertos colocados en el SNC son rechazados rápidamente (132). Cuando se ha establecido una sobrevida prolongada de alo o xenoinjertos, éstos pueden ser rechazados rápidamente si se sensibilizan al receptor con antígenos del donador (175). Por otro lado, en los casos de xenoinjertos donde las diferencias antigénicas son muy grandes, el rechazo es la regla, habitualmente durante los primeros veinte días (65, 130). Finalmente, se ha desechado el concepto de que el tejido neural es no inmunogénico per se, pues es rechazado rápidamente cuando se coloca fuera del SNC, por ejemplo, al implantarse bajo la cápsula renal (129).

El inmunodepresor más usado para evitar el rechazo en trasplantes neurales es la ciclosporina A, por su efecto selectivo sobre el tejido linfoide, con inhibición de la respuesta inmune celular y humoral a bajas dosis (5-10 mg/kg/día) (32, 64, 78).

#### IV TRABAJO DE INVESTIGACION

##### A) Planteamiento del Problema

La lesión secundaria de la ME es el resultado de una cascada de eventos autodestructivos que se presentan después del trauma inicial. Dicha lesión es la causa de que algunas lesiones originalmente incompletas evolucionen a lesiones completas. Desconocemos si el implante de tejidos en la zona de lesión original puede evitar, al menos en parte, la lesión secundaria.

Las preguntas a responder en el primer experimento fueron:

El implante de ME fetal alogénica y/o xenogénica (humana) colocado en el área de lesión inmediatamente después de una laceración medular completa en rata adulta

- 1- Protegerá al parénquima medular del hospedero de la lesión secundaria?
- 2- Se mantendrá histológicamente viable?
- 3- Se integrará anatómicamente a la ME hospedero?

Las preguntas a responder en el segundo experimento fueron:

- 1- El implante de otros tejidos o sustancias tienen el efecto benéfico observado en el primer experimento?
- 2- Puede el implante de otros tejidos o sustancias modificar la pérdida de peso y/o el tiempo en el que se recuperan los reflejos después de una lesión severa de la ME?
- 3- Existe alguna diferencia entre la destrucción del parénquima medular del hospedero al emplear diferentes implantes inmediatamente después de una laceración medular completa en ratas?



## B) Hipótesis General

En el primer experimento:

- 1- El aloinjerto y/o el xenoinjerto (humano) homotópico de tejido fetal colocado en el área de lesión inmediatamente después de una laceración medular completa en rata adulta, se mantendrá viable, y protegerá de la lesión secundaria al parénquima medular del hospedero, aún cuando no se integre anatómicamente.

En el segundo experimento:

- 1- El autoimplante de nervio periférico o de tejido adiposo, así como el implante de Gelfoam (esponja de fibrina) o de ME fetal homóloga, después de una laceración medular completa en ratas adultas, en comparación con animales lesionados no implantados, propiciarán:
  - a) Mayor sobrevivencia de los animales implantados.
  - b) Recuperación más temprana del choque medular en los animales implantados.
  - c) Menor pérdida de peso en los animales implantados.
  - d) Menor destrucción del parénquima medular vecino a la zona de lesión en los animales implantados.

### C) Objetivos

En el primer experimento:

Evaluar histológicamente el efecto del implante de ME fetal alogénica y/o xenogénica (humana) en el área de lesión después de una laceración medular completa en ratas adultas, en términos de:

- 1- Destrucción del parénquima medular del hospedero.
- 2- Viabilidad del implante.
- 3- Integración anatómica del implante con el parénquima medular del hospedero.

En el segundo experimento:

Evaluar el efecto del autoimplante de nervio periférico y/o de tejido adiposo, así como el implante de Gelfoam o de ME fetal homóloga, en el área de laceración medular completa en ratas, en términos de:

- 1- Sobrevida de los animales después de la lesión.
- 2- Tiempo de recuperación del choque medular después de la lesión, a juzgar por el retorno de reflejos nociceptivos.
- 3- Pérdida de peso en los animales después de la lesión.
- 4- Extensión de la destrucción del parénquima medular vecino a la zona de lesión inicial.

### Primer Experimento

**Grupos Experimentales.** Se utilizaron 41 ratas Long-Evans, hembras, de 14 a 15 semanas de edad y con peso corporal de 200 a 230 g. Todos los animales fueron sometidos a laceración completa de la ME y se dividieron en tres grupos: grupo A (n = 18), las ratas recibieron un implante homotópico de ME fetal alogénica inmediatamente después de la lesión; grupo B (n = 5) las ratas recibieron un implante homotópico de ME fetal xenogénica (humana), solo se implantaron 5 ratas debido a que no fue posible obtener tejido para implantar un mayor número de animales; grupo C (n = 18), ratas unicamente lesionadas sin implante (grupo testigo).

**Preparación de los fragmentos de ME para implante.** La ME fetal de rata se obtuvo de fetos de la misma cepa. En el 15o. día de gestación (tomando el día de apareamiento como día 0), las ratas se anestesiaron con una mezcla de ketamina (63 mg/kg) y haloperidol (16 mg/kg) IM. Los fetos fueron extraídos por cesárea en condiciones asépticas, luego colocados en solución salina isotónica sobre hielo. La disección completa de la ME fetal se llevó a cabo con microespátulas, en dirección caudo-rostral, bajo visión en un microscopio quirúrgico. Finalmente se tomó para implante un fragmento de 2 mm de longitud de la región medio torácica, teniendo cuidado de eliminar completamente las meninges.

La ME de cadáver fetal humano se obtuvo de los mismos fetos

expulsados a manera de aborto espontáneo y donados para el programa de homotrasplantes a pacientes con enfermedad de Parkinson (126). El rango de edad gestacional fue de 10 a 14 semanas. Los fetos se mantuvieron en solución salina estéril, sobre hielo, hasta completar la disección de los tejidos. La disección y preparación de cada ME para implante se llevó a cabo básicamente como se describió en el párrafo previo. Los fragmentos de ME fueron trasplantados entre 3 y 4 horas después de la muerte fetal. Todos los fetos fueron expulsados aún vivos, la hora de su muerte fue determinada y registrada por dos médicos pediatras adscritos al hospital donde se atendió el aborto.

**Cirugía y Cuidados Posquirúrgicos.** Para producir la lesión medular, las ratas fueron anestesiadas como se describió previamente, luego se practicó una laminectomía incluyendo los niveles T7-T8, en condiciones de esterilidad y bajo visión estereomicroscópica. La ME se expuso a través de una incisión longitudinal de la duramadre (de aproximadamente 4 mm de longitud) y se resecó un fragmento de ME de 2 mm de longitud; con el objeto de producir las lesiones de igual magnitud se hizo un montaje con dos hojas de bisturí del número 11 con una separación de 1.8 mm entre sus filos, con dicho instrumento se cortó parcialmente la ME, luego se completó el corte con microtijeras con el objeto de evitar lesiones incidentales de la duramadre. Para corroborar que la sección medular fuera completa, incluyendo los ligamentos dentados, se pasó un microgancho a través de todo el contorno interno de la duramadre. Después, en las ratas de los grupos A y B, se colocó de inmediato el tejido de trasplante

correspondiente dentro del hueco creado entre los dos muñones medulares. El tejido se implantó como un fragmento único de aproximadamente 2 mm de longitud y de todo el espesor de la ME incluyendo substancia gris y blanca, se procuró que su orientación rostro-caudal y ventro-dorsal coincidieran con la ME del hospedero. En las ratas del grupo C, el espacio entre los muñones medulares se dejó libre de tejido. Finalmente, la duramadre fue suturada con monofilamento de nylon 9-0, la aponeurosis y la piel fueron suturadas por separado con monofilamento de nylon 5-0. Después de la cirugía, las ratas recibieron penicilina benzatínica en dosis intramuscular única de 240,000 UI, luego fueron colocadas en una unidad de cuidados intensivos para animales menores (Schroer Manufacturing Co., Kansas City) hasta que se recuperaron de la anestesia.

Los animales fueron alimentados ad libitum y colocados en jaulas individuales con aserrín estéril. El intestino y la vejiga neurogénica fueron manejados manualmente 2 veces al día hasta que se recuperó el automatismo. En todos los casos se administró ciclosporina A a dosis de 10mg/kg/día vía oral, iniciando el día de la cirugía y hasta el día en que se sacrificaron o murieron. En los animales con autofagia se les practicó aseo diario del área cruenta e inmediatamente después se les aplicó localmente furoxona (Topazone). No se administró ningún otro medicamento para manejo de las complicaciones que se presentaron. El tiempo de seguimiento programado fue de 8 semanas después de la cirugía.

Para el estudio histológico, los animales fueron sacrificados por

perfusión intraórtica 8 semanas después de la cirugía o antes si la rata presentaba complicaciones severas. Para la perfusión se anestesiaron con la misma mezcla anestésica empleada en la cirugía, seguida de lo cual se aplicó una dosis intraperitoneal de 1000 UI de heparina. Se practicó una toracotomía amplia, se canuló la aorta ascendente y empleando una bomba peristáltica (Masterflex; Cole-Parmer Inst. Co. Chicago Il.) se perfundieron 100 ml de solución salina fisiológica, seguido de 500 ml de formol al 10%. Ambas soluciones se perfundieron a una velocidad de 30 ml/min. Al término del procedimiento se extrajo la ME y se almacenó en el mismo fijador durante una semana, al cabo de la cual, un segmento de 2 cm de largo, incluyendo la zona de lesión en el centro, fue deshidratado en alcoholes graduales y finalmente embebido en parafina. Se hicieron cortes seriados de 7 micras de espesor en sentido sagital y se tiñeron con hematoxilina y eosina, Masson, Gallego y azul firme de luxol.

**Análisis Estadístico.** Para evaluar la probabilidad de supervivencia se emplearon las curvas de Kaplan-Meier. A efecto de determinar la significancia estadística de las diferencias entre las curvas de supervivencia se usó la prueba de Mantel-Haenszel (131).

**Consideraciones Éticas y Legales del uso de tejidos humanos y animales en experimentación biomédica**

**1- En relación al empleo de tejidos de cadáver de feto humano:**

La disposición y utilización de los tejidos de cadáver de feto humano empleados en el presente experimento, se llevó a cabo cubriendo el requisito de un dictamen de no viabilidad biológica del producto emitido por dos médicos distintos a los del equipo

del trasplante y la autorización escrita de la progenitora. Tales documentos, se encuentran en los archivos de la Unidad de Investigación Clínica en Neurología y Neurocirugía del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

El manejo de los cadáveres de feto humano se apegó estrictamente al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Organos, Tejidos y cadáveres de Seres Humanos, publicado en el Diario Oficial de la Federación el día 18 de febrero de 1985.

La justificación para el empleo de ME de cadáver de feto humano fué el desconocimiento del comportamiento de dicho tejido en un medio hostil, como el que se produce después de una laceración medular completa. El conocimiento generado en tal sentido, podría ser de utilidad para su posible utilización clínica en el futuro.

2- En relación al uso de animales para experimentación biomédica:  
Para la realización del presente proyecto se tomaron en cuenta los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación Para la Salud (Título Séptimo: De la Investigación que incluya la utilización de animales de experimentación) (117).

### **Segundo Experimento**

**Grupos experimentales.** Se sometieron a LMC a ratas de las mismas características del primer experimento, hasta completar 6 ratas que sobrevivieran 12 días después de la lesión por grupo. Grupo 1, ratas implantadas con ME fetal homóloga; Grupos 2 y 3, ratas

autotrasplantadas con nervio periférico o con tejido adiposo respectivamente; Grupo 4, ratas implantadas con esponja de fibrina (Gelfoam); Grupo 5, ratas lesionadas que no recibieron implante.

En cuanto a la preparación de tejidos para implante, el tejido fetal homólogo se obtuvo de manera idéntica a la descrita en el primer experimento. El nervio periférico se obtuvo del nervio ciático derecho de la rata a ser trasplantada. El tejido adiposo se obtuvo del tejido celular subcutáneo presente en el área de la herida quirúrgica.

La cirugía de lesión medular y los cuidados posquirúrgicos fueron los mismos descritos en el primer experimento. El espacio creado entre los dos muñones medulares se llenó con el implante correspondiente. El nervio periférico se liberó del epineurio y se cortó en fragmentos de aproximadamente 2 mm de longitud, 2 de estos fragmentos se colocaron en la zona de lesión procurando una orientación longitudinal con el eje mayor de la ME. Del tejido adiposo y del Gelfoam se cortaron fragmentos de tamaños equivalentes al hueco medular.

La evaluación clínica incluyó: 1- índice de sobrevivida: las ratas que murieron antes de completar el tiempo de seguimiento programado, se tomaron en cuenta para realizar las curvas de sobrevivida así como la prueba de Mantel-Haenszel. En este segundo experimento no se sacrificaron ratas antes de los 12 días aun cuando se encontraran con complicaciones severas, esto con el objeto de evitar un posible sesgo en las curvas de sobrevivida.



2- tiempo en que se recuperaron los reflejos, se anotó el día en que mostraron reflejo de retiro de cola y pata izquierda después de estimular con una aguja y los resultados se analizaron con la prueba de Wilcoxon; 3- porcentaje de pérdida de peso corporal, este parámetro se evaluó solo en las ratas que sobrevivieron los 12 días y se analizó con la prueba T pareada.

Para la evaluación morfológica, las ratas fueron sacrificadas a los 12 días de la cirugía. La ME fue procesada para estudio histológico como se describió previamente. En los animales donde se implantó alguno de los tejidos se evaluó la viabilidad histológica del mismo. Para el análisis morfométrico de la cantidad de destrucción del parénquima medular se utilizó un método estereológico: se seleccionó de cada espécimen (sin conocimiento del grupo, excepto cuando se identificaba el tejido implantado al observar al microscopio) la laminilla donde se observara el epéndimo más cerca de la zona de lesión o en la que hubiera mayor cantidad de epéndimo, se fotografió y se dibujó el área de destrucción parenquimatosa en papel milimétrico, excluyendo el área de laceración original, la cual fue identificada fácilmente en todos los casos; después se contó el número de cruces de 5 mm en la zona destruida y se convirtió a milímetros cuadrados. Finalmente se analizó con la prueba U de Mann-Whitney.

## E) Resultados

### Evaluación clínica

#### Primer experimento

En la Tabla I se muestra el número total de días que sobrevivió cada rata del primer experimento. En el grupo A (aloinjerto) sobrevivieron 8 semanas el 22.2%, en el grupo B (xenoinjerto) sobrevivieron el 40% y en el grupo sin trasplante sólo el 5.6%.

**TABLA I.** Sobrevida de ratas sometidas a sección medular con y sin trasplante homotópico alogénico y xenogénico.

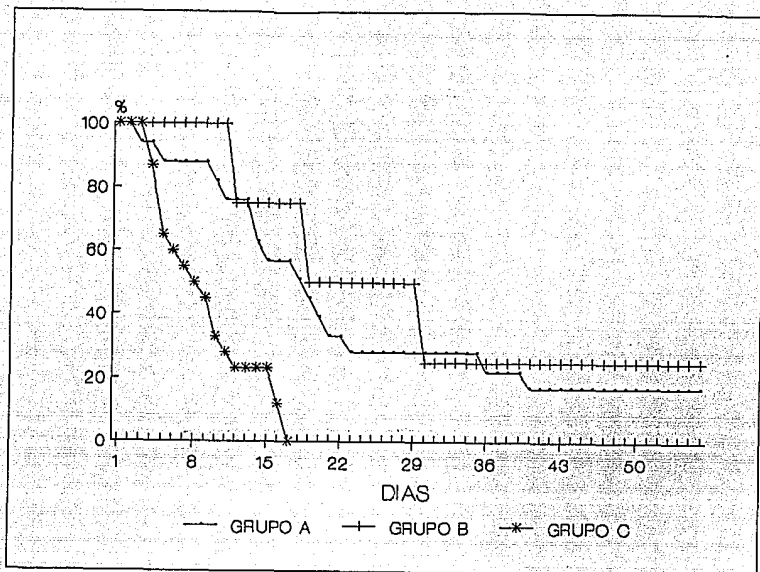
GRUPO A (n=18) días	GRUPO B (N=5) días	GRUPO C (n=18) días
3	12	4
5	19	4
10	30	5
11	56	5
14	56	6
14		7
15		8
18		9
19		10
20		10
21		11
23		12
36		16
40		16
56		17
56		17
56		47
56		56

Grupo A: Sección medular y trasplante alogénico.

Grupo B: Sección medular y trasplante xenogénico.

Grupo C: Sección medular sin trasplante.

En las curvas de sobrevida (Fig. 1), se observa desplazamiento a la derecha de ambas curvas de las ratas trasplantadas, lo cual está en relación a su mayor probabilidad de sobrevida. La comparación de las curvas usando la prueba de Mantel-Haenszel, muestra diferencias significativas entre los grupos A vs C, y B vs C, pero no entre los grupos A vs B.



**FIGURA 1.** Comparación de las curvas de sobrevida de Kaplan y Meier de las ratas sometidas a laceración medular con y sin trasplante. El desplazamiento a la derecha de las curvas de las ratas trasplantadas, está en relación a su mayor probabilidad de sobrevida.

Grupo A (n=18): Sección medular y trasplante alogénico.

Grupo B (n= 5): Sección medular y trasplante xenogénico.

Grupo C (n=18): Sección medular sin trasplante.

Las principales complicaciones postquirúrgicas de las ratas que murieron antes de completar las 8 semanas programadas de seguimiento y el tiempo en que éstas se presentaron se muestran en la Tabla II. La complicación más grave, frecuente y temprana (dentro de las primeras 2 semanas) fue la autofagia, que en algunos casos no solo incluyó a las extremidades inferiores sino también la pared abdominal. Entre la segunda y tercera semanas,

también la pared abdominal. Entre la segunda y tercera semanas, las complicaciones más frecuentemente asociadas a la muerte fueron neumonía (diagnosticada por signos de insuficiencia respiratoria aguda, estertores y en algunos casos presencia de material hemato-purulento en fosas nasales), pérdida de peso severa (pérdida de peso corporal del 30% o más en una semana) y

TABLA II. Principales complicaciones postquirúrgicas de las ratas que murieron antes de completar el tiempo programado de seguimiento.

GRUPO	COMPLICACIONES	SEMANAS								TOTAL	
		1		2		3		4		n	%
		n	%	n	%	n	%	n	%		
<b>A</b> □n = 18 ●n = 14	AUTOFAGIA	1	5.5	1	5.5	1	5.5			3	16.5
	NEUMONIA			1*	5.5	1	5.5			3	16.5
	PERDIDA DE PESO SEVERA			1*	5.5	2*	11.0			3	16.5
	COMPLICACIONES URINARIAS			1*	5.5	4*	22.0	1	5.5	6	33.0
	DESCONOCIDA	1	5.5			2	11.0	1	5.5	4	22.0
<b>B</b> □n = 5 ●n = 3	AUTOFAGIA										
	NEUMONIA										
	PERDIDA DE PESO SEVERA										
	COMPLICACIONES URINARIAS					1	20.0	1	20.0	2	40.0
	DESCONOCIDA			1	20.0					1	20.0
<b>C</b> □n = 18 ●n = 17	AUTOFAGIA	3	16.5	3	16.5	1*	5.5			7	38.5
	NEUMONIA	1	5.5	1*	5.5	2*	11.0			4	22.0
	PERDIDA DE PESO SEVERA			2*	11.0	1*	5.5			3	16.5
	COMPLICACIONES URINARIAS			2*	11.0	2*	11.0	1	5.5	5	27.5
	DESCONOCIDA	2	11.0	1	5.5	1	5.5			4	22.0

\* Asociación de 2 o más complicaciones en un mismo animal.

□ Número total de ratas en el grupo.

● Número de ratas que murieron antes de completar 8 semanas.

Grupo A: Sección medular y trasplante alogénico.

Grupo B: Sección medular y trasplante xenogénico.

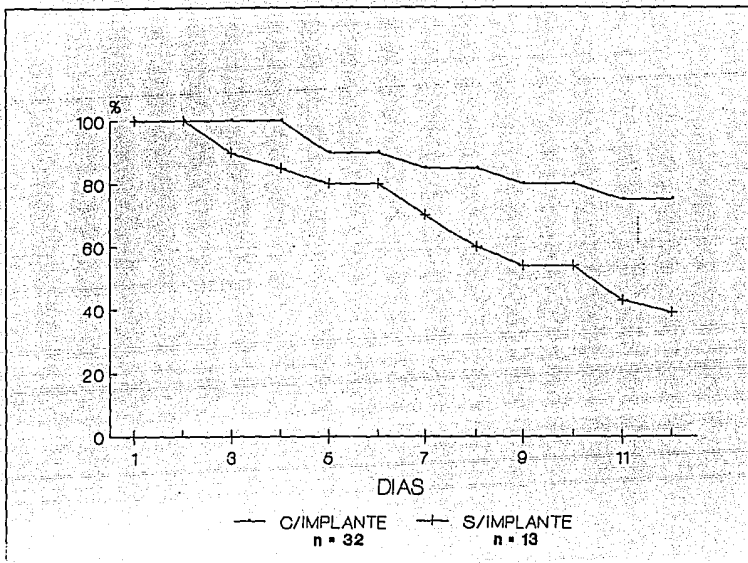
Grupo C: Sección medular sin trasplante.

complicaciones urinarias (problemas de tipo obstructivo por hipertrofia y ulceración del meato, asociado algunas veces a hematuria o piuria). Dos o más de estas complicaciones se encontraron asociadas frecuentemente en un mismo animal. En varios casos, en las diferentes semanas, no fue posible determinar la causa de muerte; los animales no mostraban signos de las complicaciones antes mencionadas, aunque casi siempre se encontraban hiporeactivos, con las mucosas secas y oligúricos (observación hecha al hacer las maniobras de vaciamiento vesical).

#### Segundo experimento

En el segundo experimento, las ratas que recibieron algún tipo de implante, independientemente del grupo, mostraron una sobrevivida significativamente mayor que las ratas no implantadas. En la Fig. 2 se muestran las curvas de sobrevivida; como se puede apreciar, todas las ratas implantadas se presentan en una sola curva para simplificar su observación, su comportamiento fue similar. Al comparar ambas curvas, la prueba de Mantel-Haenzel mostró una significancia de  $p < 0.05$ . La principal causa de muerte en las ratas no trasplantadas, al igual que en el primer experimento, fue la autofagia.

En relación al tiempo de recuperación de reflejos, parámetro que nos informa de la recuperación del choque medular, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos a excepción de las ratas implantadas con nervio periférico donde la recuperación de los reflejos estuvo significativamente retardada,



**FIGURA 2.** Comparación de las curvas de Kaplan y Meier de las ratas sometidas a laceración medular con implante de diferentes tejidos y sin implante. El desplazamiento a la derecha de la curva de las ratas implantadas, está en relación a su mayor probabilidad de sobrevida.

con un valor de  $p < 0.05$  al compararlo con cada uno de los otros grupos de acuerdo a la prueba de Wilcoxon (Tabla III y Fig. 3). La pérdida de peso corporal a 12 días no fue diferente de manera significativa entre los grupos; en promedio, el porcentaje de pérdida de peso mostró un rango de 13.4 a 16.7 %.

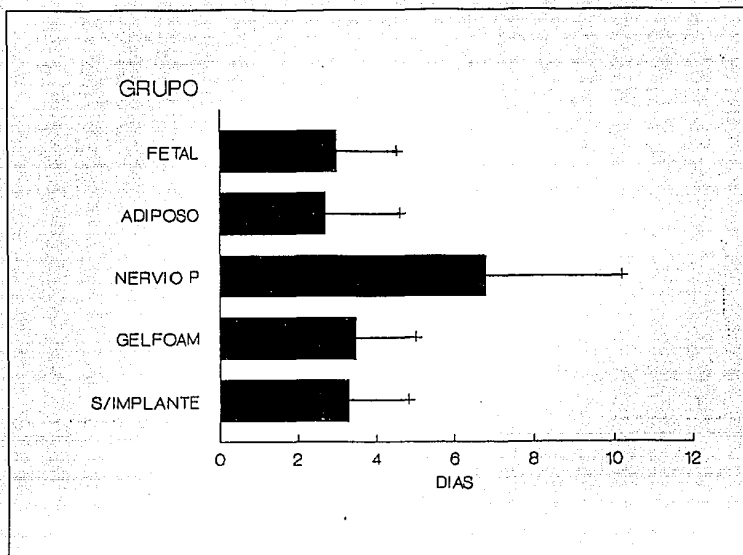
**TABLA III.** Recuperación del choque medular y destrucción del parénquima medular del hospedero en función del tipo de implante

Grupo	Rata #	Retorno de reflejos (día)	Implante viable	destrucción medular (mm2)
FETAL	1	1	SI	2.40
	2	2	SI	6.06
	3	5	SI	4.25
	4	2	NO	5.33
	5	4	NO	4.41
	6	4	NO	4.92
	X	3.0		4.56
	SD	1.5		1.24
-----				
ADIPOSO	1	1	SI	3.91
	2	1	SI	5.03
	3	2	SI	3.52
	4	2	SI	6.20
	5	5	SI	3.86
	6	5	NO	4.58
	X	2.7		4.52
	SD	1.9		0.99
-----				
NERVIO PERIF.	1	4	SI	4.14
	2	4	SI	3.91
	3	5	SI	6.82
	4	10	SI	5.53
	5	12	SI	3.13
	6	6	NO	3.91
	X	6.8		4.57
	SD	3.4		1.35
-----				
GELFOAM	1	1		4.02
	2	3		5.36
	3	3		5.42
	4	4		6.48
	5	5		3.35
	6	5		6.09
	X	3.5		5.12
	SD	1.5		1.21
-----				
SIN IMPLANTE	1	2		7.04
	2	2		4.58
	3	3		7.32
	4	3		11.18
	5	4		5.31
	6	6		6.09
	X	3.3		6.92
	SD	1.5		2.12

**TABLA IV.** Recuperación del choque medular y destrucción del parénquima medular del hospedero en función de la viabilidad histológica de los tejidos implantados.

Grupo	Rata #	Retorno de reflejos (día)	Implante viable	destrucción medular (mm2)
<hr/>				
FETAL	1	1	SI	2.40
	2	2	SI	6.06
	3	5	SI	4.25
ADIPOSO	1	1	SI	3.91
	2	1	SI	5.03
	3	2	SI	3.52
	4	2	SI	6.20
	5	5	SI	3.86
NERVIO PERIF.	1	4	SI	4.14
	2	4	SI	3.91
	3	5	SI	6.82
	4	10	SI	5.53
	5	12	SI	3.13
	X	4.1		4.52
	SD	3.4		1.31
<hr/>				
FETAL	4	2	NO	5.33
	5	4	NO	4.41
	6	4	NO	4.92
ADIPOSO	6	5	NO	4.58
NP	6	6	NO	3.91
	X	4.2		4.63
	SD	1.5		0.53
<hr/>				
GELFOAM	1	1		4.02
	2	3		5.36
	3	3		5.42
	4	4		6.48
	5	5		3.35
	6	5		6.09
	X	3.5		5.12
	SD	1.5		1.21
<hr/>				
SIN IMPLANTE	1	2		7.04
	2	2		4.58
	3	3		7.32
	4	3		11.18
	5	4		5.31
	6	6		6.09
	X	3.3		6.92
	SD	1.5		2.33
<hr/>				





**FIGURA 3.** Dias que tomó la recuperación de los reflejos después de la cirugía. Las ratas implantadas con nervio periférico, mostraron un retardo en la recuperación de los reflejos significativamente mayor al compararlo con el resto de los grupos.

### Evaluación histológica

#### Primer experimento

En el primer experimento, con la excepción de un caso en las ratas implantadas con aloinjerto, no se observaron evidencias histológica de viabilidad de las neuronas trasplantadas en los especímenes estudiados. En la mayoría de los casos, la zona de trasplante fue ocupada por tejido conectivo fibroso denso

dispuesto irregularmente, positivo a la tinción de Masson. Adicionalmente, se observó una área de cavitación entre la zona de trasplante y los muñones medulares tanto en sentido cefálico como caudal. En las ratas que no recibieron trasplante, la zona de laceración original en la mayoría de los casos se encontró adelgazada en relación al resto de la ME, dando un patrón en "reloj de arena" y conteniendo también tejido fibroconectivo dispuesto irregularmente en la zona de lesión original; en sentido cefálico y caudal se encontraron áreas de destrucción y cavitación en los muñones medulares (Figura 4). No fue posible comparar objetivamente la cantidad de destrucción del parénquima medular vecino a la zona de lesión inicial entre las ratas implantadas y no implantadas, ya que los especímenes no tenían un tiempo de evolución comparable, por lo que se decidió evaluar este aspecto en un segundo experimento.

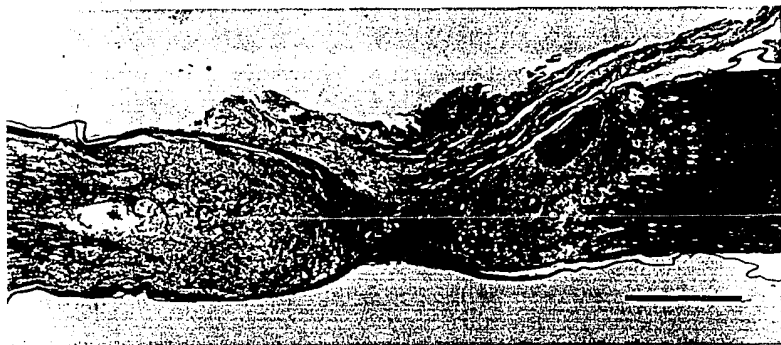
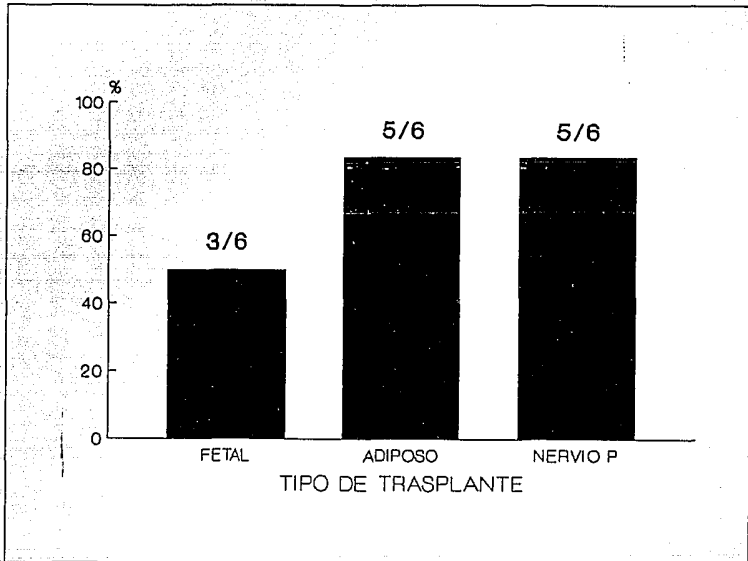


FIGURA 4. Fotomicrografía de un espécimen de ME lesionada y no implantada, 16 días después de la cirugía. Se observa un adelgazamiento en la zona de lesión inicial (L) que le da el aspecto de "reloj de arena". En los muñones medulares se observan extensas áreas de destrucción parenquimatosa y cavitación (C). Tinción: hematoxilina y eosina. Barra = 1.5 mm

## Segundo experimento

En el segundo experimento, se encontraron evidencias histológicas de sobrevivencia del tejido implantado en todos los grupos experimentales, aunque en ningún caso se observó integración anatómica del tejido implantado al parénquima medular del hospedero (Figura 5).



**FIGURA 5.** Número de ratas con tejido de trasplante viable 12 días después de la cirugía. Se incluyen ratas con cualquier cantidad de tejido histológicamente viable.

En la Figura 6 se muestran imágenes histológicas panorámicas representativas de los 5 grupos estudiados. La zona de destrucción del parénquima medular del hospedero se caracterizó por la

presencia de cavidades ubicadas tanto en sentido cefálico, como caudal a la zona de laceración original, que contenían en su interior un número variable de macrófagos de citoplasma espumoso reflejando su intensa actividad fagocítica, así como detritus (Figs 7 y 8). Entre la zona de destrucción y el parénquima medular preservado se identificó en algunas áreas la presencia de un tabique delgado de tejido fibrogliial, en otras áreas dicho tabique no se identificó (un ejemplo se ilustra en las Figuras 6 D y 8). En el parénquima medular preservado, cerca del área de destrucción, se identificaron formaciones microquísticas ubicadas principalmente en la sustancia blanca, las cuales se asociaron con bulbos de retracción de los axones seccionados (Figura 9).

En los implantes de ME fetal se encontró tejido implantado histológicamente viable en muy poca cantidad a manera de pequeña(s) isla(s) en 3 de las 6 ratas estudiadas. Se identificó una cápsula gruesa de tejido fibroconectivo vascularizado en la periferia del implante, el centro del implante se encontró ocupado por abundantes macrófagos; los fragmentos de tejido viable se encontraron rodeados por pequeñas áreas de cavitación. En la ME implantada viable se identificaron neuronas pequeñas y células gliales (Figs. 6 A y 10).

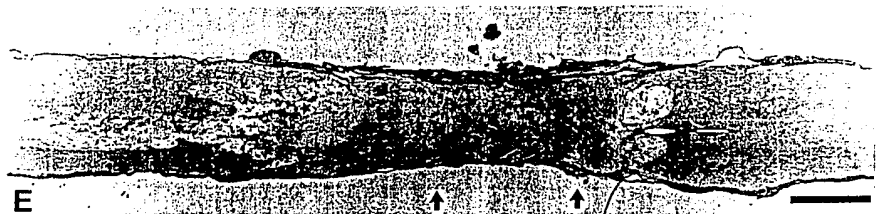
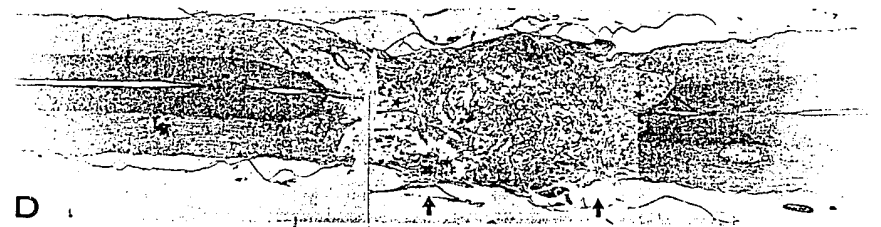
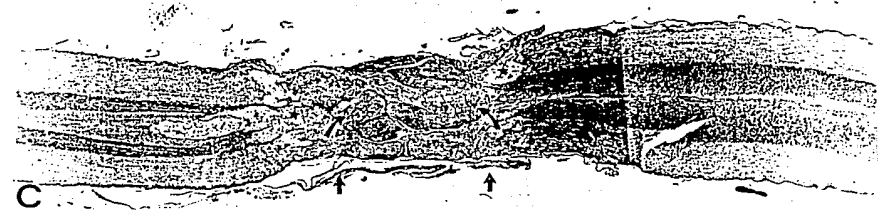
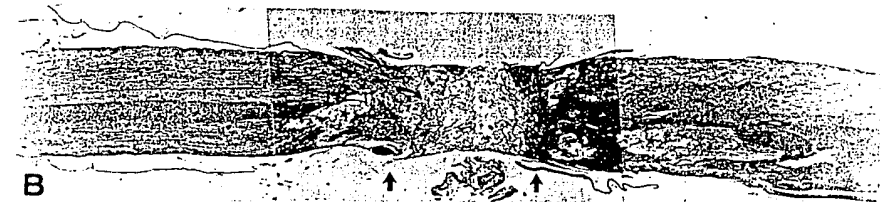
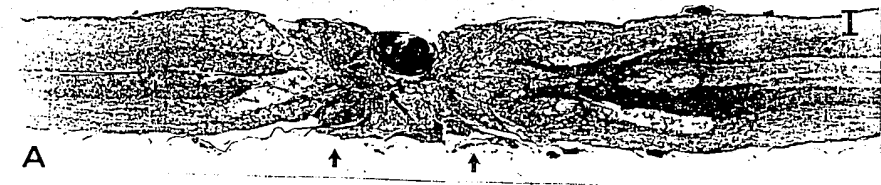
El tejido adiposo se encontró ocupando la mayor parte de la cavidad medular donde fue implantado. En la porción central del implante se encontraron zonas de cavitación, el resto del tejido adiposo mostró estructura histológica normal. En la periferia del implante se identificó una cápsula incompleta de tejido fibro-

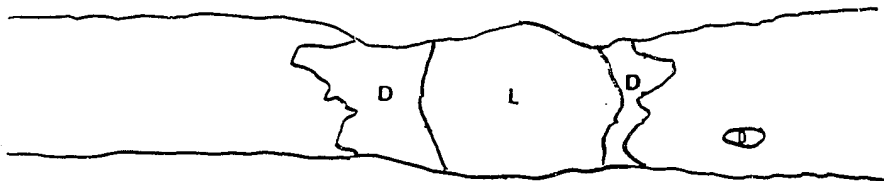
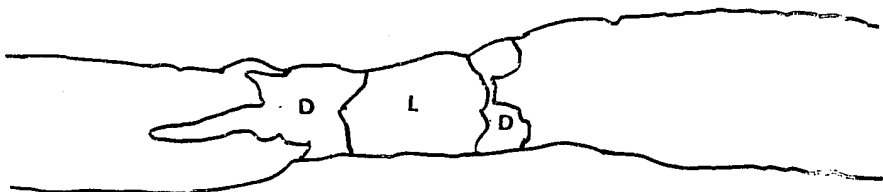
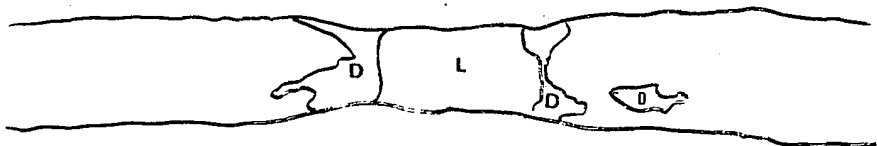
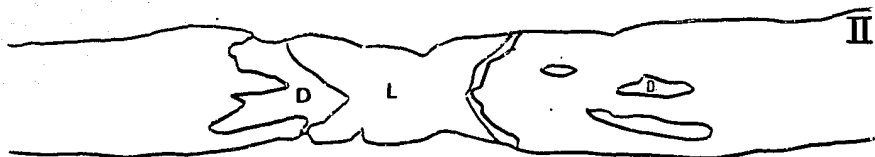
conectivo, mas delgada que la observada en los implantes de tejido fetal (Figs. 6 B y 11).

El nervio periférico, al igual que el tejido adiposo, ocupaba la mayor parte del sitio de implante. No se identificó tejido conectivo en torno al tejido viable, el cual estaba en contacto directo con el área de destrucción del parénquima medular del hospedero; el implante viable mostraba su estructura endoneural aparentemente intacta (Figs. 6 C y 12).

El Gelfoam se encontró en el sitio donde fue colocado; en la mayoría de los casos estaba rodeado por una cápsula delgada de tejido fibroconectivo. Entre sus compartimientos, particularmente hacia la periferia, se observaron abundantes células gigantes

**FIGURA 6.** (siguientes 2 páginas) I) Imagen histológica panorámica representativa de especímenes de los 5 grupos. Área de laceración inicial (delimitado por las flechas rectas inferiores); área de destrucción secundaria (estrellas), ver esquema anexo donde se delimitan dichas áreas. Al lado izquierdo de la fotografía se encuentra la porción cefálica y al lado derecho la caudal. A) Implante de tejido fetal; pequeño fragmento de tejido implantado viable (flecha curva), rodeado por pequeñas áreas de cavitación; el resto del implante está substituido por una cápsula gruesa de tejido fibroconectivo (c) y por macrófagos (m). B) Implante de tejido adiposo; tejido implantado viable (entre las dos flechas curvas), con áreas de cavitación central; cápsula de tejido conectivo en la periferia (c) C) Implante de nervio periférico; tejido implantado viable (entre las dos flechas curvas); no se observa cápsula de tejido fibroso en torno al implante. D) Implante de Gelfoam (G); alrededor del implante se observa una cápsula delgada de tejido fibroconectivo; con las flechas delgadas, del lado derecho se señala un tabique fibrogliial delgado en la interfase entre la zona de destrucción secundaria y el parénquima medular preservado, del lado izquierdo la flecha señala la ausencia de dicho tabique en una zona equivalente. E) Médula espinal sin implante; en el área de destrucción secundaria, los macrófagos espumosos son más abundantes cerca de la zona original de lesión que cerca del parénquima preservado. Tinción en los 5 especímenes: Gallego. Barra = 1.0 mm. II) Esquema de la fotomicrografía previa, donde se delinea el perfil del área de laceración inicial (L) y del área de destrucción secundaria (D).





multinucleadas (células gigantes de cuerpo extraño), formando parte de una reacción granulomatosa (Figs. 6 D y 13).

En la ME donde no se colocó implante, el área de laceración se encontró ocupada por tejido fibroconectivo dispuesto irregularmente (Figura 14). En el límite entre el área de laceración inicial y la zona de destrucción secundaria del parénquima medular, se formó un tabique delgado e irregular de tejido fibroconectivo, de mayor densidad que el tejido adyacente (Figura 6 E).

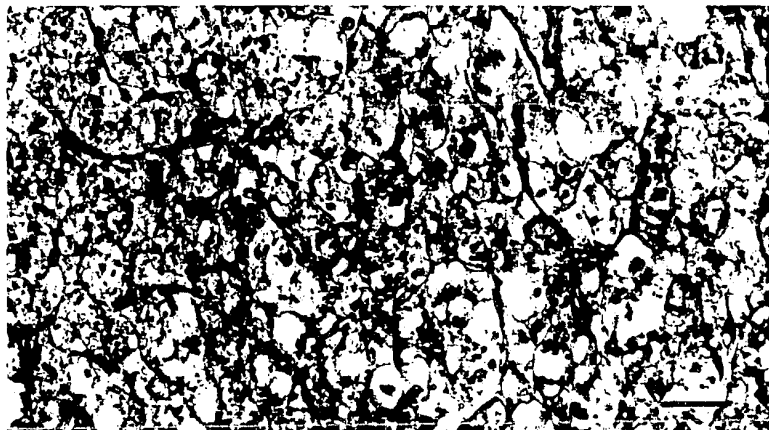


FIGURA 7. Fotomicrografía del área de lesión secundaria, cerca de la zona de laceración original en un espécimen que no recibió implante, 12 días después de la cirugía. Se observan detritus y abundantes macrófagos con citoplasma espumoso. Tinción: Masson. Barra = 30 micras.



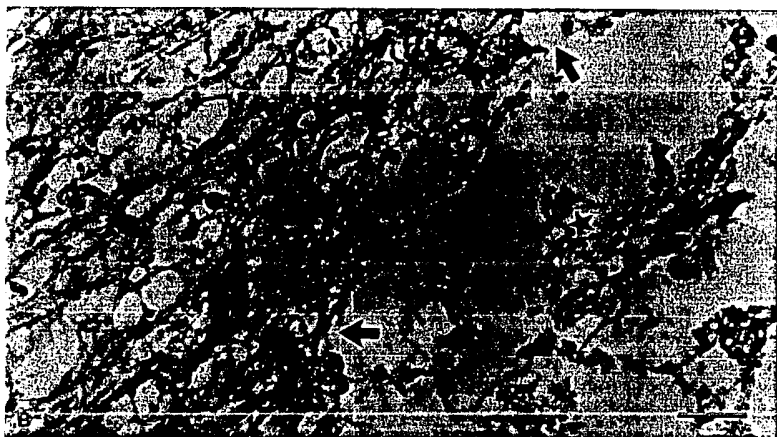
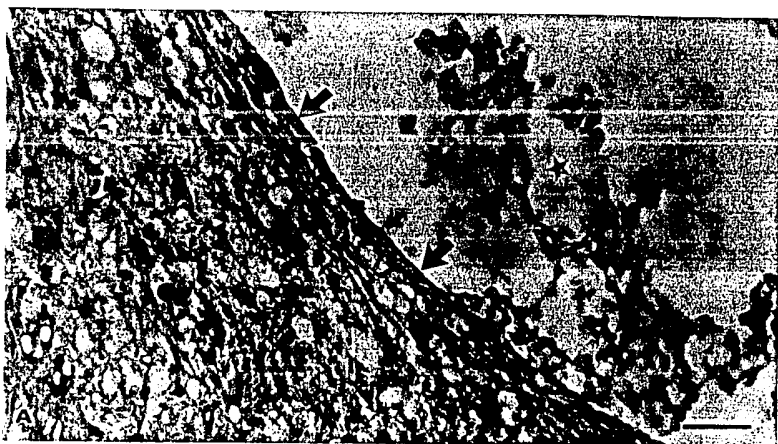


FIGURA 8. Fotomicrografías correspondientes a las áreas señaladas con las flechas pequeñas en la figura 6 D. Interfase entre la zona de destrucción secundaria (estrella) y el parénquima medular preservado (círculo). A) Interfase bien delimitada por un tabique delgado de tejido fibroglial (flechas). B) Interfase pobremente delimitada (flechas). En ambas fotografías, en la zona de destrucción, se observan detritus y algunos macrófagos con citoplasma espumoso. Tinción: Gallego. Barra =30 micras.



FIGURA 9 Fotomicrografía de la sustancia blanca preservada, vecina a la zona de destrucción secundaria en la ME de una rata que no recibió implante. Se observa un microquiste (flecha), asociado al bulbo de retracción de un axón seccionado (estrella). Tinción: Masson. Barra = 15 micras

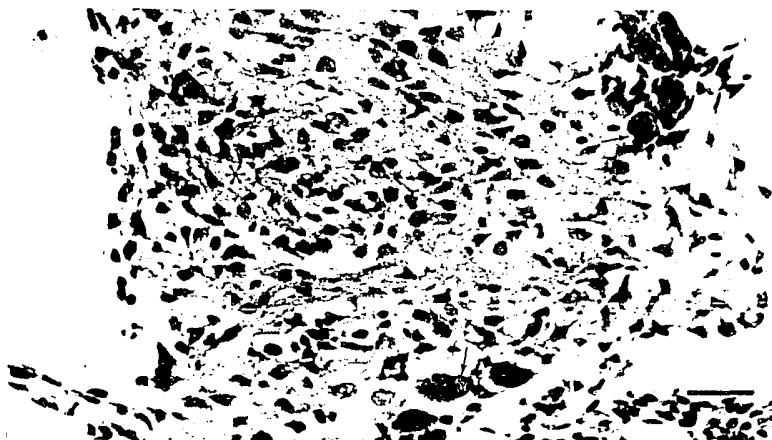


FIGURA 10. Fotomicrografía correspondiente al área señalada con la flecha curva en la figura 5 A. Fragmento de tejido fetal implantado histológicamente viable. Se observan algunas neuronas (flechas), así como células gliales (asterisco). Tinción: hematoxilina y eosina. Barra = 30 micras

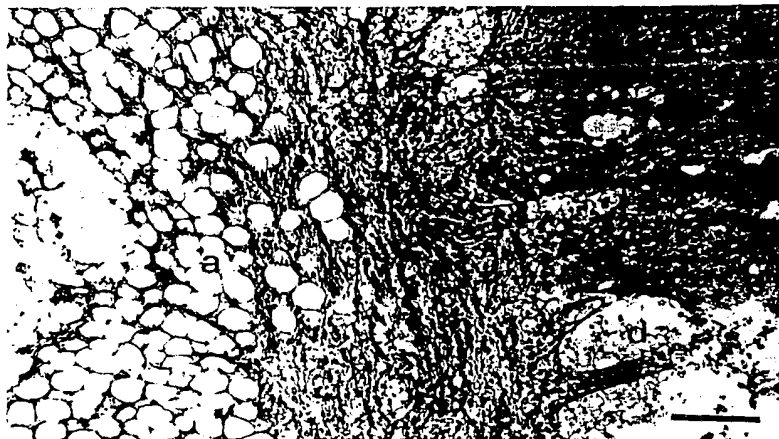


FIGURA 11. Fotomicrografía de la periferia de un implante de tejido adiposo. En la parte izquierda se observa el aspecto histológico característico del tejido adiposo (a); al centro, se observa la cápsula de tejido fibroconectivo que rodea parcialmente al implante (c); a la derecha, una porción de substancia blanca preservada (p) y substancia blanca destruida (d). Tinción: Gallego. Barra = 150 micras

#### Estudio morfométrico.

La destrucción del parénquima medular medida en el área vecina a la zona original de laceración fue significativamente mayor en el grupo sin trasplante al compararla con los grupos trasplantados (prueba U de Mann-Whitney  $p < 0.05$ ), independientemente del tipo de tejido trasplantado o de su viabilidad (Tablas III y IV). En las ratas implantadas con Gelfoam, aunque la destrucción del parénquima medular fue aparentemente menor que en las ratas no implantadas, no se encontró diferencia estadísticamente significativa. Al comparar la destrucción de los grupos implantados entre sí, incluyendo el grupo de Gelfoam, no se encontró diferencia significativa.

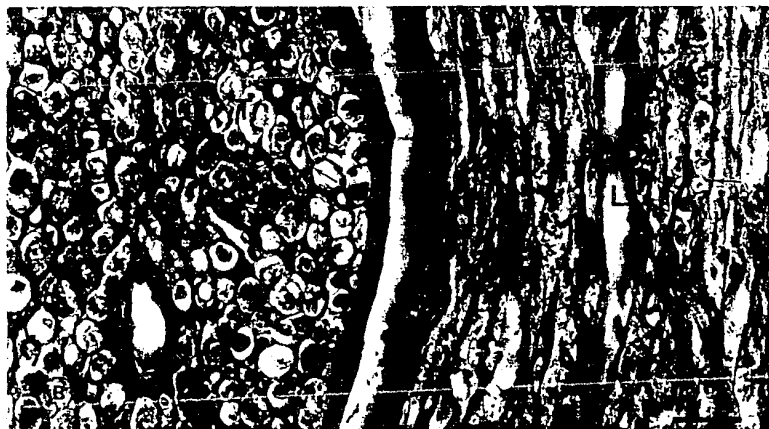


FIGURA 12. Fotomicrografías de un implante de nervio periférico. A) Se observa un fragmento del implante (circulo) en continuidad con la zona de destrucción secundaria (estrellas), no se observa cápsula de tejido fibroso; parénquima medular preservado (cuadrado). B) Mayor aumento mostrando un corte longitudinal (L) y transversal (T) de fragmentos de nervio periférico implantado; nótese la aparente preservación de la estructura endoneural (Flechas). Tinción: Gallego. Barras A = 150 micras, B = 30 micras



FIGURA 13. Aspecto microscópico del implante de Gelfoam. Se observa la estructura esponjosa característica de dicha sustancia (asteriscos), así como la presencia de células gigantes multinucleadas (flechas), ubicadas predominantemente en la periferia del implante. Tinción: Gallego. Barra = 30 micras.

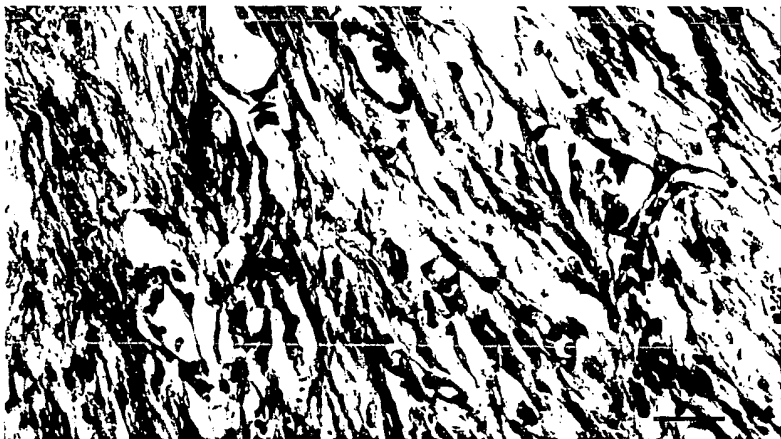
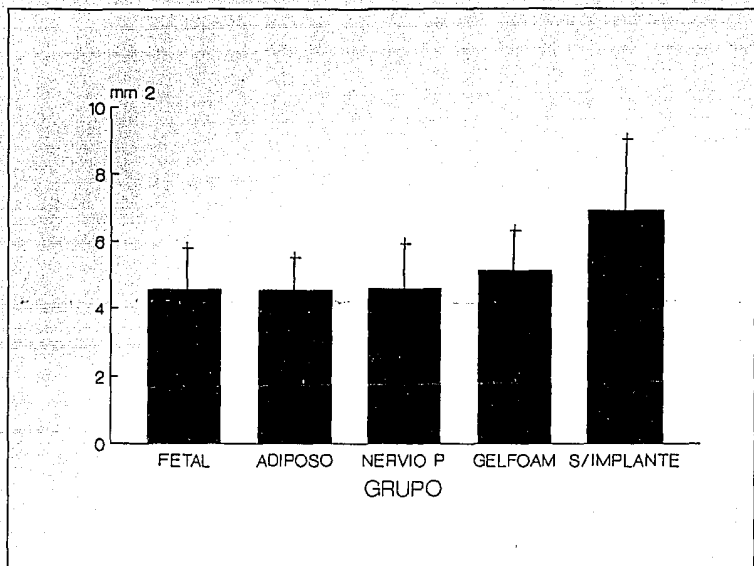


FIGURA 14. Fotomicrografía de la porción central de la zona de laceración de una rata sin implante, 12 días después de la cirugía. Se observa tejido fibroconectivo positivo a la tinción de Masson, dispuesto irregularmente (estrellas), así como vasos sanguíneos (flecha). Tinción: Masson. Barra = 30 micras.



**FIGURA 15.** Evaluación morfométrica de la destrucción del parénquima medular, expresada en mm<sup>2</sup>

## F) Discusión

La sección y/o laceración experimental completa de la ME, a diferencia de las lesiones parciales, se acompaña de efectos devastadores en los animales sometidos a dicho procedimiento (48). La probabilidad de sobrevivencia de los animales es muy limitada, debido a la presencia de complicaciones letales y las posibilidades de recuperación funcional espontánea son nulas (49). La colocación de trasplantes neurales en la zona de lesión inmediatamente después de producir una laceración completa han dado pobres resultados. Así, Sugar y Gerard (180) injertaron ME fetal en la ME seccionada de ratas jóvenes; en la mayoría de los casos no se identificó histológicamente el material trasplantado, o bien, se identificaba una masa densa en degeneración. Das (46) inyectó tejido medular fetal entre los muñones de la ME seccionada en ratas, el tejido implantado no sobrevivió. Bunge et al (34) trasplantaron segmentos de ME fetal en la ME seccionada de ratas adultas y sólo en 2 de 14 casos encontraron escasas neuronas del implante viables. Gelderd y Quarles (69), empleando cotrasplantes de tejido fetal cortical y medular, no encontraron sobrevivencia del implante cuando éste fue injertado en el área de sección medular completa en ratas adultas. Pallini et al (144) implantaron tejido fetal alogénico homotópico en ratas sometidas a laceración medular completa y aun cuando no encontraron mejoría motora ni electrofisiológica, reportaron viabilidad del tejido fetal implantado en el 55% de los casos, con neuronas que mostraban un grado limitado de crecimiento y de diferenciación.

Los resultados pobres obtenidos con el empleo de trasplantes

## F) Discusión

La sección y/o laceración experimental completa de la ME, a diferencia de las lesiones parciales, se acompaña de efectos devastadores en los animales sometidos a dicho procedimiento (48). La probabilidad de sobrevivida de los animales es muy limitada, debido a la presencia de complicaciones letales y las posibilidades de recuperación funcional espontánea son nulas (49). La colocación de trasplantes neurales en la zona de lesión inmediatamente después de producir una laceración completa han dado pobres resultados. Así, Sugar y Gerard (180) injertaron ME fetal en la ME seccionada de ratas jóvenes; en la mayoría de los casos no se identificó histológicamente el material trasplantado, o bien, se identificaba una masa densa en degeneración. Das (46) inyectó tejido medular fetal entre los muñones de la ME seccionada en ratas, el tejido implantado no sobrevivió. Bunge et al (34) trasplantaron segmentos de ME fetal en la ME seccionada de ratas adultas y sólo en 2 de 14 casos encontraron escasas neuronas del implante viables. Gelderd y Quarles (69), empleando cotrasplantes de tejido fetal cortical y medular, no encontraron sobrevivida del implante cuando éste fue injertado en el área de sección medular completa en ratas adultas. Pallini et al (144) implantaron tejido fetal alogénico homotópico en ratas sometidas a laceración medular completa y aún cuando no encontraron mejoría motora ni electrofisiológica, reportaron viabilidad del tejido fetal implantado en el 55% de los casos, con neuronas que mostraban un grado limitado de crecimiento y de diferenciación.

Los resultados pobres obtenidos con el empleo de trasplantes



fetales en modelos de LMC, contrastan con los resultados de trasplantes en modelos de lesión medular parcial, donde la sobrevivida, maduración e integración del tejido trasplantado se observa en la mayoría de los casos y muchas veces se acompañan de algún grado de mejoría clínica (20, 21, 38, 45, 86, 93, 139, 154, 171, 184). Los resultados pobres en el primer caso se han atribuido a la falta de "influencia trófica" entre el injerto y el hospedero (la cual consideran esencial para la sobrevivida del injerto) debido al sangrado, al desarrollo de una mayor reacción edematosa, a la neoformación de tejido conectivo y a la proliferación glial (46); también se atribuyen los resultados pobres al microambiente desfavorable por la reacción tisular compleja al trauma (mecanismos secundarios de lesión) que representa la sección completa (34).

En la mayor parte de los estudios de trasplante a la médula espinal, la evaluación funcional (cuando existe) se enfoca principalmente a la función motora voluntaria o refleja y algunas veces se incluye también la función sensitiva, pero son muy pocos los trabajos en que se evalúan otros aspectos clínicos, tales como la sobrevivida del animal o sus complicaciones (49).

En el primer experimento demostramos el efecto benéfico del trasplante de tejido fetal homotópico alogénico en relación a la mayor sobrevivida de ratas sometidas a sección de la ME. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Kopyev et al. (105) y Tulipan et al. (188), en relación a sobrevivida de animales con lesiones neurológicas severas y sometido a trasplantes neurales. Kopyev et al observaron un incremento significativo en

la sobrevida de ratas sujetas a traumatismo craneocerebral e implante de tejido fetal neocortical en el área de lesión inmediatamente después del trauma. Tulipan et al demostraron en ratas que el injerto de estriado neonatal puede evitar el síndrome letal producido por la inyección intraestriatal bilateral de ácido kainico. Ellos atribuyen tal efecto a la protección dada por el injerto a las neuronas dañadas excitotóxicamente (189).

Nuestros resultados inherentes a una menor incidencia de complicaciones severas, aunada a una mayor probabilidad de sobrevida de los animales trasplantados, contrastan con los resultados de Das et al (49), quienes reportan la ausencia de un efecto significativo de los trasplantes neurales sobre la incidencia o severidad de las complicaciones postoperatorias, o en la sobrevida de los animales sometidos a lesión medular severa. No contamos con elementos suficientes para explicar esta discrepancia. Pensamos que ésta pudiera deberse a diferencias de tipo metodológico, ya que ellos pudieron haber instaurado una terapia temprana cuando se presentaban las complicaciones, o bien, que el método estadístico que emplearon no les permitió detectar diferencias significativas entre los grupos, aún cuando estos aspectos no se mencionan en su trabajo. No encontramos en la literatura otros reportes en relación a diferencias en morbi-mortalidad después de lesión medular experimental y trasplantes que nos permitan comparar nuestros resultados en este aspecto.

La autofagia, principal causa de muerte en las ratas lesionadas y

no trasplantadas, es una complicación descrita desde hace mucho tiempo en animales sometidos a lesión medular (67, 200), pero hasta el momento no se ha podido explicar con certeza la razón por la cual algunos de estos animales se automutilan.

Los animales en los que no pudimos determinar la causa de muerte pudieran corresponder al mismo grupo que Das et al (49) catalogan como "hipotermia", disfunción autonómica caracterizada por la incapacidad para mantener la temperatura corporal dentro de un rango normal y acompañada por adinamia y signos de deshidratación, cuadro clínico que pudimos identificar en la mayoría de estos casos, aunque en nuestro estudio no determinamos la temperatura corporal. En el segundo experimento se corroboró la mayor sobrevida de los animales implantados, independientemente del tipo de implante, en relación a los que se dejaron con la zona de laceración libre y al mismo tiempo se probó la impresión que se tenía desde el primer experimento, en relación a que en los animales tras-plantados existe menor destrucción del parénquima medular vecino a la zona de lesión inicial.

Con estos antecedentes es factible proponer que la menor incidencia de complicaciones graves, puede ser atribuida a una mejor función segmentaria de la ME, posiblemente como una consecuencia de la menor destrucción tisular, observada en el área vecina al sitio de sección en la ME de los animales trasplantados.

Para explicar la menor destrucción observada en el tejido vecino a la zona de laceración inicial, evidenciada histológicamente,

proponemos, de acuerdo con los hallazgos recientes de Tulipan et al. (188, 189) y de Pearlman et al. (146), que el tejido trasplantado puede asumir un papel benéfico al amortiguar, neutralizar y/o captar algunas de las sustancias neurotóxicas liberadas en el área de lesión, tales como aminoácidos excitatorios y enzimas líticas, o bien por captación del exceso de iones libres. El efecto benéfico de los injertos heterotópicos (nervio periférico y tejido adiposo), apoya esta posibilidad y coinciden con los resultados de Pearlman et al. (146) en sus estudios de trasplantes heterotópicos como neuroprotectores del estriado.

Otra posibilidad para explicar la menor destrucción del parénquima después del trasplante, pudiera ser el efecto trófico ejercido por el injerto, en particular por células gliales (ej. atrociitos en el caso de los trasplantes de tejido fetal o células de Schwann en el de los de nervio periférico) (4, 7, 60). Las células gliales pudieran haber migrado en una etapa temprana después del trasplante, desde el injerto hacia el parénquima medular del hospedero, tal como ha sido propuesto previamente (21, 73). Con la metodología empleada en este trabajo, no podemos determinar si realmente migraron las células gliales, por lo que resulta prematuro emitir consideraciones sólidas respecto a la posible participación glial en este papel protector putativo.

El implante de Gelfoam, aunque fue útil para mejorar la sobrevivencia de los animales trasplantados y se observó una menor destrucción del parénquima medular del hospedador en relación con las ratas no implantadas, esta última no fue significativa, lo que nos hace

pensar que los tejidos viables implantados, deben tener alguna actividad metabólica más que la simple captación pasiva de los tóxicos liberados en el área de lesión, además de la posible liberación de factores tróficos discutida previamente. No descartamos la posibilidad de algún otro efecto inespecífico del implante como pudiera ser el control de la hemorragia postraumática por su sola presencia como una masa ocupativa.

En relación al tiempo en el que se logró la recuperación de los reflejos después de la lesión en el segundo experimento, parámetro tomado como un indicador de la recuperación del choque medular, cabe destacar que el único grupo que mostró un significativo retardo en dicha recuperación, fue el de ratas autoimplantadas con nervio periférico. No contamos con una evidencia experimental para explicar dicho retardo; como hipótesis, proponemos que éste pudiera ser originado por un efecto inhibitorio transitorio de la acetilcolina (presente en los segmentos de nervio implantado), sobre las motoneuronas medulares vecinas al implante; dicha hipótesis se basa en los estudios de Rotter et al. (160) quienes demostraron en el núcleo del hipogloso que las motoneuronas son ricas en autorreceptores muscarínicos, los cuales al ser activados por la acetilcolina inhiben la excitabilidad neuronal al producirse potenciales postsinápticos inhibitorios lentos (92). La evidencia indirecta del efecto neurodepresor central de la acetilcolina pudiera contribuir de manera análoga al fenómeno que observamos. El empleo de ciertas drogas de acción anticolinérgica central permitirán probar esta hipótesis.

En el estado actual del conocimiento, se requiere de nuevos estudios para un mejor entendimiento sobre el o los mecanismo(s) mediante los cuales los tejidos trasplantados en las áreas de lesión del sistema nervioso central ejercen su efecto neuroprotector.

## G) Conclusiones

1- Los trasplantes de tejido fetal homotópico alogénico y xenogénico incrementan la sobrevivencia de ratas sometidas a laceración completa de la médula espinal.

2- El implante de otros tejidos heterotópicos como nervio periférico o tejido adiposo, así como el empleo de un ocupador de espacio (Gelfoam), también incrementan la sobrevivencia de ratas sometidas al mismo modelo de lesión.

3- El implante homotópico de tejido fetal alogénico, así como el autotrasplante de nervio periférico o de tejido adiposo en ratas sometidas a laceración medular completa, disminuye la destrucción del parénquima medular vecino a la zona de lesión.

4- El implante de nervio periférico retarda la recuperación del choque medular.

5- Se requieren futuros estudios para entender mejor el mecanismo neuroprotector de los tejidos trasplantados.

## V PERSPECTIVAS DE INVESTIGACION A FUTURO

1- Desconocemos el mecanismo por el cual los implantes probados tienen un efecto neuroprotector, cuando son colocados en la ME severamente lesionada. Para probar la hipótesis de su posible función como "amortiguador" de tóxicos liberados en la zona de lesión, proponemos la microdiálisis del tejido implantado, con el objeto de determinar el contenido de las sustancias neurotóxicas involucradas en la fisiopatología de la lesión medular traumática.

2- Proponemos investigar el efecto de dos implantes sucesivos al mismo sitio de lesión. El primero, para limitar el daño neurológico, disminuir complicaciones graves y favorecer la sobrevida del hospedero, creando de esta manera un ambiente más favorable para la posible sobrevida e integración de un segundo trasplante con el objeto de estimular la regeneración.



## VI. REFERENCIAS

- 1- Aguayo AJ. Axonal regeneration from injured neurons in the adult mammalian central nervous system. In: Cotman CW (Ed). Synaptic plasticity. Guilford Press, New York. 1985; pp 457-484
- 2- Aguayo AJ, Bray GM, Rasminsky M, Zwimpfer T, Carter D, Vidal-Sanz M. Synaptic connections made by axons regenerating in the central nervous system of adult mammals. J Exp Biol 1990; 153:199-224
- 3- Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. JAMA 1911; 57:878-880
- 4- Althaus H, Seifert W (Eds). Glial-neuronal communication in development and regeneration. Springer-Verlag, New York. 1987
- 5- Anderson DK, Means ED. Iron-induced lipid peroxidation in spinal cord: protection with mannitol and methylprednisolone. J Free Rad Biol Med 1985; 1:59-64
- 6- Anderson DK, Saunders RD, Demediuk P, Dugan LL, Braughler JM, Hall ED, Means ED, Horrocks LA. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. Cent Nerv Syst Trauma 1985; 12:257-267
- 7- Assouline JG, Bosch P, Lim R, et al. Rat astrocytes and Schwann cells in cultures synthesize nerve growth factor-like neurite-promoting factors. Dev Brain Res 1987; 31:103-118
- 8- Balentine JD, Paris D. Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. Lab Invest 1978; 39:236-253
- 9- Balentine JD. Calcium toxicity as a factor in spinal cord injury. Surv Synth Path Res. 1983; 2:184-193
- 10- Balentine JD. Spinal cord trauma: In search of the meaning of granular axoplasm and vesicular myelin. J Neuropath Exp Neurol 1988; 47:77-92
- 11- Banik NL, McAlhaney WW et al. Calcium-stimulated proteolysis in myelin: Evidence of a Ca<sup>+</sup> activated neutral proteinase associated with purified myelin of rat CNS. J Neurochem 1985; 45:581-588
- 12- Banik NL, Hogan EL, et al. Proteolytic enzymes in experimental spinal cord injury. J Neurol Sci 1986; 73:245-256
- 13- Barde YA. What, if anything, is a neurotrophic factor? TINS 1988; 11:343-345

- 14- Bedbrook GM. The development and care of spinal cord paralysis (1918-1986). Paraplegia 1987; 25:172-184
- 15- Benfey M, Aguayo AJ. Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts. Nature 1982; 296:150-152
- 16- Bernstein JJ, Bernstein ME. Axonal regeneration and formation of synapses proximal to the site of the lesion following hemisection of the rat spinal cord. Exp Neurol 1971; 30:336-351
- 17- Bernstein ME, Bernstein JJ. Regeneration of axons and synaptic complex formation rostral to the site of hemisection in the spinal cord of the monkey. Int J Neurosci 1973; 5:15-26
- 18- Bernstein JJ. Ependyma formation in adult rat spinal cord after transplantation of fetal cerebral cortex homografts. J Neurosci Res 1986; 15:481-490
- 19- Bernstein JJ, Goldberg W. Injury-related spinal cord astrocytes are immunoglobulin-positive (IgM and IgG) at different time periods in the regenerative process. Brain Res 1987; 426:112-118
- 20- Bernstein JJ, Goldberg WJ. Fetal spinal cord homograft ameliorate the severity of lesion-induced hind limb behavioral deficits. Exp Neurol 1987; 98:633-644
- 21- Bernstein JJ, Goldberg WJ. Graft derived reafferentation of host spinal cord is not necessary for amelioration of lesion-induced deficits: Possible role of migrating grafted astrocytes. Brain Res Bull 1989; 22:139-146
- 22- Bjorklund A, Stenevi U. Nerve growth factor: Stimulation of regenerative growth of central noradrenergic neurons. Science 1972; 175:1251-1253
- 23- Bjorklund A, Nornes H, Gage FH. Cell suspension grafts of noradrenergic locus coeruleus neurons in rat hippocampus and spinal cord: reinnervation and transmitter turnover. Neuroscience 1986; 18:685-698
- 24- Bjorklund A, Lindvall O, Isacson O, Brundin P, Wictorin K, Strecker RE, Clarke DJ, Dunnett SB. Mechanisms of action of intracerebral neural implants: studies on nigral and striatal grafts to the lesioned striatum. TINS 1987; 10:509-516
- 25- Blakemore WF, Crang AJ. Extensive oligodendrocyte remyelination following injection of cultured central nervous system cells into demyelinating lesions in adult central nervous system. Dev Neurosci 1988; 10:1-11
- 26- Blight A. Delayed demyelination and macrophage invasion: A candidate for secondary cell damage in spinal cord injury. Cent Nerv Syst Trauma 1985; 2:299-315

- 27- Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M. Neurite outgrowth inhibitors in gliotic tissue. *Restor Neurol Neurosci* 1992; 4:179
- 28- Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Eng J Med* 1990; 322: 1405-1411
- 29- Brailowsky S, Stein DG, Wills B (Eds). *El cerebro averiado. Plasticidad cerebral y recuperación funcional*. Fondo de Cultura Económica, México. 1992
- 30- Bregman BS, Reier PJ. Neural tissue transplants rescue axotomized rubrospinal cells from retrograde death. *J Comp Neurol* 1986; 244:86-95
- 31- Broadwell RD. Origins of blood vessels in allogeneic neural grafts. In: Johanson BB, Ouman C, Widner H. (Eds). *Pathophysiology of the blood-brain barrier. Long term consequences of barrier dysfunction for the brain*. Fernstrom Foundation Series 14, Elsevier, Amsterdam. 1990; pp 561-572
- 32- Brundin P, Widner H, Nilsson OG, Strecker RE, Bjorklund A. Intracerebral xenografts of dopamine neurons: the role of immunosuppression and the blood-brain barrier. *Exp Brain Res* 1989; 75:195-207
- 33- Buchanan JT, Nornes H. Transplants of embryonic brainstem containing the locus coeruleus into spinal cord enhance the hindlimb flexion reflex in adult rats. *Brain Res* 1986; 381:225-236
- 34- Bunge RP, Johnson MI, Thuline D. Spinal cord reconstruction using cultured embryonic spinal cord strips. In: Kao CC, Bunge RP, Reier PJ (Eds). *Spinal Cord Reconstruction*. Raven Press, New York. 1983; pp 341-358
- 35- Burmeister DW, Rivas RJ, Goldberg DJ. Substrate-bound factors stimulate engorgement of growth cone lamellipodia during neurite elongation. *Cell Motility Cytoskeleton* 1991; 19:255-268
- 36- Chiquet M. Neurite growth inhibition by CNS myelin proteins: a mechanism to confine fiber tracts? *TINS* 1989; 12:1-3
- 37- Clendenon NR, Allen H, Gordon WA, Bingham WG. Inhibition of Na<sup>+</sup> K-activated ATPase activity following experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg* 1978; 49:563-568
- 38- Clowry G, Sieradzan K, Vrbová G. Transplant of embryonic motoneurons to adult spinal cord: survival and innervation abilities. *TINS* 1991; 14:355-357

- 39- Commissiong JW. Fetal locus coeruleus transplanted into the transected spinal cord of the adult rat; some observations and implications. *Neuroscience* 1984; 12:839-853
- 40- Commissiong JW, Sauve Y. The physiological basis of transplantation of fetal catecholaminergic neurons in the transected spinal cord of the rat. *Comp Biochem Physiol* 1989; 93: 301-307
- 41- Cotman CW, Kesslak JP. The role of trophic factors in behavioral recovery and integration of transplant. Gash DM, Sladek JR Jr (Eds). *Transplantation into the mammalian CNS. Serie Progress in Brain Research. Elsevier, Amsterdam. 1988; pp 311-320*
- 42- Cotman CW, Cummings BJ, Whitson JS. The role of misdirected plasticity in plaque biogenesis and Alzheimer's disease pathology. In: Hefti F, Brachet P, Will B, Christen Y (Eds). *Growth factors and Alzheimer's disease. Springer-Verlag, Heidelberg 1991; pp 222-233*
- 43- Das GD, Hallas BH, Das KG. Transplantation of neural tissues in the brains of laboratory mammals: technical details and comments. *Experientia* 1979; 35:143-286
- 44- Das GD. Neural transplants in the spinal cord of the adults rats. *Anat Rec* 1981; 199:64a
- 45- Das GD. Neural transplantation in the spinal cord of the adult rats. Condition, survival, cytology and conectivity of the transplants. *J Neurol Sci* 1983; 62:191-210
- 46- Das GD. Neural transplantation in the spinal cord of the adult mammals. In: Kao CC, Bunge RP, Reier PJ (Eds). *Spinal Cord Reconstruction. Raven Press, New York. 1983; pp 367-396*
- 47- Das GD. Neural transplantation in spinal cord under different conditions of lesions and their functional significance. In: Das GD, Wallace RB (Eds). *Neural transplantation and regeneration. Springer-Verlag, New York. 1986; pp 1-61*
- 48- Das GD. Perspectives in anatomy and pathology of paraplegia in experimental animals. *Brain Res Bull* 1989; 22:7-32
- 49- Das GD, Das KG, Brasko J, Riedl M, Rai P, Rajeswari V. Spinal traumas: Some postoperative complications in experimental animals. *Brain Res Bull* 1989; 22:33-37
- 50- David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into PNS bridges after CNS injury in adult rats. *Science* 1981; 214:931-933
- 51- De la Torre JC, Goldsmith HS. Increased blood flow enhances axon regeneration after spinal transection. *Neurosci Lett*; 94: 269-273

- 52- Demierre B, Martinou JC, Kato AC. Embryonic motoneurons grafted into the adult CNS can differentiate and migrate. Brain Res 1990; 510:355-359
- 53- Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD, et al. The free radical pathology and the microcirculation in the mayor central nervous system disorders. Acta Physiol Scand (suppl III) 1980; 492:91-119
- 54- Droz B, Leblond CP. Axonal migration of proteins in the central nervous system and peripheral nerves as shown by radioautography. J Comp Neurol 1963; 121:325-346
- 55- Edds MV. Collateral nerve regeneration. Quartz Rev Biol 1953; 28:260-276
- 56- Eidelberg E. Locomotor control in monkeys. In: Eccles J, Dimitrijevic MR (Eds). Recent achievements in restorative neurology I: Upper motor neuron functions and dysfunctions. Karger, Basel. 1985 pp 179-184
- 57- Faden AI.. Pharmacology in spinal cord injury: a critical review of recent developments. Clin Neuropharmacol 1987; 10:193-204
- 58- Faden AI, Simon RP. A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. Ann Neurol 1988; 23:623-626
- 59- Faden AI, Gannon A, Basbaum AI. Use of serotonin immunocytochemistry as a marker of injury severity after experimental spinal trauma in rats. Brain Res 1988; 450:94-100
- 60- Fallon JR. Preferential outgrowth of central nervous system neurites on astrocytes and Schwann cells in vitro. J Cell Biol 1985; 100:198-207
- 61- Feringa ER, Vahlsing HL. Retrograde transport in cortico-spinal neurons after spinal cord transection. Neurology 1983; 33:478-482
- 62- Feringa ER, McBride RL, Pruitt II JN. Loss of neurons in the red nucleus after spinal cord transection. Exp Neurol 1988; 100:112-120
- 63- Fernandez E, Pallini R, Mercanti D. Effects of topically administered nerve growth factor on axonal regeneration in peripheral nerve autografts implanted in the spinal cord of rats. Neurosurg 1990; 26:37-42
- 64- Finsen B, Pulsen PH, Zimmer J. Xenografting of fetal mouse hippocampal tissue to the brain of adult rats: effects of cyclosporin A treatment. Exp Brain Res 1988; 70:117-133

65- Finsen B, Pedersen EB, Sorensen T, Hokland M, Zimmer J. Immune reaction against intracerebral murine xenografts of fetal hippocampal tissue and cultured cortical astrocytes in the adult rat. In: Dunnett SB, Richards SJ (Eds). Serie Progress in Brain Research. Elsevier, Amsterdam. 1990; pp 111-128

66- Frankel H. Spinal cord injury units. Paraplegia 1987; 25:239-240

67- Freeman LW. Return of function after complete transection of the spinal cord of the rat, cat and dog. Ann Surg 1952;136:193-205

68- Gage FH, Cotman CW (Eds). Plasticity and pathology in the damaged brain. Raven Press, New York. 1992

69- Gelderd JB, Quarles JE. A preliminary study of homotopic fetal cortical and spinal cotransplants in adult rats. Brain Res Bull 1990; 25:35-48

70- Gelderd JB. Evaluation of blood vessel and neurite growth into a collagen matrix placed within a surgically created gap in rat spinal cord. Brain Res 1990; 511:80-92

71- Giulian D, Vaca K, Johnson B. Secreted peptides as regulators of neuron-glia and glia-glia interactions in the developing nervous system. J Neurosci Res 1988; 21:487-500

72- Giulian D, Robetson C. Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. Ann Neurol 1990; 27:33-42

73- Goldberg W, Bernstein JJ. Grafted fetal astrocytes migrate from host thoracic spinal cord to lumbar cord and medulla. In: Gorio A, Perez-Polo R, De Vellis J, Haber B (Eds). Neural Development and Regeneration. Springer-Verlag, Heidelberg. 1988; pp 523-538

74- Goldberger M, Murray M. Restitution of function and collateral sprouting in cat spinal cord: The deafferented animal. J Comp Neurol 1974; 158:37-54

75- Goodkin R, Campbell JB. Sequential pathologic changes in spinal cord injury: A preliminary report. Surg Forum 1969; 20:430-432

76- Goodman JG, Bingham WG, Hunt WE. Platelet aggregation in experimental spinal cord injury. Arch Neurol 1979; 30:197-201

77- Gout O, Gansmuller A, Baumann N, Gumpel M. Remyelination by transplanted oligodendrocytes of a demyelinated lesion in the spinal cord of the adult shiverer mouse. Neurosci Lett 1988; 87: 195-199

78- Green C. Experimental transplantation and cyclosporine. Transplantation 1988; 46:3-10

79- Guth L, Bernstein JJ. Selectivity in the re-establishment of synapsis in the superior cervical sympathetic ganglion of the cat. Exp Neurol 1961; 4:59-69

80- Guth L. History of central nervous system regeneration research. Exp Neurol 1975; 48:3-15

81- Guth L, Barrett C P, Donati E J. Histological factors influencing the growth of axons into lesions of the mammalian spinal cord. Exp Brain Res Suppl 1986; 13:271-282

82- Hall ED, Wolf DL. A pharmacological analysis of the pathophysiological mechanisms of posttraumatic spinal cord ischemia. J Neurosurg 1986; 64:951-961

83- Hall ED, Braughler JM. The role of oxygen radical-induced lipid peroxidation in acute central nervous system trauma. In: Halliwell B, (Ed). Oxygen Radicals and Tissue Injury Symposium (Proceeding). Bethesda MD, FASEB. 1988; pp 92-98

84- Hall ED, Braughler JM. Central nervous-system trauma and stroke. II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. Free Radical Biol Med 1989; 6:303-313

85- Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. J Neurosurg 1992; 76:13-22

86- Hallas BH. Transplantation of embryonic rat spinal cord of neocortex into the intact or lesioned adult spinal cord. Appl Neurophysiol 1984; 47:43-50

87- Hashim G, Day E. Role of antibodies in T cell-mediated experimental allergic encephalomyelitis. J Neurol Res 1988; 21: 1-5

88- Hirano A. Review of the morphological aspects of remyelination. Dev Neurosci 1989; 11:112-117

89- Hito H, Tessler A. Regeneration of adult dorsal root axons into transplants of fetal spinal cord and brain: a comparison of growth and synapse formation in appropriate and inappropriate targets. J Comp Neurol 1990; 302:272-293

90- Hoffman H, Springell PH. An attempt at the chemical identification of "neurocletin" (the substance evoking axon-sprouting). Austral J Exp Biol Med Sci 1951; 29:417-424

91- Hogan EL, Hsu C, et al. Calcium-activated mediators of secondary injury in the spinal cord. Cent Nerv Syst Trauma 1986; 3: 175-179

92- Holets VR. Intraspinial transplantation of fetal raphe neurons and competition with sprouting host spinal afferents. *Restor Neurol Neurosci* 1992; 4:183

93- Horn JP, Dodd J. Inhibitory cholinergic synapses in autonomic ganglia. In: Bousfield D (Ed). *Neurotransmitters in Action*. Serie Trends in Neurosciences. Elsevier, Amsterdam. 1985; pp 65-73

94- Houle JD, Reier J. Transplantation of fetal spinal cord tissue into the chronically injured adult rat spinal cord. *J Comp Neurol* 1988; 269:535-547

95- Houle JD, Johnson JE. Nerve growth factor (NGF)-treated nitrocellulose enhances directly the regeneration of adult rat dorsal root axons through intraspinal neural tissue transplants. *Neurosci Lett* 1989; 103:17-23

96- Hsu CY, Halushka PV, Hogan EL, Cox RD. Increased thromboxane level in experimental spinal cord injury. *J Neurol Sci* 1986; 74: 289-296

97- Hughes JT, Phil D. Historical review of paraplegia before 1918. *Paraplegia* 1987; 25:168-171

98- Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* 1990; 27:1-11

99- Jakeman L, Reier PJ. The response of corticospinal tract fibers following injury and transplantation in the adult rat spinal cord. *Soc Neurosci Abst* 1987; 13:750

100- Johnson MI, Bunge RP. Plasticity in neurotransmitter expression and the use of neuronal relays in spinal cord repair. In: Kao CC, Bunge RP, Reier PJ (Eds). *Spinal cord reconstruction*. Raven Press, New York. 1983; pp 329-340

101- Kalil K, Schneider G. Retrograde cortical and axonal changes following lesions of the pyramidal tract. *Brain Res* 1975; 89:15-27

102- Kao CC, Chang LW. The mechanism of spinal cord cavitation following spinal cord transection. Part I. A correlated histochemical study. *J Neurosurg* 1977; 46:197-209

103- Kao CC. Peripheral nerve autografts in spinal cord transection. In WF Windle, (Ed) *The spinal cord and its reaction to traumatic injury*. New York: Marcel Dekker. 1980, pp 271-296

104- Kerr FWL. Structural and functional evidence of plasticity in the central nervous system. *Exp Neurol* 1975; 48:16-31

105- Kopyev OV, Bragin AG, Pichkour LD, Radzievski AA, Tsinbalyuk VI, Vinogradova OS. Grafting of the embryonal brain tissue helps to survival of the rats after severe craniocerebral trauma.



106- Kuang RZ, Kalil. Specificity of corticospinal axon arbors sprouting into denervated contralateral spinal cord. J Comp Neurol 1990; 302:461-472

107- Kuhlengel KR, Bartlett M, Bunge RP, Burton H. Implantation of cultured sensory neurons and schwann cells into lesioned neonatal rat spinal cord. II. Implant characteristics and examination of corticospinal tract growth. J Comp Neurol 1990; 293:74-91

108- Lampson L. Molecular bases of the immune response to the neural antigens. TINS 1987; 10:211-216

109- Lander AD. Understanding the molecules of neural cell contacts: emerging patterns of structure and function. TINS 1989; 12:189-195.

110- Langley JN. On the regeneration of pre-ganglionic and of post-ganglionic visceral nerve fibres. J Physiol (London) 1897; 22: 215-230

111- Lasek RJ. Protein transport in neurons. Int Rev Neurobiol 1970; 13:289-321

112- LaVail JH, LaVail MM. Retrograde axonal transport in the central nervous system. Science 1972; 176:1416-1417

113- Lemke M, Demediuk P, McIntosh TK, Vink R, Faden A I. Alterations in tissue Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> and spinal cord edema following impact trauma in rats. Bioch Bioph Res Com 1987; 147:1170-1175

114- Letourneau PC, Shattuck TA, Roche FK, Takeichi M, Lemmon V. Nerve growth cone migration onto Schwann cells involves the calcium-dependent adhesion molecule, N-cadherin. Dev Biol 1990; 138:430-442

115- Levi-Montalcini R, Hamburger V, Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. J Exp Zool 1951; 116:321-338

116- Levi-Montalcini R, Angeletti P U. Nerve growth factor. Physiol Rev 1968; 48:534-569

117- Ley General de salud. Título Séptimo: De la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación. Editorial Porrúa, Sexta edición, México, D.F. 1990; pp 430-431

118- Liesi P. Extracellular matrix and neuronal movement. Experientia 1990; 46:900-907

119- Lieth E, McClay DR, Lauder JM. Neuronal adhesion and neurite growth on glia-enriched substrates from target brain regions. Soc Neurosci Abstr 1988; 14:581

- 120- Linnemann D, Bock E. Cell adhesion molecules in neural development. *Dev Neurosci* 1989; 11:149-173
- 121- Liu CN, Chambers WW. Intrasprouting of dorsal root axons. *Arch Neurol Psychiat* 1958; 79:46-61
- 122- Liuzzi FJ. Proteolysis is a critical step in the physiological stop pathway: Mechanisms involved in the blockade of axonal regeneration by mammalian astrocytes. *Brain Res* 1990; 512:277-283
- 123- Loeb GE. Hard lesions in motor control from the mammalian spinal cord. *TINS* 1987; 10:108-117
- 124- Lorente de N6. La regeneraci6n de la m6dula espinal en las larvas de batracio. *Trab Lab Invest Biol (Madrid)* 1921; 19:147-183
- 125- Ludwin SK. Evolving concepts and issues in remyelination. *Dev Neurosci* 1989; 11:140-148
- 126- Madraza I, Franco-Bourland R, Ostrosky-Solis F, Aguilera M, Cuevas C, Zamorano C, Morelos A, Magallon E, Guizar-Sahagun G. Fetal homotransplants (ventral mesencephalon and adrenal tissue) to the striatum of parkinsonian subjects. *Arch Neurol* 1990; 47:1281-1285
- 127- Marchand R, Woerly S. Transected spinal cords grafted with in situ self-assembled collagen matrices. *Neuroscience* 1990; 36:45-60
- 128- Marx JL. Nerve growth factor acts in brain. *Science* 1986; 232: 1341-1342
- 129- Mason DW, Morris PJ. Effector mechanisms in allograft rejection. *Ann Rev Immunol* 1986; 4:119-145
- 130- Mason DW, Charlton HM, Jones AJ, Lavy CV, Puklavec M, Simmonds SJ. The fate of allogeneic and xenogeneic neuronal tissue transplanted into the third ventricle of rodents. *Neuroscience* 1986; 19:685-694
- 131- Matthews DE, Farewell V, (Eds). Using and understanding medical statistics. Karger, Basel. 1985; pp 67-87
- 132- Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Brit J Exp Pathol* 1948; 29:58-69
- 133- Michel ME, Reier PJ. Axonal-ependymal associations during early regeneration of the transected spinal cord in *xenopus laevis* tadpoles. *J Neurocytol* 1979; 8:529-548
- 134- Miller RJ. Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 1987; 235:46-52

- 135- Mizrachi Y, Ohry A, Aviel A, Rozin R, Brooks ME, Schwartz M. Systemic humoral factors participating in the course of spinal cord injury. *Paraplegia* 1983; 21:287-293
- 136- Murray JG, Thompson JW. The occurrence and function of collateral sprouting in the sympathetic nervous system of the cat. *J Physiol (London)* 1957; 135:133-162
- 137- Murray M, Goldberger M. Restitution of function and collateral sprouting in cat spinal cord: The partially hemisected animal. *J Comp Neurol* 1974; 158:19-36
- 138- Nathan PW, Smith MC. Effects of two unilateral cordotomies on the motility of the lower limbs. *Brain* 1973; 96:171-194
- 139- Nogradi A, Vrbova G. The use of embryonic spinal cord grafts to replace identified motoneurone pools depleted by a neurotoxic lectin, volkensin. *Restor Neurol Neurosci* 1992; 4:219
- 140- Nornes H, Bjorklund A, Stenevi U. Reinnervation of the denervated adult spinal cord of rats by intraspinal transplants of embryonic brain stem neurons. *Cell Tissue Res* 1984; 230:15-35
- 141- Norris CR, Kalil K. Morphology and cellular interactions of growth cones in the developing corpus callosum. *J Comp Neurol* 1990; 293:268-281
- 142- Nygren L, Olson L, Seiger A. Monoaminergic reinnervation of the transected spinal cord by homologous fetal brain grafts. *Brain Res* 1977; 129:227-235
- 143- Palladini G, Grissi M, Maleci A, Lauro M. Immunocomplexes in rat and rabbit spinal cord after injury. *Exp Neurol* 1987; 95:639-651.
- 144- Pallini R, Fernandez E, Gangitano C, Del Fa A, Olivier-Sangiaco O, Sbriccoli A. Studies on embryonic transplants to the transected spinal cord of adult rats. *J Neurosurg* 1989; 70: 454-462
- 145- Panters SS, Yum SW, Faden AI. Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. *Ann Neurol* 1990; 27:96-99
- 146- Pearlman SH, Levivier M, Collier TJ, Sladek JR Jr, Gash DM. Striatal implants protect the host striatum against quinolinic acid toxicity. *Exp Brain Res* 1991; 84:303-310
- 147- Perry V, Gordon S. Macrophages and microglia in the nervous system. *TINS* 1988; 11:273-277
- 148- Pietronigro DD, Hovsepian M, Demopoulos HB, Flamm ES. Loss of ascorbic acid from injured feline spinal cord. *J Neurochem* 1983; 41:1072-1076

- 149- Privat A, Mansour H, Geffard M. Transplantation of fetal serotonin neurons into the transected spinal cord of adult rats; morphological development and functional influence. Gash DM, Sladek JR Jr (Eds). Transplantation into the mammalian CNS. Serie Progress in Brain Research. Elsevier, Amsterdam. 1988; pp 155-166
- 150- Raisman G. Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. Brain Res 1969; 14:25-48
- 151- Rakic P. Limits of neurogenesis in primates. Science 1985; 227: 1054-1056
- 152- Ramón y Cajal S. Degeneration and regeneration of the nervous system. Vol. 1 & 2. University Press, Oxford, London. 1928
- 153- Reier PJ, Perlow MJ, Guth L. Development of embryonic spinal cord transplants in the rat. Dev Brain Res 1983; 10:201-219
- 154- Reier PJ, Bregman BS, Wujek JR. Intraspinal transplantation of embryonic spinal cord tissue in neonatal and adult rats. J Comp Neurol 1986; 247:275-296
- 155- Reier PJ. Gliosis following CNS injury: The anatomy of astrocytic scars and their influences on axonal elongation. In: Federoff S, Vernadakis A (Eds). Astrocytes. Vol. 3, Academic Press, Orlando. 1986 pp 263-324
- 156- Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ. Axons from CNS neurons regenerate into PSN grafts. Nature 1980; 284:264-265
- 157- Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ. Peripheral nerve autografts to the rat spinal cord: studies with axonal tracing methods. Brain Res 1982; 237:147-162
- 158- Richardson PM, Issa VMK, Aguayo AJ. Regeneration of long spinal axons in the rat. J Neurocytol 1984; 13: 165-182
- 159- Rohrer H. The role of growth factors in the control of neurogenesis. Eur J Neurosci 1990; 2:1005-1015
- 160- Rotter A, Birdsall NJM, Field PM, Raisman G. Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. II. Distribution of binding of [3H]propylbenzilylcholine mustard in the midbrain and hindbrain. Brain Res Rev 1979; 1:167-184
- 161- Sabel BA, Stein DG. Pharmacological treatment of central nervous system injury. Nature 1986; 323:493
- 162- Saffran BN, Crutcher KA. NGF-induced remodeling of mature uninjured axon collaterals. Brain Res 1990; 525:11-20
- 163- Sanders RD, Dugan LL, Demediuk P, Means ED, Horrocks LA, Anderson DK. Effect of methylprednisolone and the combination of alpha tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and

lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue. J Neurochem 1987; 49:24-31

164- Savio T, Schwab ME. Lesioned corticospinal tract axons regenerate in myelin-free rat spinal cord. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:4130-4133

165- Sceats DJ, Frieriedman WA, Sypert GW, Ballinger WE. Regeneration in peripheral nerve grafts to the cat spinal cord. Brain Res 1986; 362:149-156

166- Schlaepfer WW, Zimmerman UP. Calcium-mediated breakdown of glial filaments and neurofilaments in rat optic nerve and spinal cord. Neurochem Res 1981; 6:243-255

167- Schlaepfer WW. Neurfilaments: Structure, metabolism and implications in disease. J Neuropathol Exp Neurol 1987; 46:117-129

168- Schwab ME. Myelin-associated inhibitors of neurite growth. Exp Neurol 1990; 109:2-5

169- Schwab ME. Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS. TINS 1990; 13:452-456

170- Selzer ME. Mechanisms of functional recovery and regeneration after spinal cord transection in larval sea lamprey. J Physiol (Lond) 1978; 277:395-408

171- Sieradzan K, Clowry G, Haynes L, Vrbova G. The ability of isolated embryonic motoneurons grafted into rat spinal cord to express cholinergic markers and innervate skeletal muscle. Restor Neurol Neurosci. 1992; 4:220

172- Simpson RK Jr, Robertson CS, Goodman JC. Spinal cord ischemia-induced elevation of amino acids: extracellular measurement with microdialysis. Neurochem Res 1990; 15:635-639

173- Singer M, Nordlander RH, Egar M. Axonal guidance during embryogenesis and regeneration in the spinal cord of the newt: the blueprint hypothesis of neural pathway patterning. J Comp Neurol 1979; 185:1-22

174- Sivron T, Cohen A, Duvdevani R, Jeserich G, Schwartz M. Glial response to axonal injury: In vitro manifestation and implication for regeneration. Glia 1990; 3:267-276

175- Sloan DJ, Baker BJ, Puklavec SM, Charlton HM. The effect of site of transplantation and histocompatibility differences on the survival of neural tissue transplanted to the CNS of defined inbred rat strains. In: Dunnett SB, Richards SJ (Eds). Serie Progress in Brain Research, Elsevier, Amsterdam 1990; pp 141-152

176- Smith GM, Rudge J, Silver J, Miller RH. Astrocyte supported neurite outgrowth and neuronal adhesion is reduced as the

astrocyte matures. Soc Neurosci Abstr 1988; 14:867

177- Sotelo C, Palay SL. Altered axons and axon terminals in the lateral vestibular nucleus of the rat. Lab Invest 1971; 25:653-671

178- Sperry RW. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connexions. Proc Nat Acad Sci USA 1963; 50:703-710

179- Sperry RW, Hibbard E. Regulative factors in the orderly growth of retino-tectal connexions. In: Wolstenholme GE, O'Conner M (Eds). Growth of the nervous system. Ciba symposium, A. Churchill, Ltd., London. 1968; pp 41-52

180- Stokes BT, Reier PJ. Fetal grafts alter chronic behavioral outcome after contusion damage to the adult rat spinal cord. Exp Neurol 1992; 116:1-12

181- Sugar O, Gerard RW. Spinal cord regeneration in the rat. J Neurophysiol 1940; 3:1-19

182- Stansfeld C. Mast cell degranulating peptide and dendrotoxin selectively inhibit a fast activating potassium current and bind to common neuronal proteins. Neuroscience 1987; 23:893-902

183- Stover SL, Fine PR. The epidemiology and economics of spinal cord injury. Paraplegia 1987; 25:225-228

184- Szeifert GT, Ladocsi T, Zagon A, Fedina L, Pasztor E. Transplantation of cultured embryonic spinal cord grafts into the hemisectioned spinal cord of adult rabbits. Surg Neurol 1989; 32:273-280

185- Tator CH, Rivlin AS, Lewis AJ, Schmoll B. Effect of spinal cord injury on axonal counts in the pyramidal tract of rats. J Neurosurg 1984; 61:118-123

186- Tessler A. Intraspinial transplants. Ann Neurol 1991; 29: 115-123

187- Thoenen H, Edgar D. Neurotrophic Factors. Science 1985; 29:238-242

188- Tulipan N, Whetsell WO, Luo S, Huang S, Allen GS. Long-term prevention of toxin-induced damage by neural grafts. Gash DM, Sladek JR Jr (Eds). Transplantation into the mammalian CNS. Serie Progress in Brain Research. Elsevier, Amsterdam. 1988; pp 613-618

189- Tulipan N, Huang S, Whetsell WO, Allen GS. Neonatal striatal grafts prevent lethal syndrome produced by bilateral intrastriatal injection of kainic acid. Brain Res 1986; 377:163-167

- 190- Wagner FC, Dohrmann GJ, Bucy PC. Histopathology of transitory traumatic paraplegia in the monkey. *J Neurosurg* 1971; 35: 272-276
- 191- Wallace RB, Das GD. Behavioral effects of CNS transplants in the rat. *Brain Res* 1982; 243:133-139
- 192- Walter J, Allsopp TE, Bonhoeffer F. A common denominator of growth cone guidance and collapse? *TINS* 1990; 13:447-452
- 193- Weddell G, Gutmann L, Gutmann E. The extension of nerve fibres into denervated areas of skin. *J Neurol Psychiat* 1941; 4:206-225
- 194- Weiss P. Nerve pattern: The mechanics of nerve growth. Growth (third growth symposium suppl) 1941; 5:163-203
- 195- Weiss P, Hiscoe HB. Experiments on the mechanism of nerve growth. *J Exp Zool* 1948; 107:315-396
- 196- Victorin K, Ouimet CD, Bjorklund A. Intrinsic organization and connectivity of intrastriatal striatal transplants in rat as revealed by DARPP-32 immunohistochemistry: specificity of connections with the lesioned host brain. *Eur J Neurosci* 1989; 1:690-701
- 197- Williams TH, Jew J, Palay SL. Morphological plasticity in the sympathetic chain. *Exp Neurol* 1973; 39:181-203
- 198- Willenborg E, Eidelberg E. Studies on cell-mediated hypersensitivity to neural antigens after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 1977; 54:383-392
- 199- Windle WF. Regeneration of axons in the vertebrate central nervous system. *Physiol Rev* 1956; 36:427-440
- 200- Windle WF, Littrell JL, Smart JO, Joralemon J. Regeneration in the cord of spinal monkeys. *Neurology* 1956; 6:420-428
- 201- Windle WF, Smart JO, Beers JJ. Residual function after subtotal cord transection in adult cats. *Neurology* 1958; 8:518-521
- 202- Windle WF. Concussion, contusion and severance of the spinal cord. In: Windle WF (Ed). *The spinal cord and its reaction to traumatic injury*. Marcel Dekker, New York. 1980; pp 205-217
- 203- Winialski D, Houle J, Jakeman L, Reier PJ. Transplantation of fetal rat spinal cord into longstanding contusion injuries of adult rat spinal cord. *Soc Neurosci Abst* 1987; 13:751
- 204- Wong EK, Kemp JA, et al. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Nat Acad Sci* 1986; 83:7104-7108

205- Wood MR, Cohen MJ. Synaptic regeneration and glial reactions in the transected spinal cord of the lamprey. J Neurocytol 1981; 10:57-79

206- Wujek JR, Haleem-Smith H, Yamada Y, Lipsky R, Lan YT, Freese E. Evidence that the B2 chain of laminin is responsible for the neurite outgrowth-promoting activity of astrocyte extracellular matrix. Dev Brain Res 1990; 55:237-247

207- Xu J, Hsu CY, Liu TH, Hogan EL, Perot PL, Tai HH. Leukotriene B4 release and polymorphonuclear cell infiltration in spinal cord injury. J Neurochem 1990; 55:907-909

208- Yashon D, Bingham WG Jr, Friedman SJ, Faddoul EM. Intracellular enzyme liberation in primate spinal cord injury. Surg Neurol 1975; 4:43-51

209- Young W, Koreh I. Potassium and calcium changes in injured spinal cords. Brain Res 1986; 365:42-53