

11261 7
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

ANALISIS MORFOMETRICO DE LOS AXONES EN RATAS
ADULTAS CON MEDULA ESPINAL SIN LESION Y DESPUES
DE CONTUSION SEVERA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A:

HERMELINDA SALGADO CEBALLOS.

TUTOR ACADEMICO: DR. ALFREDO FERIA VELASCO.
COASESOR: DR. GABRIEL GUIZAR SAHAGUN.
COASESOR: DR. IGNACIO MADRAZO NAVARRO.
COASESOR: DR. MIGUEL BETANCOURT RULE.

1994
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

TUTOR ACADEMICO

DR. ALFREDO FERIA VELASCO

Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional
Siglo XXI. Subjefatura de Servicios de Investigación Biomédica.

COASESOR

DR. GABRIEL GUIZAR SAHAGUN

Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional
Siglo XXI. Hospital de Especialidades.

COASESOR

DR. IGNACIO MADRAZO NAVARRO

Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional
Siglo XXI. Hospital de Especialidades.

COASESOR

DR. MIGUEL BETANCOURT RULE

Universidad Autónoma Metropolitana, plantel Iztapalapa.

Este trabajo de investigación fue realizado en las instalaciones del Centro de Investigación del Proyecto Camina A.C., en el departamento de Biología Celular y Tisular, de la Facultad de Medicina, U.N.A.M. y en la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, I.M.S.S.

El financiamiento para el desarrollo de este trabajo fue obtenido del Proyecto Camina A.C. y del FIDRESIN (Fideicomiso Interinstitucional de Investigación para la Regeneración del Sistema Nervioso)

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO.

DR. SIMON BRAILOWSKY KLIPSTEIN

DR. RAUL MENA LOPEZ

DR. ALFREDO FERIA VELASCO

DR. ALFONSO CARABEZ TREJO

DR. SALVADOR SANCHEZ DE LA PEÑA

Dedico esta tesis

A Mario, como un testimonio del amor y el cariño que siento por él y como una muestra de agradecimiento por su apoyo y comprensión.

A mis padres Guillermo y Hermelinda, como un tributo por su apoyo incondicional, sus sacrificios y su cariño.

A mis hermanos

Moises

Alejandro

Daniel

Nohemi

Martha

Cristina

Guillermo

A mis inseparables amigas, Norma Leticia y Verónica

A mis familiares, profesores, compañeros de trabajo y amigos.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Alfredo Feria, por su tiempo, dedicación, paciencia, asesoría y orientación que hicieron posible la realización de esta tesis.

Al Dr. Gabriel Guizar, por su orientación académica y científica, su prestancia al intercambio de ideas, observaciones, apoyo y dedicación para el logro de este trabajo.

Al Dr. Eñen Grijalva, por su tiempo, comentarios y críticas que enriquecieron este documento.

Al Dr. Antonio Ibarra y a Ana Laura Espitia, por la disposición que siempre presentaron para la realización de este trabajo y por las experiencias compartidas durante este transcurso.

Al Dr. Ignacio Madrazo, por su apoyo incondicional y por el ejemplo que ha representado para mí.

A la Dra. Gabriela Morali y al Dr. Miguel Betancourt, por el gran apoyo que me brindaron durante la realización de mi posgrado y que fue determinante para su culminación.

A los Señores Salvador y Raquel Harari, quienes con su esfuerzo y dedicación han hecho posible que el Centro de Investigación del Proyecto Camina A.C. se perfilara como una importante institución académico-científica cuyos logros nacionales e internacionales como centro de investigación no habrían sido posibles sin su apoyo.

A la Sra. Enna Boijseauncau, a la Srita. Laura Baldwin, al Sr. Fidel López, al Sr. Guillermo González y familia y a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido al logro de este esfuerzo.

**Aprender
es descubrir
lo que ya sabes.**

**Actuar es demostrar que
lo sabes.**

**No existe
ningún problema
que no te aporte simultáneamente
un don.**

**Buscas los problemas
porque necesitas
sus dones.**

Richard Bach

INDICE.

Resumen.....	1
Introducción	
Características de la mielina.....	3
Proceso de mielinogénesis.....	4
Patologías desmielinizantes.....	7
Características de la remielinización.....	9
Modelos experimentales de lesión en la médula espinal.....	15
Lesión tipo contusión-compresión.....	16
Lesión por corte con bisturí.....	18
Lesión por laceración.....	20
Administración de sustancias tóxicas.....	22
Otros modelos.....	22
Fisiopatología de la lesión por contusión de la médula espinal.....	23
Antecedentes	
Mielinización en la médula espinal de la rata.....	29
Características morfométricas de la mielinización.....	30
Desmielinización en la médula espinal después de lesión por contusión.....	32
Remielinización en la médula espinal después de lesión por contusión.....	33
Planteamiento del problema.....	36
Hipótesis.....	37
Objetivos.....	37
Material y Métodos	
Grupo experimental y control.....	38
Etapas del estudio.....	38
Procedimientos generales	
Técnica anestésica.....	38

Técnica de contusión de la médula espinal.....	38
Cuidado postoperatorio.....	38
Criterios de inclusión y exclusión.....	39
Estudio histológico.....	39
Estudio morfométrico.....	41
Recolección de datos.....	41
Método estadístico.....	41
Consideraciones éticas.....	41
Resultados.....	42
Discusión.....	50
Conclusiones.....	53
Bibliografía.....	54

RESUMEN.

Tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el sistema nervioso periférico (SNP) la velocidad de conducción de los potenciales de acción en las fibras nerviosas es proporcional al diámetro del axón y se incrementa notablemente con la mielinización, a tal grado que en una fibra mielinizada, la transmisión ocurre 100 veces más rápido que en ausencia de mielina.

Además de la rapidez en la conducción de impulsos nerviosos, la formación de una vaina de mielina alrededor de un axón proporciona otras ventajas, como mayor compactación en la organización del SNC y ahorro de energía en la restauración y mantenimiento del potencial de acción.

El índice de mielinización (IDM) o radio "g" se ha empleado para establecer el espesor relativo de la vaina de mielina y se obtiene al dividir el diámetro del axón entre el diámetro del mismo más la mielina. El IDM óptimo para que se lleve a cabo una adecuada conducción de los impulsos nerviosos en las fibras mielínicas oscila entre 0.60 y 0.80 con variaciones específicas entre las distintas especies y entre las diferentes estructuras nerviosas de la misma especie.

La desmielinización es un proceso sumamente importante en las lesiones de la médula espinal (ME) en las que ésta no es seccionada completamente, ya que produce bloqueo en la conducción de impulsos nerviosos y contribuye de manera importante en la generación del déficit funcional. Su importancia radica en que al parecer, la recuperación en este tipo de patologías puede depender en gran parte de la cantidad de remielinización que pueda generarse después de la lesión.

Aún cuando al parecer la remielinización en el SNC sigue el patrón observado en la mielinización durante el desarrollo, puede mostrar variaciones como la participación de las células de Schwann y el hecho de que generalmente es abortiva e incompleta.

A fin de determinar objetivamente si la remielinización, después de una lesión de la ME era abortiva e incompleta, se estudiaron mediante microscopía electrónica y digitalización computarizada, los axones medulares de 28 ratas Long Evans adultas; 7 de ellas sin lesión y 21 con contusión severa de la ME con observación a diferentes tiempos (1, 2, 4, 6 y 12 meses después de la lesión).

De las casi 4,000 fibras medulares estudiadas en las ratas sin lesión, más del 60% tenían diámetros entre 1 y 2 μm , sólo el 1.08% tenían diámetros de 0.5 μm o menos y en el 4% se observaron diámetros de 5 μm o más.

En el grupo experimental se estudiaron más de 10,000 fibras medulares, de las cuales el 58% tuvieron diámetros entre 0.5 y 1 μm . Un año después de la contusión de la ME se encontró que el porcentaje de fibras grandes disminuyó hasta 0.11% y que la población de fibras con diámetro de 0.5 μm o menos se incrementó hasta 27%, dicha población se consideró como colaterales axónicas y se estudió por separado.

El IDM en las ratas sin lesión fue 0.72 mientras que 2 meses después de la lesión, cuando alrededor del 60% de las fibras eran amielínicas el IDM fue 0.90. A los 4 y 6 meses posteriores a la contusión de la ME, cuando los procesos de remielinización ya se habían establecido, el IDM se mantuvo en 0.88 y a los 12 meses, el IDM fue de 0.83. Se observó una diferencia significativa al comparar el grupo control con los experimentales hasta los 6 meses. Al comparar el subgrupo de ratas 2 meses posteriores a la lesión contra el subgrupo correspondiente a los 12 meses, también se encontró una diferencia significativa ($p < 0.02$).

El IDM en las colaterales axónicas de ratas sin lesión fue de 0.60, dos meses después de la lesión fue de 1.00 (totalmente amielínicas) y un año posterior a la contusión se encontró un IDM de 0.90.

Estos resultados indican que después de una contusión severa de la ME se presentan fenómenos de plasticidad como la emisión de ramas colaterales axónicas y remielinización, ambos procesos son significativos y aun cuando su evolución es lenta, no son procesos incompletos ni abortivos.

INTRODUCCION.

Características de la mielina.

La membrana de mielina es el tejido animal más rico en lípidos, ya que sólo el 20% de su peso seco está formado por proteínas y alrededor del 80% por lípidos (Stoffel, 1990). Cuantitativamente los componentes lipídicos más importantes de esta membrana son colesterol, cerebroside y etanolamina y los menos abundantes, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina y esfingomielina (Norton, 1984).

La composición de los lípidos de la mielina, tanto en el sistema nervioso periférico (SNP), como en el sistema nervioso central (SNC) es muy parecida, pero existen diferencias significativas en cuanto a su composición proteica (Stoffel, 1990).

En el SNP, la glucoproteína asociada a la mielina (MAG) y el galactocerebroside (GalC) se expresan en estadios tempranos de la diferenciación de las células de Schwann (CS) o células mielinizantes (Stoffel, 1990).

La MAG no es funcional, hasta que la lámina basal de las CS se ha formado (Owens y Bunge, 1989) y una vez que esto ocurre, la MAG puede mediar el envainamiento inicial de los axones que van a ser mielinizados (Owens et al., 1990), especialmente los de gran calibre. También puede funcionar como molécula de adhesión en el proceso de mielinización y por su localización periaxonal, se ha implicado en el mantenimiento del volumen citoplásmico periaxonal de las CS dentro de la lámina compacta de mielina (Trapp et al., 1984).

La expresión de la MAG, al igual que la de GalC, está regulada por su interacción con los axones; se expresa antes del desarrollo de la vaina de mielina y continúa expresándose a lo largo del proceso de mielinización. Sin embargo, después de la formación de la lámina basal, la interacción de las CS con los axones ya no ejerce ningún efecto de regulación sobre estas proteínas (Owens y Bunge, 1989). La MAG presenta una regulación negativa en CS que envainan axones que no serán mielinizados y su expresión persiste en la superficie de las CS mielinizantes (Stoffel, 1990).

El GalC se ha implicado en la formación en espiral de la membrana de las CS (Ranscht et al., 1987) y las proteínas básicas de la mielina P0 y P1 en el proceso de compactación de la membrana mielínica (Trapp, 1988; Owens et al., 1990).

En el SNP las principales proteínas de la mielina son la proteína P0 y GalC (Greenfield et al., 1973).

En el SNC la proteína básica de la mielina (MBP) constituye del 30 al 40% del total de las proteínas de la mielina. Esta proteína es la responsable de la compactación en capas de los procesos citoplásmicos de las células mielinizantes u oligodendrocitos (OD). En este sistema, debido a que la MBP se encuentra localizada en el espacio citoplásmico de la membrana mielínica y en condiciones normales, no tiene contacto con el exterior, después de una lesión que altere estas condiciones, dicha proteína se convierte en el primer antígeno capaz de desencadenar la respuesta autoinmune en el SNC (Stoffel, 1990).

Las proteínas proteolípídicas (PLP) constituyen la mayor fracción protéica de la mielina central y conforman del 50 al 55% de su peso seco. Una alteración en la expresión estructural de esta proteína puede causar la muerte de los OD, falla en la mielinización, y la muerte a corto plazo del individuo (Stoffel, 1990).

Otros componentes que se expresan en menor proporción son las proteínas Wolfram y la MAG, esta última constituye el 1% de la concentración protéica de la mielina en el SNC. En ratas adultas, su localización en la región periaxonal de la mielina, puede constituir el punto de interacción entre las neuronas y los OD durante la mielinogénesis (Stoffel, 1990).

Proceso de mielinogénesis.

La mielinogénesis en el SNC se inicia en las ratas aproximadamente 10 días después del nacimiento y en los humanos a los 6 meses de gestación. El proceso de mielinización, tanto en el cerebro como en la médula espinal (ME), se completa 30 días después del nacimiento en las ratas y en los humanos del segundo al cuarto año de vida. La mielinización es un proceso minuciosamente regulado en tiempo y espacio para cada región (Stoffel, 1990).

Los axones mielinizados presentan un complejo de interacción específico célula-célula con las CS en el SNP y con los OD y astrocitos en el SNC. Las fibras mielinizadas, en ambos casos, pueden determinar una diferenciación regional en la membrana axónica, con diferencias en la estructura macromolecular de las membranas en los segmentos nodal, paranodal e internodal (Waxman y Ritchie, 1985).

La formación de una vaina de mielina alrededor de un axón proporciona 3 ventajas: mayor rapidez en la conducción de impulsos nerviosos (Schwab y Schnell, 1989), compactación en la organización del SNC, y ahorro de energía en la restauración y mantenimiento del potencial de reposo (Stoffel, 1990).

En estudios *in vitro* se ha observado que los axones mielinizados por CS poseen aproximadamente 1.3 láminas en sus vainas mielínicas, mientras que los axones mielinizados por OD tienen un promedio de 8.4 láminas (Windebank et al., 1985) y cada bicapa lipídica tiene un espesor aproximado de 4-5 nm (Stoffel, 1990).

Cada vez existen más evidencias de que en el SNC las vainas de mielina no son uniformes en sus propiedades bioquímicas y estructurales. La composición bioquímica varía con el grado de madurez de las vainas y el diámetro axonal, ya que la mielina de las fibras de gran calibre (5 μ m o más) difiere de la mielina de las fibras pequeñas (< 0.6 μ m) en términos de su composición lipídica y protéica (Hartman, 1982) y en sus propiedades inmunohistoquímicas (Remahl y Hildebrand, 1990). Estos distintos tipos de mielina pueden corresponder a diferentes tipos de OD, por lo que se requiere de más investigación al respecto.

Se han descrito 4 tipos básicos de OD (I-IV). La clasificación está basada en el número de prolongaciones oligodendrogliales y su patrón de ramificación. Los OD que están en relación con grandes fibras poseen menos ramificaciones que aquellos que están en contacto con axones pequeños. Los OD tipo I se caracterizan por poseer muchas prolongaciones y son los principales productores de mielina (Chiquet, 1989).

Existen señales que regulan el desarrollo de los OD y la expresión de los constituyentes de la mielina; dichas señales pueden ser directas entre el axón y el OD o indirectas a través de los astrocitos (Schwab y Schnell, 1989).

Las células precursoras de la oligodendroglia deben diferenciarse antes de sintetizar las

proteínas de la mielina (Giulian et al., 1988).

Durante el período de máxima mielinización, los OD llegan a sintetizar diariamente más de 3 veces su peso en componentes de mielina (Norton, 1981; Stoffel, 1990).

Cada OD puede elaborar y mantener más de 50 vainas de mielina de manera separada (Stoffel, 1990) y de diferente espesor (Waxman, 1984). Sin embargo, algunos OD elaboran únicamente un internodo grande (Remahl y Hildebrand, 1990).

Existe una relación más o menos lineal entre el diámetro de un axón mielinizado y la longitud promedio de sus internodos, y una relación inversamente proporcional entre el diámetro axonal y el número de internodos que cada OD produce (Matthews y Duncan, 1972).

Una unidad glial está formada por el OD y el axón con su vaina de mielina. Las vainas-E son aquellas en las que las células gliales generan vainas citoplásmicas no compactadas, en donde las láminas forman cuando menos una vuelta completa alrededor del axón, mientras que las vainas-M se caracterizan por encontrarse compactadas y presentar cuando menos una línea densa mayor y una menor. Las unidades gliales monoaxonales y poliaxoniales difieren en términos del metabolismo de su mielina (Remahl y Hildebrand, 1990).

En comparación con las CS del SNP, las cuales dependen fuertemente de las señales axonales para expresar los constituyentes de la mielina, los OD del SNC pueden diferenciarse en cultivo de células precursoras, en células capaces de expresar componentes mielínicos (Dubois-Dalcq et al., 1986). Sin embargo, los OD y las CS no están limitados en cuanto a su capacidad para formar mielina, ya que los OD del SNC pueden mielinizar axones del SNP (Aguayo et al., 1978) y las CS del SNP pueden mielinizar axones del SNC (Blakemore, 1977).

Las vainas de mielina se rompen a intervalos de 1-2 μ m (nodos de Ranvier). En estos espacios donde los axones se encuentran desnudos, existen bombas iónicas capaces de movilizar grandes concentraciones de sodio y potasio, necesarias para restaurar el potencial de acción, lo cual explica por qué en las fibras mielínicas la gran velocidad de transmisión de impulsos nerviosos no está dada por una despolarización continua como

ocurre en las fibras amielínicas, sino en forma de saltos de un nodo a otro sobre la región internodal (conducción saltatoria), lo cual permite que la despolarización ocurra localmente en los nodos con un considerable ahorro de energía en la repolarización (Stoffel, 1990).

Patologías desmielinizantes.

Estudios de simulación computarizada han demostrado que la desmielinización paranodal lentifica, de manera más efectiva, la conducción de los impulsos nerviosos en comparación con la desmielinización uniforme del internodo en su totalidad y que la propagación de impulsos nerviosos puede continuar a través de un internodo severamente desmielinizado, siempre y cuando el internodo adjunto sea relativamente normal. También se demostró que la excitabilidad permanece confinada al nodo en las fibras desmielinizadas con la persistencia de alguna forma de conducción saltatoria, porque las propiedades de la membrana nodal permanecen sin cambio (Koles y Rasminsky, 1972).

En el SNP la desmielinización, a consecuencia de diversos agentes, se inicia en los nodos de Ranvier y puede quedar confinada a la región paranodal, mientras que en el SNC, la desmielinización paranodal es una característica de las lesiones producidas por tóxicos (Harrison et al., 1972).

La desmielinización resulta del daño directo a la mielina o por daño a los OD que afectan subsecuentemente las vainas mielínicas (Ludwin, 1981) y a su vez, la desmielinización favorece la degradación de la mielina intacta por agentes inflamatorios o tóxicos (Stoffel, 1990), ya que las citocinas producidas por los macrófagos activados pueden ser tóxicas para los OD y la mielina del SNC (Selmaj y Raine, 1988).

Los cambios patológicos en las vainas de mielina de los axones centrales no sólo son responsables de la alteración estructural, sino también de la alteración funcional del axón (Dusart et al., 1992), porque al disminuir el diámetro axonal en las fibras desmielinizadas, se puede incrementar la resistencia axoplásmica a lo largo de la fibra e incrementar el tiempo de conducción internodal y en caso extremo, bloquear la conducción nerviosa en su totalidad (Koles y Rasminsky, 1972).

En la encefalomiелitis diseminada, también conocida como esclerosis múltiple (EM), la

desmielinización observada parece ser consecuencia de una respuesta autoinmune. Como los dominios hidrofílicos de la PLP se encuentran expuestos en la superficie de la membrana, éstos se convierten en un punto accesible para el ataque directo de proteasas de macrófagos, linfocitos y leucocitos. La fragmentación de la PLP puede alterar severamente la organización de la membrana mielínica, con lo cual quedan expuestos los fosfolípidos al ataque de las fosfolipasas y la MBP al ataque de las proteasas (Stoffel, 1990).

La gran antigenicidad de la MBP juega un papel importante en el proceso de autoinmunización. Se ha encontrado en el líquido cefaloraquídeo de pacientes con EM, linfocitos T específicos para la MBP. Los linfocitos T citotóxicos reconocen las estructuras de la mielina como epítomos y los destruyen (Stoffel, 1990).

La desmielinización en el SNC tiene lugar durante la primera semana después de una lesión por inyección de ácido kaínico y se acompaña con pérdida de OD y astrocitos y con la presencia de restos celulares, numerosas células de la microglia y macrófagos. El ácido kaínico puede interferir con la relación axono-glial normal. Los axones presentan degeneración Walleriana con alteraciones morfológicas en sus mitocondrias. El proceso de desmielinización es aparentemente completo a los 16-20 días después de la lesión y se observa un gran número de pequeños axones amielínicos y fibras de gran calibre desmielinizadas (Dusart et al., 1992).

En la intoxicación del SNC por cuprizona, los OD se degeneran dentro de las 2 semanas posteriores al tratamiento. Después de la degeneración vesicular y la vacuolización de las láminas, la vaina de mielina se rompe y los restos mielínicos son fagocitados por macrófagos. Dicha reacción se encuentra bien establecida en la tercera semana y generalmente se completa en la sexta. Después de 6-8 semanas, todos los axones se encuentran desmielinizados. Los astrocitos comienzan a proliferar alrededor de la tercera semana y se mantienen a través de todo el proceso de desmielinización (Ludwin, 1978).

La desmielinización por degeneración de los OD también ocurre en la infección por el virus JHM (Weiner, 1973) y contrasta con lo observado en la encefalomiелitis alérgica experimental (Prineas et al., 1969) y la intoxicación con lisolecitina (Blakemore, 1976), donde el blanco inicial de la lesión es la vaina de mielina.

Las patologías mencionadas anteriormente difieren con aquellos procesos en los que la desmielinización se acompaña con algún grado de lesión axonal, como en la intoxicación

por cianuro (Hirano, 1968), deficiencia de tiamina (Collins, 1966), lesión por la toxina de la difteria (Wisniewski y Raine, 1971) y compresión de la ME (Gledhill et al., 1973).

La diferencia anterior es importante debido a que en las desmielinizaciones primarias la mielina dañada es eliminada rápidamente, mientras que en los procesos que involucran degeneración Walleriana, la eliminación de los restos mielínicos es mucho más lenta (Ludwin, 1978).

La desmielinización es un proceso sumamente importante en las lesiones de la ME en las que ésta no es seccionada completamente, ya que produce bloqueo de la conducción de impulsos nerviosos y contribuye de manera importante en la producción del déficit funcional (Gledhill et al., 1973).

Características de la remielinización.

La recuperación de enfermedades desmielinizantes del SNC puede depender, en gran parte, de la proporción de remielinización que pueda darse después de la lesión (Young, 1989).

En el SNC, la remielinización generalmente sigue el patrón observado en la mielinización durante el desarrollo (Duncan et al., 1988), aunque no es completamente normal y puede mostrar algunas variaciones, como la participación de las CS, la presencia de internodos muy cortos y vainas de mielina muy delgadas (Blight y Young, 1989) y el hecho de que generalmente es abortiva e incompleta (Hirano, 1989).

La incapacidad en el SNC para remielinizar axones ante un gran número de circunstancias, contrasta con la rápida y eficiente remielinización observada en el SNP (Ludwin, 1978).

Entre las posibles razones para explicar la disminución en la capacidad de remielinización del SNC, se han hecho las siguientes consideraciones:

a) Los axones *per se* presentan anomalías que no permiten su remielinización.

b) Las prolongaciones astrocíticas interfieren con los procesos de mielinización generados por los OD.

c) El número de OD es insuficiente para proporcionar una adecuada remielinización.

Sin embargo, no existen evidencias morfológicas de que los axones sean anormales en las desmielinizaciones crónicas, aún cuando en el SNC con desmielinización aguda, el diámetro axonal aparentemente sea menor que en los axones mielinizados, fenómeno que también ha sido observado en el SNP y en donde en términos generales ésto no ha demostrado tener ningún efecto en la remielinización. Más aun, se ha observado que después de la remielinización, el diámetro axonal alcanza los valores de normalidad. Lo anterior no quiere decir que los axones no tengan ningún papel en la remielinización (Ludwin, 1980).

Asimismo, la interferencia de las prolongaciones astrocíticas con la remielinización aparentemente no es tal, o cuando menos no en todas las patologías desmielinizantes, ya que no se detectan diferencias importantes entre la cantidad de prolongaciones astrocíticas que rodean las fibras amielínicas y las observadas en las proximidades de las fibras mielínicas en la desmielinización producida por cuprizona (Ludwin, 1980). Sin embargo, en la EM la gliosis sí juega un importante papel de barrera (Prineas y Conell, 1979).

La disminución en el número de OD parece ser el factor más factible a correlacionar con el decremento en la remielinización, con base en que la mayor actividad mitótica de estas células ocurre durante la fase de desmielinización como resultado de la reacción gliótica o inflamatoria, y como después de que la desmielinización se ha completado la respuesta glial comienza a decrecer, es probable que ya no exista estímulo alguno para la proliferación de los OD (Ludwin, 1980).

Es evidente que mientras más tiempo persista la desmielinización, menor será la remielinización y que el grado en que este proceso se da, puede estar determinado por el tamaño de la lesión, la naturaleza y persistencia del agente desmielinizante y la disponibilidad de un adecuado número de células para mielinizar.

A pesar de que la remielinización en el SNC ha sido comunicada en pocas situaciones experimentales, existen algunas investigaciones que han demostrado la capacidad del SNC de los mamíferos para generar una remielinización significativa. En 1980, Ludwin demostró la capacidad del SNC para remielinizar axones desmielinizados crónicamente, aun cuando el grado en que éstos fueron remielinizados se redujo marcadamente.

Anteriormente (1978) Ludwin había observado que todos los axones eran remielinizados después de haber sido desmielinizados por intoxicación con cuprizona. No obstante, si la desmielinización se mantenía durante largo tiempo, el área de lesión permanecía, por lo general, completamente desmielinizada y sólo ocasionalmente algunas fibras eran remielinizadas de manera aleatoria y algunas veces en pequeños grupos.

Así pues, en los animales, tanto jóvenes como adultos con desmielinización a corto plazo (8 semanas), a los que se les reemplazó la cuprizona por una dieta normal durante 7-8 semanas, la remielinización fué del 95% aproximadamente; mientras que en los animales con desmielinización a largo plazo (6-7 meses) la remielinización disminuyó alrededor del 22%. En los animales jóvenes en quienes no fué reemplazada la cuprizona por una dieta normal, tanto a corto como a largo plazo, la remielinización fué tan sólo del 7% aproximadamente.

La remielinización inició 1 a 2 semanas después de que la cuprizona fué reemplazada por una dieta normal y para la cuarta semana, casi todos los axones estaban cubiertos por mielina (Ludwin, 1978). Este mismo ritmo también se ha observado en la lesión por el virus JHM, en que la remielinización suele ser completa (Weiner, 1973) y en la compresión de la ME donde este proceso tiene lugar de 7 a 21 días después de la lesión (Gledhill et al., 1973).

Lo anterior contrasta con lo que ocurre en la intoxicación del SNC por ácido kaínico, en que la remielinización de axones de gran calibre tiene lugar 1 a 2 meses después de la lesión y coincide con la aparición de astrocitos reactivos, OD y numerosas CS en el tejido lesionado (Dusart et al., 1992). Igualmente con la encefalomiелitis alérgica experimental, en que la remielinización inicia a los 3 meses y suele ser muy limitada (Prineas et al., 1969) y con la lesión producida por la tóxina de la difteria, en que la remielinización se encuentra aparentemente ausente a los 6 meses e incluso un año después de la lesión (Wisniewski y Raine, 1971).

La razón por la que la remielinización puede retardarse en estos casos puede deberse a la persistencia de algunos factores que causaron la lesión inicial. Lo anterior quiere decir que la remielinización depende en gran parte del modo de actuar del agente desmielinizante original.

En los seres humanos con enfermedades desmielinizantes crónicas, como la EM, la remielinización es escasa y limitada (Prineas y Connel, 1979), probablemente como consecuencia de la interferencia física de la mielinización por las densas prolongaciones astrogliales de las placas o por incapacidad de los OD para dividirse (Ludwin, 1980). En esta patología, la mielina y los OD son destruidos tempranamente y 30 días después se observa proliferación de OD asociados con áreas de remielinización. Sin embargo, esta nueva mielina puede ser destruida si el agente desmielinizante persiste (Ludwin, 1989).

Los OD son las células responsables de la remielinización en la intoxicación por cuprizona (Ludwin, 1978 y 1980), en la encefalomiелitis alérgica experimental (Wisniewski y Madrid, 1983) y en la lesión por tóxico de la difteria (Wisniewski y Raine, 1971), mientras que en otros modelos, como la intoxicación por cianuro, este proceso está a cargo de las CS. En algunos modelos ambas células son las responsables de dicho fenómeno, como en la intoxicación por lisolecitina (Blakemore, 1976), ácido kainico (Dusart et al., 1992) y algunas lesiones por tóxico de la difteria (Wisniewski y Raine, 1971).

En situaciones patológicas los OD pueden provenir de células gliales inmaduras, de OD satélites perineuronales residuales (Ludwin, 1979) o de la glia reactiva. Sin embargo, estudios *in vitro* sobre proliferación de OD adultos han demostrado que no todos los OD así diferenciados son capaces de mielinizar axones (Wood and Bunge, 1986).

Aun cuando la mayor parte de la remielinización está dada por los OD, en algunas ocasiones en las que la barrera glial se rompe, las CS son las responsables de esta función (Ludwin, 1989).

En los mamíferos adultos las CS normalmente no se dividen (Asbury, 1967). Sin embargo, se ha observado ocasionalmente remielinización espontánea por CS en axones centrales de la ME en seres humanos sanos (Raine, 1976), procedentes de las raíces nerviosas, los nervios de la pia madre o los pequeños nervios de la *nerva vasorum* (Harrison, 1987), en ciertas enfermedades desmielinizantes como la EM (Prineas y Connel, 1979) y en fibras aberrantes regeneradas después de compresión medular (Druckman, 1953), en animales de experimentación con encefalomiелitis alérgica experimental (Raine y Traugott, 1978), aplicación medular de 6-aminonicotinamida (Blakemore, 1975), lisolecitina (Blakemore, 1976), y lisofosfatidilcolina (Harrison, 1987), deficiencia aguda de tiamina (Collins, 1966), intoxicación con cuprizona (Ludwin,

1978), intoxicación por ácido káimico (Dusurt et al., 1992), radiación (Brokes, 1980) y compresión aguda de la ME (Gledhill et al., 1973).

Se ha demostrado que las CS son capaces de formar típicas vainas de mielina periférica dentro del SNC. Una característica común en las lesiones medulares, en las que la remielinización está dada principalmente por SC, es la presencia de degeneración Walleriana en o cerca de la entrada de las raíces dorsales (Gledhill et al., 1973).

Las CS sufren una serie de cambios en su forma y sus funciones al generar las vainas de mielina (Owens et al., 1990). Se observa un considerable incremento en el número de CS antes del período de mielinización; posteriormente la CS envaina al axón y establece una relación de uno a uno con axones de diámetro mayor a 1 μm (Martin y Webster, 1973). La elaboración de la membrana espiral que precede a la formación de la mielina compacta sólo ocurre cuando esta relación se ha establecido y la CS se extiende a lo largo de la superficie axonal y forma la lámina basal (Owens y Bunge, 1989).

Las CS son más numerosas la segunda semana poslesión, cuando la desmielinización es más extensa, y comienzan a disminuir durante la tercera semana, conforme la remielinización progresa en el sitio de lesión, ya que el mitógeno que permite esta proliferación se encuentra en los axones desnudos y en los restos de mielina (Harrison, 1987).

La remielinización de axones centrales por las CS parece ser más completa que por los OD, en términos del espesor de la vaina de mielina que generan, pero la geometría longitudinal de los internodos es anormal. Específicamente, en lesiones crónicas de la ME las delgadas vainas de mielina presentan longitudes nodales e internodales inapropiadas (Blight, 1985).

No obstante, esta remielinización anormal que ocurre en una gran variedad de condiciones desmielinizantes, es capaz de restaurar de manera efectiva la conducción de los potenciales de acción en los tractos sensitivos de la ME de los mamíferos (Blight y Young, 1989), y se ha demostrado que aun cuando el tiempo de conducción internodal se incrementa conforme el espesor de la vaina disminuye, vainas muy delgadas como las que se observan un mes después de lesión por compresión de la ME pueden contribuir a la recuperación funcional de los axones (Gledhill et al., 1973). Más aún, al utilizar modelos de simulación computarizada se ha comunicado que la conducción saltatoria no

se altera con vainas delgadas de hasta el 3% de su espesor normal (Mc Donald y Sears, 1970). Sin embargo, ésto sólo es válido para internodos aislados (Koles y Rasminsky, 1972).

Modelos experimentales de lesión en la médula espinal.

Desde hace mucho tiempo la lesión traumática de la médula espinal (ME) ha captado el interés de diferentes disciplinas científicas y asistenciales, porque representa un problema con importantes repercusiones físicas, psicológicas y socioeconómicas, tanto para el individuo afectado, como para su familia y la sociedad en la que se desarrolla (Stover, 1987; Das, 1989).

Una lesión de la ME puede originar pérdida parcial o total de la función motora, sensitiva, tanto somática como vegetativa, a partir del nivel de lesión e incluso en regiones distales a la misma. Según el nivel medular afectado puede generarse parálisis en ambas piernas (paraplejía) o en ambas piernas y en ambos brazos (tetraplejía).

El problema en este tipo de padecimiento radica en que al considerar todas las formas de tratamiento existentes hasta el momento, y todos los niveles de lesión medular, menos del 2% de los paciente con lesión inicialmente completa llegan a caminar nuevamente (Hansebout, 1982).

Para poder establecer posibles manejos terapéuticos y el tiempo óptimo en el que deben administrarse, se debe obtener información precisa sobre la severidad de la lesión en el momento que se produce, el daño que se genera tiempo después, cómo se produce la parálisis en el individuo y por qué no existe recuperación espontánea o respuesta satisfactoria ante los diferentes tratamientos ensayados.

Debido a que no es posible realizar estudios histopatológicos de la ME lesionada en seres humanos, se han empleado una serie de modelos experimentales que permiten inducir parálisis en los animales de experimentación y reproducir las condiciones observadas en traumatismos medulares de los seres humanos (Das, 1989), a fin de conocer los mecanismos de lesión y de las alteraciones resultantes, así como el diseñar medidas de manejo y tratamiento con mejores resultados que los que actualmente se tienen.

Para que un modelo experimental sea útil, éste debe remedar los aspectos centrales de lo que ocurre en el hombre después de una lesión de la ME, ser reproducible con un cierto grado de certeza y ser capaz de adaptarse para simular diferentes aspectos clínicos del problema (Panjabi, 1987).

De acuerdo con los aspectos que se deseen estudiar, se deberán tomar en cuenta los siguientes puntos antes de seleccionar un determinado modelo:

-Las lesiones subumbrales son útiles para estudiar la capacidad de reparación o restauración de los axones dañados y la formación de la cicatriz que se produce después de una lesión medular. Las lesiones umbrales y supraumbrales se han empleado para estudiar los cambios producidos por la lesión en sí, los generados de manera secundaria, aquellos del tipo degenerativo y los involucrados con la reparación del tejido afectado.

-Debido a que la recuperación de la parálisis esta directamente relacionada con la severidad de la lesión, sólo las lesiones umbrales o supraumbrales son capaces de producir parálisis permanente. Sin embargo, este grado de afección genera en los animales de experimentación una importante disminución en el rango de sobrevivencia, ya que además de la parálisis se producen alteraciones como incapacidad para regular la temperatura corporal, falla en el funcionamiento del riñón y algunas alteraciones respiratorias, lo que ocasiona la muerte de la mayoría de los animales pocos días después de la cirugía; el pequeño número de los que sobreviven pueden presentar problemas como autofagia de los miembros paralizados (Das, 1989).

-A pesar de que todos los modelos experimentales tienen los componentes de una lesión, en cada uno predomina un aspecto en especial.

A) Lesión tipo contusión-compresión.

El trauma mecánico de la ME produce muerte del tejido y pérdida de la función (Anderson, 1991). El método de Allen (1911), o algunas modificaciones de éste, se constituye como el modelo que más se ha utilizado en estudios experimentales, debido a que reproduce con mayor fidelidad los fenómenos que ocurren en la mayoría de los casos de lesión medular traumática en seres humanos (Panjabi, 1987).

La manera de producir este tipo de lesión, consiste en anestesiarse al animal de experimentación, para exponer quirúrgicamente el nivel medular adecuado, a través de una laminectomía. Posteriormente se coloca en un aparato estereotáxico y a través de un tubo guía, se deja caer directamente sobre la ME un peso determinado a una altura preestablecida, con lo cual se produce una lesión medular bilateral. Con el objeto de

producir lesiones de diferente severidad, se varía el peso de la masa que se dejar caer sobre la ME y se mantiene constante la altura; se mantiene constante el peso de la masa y se varía la altura o, en el menor de los casos se varían ambos factores (Panjabi, 1987).

Una modificación a esta técnica es la compresión de la ME mediante un balón o válvula inflable a una presión determinada y durante un tiempo preestablecido (Tator, 1973). La compresión medular con forceps se ha empleado también, en ésta, el tiempo de aplicación es tan importante como la fuerza empleada y el producto de estos dos factores se define como impulso. La correlación del coeficiente del impulso con la lesión medular y la dislunción neurológica, representa el déficit motor (Panjabi, 1987). Algunos autores consideran que probablemente sea más importante la deformación medular producida después de la lesión, que la fuerza o incluso el impulso (Anderson, 1982).

En este modelo, los efectos de la lesión primaria se distribuyen con base en un gradiente que va de la superficie de la ME hasta el interior de la misma y desde el sitio más cercano al cerebro, hasta la región más alejada del mismo. Predominan los cambios patológicos secundarios, como sangrado e inflamación (los cuales se relacionan directamente con la severidad del trauma), suspensión de la circulación arterial, falta de oxígeno, presencia de macrófagos (los cuales pueden penetrar a la ME por lesión del sistema vascular), muerte y destrucción de neuronas y reacción de varios elementos celulares, que incluye las células gliales y las células endoteliales de los capilares. El tejido muerto se desunye o es fagocitado por los macrófagos y como consecuencia, se forman cavidades en el sitio de lesión cuyo tamaño se relaciona con la intensidad del trauma. Existen diferencias entre la sustancia blanca y la sustancia gris de la ME en cuanto a su capacidad de respuesta al trauma, debido a la diferencia en sus características tisulares; la más afectada es la sustancia gris (Fairholm y Turnbull, 1971).

Originalmente se pensó que en este tipo de lesión, la severidad del trauma podía cuantificarse matemáticamente al considerar el producto del peso en gramos y la altura en centímetros (Allen, 1911). Sin embargo, esta forma simplista de cuantificación no considera las dificultades y variabilidad inherentes a este método, ya que se pueden producir diferencias en la lesión, según el material de la masa, el área de contacto del objeto lesionador, las características del aparato en el que se fija al animal y donde se produce la lesión. Es decir, que la energía transferida en el momento del impacto depende de la masa empleada, de sus características físicas y de la velocidad a la que

los cuerpos hacen contacto, según el peso que cae, el lesionador, la ME y la columna vertebral (Panjabi, 1987).

La lesión medular producida con este modelo, ha sido cuantificada con base en potenciales evocados sensitivos (PES), pérdida de la función motora, tamaño del área lesionada, área de sección y el volumen total del tejido lesionado.

Con esta técnica es posible establecer cuantitativamente el valor umbral del impacto, a fin de producir parálisis permanente en los animales de experimentación. No se lesionan los axones de manera directa y las membranas que cubren a la ME conservan su integridad, lo cual evita la penetración de tejido, células y elementos extraños al tejido medular, que en otros modelos experimentales contribuyen a la intensidad de las reacciones patológicas. Sin embargo, existe una gran variabilidad en la naturaleza y la simetría del impacto en la ME, lo que implica serias restricciones al comparar hallazgos de un animal a otro o entre lesiones generadas con base en diferentes técnicas de contusión. La lesión producida por el impacto no se limita al sitio donde hizo contacto el impactador, sino que se extiende irregularmente a lo largo de una zona extensa de la ME. El hecho de que las meninges que envuelven la ME permanezcan intactas permite que el sangrado y el tejido muerto produzcan cierta presión sobre la ME, lo que puede contribuir a las alteraciones funcionales. Por otra parte, los diferentes sistemas axonales dañados no se pueden definir en términos anatómicos precisos (Das, 1989).

Las medidas terapéuticas ensayadas en este modelo consisten en cortar las meninges que envuelven la ME a fin de liberar la presión ejercida por la sangre y el tejido muerto (Campbell et al., 1973), la irrigación del sitio de lesión con solución fisiológica fría (Tator y Deecke, 1972), bajar la temperatura en el sitio de lesión (Richardson y Nakamura, 1971) y la administración de esteroides (Means et al., 1981) y medicamentos como el dimetilsulfóxido entre otros.

B) Lesión por corte con bisturí.

Este modelo permite lesionar selectivamente sólo un lado de la ME o ambos, al realizar cortes parciales unilaterales o bilaterales de las fibras nerviosas de la ME. También se pueden hacer cortes bilaterales completos (umbrales), los cuales son los únicos que producen parálisis permanente en los animales de experimentación (Das, 1989; Young, 1989).

Para producir esta lesión se expone la ME mediante técnica quirúrgica a través de una laminectomía en el nivel deseado y bajo visión microscópica se realiza el corte con bisturí.

Este modelo se ha utilizado para investigar aspectos de regeneración medular al relacionar la naturaleza y el grado de la lesión, con la parálisis. También permite estudiar la regeneración de axones grandes mielinizados (Lampert et al., 1964) y la formación de la cicatriz (Barret et al., 1981), la cual se ha identificado como barrera importante para la regeneración axonal y se constituye primordialmente por astrocitos. En este tipo de lesión también se desarrollan cavidades por muerte del tejido nervioso y fagocitosis del mismo, así como por la retracción del tejido medular en la zona afectada.

En este tipo de lesión predominan los aspectos producidos por la lesión primaria, la cual es menos extensa en comparación con el modelo de contusión-compresión. La extensión del daño va de la región más cercana al cerebro hasta la porción más alejada del mismo.

La lesión generada por corte con bisturí puede definirse en términos anatómicos relativamente precisos; es generalmente limpia y regular e involucra de manera similar a los axones, la sustancia blanca y la sustancia gris y puede hacerse con cierto grado de selectividad y gran precisión. El sangrado que se produce después de la lesión puede detectarse y controlarse inmediatamente, lo cual permite obtener lesiones definidas como primarias.

El problema es que las lesiones de este tipo se observan muy rara vez en la ME del ser humano, por lo que los datos obtenidos en estudios de esta índole tienen aplicaciones restringidas e interpretaciones limitadas. Además, éste modelo tiene varios inconvenientes, como el hecho de que por la tensión natural que existe en la ME, los segmentos cortados tiendan a separarse; que al cortar la ME se abran las meninges que la cubren, lo cual permite la invasión del tejido por células externas capaces de modificar el microambiente y por consiguiente, la evolución de la lesión; y porque en la mayoría de las lesiones observadas en el ser humano, cierto número de axones sobreviven y este modelo no permite estudiar la interacción entre dichas fibras y las regeneradas (Young, 1989).

Las lesiones hechas por corte con bisturí no se pueden describir en términos cuantitativos o semicuantitativos, por lo que las lesiones comunicadas en dos estudios no pueden ser comparadas entre sí, lo cual afecta la reproducibilidad del experimento.

Al realizar el corte de la ME puede quedar una pequeña proporción de axones en la porción ventral que no alcanzan a ser cortados, por lo que la lesión aparentemente completa, resulta no serlo, y los animales sometidos a este procedimiento pueden recuperarse espontáneamente. Esto genera errores de interpretación en los posibles resultados obtenidos, porque si no se cortan completamente las fibras, las que se observan posteriormente pueden confundirse con axones regenerados (Guth et al, 1980).

Las estrategias empleadas para controlar el sangrado pueden representar artificios que influyan en los hallazgos detectados posteriormente, ya que pueden intensificar la lesión primaria al sumar sus efectos. La naturaleza e intensidad de los cambios patológicos secundarios varían considerablemente en relación con las variables experimentales adicionales empleadas.

Además, como en este modelo las meninges que envuelven la ME son cortadas, se permite la entrada de tejido extraño y sangre en el sitio de lesión. Dichos elementos juegan un papel importante en la formación de la cicatriz y de sus características.

A partir del conocimiento de que la formación de la cicatriz puede servir como barrera en la regeneración axonal, se ha intentado eliminar o disminuir dicha barrera con el empleo de agentes pirógenos como el Pirómen (Chambers et al., 1949), con inyección de tripsina (Turbes, 1980) o mediante trasplante de fragmentos de nervio o tejido neural adulto cultivado. Esto último también favorece la regeneración axonal (Cseuz et al., 1963), ya que proporcionan un sustrato para el crecimiento axonal.

C) Lesión por laceración.

Este modelo combina las características de la contusión-compresión y el corte con bisturí y reproduce las características observadas después de una fractura vertebral con penetración de sus fragmentos dentro del tejido medular, lo cual produce una lesión de laceración múltiple. La lesión puede extenderse 1 ó 2 segmentos más en la ME.

Con el animal bajo anestesia, se realiza laminectomía de la zona adecuada, se cortan las meninges que cubren la ME longitudinalmente y con el bisturí o las tijeras se corta la ME en dos puntos y se extrae el tejido medular, lo que deja una cavidad que puede ser de tamaño variable.

Este modelo experimental se caracteriza principalmente por cambios degenerativos progresivos. Permite estudiar cada una de las fases de lesión medular y la interacción entre las mismas para producir degeneración progresiva. Es útil como modelo para investigaciones electrofisiológicas y en técnicas de trasplante, donde la cavidad creada por la laceración se emplea como sitio para colocar el tejido a trasplantar.

Las lesiones por laceración se acompañan de sangrado extenso, el cual puede manejarse fácilmente.

Este es el modelo más utilizado en el estudio de la función y el efecto de los trasplantes neurales, ya que no se produce ninguna lesión adicional en la ME cuando se coloca el implante. También ha servido para detallar y definir los componentes de la lesión medular, lo cual ha permitido identificar la naturaleza subumbral, umbral y supraumbral de la misma.

La extensión de la lesión y la afección de los axones puede definirse en términos anatómicos específicos, ya que se pueden producir lesiones de varios grados de severidad bajo condiciones quirúrgicas controladas.

Puede producir parálisis permanente después de lesiones parciales, lo que permite estudiar el sistema axonal preservado. Debido a ello se sabe que no necesariamente deben preservarse la mayoría de los axones para lograr una recuperación motora útil (Eidelberg, 1985).

Al producir lesiones por laceración se rompe la continuidad de las meninges que protegen a la ME, por lo que células sanguíneas, elementos y tejidos extraños entran en la cavidad creada por la lesión. Este tipo de afección se caracteriza por sangrado extenso y la entrada de elementos extraños a la cavidad traumática que generan un medio ambiente desfavorable para la sobrevivencia y el crecimiento de los trasplantes neurales.

Los axones lesionados tienen el potencial de recuperarse sólo durante la fase de parálisis transitoria, es decir, inmediatamente después de la lesión, cuando la ME se encuentra en shock. En esta etapa se ha utilizado tejido neural embrionario con elevado potencial de crecimiento, como tejido de trasplante, el cual preserva y protege a los axones de los cambios degenerativos progresivos.

.D) Administración de sustancias tóxicas.

La utilidad de estos modelos se fundamenta en el hecho de que al producir desmielinización axonal, se reproduce una de las características principales de la lesión medular, ya que estudios recientes sugieren que la desmielinización puede jugar el papel más importante en el déficit neurológico observado después de una lesión de la ME (Young, 1989).

Este tipo de lesiones pueden producirse al inyectar directamente en la ME, sustancias como la 6-aminonicotinamida (Blakemore, 1975), lisolecitina (Blackemore, 1976), bromuro de etidio (Blackemore, 1982), mitomicina C (Harrison, 1982) o lisofosfatidilcolina (Harrison, 1987), con lo cual se produce desmielinización extensa de los axones en el sitio de lesión.

Estos modelos permiten la generación de lesiones locales y selectivas ya sea sobre la sustancia blanca, la sustancia gris o ambas, por lo que facilitan el estudio del proceso de lesión. Cada sustancia permite estudiar diferentes patrones de remielinización, ya sea por los OD, las CS o ambos, después de una desmielinización primaria.

Desafortunadamente la mayoría de los agentes desmielinizantes empleados para este tipo de investigación, no sólo inducen desmielinización, sino que también destruyen las células astrocíticas y con ello, la membrana limitante que protege y aísla a la ME.

Como medidas terapéuticas se han empleado trasplantes celulares de OD o CS con la finalidad de remielinizar los axones que han sufrido desmielinización primaria en estos modelos de lesión.

E) Otros modelos.

También se pueden emplear los rayos X para producir lesiones desmielinizantes de la ME, aunque de manera más limitada e infrecuente con respecto a los modelos anteriormente mencionados. Este procedimiento es capaz de producir destrucción irreversible de las meninges que rodean a la ME (Blakemore y Patterson, 1975).

Fisiopatología de la lesión por contusión de la médula espinal.

La lesión traumática de la ME produce pérdida parcial o total de la función motora, sensitiva y vegetativa a partir del nivel de lesión, e incluso en segmentos distales a la misma. Al considerar todas las formas de tratamiento disponibles por el momento y todos los niveles de afección, menos del 2% de los pacientes con lesión de la ME inicialmente completa, llegan a caminar otra vez (Hansebout, 1982).

La lesión medular desconecta al cerebro del cuerpo debido al daño en sus conductores mayores a través de los cuales pasan las señales sensitivas y motoras (Young, 1989).

En los mamíferos los efectos de lesiones por contusión de la ME (Fig. 1), se pueden dividir en:

a) Lesión primaria, que varía de acuerdo al tipo e intensidad de la lesión y es causada al momento de infringir el daño (Das, 1989).

b) Lesión secundaria, la cual comprende los cambios que se presentan después de la lesión primaria y que se dan con el transcurso del tiempo e incluyen desregulación iónica, liberación de neurotransmisores con efecto tóxico, acumulación de lactato, producción de radicales libres y peroxidación de lípidos, liberación de enzimas líticas, acidosis, hemorragia, edema e isquemia. Reacción de varios elementos celulares que incluye las células gliales y las células endoteliales de los capilares. Los cambios siguen un gradiente dorso-ventral y próximo-distal. Después de un período, el tejido necrótico es fagocitado gradualmente por macrófagos en el sitio de lesión (Das, 1989).

Las células de la sustancia gris y muchos axones de la sustancia blanca pierden el control de la regulación iónica y osmótica. Ocurre un incremento de los iones de sodio y calcio con una disminución concomitante de los iones de potasio y magnesio. La alteración del gradiente iónico impide la conducción de impulsos nerviosos (Lemke, 1987; Young, 1986).

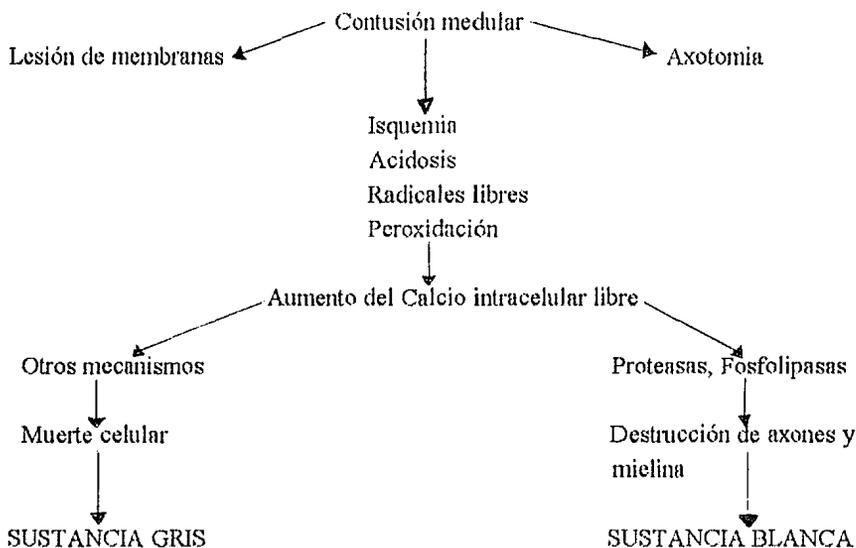
Es posible que la isquemia resultante de la ruptura de los vasos sanguíneos, la liberación de sustancias vasoactivas y obstrucción de la microcirculación (Balentine, 1978), probablemente por activación de la cascada del ácido araquidónico, sea el principal

factor patogénico que favorezca la acción nociva del ácido láctico y los radicales libres sobre el tejido medular (Demopoulos, 1980).

Parte del rompimiento de la barrera hematoencefálica en este tipo de lesiones puede ser el resultado del daño celular mediado por mecanismos secundarios (Blight, 1989).

c) Cambios degenerativos, dados por la fragmentación y necrosis del tejido neural, rompimiento axonal con muerte retrógrada, alteración en las vainas de mielina, cavitación extensa, degeneración progresiva caracterizada por degeneración gradual del neurópilo, atrofia lenta de neuronas, reacción glial, hipertrofia de astrocitos, degeneración axonal y desmielinización. Estos cambios no duran mucho, pero sus efectos son permanentes. El proceso de degeneración sigue un gradiente próximo-distal en relación a la lesión y puede extenderse de 6 a 8 segmentos en la ME (Das, 1989).

Figura 1. Fisiopatología de la lesión por contusión de la médula espinal.



En lesiones medulares experimentales las proteínas neutras (catepsina B y D), que probablemente son activadas por calcio, pueden ser un mediador importante de la degeneración axonal y de las vainas mielínicas porque son capaces de degradar neurofilamentos y proteínas de la mielina (Banik et al., 1986).

Dos hrs. después de una contusión de la ME se observa pérdida del 62% de la MBP, lo cual se incrementa a las 24 hrs. (78%); ésto puede estar relacionado con una actividad proteolítica neutral. El calcio acumulado dentro de los axones en el sitio de lesión parece incrementar las proteínas neutras activadas por calcio, a las cuales los neurofilamentos y la MBP son muy susceptibles (Banik et al., 1986). Se observa una degeneración intraaxonal de los filamentos y una disolución vesicular de la mielina paralela a una pérdida temprana de las proteínas de los neurofilamentos de los axones y de la MBP en la mielina, con pérdida progresiva de otras proteínas mielínicas (Banik, 1982).

Probablemente el incremento inicial en la actividad de estas enzimas provenga de células gliales activadas, axones, mielina u otras células que no sean leucocitos, ya que los cambios estructurales y la pérdida de las proteínas de los neurofilamentos ocurren antes de la infiltración celular. Un incremento posterior en estas enzimas puede resultar de la liberación de las mismas por los macrófagos que invaden el tejido lesionado.

Dentro de las primeras horas después del daño medular se presentan cambios iónicos por el daño a las membranas plasmáticas que alteran su permeabilidad selectiva, lo que propicia la pérdida de potasio y la acumulación de sodio y calcio (Young, 1985), daño peroxidativo y reducción local del flujo sanguíneo (Blight, 1985).

Seis días después de la contusión de la ME se desarrolla un centro necrótico que involucra tanto la sustancia gris como la sustancia blanca. El epicentro de la lesión contiene acumulaciones densas de macrófagos y de otras células inflamatorias que se pueden observar en los quistes bien desarrollados o que delimitan áreas de la cavitación; también se observan muchos axones degenerados. De 28 a 60 días después de la contusión pueden existir quistes que se extienden de 3.75 a 4.60 mm en el plano rostro caudal (Thompson et al, 1992).

Durante la respuesta inflamatoria subaguda, es casi imposible distinguir entre el papel

normal de los fagocitos de limpiar los restos tisulares generados por la lesión primaria y el de su participación en el daño celular secundario, ya que muchas de estas células permanecen en el sitio de lesión mucho tiempo después de haber ingerido productos de degeneración. Se observa un influjo de leucocitos polimorfonucleares generalmente restringido al espacio subaracnoideo y áreas hemorrágicas del parénquima. A los 7 días, los macrófagos constituyen el 30% del volumen de la lesión (Blight, 1985). Estos macrófagos activados secretan una gran cantidad de sustancias dañinas, algunas de las cuales están implicadas en la desmielinización autoinmune (Cammer, 1978).

Se pueden observar numerosos axones completamente desmielinizados 3 días después de la contusión y a los 7 días estos se encuentran en pequeños grupos. Los axones desmielinizados generalmente se encuentran separados por prolongaciones citoplásmicas de astrocitos y fagocitos y por otras prolongaciones cuyo origen es incierto.

Alrededor de la segunda semana postlesión, la cavidad quística es rodeada por una cicatriz continua formada por astrocitos (Houlé y Reier, 1988).

En el sitio de lesión de la ME contundida, se observa una disolución histológica progresiva horas después de la contusión o la compresión medular (Blight, 1985).

Entre las características morfológicas después de una lesión de la ME se pueden destacar las siguientes:

a) Calcificación axonal selectiva: la calcificación se realiza en forma de cristales de hidroxiapatita localizados cerca de las mitocondrias del axón y en el citosol axónico, dicho fenómeno puede observarse en algunos axones dentro de los primeros 30 min. y en muchos 2 hrs. después de la lesión (Balentine, 1988).

Se observa un incremento progresivo de los niveles de calcio en el sitio de lesión dentro de los primeros 15 min., con significancia estadística a los 45 min. y alcanza su pico máximo a las 8 hrs. El calcio juega un papel muy importante en el deterioro de la sustancia blanca, dicha alteración se vuelve irreversible en la mayoría de los casos entre las 8 y las 24 hrs. postlesión (Balentine, 1988).

El calcio activa proteasas neutras que lisan de manera masiva los neurofilamentos, lo cual produce pérdida del soporte estructural con colapso progresivo y fragmentación del

axón. El calcio también activa fosfolipasas que lisan la mielina y pueden producir desmielinización en el área de lesión (Balentine, 1988).

Los mecanismos por los cuales el calcio media la lesión celular incluyen inhibición de la función mitocondrial, depleción del ATP por activación de las ATPasas, activación de proteasas y fosfolipasas, con el consecuente catabolismo de proteínas y lípidos estructurales en que se incluyen los de las membranas y la inhibición del transporte axoplásmico (Balentine 1988). El calcio ha sido implicado en la degeneración Walleriana.

Después de la lesión, algunos amino ácidos excitatorios como el glutamato y el aspartato se liberan en grandes cantidades al espacio extracelular (Simpson, 1990) y producen una excitación extensa de las neuronas viables (Miller, 1987).

b) Granulación del axoplasma: aparece a los 30 min. Los cambios granulares en el axoplasma se relacionan con la ruptura de los neurofilamentos que se inicia 15 min. después de la lesión (Banik, 1982; Balentine, 1988).

c) Desmielinización vesicular: se observa 1 hr. después de la contusión y es el resultado de la activación de fosfolipasas y proteasas que rompen las vainas de mielina. Paralelo a este fenómeno se observa un rápido decline en las proteínas de la mielina, especialmente de las proteínas básicas, 30 min. después de la lesión (Banik, 1980; Balentine, 1988).

Un anillo periférico de axones medulares que rodea el centro del quiste se encuentra, en algunos casos, intacto en su mayoría (Blight y Young, 1989). Algunos axones ventrales pueden permanecer intactos y sin ninguna señal de degeneración, pueden mantener en cierto grado la integridad morfológica y fisiológica de la ME (Das, 1989).

A los 7 días después de la lesión, algunas fibras que se encuentran cerca de las raíces dorsales son rodeadas por CS (Blight, 1985) y a las 3 semanas se pueden observar axones con delgadas vainas de mielina (Gledhill et al., 1973).

La mayor parte de la remielinización en el sitio de lesión está dada por los OD, mientras que cerca de las raíces dorsales, en lo profundo de la lesión y alrededor de los márgenes del quiste o cavitación, la mayoría de las fibras son remielinizadas por CS (Blight y Young, 1989), desafortunadamente en la mayoría de los casos este tipo de remielinización espontánea suele ser parcial e incompleta (Prineas, 1985; Hirano, 1989).

ANTECEDENTES.

Mielinización en la médula espinal de la rata.

En las ratas, la mielinización en la médula espinal (ME), tanto de las fibras de los tractos ascendentes como descendentes sigue un gradiente rostro-caudal (Schwab y Schnell, 1989) y generalmente el orden en el que los tractos aparecen durante el desarrollo es el orden que se sigue para su mielinización (Matthews y Duncan, 1972).

En estos animales, la porción dorsal de la sustancia blanca se conforma principalmente por 3 fascículos: el cuneatus, el *gracilis* y el corticoespinal.

El fascículo cuneatus inicia su mielinización el segundo día después del nacimiento (Schwab y Schnell, 1989). El diámetro de los axones amielínicos se encuentra en un rango de 0.1 a 0.8 μm y el de las fibras promielínicas de 0.6 a 1.3 μm ; se observan muy pocas fibras mielinizadas cuyo diámetro es pequeño. A los 20 días después del nacimiento la mielinización casi se ha completado, las fibras mielínicas tienen un diámetro promedio de 3 μm y es muy raro que axones de menos de 0.7 μm estén mielinizados. A esta edad las fibras mielínicas más grandes tienen diámetros de 3 y 4 μm , las fibras promielínicas ahora son pocas y más pequeñas (0.3 a 0.6 μm). A los 120 días posnatales, el fascículo se encuentra completamente mielinizado, se observan numerosas fibras con delgadas vainas de mielina que pueden corresponder a las fibras amielínicas que acaban de adquirir su vaina de mielina (Matthews y Duncan, 1972).

En el fascículo *gracilis*, la mielinización tiene lugar a partir del tercer día (Schwab y Schnell, 1989). Al décimo día se observan fibras amielínicas de 0.1 a 1.3 μm , las fibras promielínicas son numerosas y miden entre 0.4 y 1.4 μm , aunque la mayor parte de estas fibras oscilan entre 0.7 y 0.9 μm de diámetro. A los 15 días, la mielinización es extensa y los axones amielínicos comienzan a presentar diámetros cada vez más pequeños (0.1 a 0.4 μm). Más del 85% de las fibras promielínicas presentan diámetros entre 0.6 y 0.8 μm . A los 20 días hay más fibras mielinizadas con diámetros de 0.8 a 2 μm . A los 120 días el fascículo se encuentra completamente mielinizado, el diámetro axonal predominante oscila entre 0.5 y 5 μm (Matthews, 1972).

En el tracto corticoespinal, los antígenos específicos de la mielina pueden ser detectados a los 11 días después del nacimiento (Schwab y Schnell, 1989). Presenta una

FALTA PAGINA

No. ~~a la~~

29

distribución uniforme en el calibre de los axones. A los 5 días, el 91% de las fibras miden entre 0.1 y 0.3 μm . no se observan fibras promielínicas. Entre el quinto y el décimo día existe un marcado incremento en el diámetro de estas fibras amielínicas, existen pocas fibras promielínicas y ocasionalmente se observan fibras de gran calibre (2 a 3 μm) mielinizadas. A los 15 días las fibras amielínicas son el componente más abundante y presentan un incremento sustancial en su diámetro, ya que casi el 50% miden entre 0.3 y 0.7 μm . Más del 90% de las fibras promielínicas tienen diámetros entre 0.7 y 0.8 μm . A los 20 días, las fibras promielínicas son numerosas y se observan más axones mielinizados. A los 120 días, el tracto se encuentra completamente mielinizado y sólo el 21% de los axones mielínicos tienen menos de 0.7 μm de diámetro, lo cual pueden indicar que progresivamente los axones pequeños son mielinizados (Matthews, 1972).

En estos tractos, la mielinización inicia en los axones que posteriormente van a ser de gran calibre y se extiende más tarde a aquellos que cada vez van teniendo menor diámetro. La mayoría de estos axones son mielinizados cuando alcanzan diámetros de 1 a 1.5 μm . Los axones que van a tener un gran calibre presentan un aumento considerable en sus diámetros, mientras son amielínicos, y pueden incrementarse de 5 a 10 veces más cuando son mielinizados, mientras que las pequeñas fibras mielínicas, que sólo se ven en estadios más avanzados de maduración, parecen crecer muy poco antes de ser mielinizadas y permanecen pequeñas aun después de la mielinización (Matthews y Duncan, 1972).

La mayor variable entre cada tracto se encuentra en el diámetro promedio de los axones y en la diferencia resultante en la longitud promedio de sus internodos (Matthews y Duncan, 1972).

Características morfométricas de la mielinización.

En el SNP de los mamíferos, el diámetro del axón es un factor crítico para que exista la mielinización (Duncan, 1934), ya que las fibras de gran calibre son mielinizadas por CS de acuerdo a una relación 1:1, los axones de mediano calibre generalmente, aunque no siempre, son mielinizados por una CS que al mismo tiempo envaina otros axones amielínicos, y los axones más pequeños se encuentran envainados juntos por una sola prolongación citoplásmica (Dusart et al., 1992).

Tanto en los nervios periféricos como en los tractos del SNC, las fibras amielínicas son pequeñas al principio y relativamente uniformes en su calibre. Posteriormente algunas de estas fibras comienzan a crecer y presentan variaciones de 0.1 a 1.5 μm en su diámetro (Matthews, 1968).

En el SNC no se ha descrito un diámetro axonal crítico por arriba del cual todos los axones son mielínicos y por debajo del cual éstos son amielínicos. En este sistema, los axones pequeños de 0.2 a 0.4 μm son mielinizados, lo cual generalmente no se observa en los axones del SNP (Matthews y Duncan, 1972), en donde el diámetro axonal crítico para que se inicie la producción de mielina varía de 1 a 2 μm y es constante en series diferentes de animales como ratas, gatos y vacas (Matthews, 1968).

Tanto en el SNP como en el SNC, la velocidad de conducción de los potenciales de acción en sus fibras nerviosas, es proporcional al diámetro del axón y se incrementa notablemente con la mielización, a tal grado que en una fibra mielinizada, la transmisión ocurre 100 veces más rápido que en ausencia de mielina (Stoffel, 1990).

En nervios de mamíferos adultos se ha observado una correlación directa entre el espesor de la mielina y el diámetro axonal (Williams y Wendell, 1971), y al parecer, el diámetro del axón es el que determina la presencia y el espesor de la vaina de mielina (Waxman, 1984), aunque éste no sólo se relaciona con el diámetro axonal, sino también con la longitud internodal (Friede, 1985).

En 1983 Richards y colaboradores observaron que el diámetro axonal disminuye con la mielización y encontraron diferentes distribuciones en los diámetros de los axones, antes y después de dicho proceso. Sin embargo, Windenbank y colaboradores (1985) argumentan que los axones alcanzan cierto tamaño pero no pueden continuar su crecimiento, a menos que sean mielinizados, lo cual implica que el diámetro axonal no sólo está determinado por la información en el pericarión neuronal, sino también por interacciones específicas con células gliales.

El índice de mielización (IDM) o radio "g" (Blight y Young, 1989) se ha empleado para establecer el espesor relativo de la vaina de mielina. Mientras más pequeño sea el IDM existirá una cubierta de mielina proporcionalmente más gruesa; es decir, un axón mielinado presentará índices inferiores a la unidad y uno amielínico tendrá un IDM igual a 1 (Guy et al, 1989).

El IDM óptimo para que exista una adecuada propagación del impulso nervioso en las fibras mielínicas oscila entre 0.60 y 0.80, con variaciones específicas entre las diferentes especies y entre distintas estructuras nerviosas de la misma especie (Williams y Chalupa, 1983).

El espesor de una vaina de mielina se incrementa al aumentar el diámetro axonal, con un radio "g" relativamente constante para las fibras de todas las dimensiones (Friede, 1985). Sin embargo, Koles y Rasminsky (1972) afirman que el espesor de la vaina puede variar considerablemente de una porción de un internodo a otra.

En estudios de simulación computarizada sobre conducción de impulsos nerviosos, en fibras desmielinizadas, se ha establecido que dicha conducción se mantiene aun cuando el IDM se incrementa hasta 0.95, es decir, hasta que el espesor de la vaina de mielina representa tan sólo del 5 al 6% de su espesor normal (Koles y Rasminsky, 1972).

Desmielinización en la médula espinal después de lesión por contusión.

Las lesiones experimentales de la ME producen la degradación de los axones y la mielina, lo que puede determinar disfunción motora, sensitiva y autonómica (Banik et al., 1986).

La parálisis producida después de una lesión de la ME se debe principalmente a la interferencia en la conducción de los tractos espinales, producida por degeneración Walleriana, en la cual, tanto el axón, como la mielina son destruidos, y por desmielinización en la cual la vaina de mielina es dañada pero el axón permanece con continuidad (Mc Donald y Sears, 1970). Es decir, que el problema fundamental en lesiones de la ME es el desarrollo de mielopatía necrótica segmental en el sitio de afección, lo cual produce interrupción de la función (Balentine, 1988).

Después de una contusión de la ME se ha observado daño a la mielina durante las primeras 4 hrs. (Dohrman, 1972). Veintidós hrs. después de la lesión se puede observar desmielinización, la cual se incrementa entre el segundo y el séptimo día, debido a la fagocitosis de las vainas dañadas y a la lesión de los OD (Gledhill et al., 1973; Blight, 1985).

Al parecer, los axones que sobreviven a este tipo de lesión se concentran en un anillo externo y aparentemente tienen vainas de mielina intactas y con una periodicidad normal en sus láminas (Blight, 1985).

En el sitio de contusión se observa una pérdida global de axones, en relación a la profundidad de la lesión, y una pérdida desproporcionada de axones de gran calibre independientemente de la profundidad. Entre el segundo y séptimo día después de la lesión, existe una pérdida secundaria de axones (Blight, 1989) y otra adicional se puede observar a los 3 meses (Blight, 1985). La pérdida axonal resultante de todo el proceso es extensa y comprende entre el 87 y el 99% de las fibras mielinizadas (Blight y Young, 1989).

Tanto en seres humanos como en animales de experimentación se ha demostrado que después de una contusión severa de la ME, en la mayoría de los casos, no existe sección completa. Sin embargo, como ya se mencionó antes, se destruye localmente una proporción variable de axones y gran parte de las fibras que permanecen con continuidad anatómica se desmielinizan en el sitio de lesión, de la periferia al centro, en el transcurso de la primera semana (Blight, 1985).

Con base en lo anterior, el nivel del déficit funcional residual, después de una contusión de la ME, se encuentra bien definido 3 a 4 semanas después de la lesión (Gale et al, 1985).

El rápido rompimiento de las vainas de mielina en el centro de la lesión, es diferente a la desmielinización observada en las fibras que sobreviven al daño, porque además de que ocurren a diferentes tiempos, el rompimiento rápido de las vainas se asocia a una rápida pérdida de axones y glía; mientras que la destrucción tardía de la mielina ocurre en presencia de una poderosa respuesta inflamatoria, probablemente secundaria a la necrosis hemorrágica central (Blight, 1985).

Remielinización en la médula espinal después de lesión por contusión.

En la ME el tejido neural perdido no es reemplazado, pero se pueden observar ciertos fenómenos de regeneración y plasticidad, tales como el crecimiento a cortas distancias de los axones seccionados (De La Torre et al., 1984), la recuperación de neuronas

parcialmente afectadas, la proliferación de vasos sanguíneos dañados, la proliferación y el crecimiento de fibras perivasculares, la posible reorganización del neurópilo, y la remielinización (Das, 1989).

Se ha demostrado que la función electrofisiológica en la vía sensitiva de la ME, puede ser restaurada después de una remielinización completa por las CS de los axones en el sitio de lesión (Blight y Young, 1989). Este tipo de recuperación puede ser posible con aproximadamente el 5% de la población axonal, aun cuando la remielinización sea anormal y exista una pérdida preferencial de axones de gran calibre (Blight y Decrescito, 1986). Es decir, que con una población axonal de menos del 10% que sobreviva y se encuentre mielinizada o remielinizada, es suficiente para que exista una adecuada conducción basal de impulsos nerviosos (Blight y Decrescito 1986; Blight y Young, 1989).

Tres meses después de la lesión, son relativamente raros los axones completamente desmielinizados (Blight, 1985). En las lesiones crónicas en las que se observan delgadas vainas de mielina, éstas representan remielinización incompleta y no desmielinización parcial (Harrison et al., 1972).

Las CS proliferan más rápido y remielinizan más agresivamente que los OD. La capacidad de las CS para invadir el SNC y remielinizar axones centrales depende, en cierta forma, del rompimiento de la barrera hematoencefálica. En una contusión medular las CS se pueden localizar en el cordón dorsal, y únicamente en el cordón ventral cuando las lesiones son más severas (Blight y Young, 1989).

Al parecer, el diámetro de los axones es un factor importante para que la remielinización esté dada particularmente por un tipo de células mielinizantes, ya que el diámetro de los axones remielinizados por CS en la ME es de alrededor de 1.5 μm , mientras que el de los mielinizados por OD es de 5 μm aproximadamente (Black et al, 1986).

Las vainas de mielina generadas por los OD son, en la mayoría de los casos, mucho más delgadas que las de los axones del mismo diámetro, pero mielinizados por CS. Las nuevas vainas formadas por los OD son especialmente delgadas (IDM = 0.87) al compararlas con las de las fibras en el tejido sin lesión (IDM = 0.69), mientras que las formadas por las CS (IDM = 0.73) no presentan una diferencia significativa al

compararlas con las vainas normales (Dusart et al., 1992).

Para axones con diámetros equivalentes, mielinizados por CS en el SNC, se observan vainas de mielina con espesor similar al de los axones mielinizados en el SNP por dichas células (Black et al., 1986).

Desafortunadamente la remielinización que tiene lugar en el SNC, después de un fenómeno patológico, no es completamente normal (Prineas, 1985; Hirano, 1989), ya que generalmente el espesor de las vainas de mielina es menor que el observado en animales sin lesión; la longitud de los internodos disminuye y se pierde la relación proporcional entre el diámetro axonal y el espesor de la vaina de mielina (Wisniewski, 1971). Más aun, se ha demostrado que la mielina producida por los OD en el SNC de los vertebrados mayores inhibe activamente el crecimiento neuronal (Chiquet, 1989), ya que la mielina del SNC y la membrana de los OD contienen 2 proteínas menores (NI-35 y NI-250) con un potente efecto inhibitorio sobre el crecimiento neural, el cual fue demostrado en ratas jóvenes con lesión del tracto corticospinal. En estos animales el crecimiento axonal era abortivo y no excedía a un mm, mientras que si se inhibían las fracciones proteicas antes citadas, se observaba un crecimiento mayor a 5 mm en 2-3 semanas después de la lesión (Schwab, 1990).

En la ME, después de un proceso remielinizante que generalmente es abortivo e incompleto, se pueden encontrar mitocondrias o cuerpos densos en cualquier área citoplásmica de la vaina, lo cual no se observa en el tejido maduro normal y ocasionalmente se llegan a observar células de la oligodendroglia rodeadas por delgadas vainas de mielina (Hirano, 1989).

Es probable que la desmielinización juegue el papel más importante en el mantenimiento del déficit neurológico, que afecta no sólo a los axones sobrevivientes, sino también a las fibras regeneradas (Young, 1989).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los mamíferos adultos, las neuronas no se dividen, los axones lesionados del SNC se regeneran hasta un cierto límite y las fibras que sobreviven se desmielinizan en el sitio de lesión, ello puede explicarse en parte porque en las lesiones medulares severas no existe recuperación funcional en forma efectiva.

El déficit funcional observado después de una lesión severa de la ME se debe a rompimiento axonal con muerte retrograda, alteraciones en las vainas de mielina, cavitación extensa y degeneración progresiva caracterizada por atrofia lenta de neuronas, reacción glial, degeneración axonal y desmielinización.

Entre los posibles factores que impiden la regeneración en la ME, destacan un microambiente desfavorable conformado por líquido, tejido necrótico y toxinas; la reacción autoinmune y la isquemia tisular, las barreras para el crecimiento axonal entre las que destacan la formación de cicatriz de colágena, la reacción astrogliosa adversa, el tejido extraño y la falla en los mecanismos guías para el crecimiento de las fibras nerviosas por pérdida de factores tróficos.

Asimismo, se ha demostrado que la mielina producida por los OD en el SNC de los vertebrados mayores inhibe activamente el crecimiento neural (Chiquet, 1989), ya que la mielina del SNC y la membrana de los OD contienen 2 proteínas menores (NI-35 y NI-250) con un potente efecto inhibitorio sobre el crecimiento neural (Schwab, 1990). Sin embargo, es probable que la desmielinización juegue el papel más importante en el mantenimiento del déficit neurológico, lo que involucra no sólo a los axones sobrevivientes, sino también a las fibras regeneradas.

Desafortunadamente, se ha reportado que después de una lesión del SNC, el proceso de remielinización que se observa suele ser anormal, abortivo e incompleto (Wisniewski, 1971; Prineas, 1985; Hirano, 1989) y que la disminución en el número de células remielinizantes, aparentemente es el factor más factible a correlacionar con el decremento en la remielinización (Ludwin, 1980).

HIPOTESIS.

Si la remielinización en el sistema nervioso central es un proceso abortivo e incompleto debido a la disminución en el número de oligodendrocitos para remielinizar las fibras que sobreviven a la lesión por contusión de la médula espinal y a las fibras resultantes de los procesos plásticos de la médula espinal, entonces si las células de Schwann participan en la remielinización este proceso no será ni abortivo ni incompleto.

OBJETIVOS.

- 1- Establecer el valor del IDM en la ME de ratas adultas sanas.
- 2- Identificar el IDM que resulta de los procesos desmielinizantes que tienen lugar después de una contusión severa de la ME.
- 3- Conocer el IDM generado por la remielinización de axones después de contusión de la ME a diferentes tiempos.
- 4- Establecer, mediante la correlación de los índices obtenidos si el proceso de remielinización después de una contusión severa de la ME es abortivo e incompleto.

MATERIAL Y METODOS.

Se estudiaron los axones de la médula espinal de 28 ratas Long Evans, hembras, adultas (12 a 14 semanas de edad), con peso corporal entre 200 y 250g.

Grupo experimental y control.

El grupo experimental se integró por 21 ratas con contusión severa de la ME, divididas al azar en 5 subgrupos. El grupo control se conformó de 7 ratas sanas sin lesión de la ME, seleccionadas al azar.

Etapas del estudio.

El estudio se efectuó en 2 etapas: la primera correspondió al establecimiento del valor del IDM en los axones de la médula espinal de ratas sin lesión y la segunda consistió en determinar dicho índice a 1, 2, 4, 6 y 12 meses después de una contusión medular severa.

Procedimientos generales.

Técnica anestésica: antes de cada procedimiento quirúrgico los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina e hidrocloreuro de xilacina a dosis de 77.5 y 12.5 mg/kg de peso corporal, respectivamente.

Técnica de contusión medular: previa tricotomía y asépsia de la región dorsal se realizó una incisión media interescapular de T7 a T10 hasta el vértice de la apófisis espinosa, laminectomía de T8 a T9 con descubrimiento de la ME sin lesionarla. Posteriormente, con base en el método de Allen (1911) modificado, se colocó a los animales sobre un aparato estereotáxico y se dejó caer por un tubo guía un peso de 15g a una altura de 10cm sobre la ME expuesta, procedimiento con el cual después de varias pruebas de estandarización se ha logrado producir parálisis total y permanente en aproximadamente el 90% de los animales lesionados. Finalmente se afrontó musculo y se cerró piel.

Cuidado posoperatorio de los animales: al finalizar el procedimiento quirúrgico se aplicó antibióticoterapia con penicilina benzatínica 240 000 US vía intramuscular y se

colocó al animal en una unidad de cuidados intensivos hasta que se recuperó de la anestesia. El intestino y la vejiga neurogénicos se manejaron con expresión manual según se requirio en cada caso.

Criterios de inclusión y exclusión.

En el grupo control se incluyeron todas las ratas que reunieron las características de edad, peso, sexo y estado clínico general.

En el grupo experimental se incluyeron los animales que reunieron los requisitos de edad, sexo y peso corporal y que además, al ser sometidas a contusión medular se corroboró bajo visión estereoscópica la presencia de hematoma en la zona central de la ME inmediatamente después del impacto y que al despertar de la anestesia presentaron paraplejia por debajo del sitio de lesión.

Se excluyeron las ratas en las que el hematoma no fué central, o que al despertar de la anestesia, o en el transcurso de las 3 primeras semanas después de la contusión tuvieron una calificación de 3 ó más en la escala de Tarlov, y aquellas que presentaron complicaciones como autofagia, infección severa de vías urinarias, etc. que no les permitieron llegar al término del estudio.

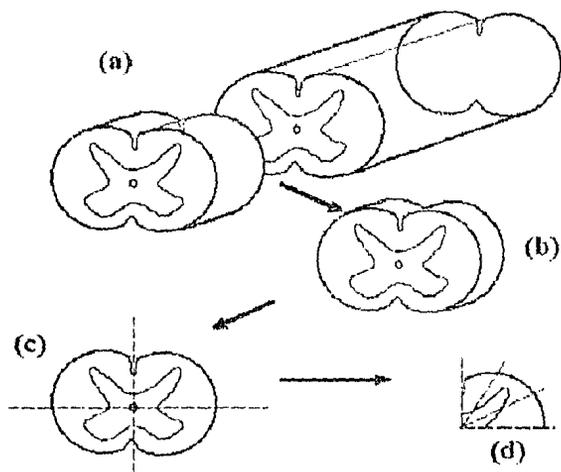
Estudio Histológico.

Las ratas del grupo control se sacrificaron para ser estudiadas al momento en que reunieron las características descritas.

Los animales del grupo experimental se sacrificaron 1, 2, 4, 6 y 12 meses después de la contusión.

Los animales fueron perfundidos vía intracardiaca con 100 ml de amortiguador de cacodilatos 0.15M, pH 7.4 más 10000 US de heparina a temperatura ambiente seguida de 500 ml de glutaraldehído al 2%, paraformaldehído al 2.5%, CaCl₂ al 0.05% y sacarosa 0.025 M, en amortiguador de cacodilatos 0.1M, pH 7.4 a 4 °C. La osmolaridad de la solución fué de 2010 mOsm/l. Ambas soluciones se perfundieron a una velocidad de 30 ml/min con el empleo de una bomba peristáltica.

Al término de la perfusión se extrajo la ME desde T5 hasta la elongación lumbar y se colocó libre de meninges en glutaraldehído al 2.5%, CaCl_2 al 0.05% y sacarosa 0.025M en amortiguador de cacodilatos 0.15M, pH 7.4 por un lapso de 2 hrs., al término del cual se realizaron los cortes indicados en el esquema.



La médula espinal se seccionó en el epicentro de la lesión y se obtuvieron fragmentos de 0.5 mm en dirección proximal y distal (a y b). Las caras transversales de corte fueron divididas en cuatro sectores (c). Cada cuadrante se seccionó en 3 partes iguales (d).

Los fragmentos obtenidos se posfijaron en una solución de tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilatos durante una hr, posteriormente se deshidrataron en acetonas en concentraciones crecientes y se incluyeron en resina EPON 812.

Se realizaron cortes semifinos de un μm de espesor, mismos que se tilaron con azul de toluidina para observación en microscopio de luz Nikon Tipo 115, a fin de seleccionar el área para cortes finos. El área elegida se cortó y se montó en rejillas de cobre de 400 espacios y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Las rejillas se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-10 a 3150 y 6300 x, en formato de 35 mm.

Estudio Morfométrico.

Para obtener el IDM, se proyectaron los negativos sobre un digitalizador Hewlett Packard 9874A, conectado a una computadora Hewlett Packard 9825B, donde se midió el diámetro del axón y el diámetro del mismo más la mielina. Posteriormente se dividió el primer resultado sobre el segundo y se obtuvo el índice para cada fibra.

Se evaluó el diámetro axonal y el IDM de 3,976 fibras de la ME de los animales del grupo control y 10,138 fibras medulares de los animales con lesión.

Recolección de datos.

A cada una de las 28 ratas incluidas en el estudio se les asignó un número de identificación. Se utilizó el programa de computación 1-2-3 de Lotus para almacenar los datos de distribución de los diámetros axonales y el IDM de cada rata y luego se incluyeron por grupos para trabajar con ellos.

Método estadístico.

El IDM y el diámetro axonal se obtuvo al considerar la media y la desviación estandar de toda la población estudiada en cada grupo, mediante el programa de computación 1-2-3 de Lotus.

Los procedimientos de análisis estadístico se realizaron a través del paquete estadístico computarizado Number Cruncher Statistical System.

Consideraciones éticas.

Durante la realización del presente trabajo se tomaron en consideración las reglas fijadas por el U.S. Animal Welfare Act (1985) y el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud de la Secretaría de Salud (1987).

RESULTADOS.

Se estudiaron un total de 3,976 fibras de la médula espinal de 7 ratas pertenecientes al grupo control y 10,138 fibras del epicentro de la lesión en las 21 ratas del grupo experimental.

En las ratas con contusión de la ME, un mes después de la lesión, se observó la presencia de macrófagos en el tejido dañado, múltiples vacuolas y cuerpos mielínicos constituidos por la mielina desprendida de los axones, la cual se enrollaba en sí misma. Se observaron algunas CS a partir del primer mes después de la lesión; se encontraron en gran número a los cuatro meses y se mantuvieron presentes incluso un año después de la contusión (fotomicrografía 1).



Fotomicrografía 1. Corte transversal un mes después de la contusión. Se observan axones amielínicos (flecha), células de Schwann mielinizando axones (*) y macrófagos (M) en el sitio de lesión. 5150X.

Dos meses después de la contusión se observaron células ependimarias y a los 4 meses la presencia de microquistes. Al año, los procesos astrocíticos fueron abundantes y los axones de pequeño calibre y las fibras mielinizadas se incrementaron (fotomicrografía 2).



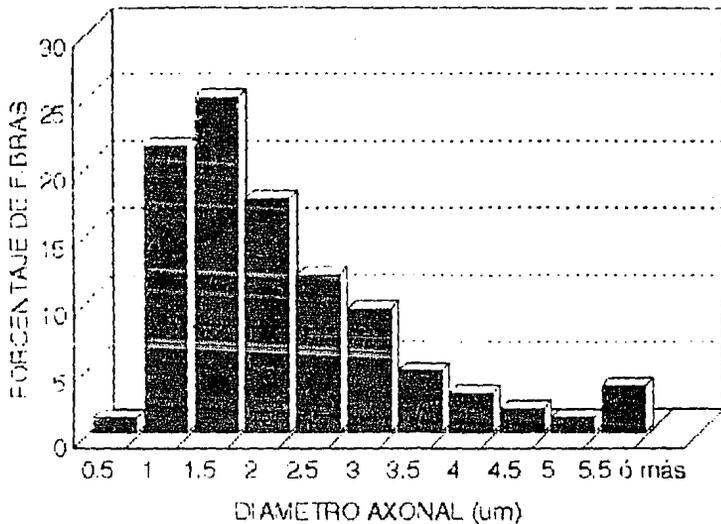
Fotomicrografía 2. Corte transversal de la médula espinal un año después de la contusión. Se observan células de Schwann envainando axones (*), procesos astrocíticos (P) y axones amielínicos (flecha). 6300X.

Análisis morfométrico.

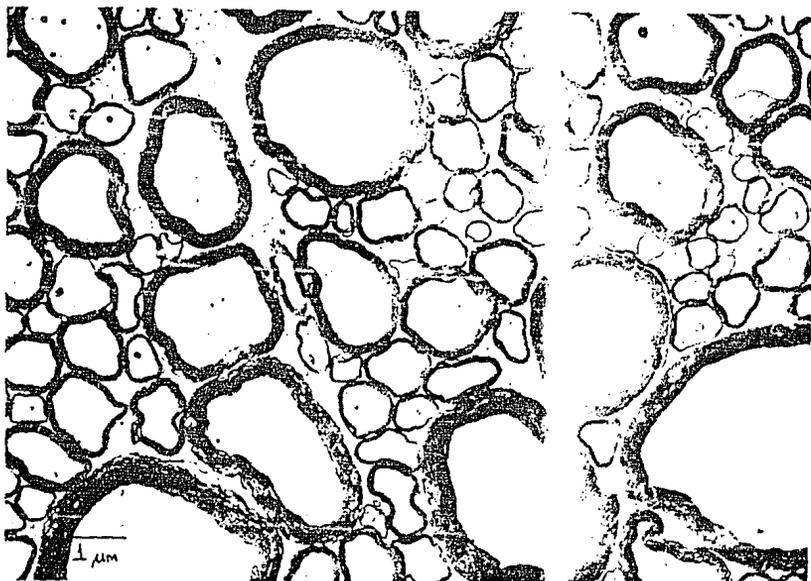
En el grupo control la distribución de los diámetros axonales fue unimodal y más del 60% de dichos axones tenían diámetros que oscilaban entre 1 y 2 μm ; sólo alrededor del 4% midieron 5 μm o más (gráfica 1 y fotomicrografía 3).

DIAMETRO AXONAL

MEDULA ESPINAL SIN LESION



Gráfica 1. Distribución del diámetro axonal en ratas sin lesión

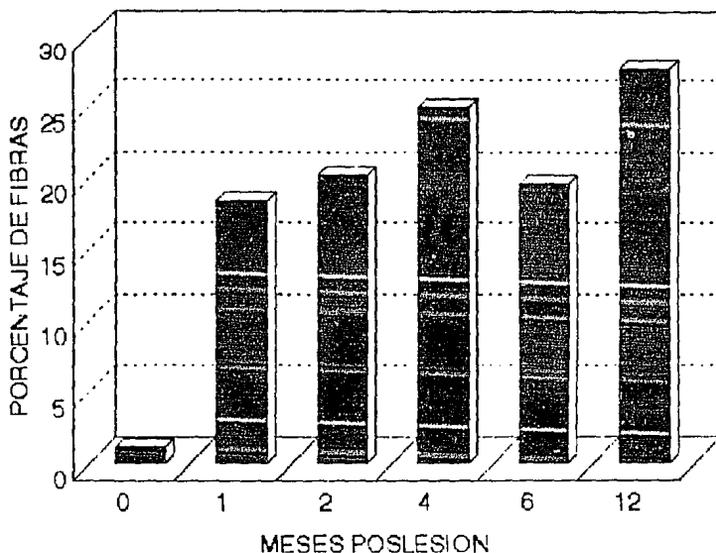


Fotomicrografía 3. Corte transversal de axones de diferente diámetro en la ME sin lesión. 3150X.

En el grupo experimental el 58% de las fibras tenían diámetros entre 0.5 y 1 μm . En todos los subgrupos la distribución de los diámetros se cargó a la izquierda de la curva, en relación con el tiempo de evolución de la lesión medular.

En las ratas sin lesión el porcentaje de axones con diámetro en el rango de 0.5 μm o menos constituyó tan sólo el 1.08% de la población total, mientras que un año después de la contusión dicha población representó más del 27% (gráfica 2.). El coeficiente de correlación Rho de Spearman fué de 0.83, lo cual indica que existe una correlación directa entre el tiempo transcurrido después de la lesión de la ME y el número de axones con diámetro menor o igual a 0.5 μm . Con base en lo anterior, se consideró a éstas fibras como colaterales axónicas y se estudiaron por separado.

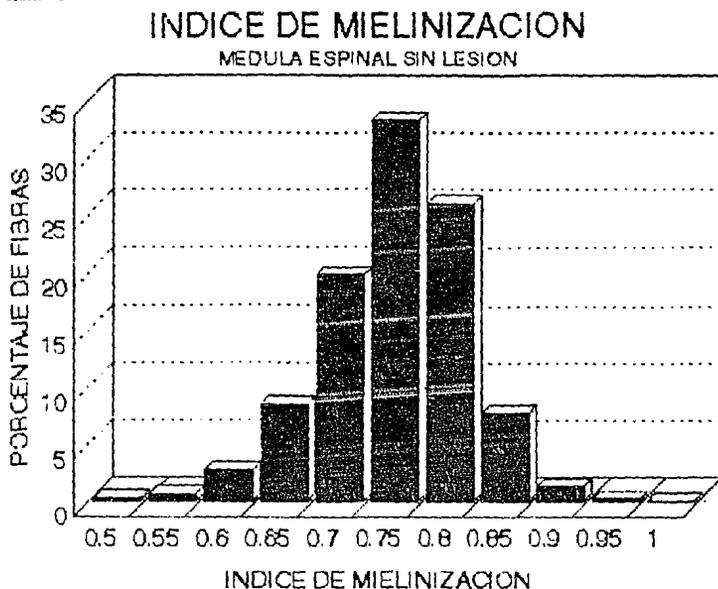
DISTRIBUCION POR PORCENTAJE DE LAS COLATERALES AXONICAS



Gráfica 2. Distribución de axones con diámetro de 0.5 μm o menos en los diferentes grupos.

En cuanto a los axones con diámetro de 5 μm o más, la tendencia fue la disminución progresiva hasta representar tan sólo el 0.11% de la población a un año de la lesión.

El IDM en la ME de las ratas del grupo control presentó una distribución unimodal. Casi el 80% de las fibras tenían IDMs entre 0.7 y 0.8 con un IDM promedio de 0.72, el cual fue considerado como parámetro de normalidad (gráfica 3). El IDM en los diferentes grupos se presenta en la tabla 1.

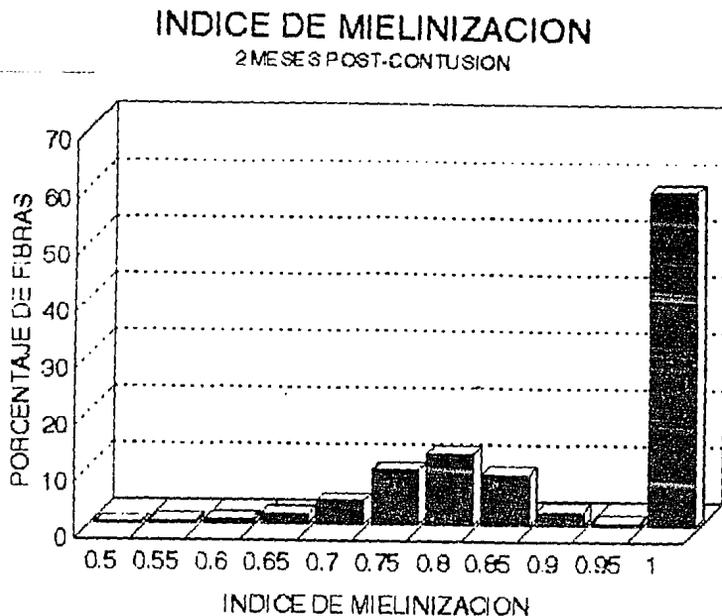


Gráfica 3. IDM de los axones en la ME sin lesión

Tabla 1. Índice de mielinización en los diferentes grupos.

Evolución después de la lesión de la ME	IDM	Desviación estandar
Sin lesión medular	0.72	0.07
1 mes	0.86	0.05
2 meses	0.90	0.03
4 meses	0.88	0.06
6 meses	0.87	0.03
1 año	0.83	0.02

Un mes después de la contusión, la distribución del IDM fue bimodal, ya que casi el 50% de las fibras tenían un IDM de 1, es decir, estaban desmielinizadas. La desmielinización máxima se observó a los dos meses después de la lesión, donde la población de fibras amielínicas representó casi el 60% de los axones (gráfica 4 y fotomicrografía 4).



Gráfica 4. IDM de los axones 2 meses después de la contusión.

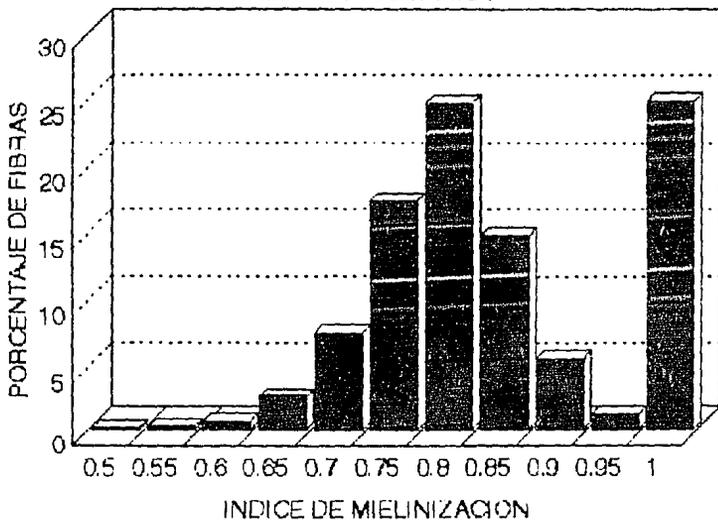
A partir del cuarto mes el porcentaje de fibras amielínicas comenzó a disminuir debido a la remielinización espontánea, que en la mayoría de los casos estuvo a cargo de las CS. Un año después de la lesión, los axones amielínicos constituyeron tan sólo el 25% de la población (gráfica 5).

Al analizar en el grupo control el IDM de las colaterales axónicas, se observó que dichas fibras estaban muy mielinizadas, ya que su IDM promedio fue de 0.60 ± 0.03 , mientras que dos meses después de la contusión el IDM promedio en esta población fue de 1.00. Sin embargo, a los doce meses el IDM promedio fue 0.90 ± 0.10 .



Fotomicrografía 4. Corte transversal de la médula espinal dos meses después de la lesión. Se observan numerosos axones amielínicos (flecha) y sólo algunas fibras mielinizadas (F). 6300X.

INDICE DE MIELINIZACION 1 AÑO POST-CONTUSION



Gráfica 5. IDM de los axones de la ME 1 año después de la contusión.

Al comparar el IDM de cada uno de los subgrupos experimentales con el IDM del grupo control, se observó una diferencia significativa entre éstos ($p < 0.05$).

Al comparar el IDM del subgrupo de máxima desmielinización (0.90) con el IDM del grupo de máxima remielinización (0.83), también se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0.02$).

La distribución del IDM con base en el diámetro axonal para cada grupo experimental se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Distribución del IDM según la distribución del diámetro axonal en los diferentes grupos.

Diámetro axonal en μm	IDM según el tiempo de evolución después de contusión de la médula espinal					
	sin lesión	1 mes	2 meses	4 meses	6 meses	1 año
< 0.5	0.59	0.94	1.00	0.98	1.00	0.90
1	0.69	0.91	0.97	0.95	0.97	0.84
1.5	0.73	0.85	0.88	0.87	0.87	0.80
2	0.74	0.81	0.81	0.82	0.80	0.84
2.5	0.73	0.79	0.79	0.80	0.78	0.82
3	0.71	0.82	0.80	0.80	0.78	0.85
3.5	0.73	0.82	0.81	0.82	0.80	0.85
4	0.72	0.87	0.85	0.84	0.82	0.83
4.5	0.73	0.85	0.82	0.84	0.82	0.79
5	0.72	0.86	0.86	0.87	0.84	0.81
> 5.5	0.77	0.87	0.84	0.88	0.85	0.80
	n=7	n=4	n=5	n=5	n=4	n=3

En los grupos con lesión medular se observó en la mayoría de los casos que las fibras con diámetro igual o menor a 1 μm se encontraban amielínicas.

En la ME sin lesión, el IDM se mantuvo casi constante cuando el diámetro axonal osciló entre 1.5 y 5 μm , mientras que 1, 2, 4 y 6 meses después de la contusión medular, el IDM no varió substancialmente cuando el diámetro de los axones se encontró entre 2 y 3.5 μm . Un año después de la lesión, éste mismo fenómeno se observó en los axones con diámetro entre 2 y 4 μm .

Los axones con diámetro entre 1 y 1.5 μm , 4 y 4.5 μm y más de 5 μm , presentaron un año después de la lesión IDMs dentro de los parámetros de normalidad. Por el contrario, los axones con 0.5 μm o menos presentaron el IDM que más se alejaba de dichos parámetros.

DISCUSION.

Blight y Decrescito en 1986, describieron una reducción en la proporción de axones con diámetro mayor a 5 μm compensada por un incremento en la proporción de axones con diámetros en el rango de 2 a 3 μm después de contusión de la ME en gatos y, contrario a los resultados referidos en este trabajo, ellos no comunican ningún incremento en el grupo de axones pequeños, sino por el contrario, según sus resultados esta población tendía a disminuir. Esto puede explicarse en parte, porque los axones amielínicos son más difíciles de identificar con microscopía de luz, técnica empleada por dichos autores en su experimento, que con microscopía electrónica la cual se utilizó en la realización de este trabajo. Los axones totalmente desmielinizados se identificaron por su contenido citoplásmico de neurofilamentos rodeados de microtubulos y algunas mitocondrias (Dusart, 1992).

En el presente trabajo se ha descrito un incremento progresivo en la población axonal con diámetros de 0.5 μm o menos después de una contusión severa de la ME que va de 1.08% en las ratas sin lesión hasta 27.66% en las ratas contundidas. Lo anterior es compatible con el fenómeno de crecimiento nervioso colateral (crecimiento de nuevas fibras nerviosas procedentes de los nervios intactos) descrito por Edds en 1953. En un principio dicho fenómeno parecía ser una propiedad inherente al SNP, hasta que Liu y Chambers demostraron que los axones de la ME podían ser estimulados para emitir prolongaciones laterales. En 1969 Raisman confirmó la existencia de crecimiento colateral en el núcleo septal del conejo con el empleo de microscopía electrónica cuantitativa.

Con base en lo anterior, se estudiaron los axones con diámetros de 0.5 μm o menos por separado y se consideraron como laterales axónicas resultantes de los procesos de plasticidad inherentes a la ME.

En 1972, Waxman y Bennett afirmaron que los axones pequeños de menos de 0.5 μm de diámetro permanecen amielínicos, lo cual no concuerda con los resultados aquí comunicados, ya que a un año de la lesión se pudo observar que alrededor del 30% de este tipo de axones habían sido remielinizados.

También se observó que después de la contusión de la ME los axones pequeños de

menos de 0.5 μm eran mielinizados por CS, lo cual no concordaba con las afirmaciones de algunos autores que indican que para que las CS mielinicen deben establecer una relación 1:1 con axones de más de 1 μm de diámetro (Martin y Webster, 1973; Windenbank et al., 1985). No obstante, Peschanski (1987) demostró que la remielinización de axones centrales por CS puede llevarse a cabo tanto en axones sobrevivientes, como en delgadas prolongaciones en crecimiento.

Blight y Young (1989) observaron que después de una contusión de la ME, en el 48% de los casos la remielinización estaba a cargo de las CS, en el 36% de los OD y en el 16% por una combinación de CS y OD; también, que de los 10,000 axones que aproximadamente sobrevivían en el cuadrante dorsal, en el 100% de los casos del grupo remielinado por CS éstos estaban mielinizados, mientras que en el grupo remielinado por OD sólo se observó en el 44% de los casos y en el grupo mixto, en un 50%. Los resultados del presente trabajo indican que después de la contusión de la ME, la mayor parte de las fibras fueron remielinizadas por CS con base en los siguientes criterios: las fibras mielinizadas por CS, presentan un delgado anillo de citoplasma alrededor del perímetro del axón envainado, la presencia de núcleo y citoplasma en la vaina que rodea al axón y el hecho de que generalmente los axones mielinizados por CS en el SNC están rodeados por un claro espacio extracelular, mientras que las fibras mielinizadas por OD generalmente se encuentran inmersas en espacios que contienen astrocitos (Blight, 1989).

Por otra parte, se ha descrito que el IDM óptimo para que exista una adecuada propagación de los impulsos nerviosos en las fibras mielinicas, oscila entre 0.60 y 0.80 con variaciones específicas entre las diferentes especies y las distintas estructuras nerviosas de la misma especie (Williams y Chalupa, 1983). Después de estudiar los axones de la ME de ratas adultas se estableció para dicha estructura un IDM de 0.72 ± 0.007 , el cual se correlaciona perfectamente con los datos anteriores. Y en los subgrupos experimentales encontramos IDMs de 0.86, 0.90, 0.88 y 0.88 a 1, 2, 4 y 6 meses después de la lesión respectivamente. Dichos IDMs se alejan francamente de los valores óptimos requeridos para que la transmisión nerviosa se de adecuadamente.

Lo más interesante es que un año después de la lesión se encontró un IDM de 0.83, que aunque no está dentro del rango óptimo, sí se acerca a éste. Lo anterior puede deberse a que la remielinización espontánea generada en la ME estuvo a cargo de las CS, las cuales son capaces de generar vaina de mielina más gruesas al compararlas con las de los OD al remielinizar axones centrales (Dusart et al., 1992).

De cualquier forma, pensamos que las afirmaciones de algunos investigadores (Prineas, 1985; Hirano, 1989) de que en el SNC la remielinización es un proceso abortivo e incompleto puede ser válida sólo para ciertos procesos patológicos. Por otra parte, es probable que el tiempo de estudio no se haya prolongado el tiempo necesario para que el fenómeno tenga lugar. En el presente estudio el IDM promedio a los 2, 4 y 6 meses fue de 0.90, 0.88 y 0.88 respectivamente, y de haber detenido el experimento en este punto quizá se hubiera concordado con los resultados de dichos autores. No obstante a los 12 meses el IDM fué de 0.83, lo cual indica que la remielinización no es un proceso que se detenga, sino que es un fenómeno de lenta evolución.

Se está de acuerdo con Blight y Young (1989) en que aun cuando las CS han demostrado ser capaces de generar una remielinización funcional en el SNC, no significa que sean capaces de restaurar completamente la función axonal, o que éstas sean más efectivas que los OD para desempeñar esta función, ya que la remielinización por CS implica que el medio ambiente normal de los axones, proporcionado por los astrocitos en el SNC, sea desplazado, lo cual puede afectar a largo plazo la función de estos axones, dado el aparente papel de los astrocitos en el control del medio ambiente extracelular, por lo que se requieren más estudios dentro de este campo.

CONCLUSIONES.

1- Después de una contusión severa de la ME en ratas adultas, tienen lugar fenómenos de plasticidad nerviosa como la emisión de colaterales axónicas y procesos de remielinización espontánea tanto en las fibras que sobrevivieron a la lesión como en las originadas por fenómenos plásticos.

2- La remielinización espontánea producida por las CB, después de una contusión severa de la ME en ratas, es significativa al compararla con la máxima desmielinización generada por este proceso.

3- El IDM es un parámetro que permite evaluar objetivamente los procesos de mielinización, desmielinización y remielinización en los axones de la ME.

4- La remielinización observada en este tipo de lesión no fue un proceso abortivo ni incompleto, sólo fue lento.

BIBLIOGRAFIA.

Aguayo, A.J., Dickson, R., Trecarten, J., Attiwell, M., Bray, G.M. y Richardson, P. (1978). Ensheathment and myelination of regenerating PNS fibers by transplanted optic nerve glia. *Neuroscience Letters*. 9: 97-104.

Allen, A.R. (1911). Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. *JAMA*. 57:878-880.

Anderson, D.K., Means, E.D., Waters, T.R. and Green, E.S. (1982). Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J. Neurosurg*. 56: 106-113.

Anderson, D.K., Reier, P.J., Wirth, E.D., Theele, D.P., Mareci, T. and Brown, S.A. (1991). Delayed grafting of fetal CNS tissue into chronic compression lesions of the adult cat spinal cord. *Rest Neurol Neurosci*. 2: 309-325.

Asbury, A.K. (1967). Schwann cell proliferation in developing mouse sciatic nerve: a radioautographic study. *J. Cell Biol*. 34: 735-743.

Balentine, J.D. (1978). Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest*. 39: 236-253.

Balentine, J.D. (1988). Spinal cord trauma: in search of the meaning of granular axoplasm and vesicular myelin. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 47: 77-92.

Banik, N.L., Hogan, E.L., Powers, J.M. and Smith, K. (1986). Proteolytic enzymes in experimental spinal cord injury. *J. Neurol. Sci*. 73: 245-256.

Black, J.A., Waxman, S.G., Sims, T.J. and Gilmore, S.A. (1986). Effects of delayed myelination by oligodendrocytes and Schwann cells on the macromolecular structure of axonal membrane in rat spinal cord. *J. Neurocytol*. 15: 745-761.

Blakemore, W.F. (1975). Remyelination by Schwann cells of axons demyelinated by intraspinal injection of 6-aminonicotinamide in the rat. *J. Neurocytol*. 4: 745-757.

Blakemore, W.F. (1976). Invasion of Schwann cells into the spinal cord of the rat following local injections of lysolecithin. *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. 2: 21-39.

Blakemore, W.F. (1977). Remyelination of CNS axons by Schwann cells transplanted

from the sciatic nerve. *Nature (Lond.)*, 266: 68-69.

Blight, A.R. (1985). Delayed demyelination and macrophage invasion: a candidate for secondary cell damage in spinal cord injury. *Central Nervous System Trauma*. 2: 299-315.

Blight, A.R. and Decrescito, V. (1986). Morphometric analysis of experimental spinal cord injury in the cat: the relation of injury intensity to survival of myelinated axons. *Neurosci*. 19: 321-341.

Blight, A.R. and Young, W. (1989). Central axons in injured cat spinal cord recover electrophysiological function following remyelination by Schwann cells. *J. Neurol. Sci*. 91: 15-34.

Bogan, N. and Cabot, J.B. (1991). Light and electron microscopic analyses of intraspinal axon collaterals of sympathetic preganglionic neurons. *Brain Res*. 541: 241-251.

Bunge, M.B., Bunge, R.P. and Ris, H. (1961). *J. Biophys. Biochem. Cytol*. 10: 67-94.

Chiquet, M. (1989). Neurite growth inhibition by CNS myelin proteins: a mechanism to confine fiber tracts?. *Trends Neurosci*. 12: 1-3.

Chmykhova, N.M. and Babalian, A.L. (1993). Structure of recurrent axon collaterals of frog lumbar motoneurons as revealed by intracellular HRP labelling. *Brain Res*. 603: 289-295.

Collins, G.H. (1966). An electron microscopic study of remyelination in the brain stem of thiamin deficient rats. *Amer. J. Pathol*. 48: 259-276.

Das, G.D. (1989). Perspectives in anatomy and pathology of paraplegia in experimental animals. *Brain Res Bull*. 22: 7-32.

De Juan J., Cuenca, N., I guez, C. and Fern ndez, E. (1992). Axon types classified by morphometric and multivariate analysis in the rat optic nerve. *Brain Res*. 585: 431-434.

De La Torre, J.C., Hill, P.K., Gonz lez-Carvajal, M. and Parker, J.C. (1984). Evaluation of transected spinal cord regeneration in the rat. *Exp. Neurol*. 84: 188-206.

Demopoulos, H.B., Flamm, E.S. and Pietronigro, D.D. (1980). The free radical pathology and the microcirculation in the mator central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand (suppl III)*. 492: 91-119.

Dohrmann, G.J. (1972). Experimental spinal cord trauma. A historical review. *Arch. Neurol*. 27: 468-473.

- Druckman, R. and Mair, W.G.P. (1953). Aberrant regenerating nerve fibers in injury to the spinal cord. *Brain*, 76: 448-454.
- Dubois-Dalq, M.; Behar, T.; Hudson, L. and Lazzarini, R.A. (1986). Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons. *J. Cell Biol.* 102: 384-392.
- Duncan, D. (1934). A relation between axone diameter and myelination determined by measurement of myelinated spinal root fibers. *J. Comp. Neurol.* 60: 437-471.
- Duncan, I.D., Hammang, J.P., Jackson, K.F., Wood, P.M., Bunge, R.P. and Langford, L. (1988). Transplantation of oligodendrocytes and Schwann cells into the spinal cord of the myelin-deficient rat. *J. Neurocytol.* 17: 351-360.
- Dusart, I., Marty, S. and Peschanski, M. (1992). Demyelination and remyelination by Schwann cells and oligodendrocytes after kainate-induced neuronal depletion in the central nervous system. *Neurosci.* 51: 137-148.
- Edds, M.V. (1953). Collateral nerve regeneration. *Quart. Rev. Biol.* 28: 260-276.
- Eidelberg, E. (1985). Locomotor control in monkeys. In: Eccles J. Dimitrijevic MR (Eds). *Recent achievements in restorative neurology I: Upper motor neuron functions and dysfunctions*. Karger, Basel, 179-181.
- Fraher, J.P., O'Leary, D., Moran, M.A., Cole, M., King, R.H.M. and Thomas P.K. (1990). Relative growth and maturation of axon size and myelin thickness in the tibial nerve of the rat. I. Normal animals. *Acta Neuropathol.* 79: 364-374.
- Friede, R.L. (1970). Control of myelin formation by axon caliber. *J. Comp. Neurol.* 144: 233-252.
- Friede, R.L. and Beuche, W. (1985). A new approach toward analyzing peripheral nerve fiber populations. I. Variance in sheath thickness corresponds to different geometric proportions of the internodes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44:60-72.
- Gale, K., Kerasidis, H. and Wrathall, J.R. (1985). Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional impairment. *Exp. Neurol.* 88: 123-134.
- Giulian, D.; Vaca, K. and Johnson, B. (1988). Secrete peptides as regulators of gliin-gliin interactions in the developing nervous system. *J. Neurosci. Res.* 21: 487-500.
- Gledhill, R.F., Harrison, B.M. and McDonald W.L. (1973). Demyelination and remyelination after acute spinal cord compression. *Exp. Neurol.* 38: 472-487.

- Greenberg, M.M., Leitao, C., Trogadis, J. and Stevens, J.K. (1990). Irregular geometries in normal unmyelinated axons: a 3D serial EM analysis. *J. Neurocytol.* 20: 978-988.
- Greenfield, S., Bröstoff, S., Eylar, E.H. and Morell, P. (1973). Protein composition of the peripheral nervous system. *J. Neurochem.* 20: 1207-1216.
- Guy, J., Ellis, E.A., Kelley, K. and Hope, G.M. (1989). Spectra of G ratio, myelin sheath thickness, and axon and fiber diameter in the guinea pig optic nerve. *J. Comp. Neurol.* 287: 446-454.
- Hansbout, R.K. (1982). A comprehensive review of methods of improving cord recovery after acute spinal cord injury. In: Tator CH. (Ed). *Early management of acute spinal cord injury*. New York, Raven Press. 181-196.
- Harrison, B.M., McDonald, W.I., Ochoa, J. and Ohlrich, G.D. (1972). Paranodal demyelination in the central nervous system. *J. Neurol. Sci.* 16: 489-494.
- Harrison, B.M. (1987). Schwann cells divide in a demyelinating lesion of the central nervous system. *Brain Res.* 409: 163-168.
- Hildebrand, C. and M_ller, H. (1974). Low-angle X-ray diffraction studies on the period of central myelin sheaths during preparation for electron microscopy. A comparison between different anatomical areas. *Neurobiology*4, 71-81.
- Hildebrand, C. (1977). Presence of Marchi-positive myelinoid bodies in the spinal cord white matter of some vertebrate species. *J. Morph.* 153: 1-22.
- Hirano, A. and Dembitzer, H.M. (1967). A structural analysis of the myelin sheath in the central nervous system. *J. Cell Biol.* 34: 555-567.
- Hirano, A. (1968). A confirmation of the oligodendroglial origin of myelin in the adult rat. *J. Cell Biol.* 38: 637-640.
- Hirano, A. (1989). Review of the morphological aspects of remyelination. *Dev. Neurosci.* 11: 112-117.
- Houl_ , J.D. and Reier, P.J. (1988). Transplantation of fetal spinal cord tissue into the chronically injured adult rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 269: 535-547.
- Koles, Z.J. and Rasminsky, M. (1972). A computer simulation of conduction in demyelinated nerve fibres. *J. Physiol.* 227:351-364.
- Lampert, P.W. (1965). Demyelination and remyelination in experimental allergic encephalomyelitis: Further electron microscopic observations. *J. Neuropathol. Exp.*

Neurol. 24: 371- 385.

Lenke, M., Demediuk, P., McIntosh, T.K., Vink, R. and Faden A.J. (1987). Alterations in tissue Mg⁺⁺, Na⁺ and spinal cord edema following impact trauma in rats. *Bioch Bioph Res Com.* 147: 1170- 1175.

Liu, C.N. and Chambers, W.W. (1958). Intrasprinal sprouting of dorsal root axons. *Arch. Neurol. Psychiat.* 79:46-61.

Ludwin, S.K. (1978). Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse. An ultrastructural study of cuprizone toxicity. *Lab Invest.* 39: 597-612.

Ludwin, S.K. (1980). Chronic demyelination inhibits remyelination in the central nervous system. *Lab. Invest.* 43: 382-387.

Ludwin, S.K. (1989). Evolving concepts and issues in remyelination. *Dev. Neurosci.* 11: 140-148.

Luo, P. (1992). The anatomical evidence of recurrent axonal collaterals of the thalamus projecting neurons of the rostral pole of the trigeminal sensory nuclear complex in the rat. *Brain Res.* 578: 342-346.

Martin, J.R. and Webster, H. deF., (1973). Mitotic Schwann cells in developing nerve: their changes in shape, fine structure and axon relationships. *Dev. Biol.* 32: 417-431.

Matthews, M.A. (1968). An electron microscopic study of the relationship between axon diameter and the initiation of myelin production in the peripheral nervous system. *Anal. Rec.* 161: 337- 352.

Matthews, M.A. and Duncan, D. (1972). A quantitative study of morphological changes accompanying the initiation and progress of myelin production in the dorsal funiculus of the rat spinal cord. *J. Comp. Neur.* 142: 1-22.

McDonald, W.I. and Sears T.A. (1970). Focal experimental demyelination in the central nervous system. *Brain.* 93: 575-582.

Miller, R.J. (1987). Multiple calcium channels and neuronal function. *Science.* 235: 46-52.

Minwegen, P. and Friede, R.L. (1984). Conduction velocity varies with osmotically induced changes of the area of the axon's profile. *Brain Res.* 297: 105-113.

Owens, G.C. and Bunge, R.P. (1989). Evidence for an early role for myelin-associated glycoprotein in the process of myelination. *Glia.* 2: 119-128.

Owens, G.C., Boyd, C.J., Bunge, R.P. and Salzer, J.L. (1990). Expression of

recombinant myelin-associated glycoprotein in primary Schwann cells promotes the initial investment of axons by myelinating Schwann cells. *J. Cell Biol.* 111: 1171-1182.

Owens, G.C. and Bunge, R.P. (1990). Schwann cells depleted of galactocerebroside express myelin-associated glycoprotein and initiate but do not continue the process of myelination. *Glia*, 3: 118-124.

Peschanski, M. and Besson, J.M. (1987). Structural alteration and possible growth of afferents after kainate lesion in the adult thalamus. *J. Comp. Neurol.* 258: 185-203.

Prineas, J.; Raine, C.S. and Wisniewski, H. (1969). An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. III. Chronic experimental allergic encephalomyelitis in the central nervous system. *Lab. Invest.* 21: 472-483.

Prineas, J. (1975). Pathology of the early lesion in multiple sclerosis. *Human Pathol.* 6:531-537.

Prineas, J.W. and Connell, F. (1979). Remyelination in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 5: 22-31.

Prineas, J.W. (1985). The neuropathology of multiple sclerosis; in Koltzler, J.C. (ed): *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 3 Demyelinating Diseases. Amsterdam, Elsevier, 213-257.

Raine, C.S. (1976). On the occurrence of Schwann cells within the normal central nervous system. *J. Neurocytol.* 5: 371-386.

Reine, C.S. and Traugott U. (1978). Glial bridges and Schwann cell migration during chronic demyelination in the CNS. *J. Neurocytol.* 7: 541-553.

Raisman, G. (1969). Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. *Brain Res.* 14: 25:48.

Ranscht, B., Wood, P.M. and Bunge, R.P. (1987). Inhibition of in vitro peripheral myelin formation by monoclonal anti - galactocerebroside. *J. Neurosci.* 7: 2936-2947.

Remahl, S. and Hildebrand, C. (1990). Relation between axons and oligodendroglial cells during initial myelination. I. The glial unit. *J. Neurocytol.* 19: 313-328.

Richards, W., Kalil, R. and Moore, C.L. (1983). An observation about myelination. *Brain Res.* 52: 219-225.

Rodriguez, M., Lennon, V.A., Benveniste, E.N. and Merrill, J.E. (1987). Remyelination by oligodendrocytes stimulated by antiserum to spinal cord. *J. Neuropathol. Exp.*

Neurol. 46: 84-95.

Schwab, M.E. and Schnell, L. (1989). Region-specific appearance of myelin constituents in the developing rat spinal cord. *J. Neurocytol.* 18: 161-169.

Schwab, M.E. (1990). Myelin-associated inhibitors of neurite growth. *Exp. Neurol.* 109: 2-5.

Schwab, M.E. (1990). Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS. *TINS.* 13: 452-456.

Selmaj, K.W. and Raine, C.S. (1988). Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann. Neurol.* 23: 339-346.

Simpson, R.K. Jr, Robertson, C.S., Goodman, J.C. (1990). Spinal cord ischemia-induced elevation of amino acids: extracellular measurement with microdialysis. *Neurochem Res.* 15: 635-639.

Sims, G. and Gilmore, S.A. (1983). Interaction between intraspinal Schwann cells and the cellular constituents normally occurring in the spinal cord: an ultrastructural study in the irradiated rat. *Brain Res.* 276: 17-30.

Stoffel, W. (1990). The myelin membrane of the central nervous system-essential macromolecular structure and function. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29: 958-976.

Stover, S.L., Fine, P.R. (1987). The epidemiology and economics of spinal cord injury. *Paraplegia.* 25: 225-228.

Thompson, F.J., Reier, P.J., Lucas, C.C. and Parmer, R. (1992). Altered patterns of reflex excitability subsequent to contusion injury of the rat spinal cord. *J. Neurophysiol.* 68: 1473-1486.

Towe, A.L. and Harding, G.W. (1985). Pattern of myelination in the pyramidal tract of the rat. *Exp. Neurol.* 89: 284-288.

Trapp, B.D. and Quarles, R.H. (1982). Presence of the myelin-associated glycoprotein correlates with alterations in the periodicity of peripheral myelin. *J. Cell Biol.* 92: 877-882.

Trapp, B.D.; Quarles, R.H. and Suzuki, K. (1984). Immunocytochemical studies of quaking mice support role for the myelin-associated glycoprotein in forming and maintaining the periaxonal space and periaxonal cytoplasmic collar of myelinating Schwann cells. *J. Cell Biol.* 99: 594-606.

Trapp, B.D. (1988). Distribution of the myelin-associated glycoprotein and P0 protein

En el tracto corticospinal, los antígenos específicos de la mielina pueden ser detectados a los 11 días después del nacimiento (Schwab y Schnell, 1989). Presenta una distribución uniforme en el calibre de los axones. A los 5 días, el 91% de las fibras miden entre 0.1 y 0.3 μm , no se observan fibras promielínicas. Entre el quinto y el décimo día existe un marcado incremento en el diámetro de estas fibras amielínicas, existen pocas fibras promielínicas y ocasionalmente se observan fibras de gran calibre (2 a 3 μm) mielinizadas. A los 15 días las fibras amielínicas son el componente más abundante y presentan un incremento sustancial en su diámetro, ya que casi el 50% miden entre 0.3 y 0.7 μm . Más del 90% de las fibras promielínicas tienen diámetros entre 0.7 y 0.8 μm . A los 20 días, las fibras promielínicas son numerosas y se observan más axones mielinizados. A los 120 días, el tracto se encuentra completamente mielinizado y sólo el 21% de los axones mielínicos tienen menos de 0.7 μm de diámetro, lo cual pueden indicar que progresivamente los axones pequeños son mielinizados (Matthews y Duncan, 1972).

En estos tractos, la mielinización inicia en los axones que posteriormente van a ser de gran calibre y se extiende más tarde a aquellos que cada vez van teniendo menor diámetro. La mayoría de estos axones son mielinizados cuando alcanzan diámetros de 1 a 1.5 μm . Los axones que van a tener un gran calibre presentan un aumento considerable en sus diámetros, mientras son amielínicos, y pueden incrementarse de 5 a 10 veces más cuando son mielinizados, mientras que las pequeñas fibras mielínicas, que sólo se ven en estadios más avanzados de maduración, parecen crecer muy poco antes de ser mielinizadas y permanecen pequeñas aun después de la mielinización (Matthews y Duncan, 1972).

La mayor variable entre cada tracto se encuentra en el diámetro promedio de los axones y en la diferencia resultante en la longitud promedio de sus internodos (Matthews y Duncan, 1972).

Características morfométricas de la mielinización.

En el SNP de los mamíferos, el diámetro del axón es un factor crítico para que exista la mielinización (Duncan, 1934), ya que las fibras de gran calibre son mielinizadas por CS de acuerdo a una relación 1:1, los axones de mediano calibre generalmente, aunque no siempre, son mielinizados por una CS que al mismo tiempo envaina otros axones amielínicos, y los axones más pequeños se encuentran envainados juntos por una sola prolongación citoplásmica (Dusart et al., 1992).

during myelinating compaction in quaking mouse peripheral nerve. *J. Cell Biol.* 107: 675-685.

Waxman, S.G. and Bennett, M.V.L. (1972). Relative conduction velocities of small myelinated and non-myelinated fibres in the central nervous system. *Nature New Biol.* 238: 217-219.

Waxman, S.G. and Sims, T.J. (1984). Specificity in central myelination: evidence for local regulation of myelin thickness. *Brain Res.* 292: 179-185.

Waxman, S.G. and Ritchie, J.M. (1985). Organization of ion channels in the myelinated nerve fiber. *Science.* 228: 1502-1507.

Williams, P.L. and Wendell-Smith, C.P. (1971). Some additional parametric variations between peripheral nerve fiber populations. *J. Anat (London).* 109: 502-526.

Williams, R.W. and Chalupa, L.M. (1983). An analysis of axon caliber within the optic nerve of the cat: Evidence of size groupings and regional organization. *J. Neurosci.* 3: 1554-1564.

Windebank, A.J., Wood, P., Bunge, R.P. and Dyck, P.J. (1985). Myelination determines the caliber of dorsal root ganglion neurons in culture. *J. Neurosci.* 5: 1563-1569.

Wisniewski, H. and Raine, C.S. (1971). An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. V. Central and peripheral nervous system lesions caused by diphtheria toxin. *Lab. Invest.* 25: 73-80.

Wisniewski, H.M. and Madrid R.E. (1983). Chronic progressive experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in adult guinea pigs. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 42: 243-255.

Weiner I.P. (1973). Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis virus (JHM virus). *Arch. Neurol.* 28: 298-305.

Wood, P.M. and Bunge, R.P. (1986). Myelination of cultured dorsal root neurons by oligodendrocytes obtained from adult rats. *J. Neurol. Sci.* 74: 153-169.

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

Young, W. (1989). Recovery mechanisms in spinal cord injury: implications for regenerative therapy. *Neural Regeneration and Transplantation.* 157-169.