

11261



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

A
2e

FACULTAD DE MEDICINA

BIODISPONIBILIDAD DE LA CICLOSPORINA-A ADMINISTRADA
POR LA VIA ORAL O LA VIA INTRAPERITONEAL EN RATAS
CON LESION DE LA MEDULA ESPINAL AGUDA Y CRONICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
P R E S E N T A :
JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS

MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

TUTORES ACADEMICOS:

Dr. Roberto Kretschmer S.

Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Instituto Mexicano del Seguro Social.

M en IBB Dolores Correa B.

**Dpto. de Inmunoparasitología Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia
Epidemiológicos.**

M en CB Gabriel Guizar S.

**Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas Hospital de
Especialidades CMN Siglo XXI IMSS**

Dr. Ignacio Madrazo N.

**Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas
Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI IMSS**

A mis padres y hermanos:

Por todo el apoyo que hasta el momento me han brindado.

A mis asesores:

Por las enseñanzas y apoyo recibidos.

A la señorita Cecilia García G.:

Por el apoyo y comprensión que siempre me ha brindado.

A mis amigos:

Por los buenos momentos y apoyo incondicional.

**BIODISPONIBILIDAD DE LA CICLOSPORINA-A ADMINISTRADA POR LA VÍA
ORAL O LA VÍA INTRAPERITONEAL EN RATAS CON LESIÓN DE LA MÉDULA
ESPINAL AGUDA Y CRÓNICA.**

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	4
CONCEPTOS GENERALES SOBRE LA RESPUESTA INMUNE	4
<i>Antígenos de Histocompatibilidad</i>	<i>4</i>
<i>Antígenos menores de Histocompatibilidad</i>	<i>6</i>
<i>Discriminación de lo propio y lo no propio</i>	<i>7</i>
<i>Activación de los linfocitos T</i>	<i>7</i>
<i>Presentación antigénica</i>	<i>10</i>
<i>Reacción inflamatoria</i>	<i>10</i>
INMUNIDAD EN EL SNC	14
<i>Células presentadoras de antígenos (CPAs) en el SNC</i>	<i>14</i>
<i>Moléculas del MHC en el SNC</i>	<i>15</i>
<i>Antígenos menores de histocompatibilidad en el SNC</i>	<i>16</i>
<i>Drenaje linfático en el SNC</i>	<i>16</i>
<i>La barrera hemato-encefálica</i>	<i>17</i>
<i>Respuesta celular en el SNC</i>	<i>17</i>
<i>Los anticuerpos en el SNC</i>	<i>19</i>
RESPUESTA INMUNE DESPUES DE UNA LESION TRAUMATICA AL SNC	21
<i>Respuesta celular</i>	<i>21</i>
<i>Respuesta humoral</i>	<i>22</i>
RESPUESTA INMUNE CONTRA TRASPLANTES AL SNC	24
INMUNOSUPRESION	25
<i>Corticosteroides</i>	<i>26</i>
<i>Azatioprina</i>	<i>26</i>

<i>Ciclofosfamida</i>	27
<i>Anticuerpos monoclonales</i>	27
<i>FK 506</i>	27
<i>Acido micofenólico (RS-61443)</i>	28
<i>Ciclosporina A</i>	28
GENERALIDADES SOBRE CSA	29
<i>Absorción</i>	29
<i>Distribución</i>	30
<i>Biotransformación</i>	30
<i>Eliminación</i>	30
<i>Acciones inmunodepresoras</i>	31
<i>Efectos tóxicos</i>	31
<i>Métodos de análisis</i>	31
<i>Selección de la dosis de acuerdo a las variables farmacocinéticas</i>	32
<i>Biodisponibilidad de la CSA en humanas y en ratas sin LTME (Dosis de 10mg/kg/día)</i>	33
JUSTIFICACION	36
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
HIPÓTESIS	38
OBJETIVOS	39
MATERIAL Y MÉTODOS	40
DISEÑO EXPERIMENTAL	40
CIRUGÍA (LTME) Y CUIDADOS POS QUIRÚRGICOS	43
EVALUACIÓN CLÍNICA	44
ADMINISTRACIÓN DE LA CSA	45

<i>Primer y segunda serie experimental</i>	45
<i>Tercer serie experimental</i>	46
COLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE	46
PROCEDIMIENTO DEL RADIOINMUNOANÁLISIS	46
DETERMINACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE LA CSA	48
REGLA DEL TRAPEZOIDE PARA EL CÁLCULO DEL AUC	49
DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE ELIMINACIÓN	50
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
CONSIDERACIONES ÉTICAS DEL USO DE ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN BIOMÉDICA	50
RESULTADOS	51
PRIMER SERIE EXPERIMENTAL	51
<i>Biodisponibilidad de la C'sA administrada por la vía oral</i>	51
<i>Biodisponibilidad de la C'sA administrada por la vía intraperitoneal</i>	53
SEGUNDA SERIE EXPERIMENTAL	58
TERCER SERIE EXPERIMENTAL	61
DISCUSIÓN	65
CONCLUSIONES	74
APÉNDICE	76
CONCEPTOS GENERALES SOBRE FARMACOCINETICA	76
<i>Absorción de las drogas</i>	76
<i>Biodisponibilidad de los fármacos</i>	77
<i>Distribución de los fármacos</i>	78
<i>Volumen de distribución</i>	78
<i>Biotransformación de los fármacos</i>	79
<i>Eliminación de los fármacos</i>	79

<i>Selección de la dosis de acuerdo a las variables farmacocinéticas</i>	80
BIBLIOGRAFÍA	81

RESUMEN

La lesión traumática de la médula espinal (LTME) en los seres humanos suele dejar graves secuelas neurológicas; éste y otros fenómenos importantes, han conducido al desarrollo de diferentes modelos experimentales de lesión medular, mismos que han sido de gran utilidad para el mejor entendimiento de la fisiopatología de la lesión, el estudio de los fenómenos de neurodegeneración- regeneración y neuroplasticidad, así como para evaluar las diferentes estrategias terapéuticas.

Después de una LTME se puede originar una respuesta de tipo autoinmune contra los antígenos neurales. Dicha respuesta podría estar participando en la falta de regeneración de la médula espinal. Por otra parte, los trasplantes neurales pueden ser de gran utilidad para promover la regeneración de la médula espinal lesionada sin embargo el sistema inmune también juega un papel importante al provocar el rechazo del trasplante.

Teniendo en consideración lo anterior, el desarrollo de una adecuada estrategia inmunodepresora que controle tanto la respuesta auto inmune como la respuesta inmune dirigida contra el trasplante después de una LTME, podría ser de gran utilidad como medida terapéutica o como medida preventiva respectivamente. La ciclosporina-A (CsA) podría funcionar como un buen agente inmunodepresor que origine un medio favorable para la regeneración en nuestro modelo experimental de LTME.

La biodisponibilidad de ciertos fármacos como la gentamicina y la teofilina se encuentra disminuida en pacientes con LTME; esta observación nos orientó a pensar que la biodisponibilidad de la CsA podría estar también disminuida en nuestro modelo experimental de LTME.

En el presente estudio se diseñaron tres series experimentales. En el primer experimento se evaluó la biodisponibilidad de la CsA administrada por la vía oral y por la vía intraperitoneal (IP) en ratas sin LTME y en ratas con LTME en fase aguda y en fase crónica, a las 0, 2, 4, 6, 12 y 24

hrs después de la administración de 10mg/kg/día del fármaco. La determinación de la CsA se llevó a cabo mediante radioinmunoanálisis. Se observó que durante la fase aguda de la LTME (24 hrs pos lesión) la biodisponibilidad de la CsA disminuye significativamente cuando se administra por la vía oral pero se incrementa también significativamente cuando se administra por la vía IP. Sin embargo, en ambos casos la biodisponibilidad no difirió significativamente con respecto a sus valores de control en la fase crónica de LTME (7 semanas pos lesión). En el segundo experimento se determinó el esquema de administración para mantener las concentraciones séricas de CsA en la rata dentro del rango de concentración mínima efectiva y concentración máxima tolerada correspondientes a los seres humanos (0.12 a 0.275 ug/ml) durante las 24 hrs del día en la fase aguda, sub aguda y crónica de la LTME. La administración de 2.5mg/kg/12hrs por la vía IP durante la fase aguda de la LTME y de 5 mg/kg/12hrs por la vía oral en la fase sub aguda y en la fase crónica de la LTME resultó ser el esquema que mantuvo los niveles dentro del rango establecido. En el tercer experimento se evaluó el efecto inmunodepresor de dicho esquema de administración de CsA sobre la recuperación clínica de ratas con LTME. Se observó una recuperación de la función motora de las ratas que recibieron el tratamiento inmunodepresor significativamente mayor que en las que no lo recibieron. Los resultados sugieren que la LTME origina alteraciones farmacocinéticas que dan lugar a modificaciones de la biodisponibilidad de la CsA, las cuales influyen de manera importante en el efecto inmunodepresor de este fármaco. El éxito del tratamiento inmunodepresor da lugar asimismo a un efecto positivo sobre la recuperación de la actividad motora de las ratas con LTME probablemente atribuible a la inducción de un medio propicio para la regeneración o la reducción de la progresión del daño del tejido nervioso luego de una LTME.

INTRODUCCIÓN

La primera descripción de LTME fue hecha por los egipcios hace 5,000 años señalándose desde entonces sus efectos devastadores.

La LTME es un fenómeno de gran incidencia y con graves repercusiones socioeconómicas por las secuelas de incapacidad física. Su manejo integral es muy complejo por lo que se requiere de la intervención de un grupo multidisciplinario. Actualmente, la incidencia de morbi-mortalidad sigue siendo considerablemente elevada, aún en los centros de atención especializados en este tipo de lesión (Bedbrook 1987, Stover y Fine 1987). El promedio de hospitalización por lesiones medulares agudas en EUA entre la población civil, es de 40 por 1,000,000 habitantes por año (Bracken y cols. 1981) y el promedio de decesos por año es de aproximadamente el 11%. En nuestro país lamentablemente hasta la fecha no contamos con algún estudio epidemiológico que describa la incidencia, mortalidad, evolución pos traumática y costo de la atención médica de este tipo de lesiones.

En los Estados Unidos se estima que por cada paciente con LTME se realiza un gasto superior a los 50 mil dólares (Roye 1988).

Como podemos darnos cuenta la LTME implica un verdadero problema socioeconómico ya que constituye un gasto elevado desde el tratamiento inicial y posteriormente implica grandes limitaciones para reintegrar al paciente a sus actividades productivas.

La LTME no solo se asocia con paraplegia sino que también involucra la alteración de varias funciones somáticas y autonómicas (Das y cols. 1989, Claus-Walker y Halstead 1982A, Claus-Walker y Halstead 1982B, Claus-Walker y Halstead 1982C), originando una serie de alteraciones a nivel sistémico que rompen con la homeostasis del organismo. Después de producir una lesión medular mecánica (lesión primaria), en adición al daño traumático per se, se desencadena una cascada de mecanismos auto destructivos (lesión secundaria) que contribuyen a una mayor destrucción del parénquima medular; finalmente, persiste un proceso neurodegenerativo crónico, con la posible participación de una respuesta de tipo auto inmune (Goodkin y Campbell 1969, Balentine 1983, Lemke y cols. 1987).

ANTECEDENTES

CONCEPTOS GENERALES SOBRE LA RESPUESTA INMUNE

El sistema inmunológico (SI) es la respuesta evolucionaria al problema de como proteger a un organismo contra agentes infecciosos. La respuesta inmune (RI) depende de la habilidad del SI para reconocer antígenos en agentes extraños al organismo y así montar una reacción apropiada para eliminarlos (Male y cols. 1991)

A los factores que forman parte de la RI , podemos agruparlos en componentes de la vía aferente (células presentadoras de antígenos, linfocitos T CD4+ y linfocitos B) que son los que llevan a cabo el reconocimiento del antígeno ; y en componentes de la vía eferente (linfocitos T CD8+, células asesinas naturales (NK, del inglés natural killer), células asesinas activadas por linfocinas (LAK, del inglés lymphokine-activated killer cells) células plasmáticas ,inmunoglobulinas y complemento) que son los que se encargan de eliminar el antígeno (Male y cols 1991).

El reconocimiento inmune es muy importante para el funcionamiento normal del sistema ya que debe reconocer antígenos de agentes extraños potencialmente patógenos y eliminarlos, al mismo tiempo que debe tolerar moléculas de tejidos propios para no dañarlos, de tal manera que una falla en la tolerancia de las moléculas propias puede generar una enfermedad "auto inmune", es decir una reacción del SI contra las moléculas propias por desconocimiento de las mismas (Male 1991).

Antígenos de Histocompatibilidad

Los antígenos de histocompatibilidad son moléculas glucoproteicas genéticamente codificadas en el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC); que se encuentran en la superficie celular y que son altamente polimórficas (Male y cols. 1991).

Moléculas del MHC clase I y clase II

En el humano existen 3 moléculas polimórficas para el MHC clase I: HLA-A, -B y -C; de las cuales, mediante técnicas serológicas se han identificado alrededor de 23 diferentes formas alélicas de A, 51 de B y 11 de C (Columbani 1990). La molécula clase I es una glucoproteína transmembranal constituida por una cadena pesada alfa, y una ligera beta2 microglobulina; esta molécula es capaz de unir antígenos en su cadena alfa. El antígeno unido es un péptido que puede originarse de la misma célula o de un virus que se encuentre infectando a la célula (Rock y cols. 1990). Las moléculas del MHC clase I se expresan constitutivamente en casi todas las células nucleadas con excepción de las células del SNC y otros tipos celulares (Male 1991). Por otra parte en el humano se conocen 3 moléculas del MHC clase II: HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Estas moléculas están constituidas por 1 cadena alfa y 1 cadena beta combinadas como un dímero, entre ambas cadenas se forma una región conocida como "nicho" (Brown y cols. 1988) donde las moléculas clase II pueden unir ocasionalmente antígenos de origen endógeno (virales o propios) (Peterson y Miller 1990) y más frecuentemente antígenos de origen exógeno, parcialmente degradados por la célula. Normalmente las moléculas clase II se expresan en ciertas células denominadas en general "células accesorias del SI", entre las que podemos mencionar a los macrófagos, las células dendríticas y las de la microglía, cuya función se relaciona con la "presentación del antígeno" a los linfocitos T (Male 1991).

Las moléculas del MHC clase II son muy importantes para iniciar la RI ya que los linfocitos T cooperadores (CD4+), reconocen al antígeno extraño unido a las moléculas clase II; al reconocerlo se activan y con ello son capaces de secretar sustancias (linfocinas) que promueven el crecimiento, la diferenciación y la proliferación de otras células del SI. La expresión de las moléculas del MHC se puede incrementar con factores como el interferón gamma, el factor de necrosis tumoral-alfa e infecciones por virus en células (Drigges y cols. 1990).

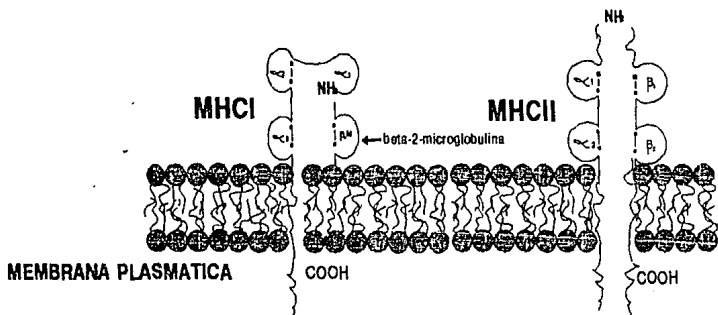


FIGURA 1. Estructura de las moléculas del MHC clase I y clase II. Las moléculas clase I están formadas por una cadena pesada alfa y una ligera beta 2 microglobulina. Las moléculas clase II están constituidas por una cadena pesada alfa y otra ligera beta.

Antígenos menores de Histocompatibilidad

Además de las moléculas del MHC se ha definido un polimorfismo genético adicional, el de los antígenos menores de histocompatibilidad. En el ratón se han clasificado aproximadamente 40 de ellos (Loveland y Simpson 1986). Estos antígenos son capaces de provocar el rechazo de un trasplante a largo plazo en individuos con MHC genéticamente idéntico. Actualmente se sabe que los antígenos menores de histocompatibilidad deben ser reconocidos en conjunto con las moléculas del MHC para funcionar como antígenos (Zinkernagel 1974) y se cree que sean

fragmentos de proteínas intracelulares que se unen a las moléculas del MHC clase I o clase II (Ting y Simpson 1989).

Discriminación de lo propio y lo no propio

El SI en condiciones normales es capaz de reaccionar contra un sin número de antígenos pero no contra los antígenos propios. El reconocimiento antigénico en el SI es llevado a cabo por los linfocitos B y T. Cada una de dichas células es capaz de unir un antígeno, los linfocitos B a través de inmunoglobulinas que funcionan como receptores y los linfocitos T a través del receptor para linfocitos T (RLT). Las inmunoglobulinas en los linfocitos B reconocen la superficie del antígeno (Laver y cols. 1990). El RLT reconoce antígenos extraños solamente en asociación con las moléculas del MHC propias, presentadas por las células accesorias (ver más adelante CPAs).

Una vez que se ha llevado a cabo el reconocimiento del antígeno extraño a través de los receptores específicos, los linfocitos pueden ser activados para producir y secretar linfocinas que inducen la producción de anticuerpos y la proliferación y movilización de células capaces de eliminar al antígeno (Male 1991).

Durante el desarrollo de las células del SI existe una combinación al azar de una gran cantidad de fragmentos génicos que codifican para inmunoglobulinas y RLTs, generando así una gran diversidad de las correspondientes moléculas de reconocimiento. Los linfocitos T son los que determinan el inicio o no de una RI. Existe la posibilidad de que un cierto número de RLTs se dirija contra antígenos propios. Durante el desarrollo de los linfocitos T, los linfocitos con afinidad por antígenos propios son eliminados en un proceso de selección. (Blackman y cols. 1990, Ramsdell y Fowlkes 1990).

Activación de los linfocitos T

Se dice que un linfocito T está activado cuando es capaz de proliferar y producir linfocinas. Un linfocito T es activado solamente si se lleva a cabo la unión específica entre el RLT del

linfocito y el complejo: molécula del MHC + el antígeno de la célula presentadora de antígenos (CPA). En la superficie de los linfocitos T existen además otras moléculas accesorias que seleccionan y refuerzan dicha unión, dos de estas moléculas son el CD4 y el CD8. Los linfocitos T que expresan moléculas CD4 se denominan "cooperadores" y su RLT se une al MHC clase II mientras que los linfocitos que expresan moléculas CD8 se denominan "citotóxicos" y su RLT se une al MHC clase I (Male 1991).

Los linfocitos T cooperadores se subdividen de acuerdo al tipo de linfocinas que secretan en T cooperadores 1 (TH1 del inglés T helper 1) y T cooperadores 2 (TH2 del inglés T helper 2). Los TH1 secretan interferón gamma, interleucina (IL) 2 y factor de necrosis tumoral (FNT); mientras que los TH2 secretan IL3, IL4, IL5 e IL10. Ambos tipos de linfocitos T juegan un importante papel en la iniciación de la RI pues al ser activados secretan las linfocinas correspondientes, mismas que pueden funcionar como factores de crecimiento esenciales para ellos mismos y para otras células como los linfocitos T citotóxicos y los linfocitos B (Ver fig. 2) (Male 1991).

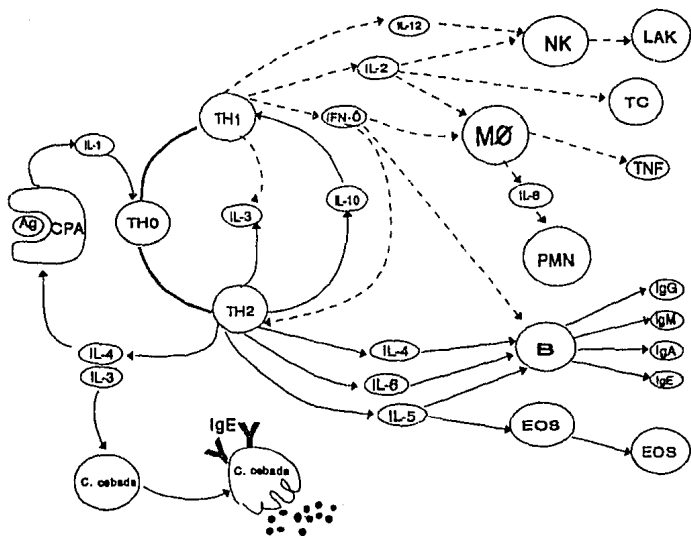


FIGURA 2. Activación de los linfocitos T. Una vez que se lleva a cabo el proceso de presentación antigénica, los linfocitos TH1 (flechas discontinuas) y los TH2 (flechas continuas) empiezan a secretar las citocinas correspondientes mismas que van a actuar sobre diferentes células del sistema inmune para amplificar la respuesta inmune.

Presentación antigénica

En todos los tejidos existen células CPA que son capaces de atrapar y degradar parcialmente antígenos extraños (Austyn y Larsen 1990, King y Katz 1996, Unanue 1984). Estos antígenos fragmentados son acoplados intracelularmente con moléculas del MHC clase I o del MHC clase II y posteriormente presentados en la superficie de la célula. Estas células se dirigen al tejido linfático regional donde activan a los linfocitos T (ver fig.2). Existen células (células del endotelio vascular, astrocitos etc.) que en condiciones normales no expresan moléculas del MHC pero que por acción de ciertas linfocinas como el interferón gamma son capaces de expresar moléculas del MHC y más aún, algunas de ellas pueden funcionar como CPAs (Fontana y cols. 1984).

Reacción inflamatoria

Una vez que se activan los linfocitos T, se genera una reacción inflamatoria localizada desencadenada por un gran número de sustancias que tienen la propiedad de atraer y activar células como los monocitos y los macrófagos (Kasama y cols. 1990). Cuando estas células se activan secretan una gran cantidad de interleucinas como el factor de necrosis tumoral- α (FNT- α), la IL1 y la IL6 que tienen la capacidad de inducir la expresión de MHC en un cierto número de células.

La falta de regeneración del sistema nervioso central (SNC) en mamíferos ha sido desde hace mucho tiempo objeto de estudio. Algunas hipótesis tratan de explicar el motivo principal de esta falta de regeneración (Willenborg y cols. 1977):

1. Los axones centrales no se regeneran porque son incapaces de penetrar la cicatriz glial y la colágena producida en el sitio de lesión.

2. El SNC de mamíferos adultos carece de células gliales indiferenciadas lo cual no provee un sustrato para el crecimiento axonal.

3. Existe un mecanismo inhibitorio de sustratos en el SNC adulto (materia blanca), originado por la unión de proteínas de superficie en la membrana de oligodendrocitos, así como en sus productos mielínicos.

4. Después de una lesión, el crecimiento axonal es inhibido por mecanismos inmunes dirigidos contra los antígenos del SNC.

Con referencia a la última hipótesis, varios estudios han demostrado que en algunas especies vertebradas primitivas, entre ellas anfibios (uredelos) y reptiles (lagartos) (Nordlander y Singer 1978), así como en fetos y en algunos casos neonatos de especies vertebradas avanzadas (mamíferos) hay regeneración del SNC (Berry . 1974, Feringa y cols. 1975). En tales casos existe una relativa incompetencia del sistema inmunológico (SI) (Willenborg y cols. 1977) lo que podría estar confiriendo ventajas para dicha regeneración.

Durante el desarrollo embrionario, los vasos sanguíneos del SNC adquieren una característica diferente a los del resto del organismo: se forma la barrera hemato-encefálica (BHE) que impide a las células del SI reconocer como propios a muchos de los antígenos neurales (Lampson 1987). Tradicionalmente se ha considerado al SNC como inmunológicamente privilegiado y existen hallazgos clínicos que apoyan esta idea como: el patrón de crecimiento poco usual de los virus, el crecimiento agresivo de los tumores neurales, la viabilidad de los trasplantes neurales (Lampson 1987).

Dicho privilegio inmunológico se le ha atribuido al SNC debido a: 1. La existencia de la BHE que por las fuertes uniones existentes entre las células endoteliales y las prolongaciones astrocíticas previenen el paso de inmunoglobulinas, inmunomoduladores de gran tamaño y células inmunocompetentes en general (Rapoport 1976), 2. El SNC carece de un drenaje linfático convencional por lo que se supone está impedido el transporte de los antígenos neurales a los órganos linfoides y 3. En condiciones normales las células neurales (neuronas y células gliales) aparentemente no expresan Moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, de las siglas en inglés Major Histocompatibility Complex) clase I y clase II, de tal forma que, las células neurales en cierto modo quedan protegidas de la respuesta inmune (RI) de tipo celular (Wekerle y cols. 1986).

Los conceptos antes mencionados no son absolutos, ya que por ejemplo, la BHE deja algunas áreas libres en los órganos periventriculares, los antígenos pueden ser acarreados a los órganos linfoides vía líquido cefaloraquídeo y las moléculas del MHC pueden expresarse en células neurales bajo condiciones especiales (contacto con interferón gamma) (Berry 1974, Cotman 1987, Nicholas y cols. 1989, Willenborg y cols. 1977).

Barker y Billingham (Barker y Billingham 1977) analizaron el privilegio inmunológico de la cámara anterior del ojo y afirmaron que aunque existe una gran cantidad de linfáticos a nivel corneal, mismos que, pueden iniciar una sensibilización inmunológica, al realizar un trasplante éste no es rechazado. Ellos afirmaron que este fenómeno estaba dado por la ausencia de vasos sanguíneos en dicha región, de tal manera que las células inmunológicas sensibilizadas no podrían llegar al tejido trasplantado. En forma contraria, el SNC carece de tejido linfático convencional pero cuenta con abundantes vasos sanguíneos, de tal manera que, al llevarse a cabo la sensibilización inmunológica (fenómeno que actualmente, se ha demostrado que sí puede llevarse a cabo) (Bradbury y Westrop 1983, Bradbury 1990) existe una extensa vía de ingreso al SNC. Medawar por otra parte (Nicholas y Arnason 1989, Medawar 1948) demostró en conejos que un trasplante en el SNC era más rápidamente rechazado cuando al animal se le sensibilizaba previamente con un injerto de piel del mismo donador del futuro trasplante al SNC, en

comparación con el muy demorado rechazo de un injerto al SNC de un animal no sensibilizado previamente. Finalmente concluyó que las células inmunológicas del conejo presensibilizado fueron capaces de infiltrarse y destruir el trasplante en el SNC. Lo antes mencionado nos demuestra que el privilegio inmunológico del SNC no es absoluto.

Diferentes observaciones y experimentos desde el siglo pasado han permitido identificar lesiones o enfermedades neurológicas con participación del SI. Dentro de dichas alteraciones se incluyen: esclerosis múltiple (Lauer 1990, Dhib-Jalbut y MacFarlin 1990), el síndrome de Guillain-Barré (Brown y cols. 1987), la enfermedad de Alzheimer (Tooyama y cols. 1990, Itagaki y cols. 1988), además de algunos problemas que pueden quedar como secuelas de infecciones virales o incluso en secuelas de poliomielitis (Pezeshkpour y Dalakas 1988). Con respecto a este último, destaca el reporte de Pezeshkpour quien describe los hallazgos patológicos en la médula espinal de personas con poliomielitis antigua, en todos los casos encontró infiltrado inflamatorio en meninges y parénquima medular.

Para estudiar algunos de los fenómenos inmunológicos que dañan al SNC ha sido de gran utilidad una enfermedad de tipo experimental conocida como encefalomielitis alérgica experimental (EAE), misma que tiene parecido a padecimientos inflamatorios desmielinizantes (Dhib-Jalbut y MacFarlin 1990, Sobel y cols. 1988). Es inducida por sensibilización de animales con antígenos de mielina y el adyuvante de Freund. Es un modelo de enfermedad auto inmune en el SNC (Umehara y cols. 1990), las células T y los macrófagos son las principales células inflamatorias, (Matsumoto y cols. 1990) pero posteriormente se observó que anticuerpos específicos juegan un papel importante (Hashim y Day 1988).

Como podemos observar hasta el momento, en condiciones fisiológicas, es factible, aunque no de igual forma que en el resto del organismo, el desarrollo de una RI contra los antígenos neurales. En condiciones patológicas, la respuesta inmune puede desarrollarse con mayor intensidad ya que llegan a conjugarse todos los factores necesarios para el desarrollo de la misma,

sobre todo después de la pérdida del equilibrio en la BHE, secundario esto, a una neoplasia, intervención quirúrgica o una lesión traumática.

Actualmente se conoce mucho más sobre las características inmunológicas del SNC y podemos decir que prácticamente no difieren en mucho de las características inmunológicas del resto del organismo, sobre todo cuando se encuentra en condiciones patológicas.

INMUNIDAD EN EL SNC

Los factores que participan en la RI del SNC podemos también agruparlos en componentes de la vía aferente (reconocimiento del antígeno) y componentes de la vía eferente (destrucción del antígeno). La cantidad de células CPA y el drenaje linfático del SNC a los órganos linfoides constituyen los componentes de la vía aferente, mientras que la BHE, la cantidad de linfocitos activados, las células NK y LAK así como las inmunoglobulinas secretadas, constituyen los componentes de la vía eferente.

Células presentadoras de antígenos (CPAs) en el SNC

Las células clásicas CPA (células dendríticas) que residen en casi todos los tejidos del organismo, están ausentes en el SNC. Sin embargo existen células que expresan moléculas del MHC y pueden funcionar como CPAs (Fontana y cols. 1987, Streit y Graeber 1988); dichas células son conocidas como células de la microglia, mismas que son consideradas como los macrófagos residentes del SNC. Además existe evidencia de que otras células como los astrocitos, también son capaces de expresar MHC clase I y MHC clase II y de esta manera funcionar como CPA (Fontana y cols. 1984). Así también los oligodendrocitos (Ting y cols. 1981), las células del endotelio vascular (Sloan y cols. 1991, McCarron y cols. 1991) y algunas células localizadas en

leptomeninges y regiones perivascuales del SNC son capaces de expresar moléculas del MHC clase II, pero hasta el momento no se les ha reconocido propiamente la actividad de CPA.

Finalmente en regiones periventriculares, leptomeninges y plexo coroideo de cerebro humano normal se han localizado poblaciones de células mononucleares con receptores para la región Fc de las IgG (R Fc IgG), mismos que presentan una actividad muy similar a la presentada por los R Fc IgG de los monocitos y macrófagos de sangre periférica (Peress y cols. 1989).

Moléculas del MHC en el SNC

En el ser humano la regulación de la expresión de moléculas clase I y clase II es compleja, puede ser afectada por la edad, la anatomía regional y por lesiones locales o remotas.

Puede influir en patrones y grados de RI mediada por linfocitos T (Sobel y Ames 1988) y pueden identificarse también en placas de esclerosis múltiple y en la vecindad de ciertos tumores neurales (Lampson 1987).

En condiciones normales, solo algunas células del SNC expresan bajas cantidades de moléculas del MHC; sin embargo, tanto en fetos de ratas como en ratas adultas se ha demostrado que varias de las células del SNC tienen la capacidad de expresar dichas moléculas bajo ciertas condiciones (condiciones patológicas). En primer término tenemos a las células de la microglia que son por excelencia, las células fagocíticas del SNC, son capaces de expresar moléculas del MHC clase I y clase II (Konno y cols. 1989). Los astrocitos (Massa 1987, Wekerle y cols. 1986), son también capaces de expresar moléculas del MHC clase II después de tener contacto con interferón gamma y de esta forma son capaces también de actuar como CPAs (Fontana y cols. 1984) e incluso secretar algunas interleucinas (IL1) y prostaglandinas (PGE1) (Nicholas y Amason 1989). Las células endoteliales por otro lado, también pueden expresar moléculas del MHC clase II al estar en contacto con interferón gamma (McCarron y cols. 1991) y pueden inclusive funcionar como CPAs (Wagner y cols. 1985). Finalmente otras células como los oligodendrocitos (Ting y cols.

1981), los pericitos, las células de plexo coroideo y leptomeninges (Wekerle y cols. 1986) y las células de la capa muscular de los vasos cerebrales (Hart y cols. 1987), también son capaces de expresar moléculas del MHC clase II.

Antígenos menores de histocompatibilidad en el SNC

Los antígenos menores de histocompatibilidad se expresan en una gran cantidad de tejidos y pueden ser tejido-específicos. Su expresión, se cree, se lleva a cabo en coordinación con las moléculas del MHC. En las células neurales se ha observado la expresión de antígenos como el SKn-1 y el H-Y (Steinmuller 1983) pero hasta el momento no existen datos que determinen si estos antígenos son capaces de originar una respuesta auto inmune después de una lesión al SNC, pero sí existen datos que determinan su capacidad antigénica cuando son objeto de trasplante (Nicholas y Arnason 1989).

Drenaje linfático en el SNC

No existen vasos linfáticos convencionales en el parénquima del SNC (Yoffey y Courtice 1970), sin embargo no podemos deducir que no exista paso de líquidos o partículas del parénquima del SNC al sistema linfático. Si se inyecta material macromolecular radioactivo en el núcleo caudado de conejos, 50% de la radioactividad es recobrada en los nódulos linfáticos cervicales (Bradbury y Westrop 1983). Se han realizado estudios similares en otras especies y también se ha recobrado un porcentaje de radioactividad en los linfáticos cervicales (Bradbury 1990). Estos hallazgos indican que existe una vía por medio de la cual se comunica el SNC con el sistema linfático. En ratas por ejemplo, el líquido intersticial del cerebro es transportado a través de vías convencionales de baja resistencia (Cser y cols. 1990) hasta el espacio subpial; de aquí drena finalmente al espacio subaracnoideo para formar parte del líquido cefaloraquídeo (LCR). En

roedores existen dos rutas de drenaje del LCR, a través de las velocidades aracnoideas y a través de la lamina cribiforme. Con respecto a esta última, existen estudios ultra estructurales que indican que a nivel de la mucosa nasal existen numerosos espacios que remedan capilares linfáticos terminales (Erich y cols. 1986) y es en este sitio donde se cree, se lleva a cabo el paso de LCR del SNC al sistema linfático. En humanos también se ha demostrado el paso del LCR a los nódulos linfáticos regionales (Nicholas y Arnason 1989, Key y Retzius 1875) y más aún en reacciones inflamatorias crónicas como la esclerosis múltiple se ha descrito que los espacios perivascuales se transforman en tejido linfático (Princeas 1989). Además, en condiciones normales, se sabe que una gran proporción de LCR drena directamente del espacio subaracnoideo a la circulación venosa a través de las velocidades aracnoideas y más aún, pequeñas proporciones de LCR pueden llegar al sistema linfático a través de la raíz de los nervios espinales y nervios ópticos.

La barrera hemato-encefálica

En condiciones normales la BHE impide el paso de las células del SI al SNC, sin embargo, se ha demostrado que los linfocitos activados, independientemente de su especificidad antigénica, en condiciones fisiológicas son capaces de atravesar la BHE (Wekerle y cols. 1986). Por otra parte, existen áreas a nivel de los órganos periventriculares que están libres de BHE (Lampson 1987). Finalmente, en enfermedades neurológicas, se puede llevar a cabo la producción de inmunoglobulinas dentro del SNC (Sharief y cols. 1990).

Respuesta celular en el SNC

En condiciones normales, un número pequeño pero consistente de linfocitos T activados, "vigilan" el SNC. Dichos linfocitos tienen la capacidad de adherirse en forma inespecífica a las células endoteliales para posteriormente atravesar la BHE y migrar al SNC (Steinman 1990). Al parecer los linfocitos T durante su activación adquieren una serie de enzimas y receptores que les ayudan a abrir y atravesar las fuertes uniones existentes entre las células endoteliales

(Wekerle y cols. 1986); de tal forma que cualquier célula T activada, independientemente de su especificidad antigénica puede ser capaz de atravesar la BHE (Cross y cols. 1990, Steinman 1990).

Moléculas de adhesión como la ICAM-1 pueden expresarse en las células endoteliales de los vasos del SNC por la acción del interferón gamma (Pryce y cols. 1991) , la IL-1 y el factor de necrosis tumoral (Pober y cols. 1986) y pueden funcionar como moléculas de adhesión entre la célula endotelial y el linfocito, a través del receptor LFA-1 de este último. Esta adhesión (ICAM-1---LFA-1) podría estar facilitando el paso del linfocito a través del endotelio vascular hacia el parénquima del SNC (Pryce y cols. 1991) constituyendo de esta forma, la principal ruta de migración del linfocito al SNC pero no la única pues también se sabe que los linfocitos T CD4+ pueden interactuar con las células endoteliales a través de las moléculas del MHC clase II y dicha interacción puede facilitar también la migración de estas células al SNC (McCarron y cols. 1991).

Las diferentes poblaciones de linfocitos T se adhieren en forma distinta al endotelio cerebral; los CD8+ se adhieren más que los CD4+ (Pryce y cols. 1991), pero una vez que los linfocitos ganan acceso al SNC, éstos presentan diferentes propiedades inmunoregulatorias y fenotípicas comparadas con las presentadas por los linfocitos de sangre periférica, de tal forma que, en LCR de pacientes con esclerosis múltiple por ejemplo (enfermedad en la que existe un extenso infiltrado de linfocitos al SNC), se han encontrado proporciones muy bajas de linfocitos CD8+ y muy altas de CD4+ comparadas con las proporciones de linfocitos de sangre periférica (Freedman y cols. 1990).

Finalmente, se ha demostrado que los linfocitos T sensibilizados son altamente específicos a una porción peptídica (epitopo- dominante) de la proteína básica de la mielina (PBM) localizada en la secuencia 86-105 y 152-170 (Chou y cols. 1989, Richert y cols. 1989).

Los anticuerpos en el SNC

Anteriormente mencionamos que, en el SNC puede llevarse a cabo la activación y proliferación de los linfocitos T; por tanto, es factible que se estimule la formación de anticuerpos específicos. Los anticuerpos son producidos por las células plasmáticas, mismas que son el resultado de la diferenciación de los linfocitos B. Los linfocitos B al igual que los linfocitos T tienen la capacidad de adherirse al endotelio vascular de los vasos sanguíneos en el SNC (Pryce y cols. 1991), así mismo se ha demostrado que tienen la capacidad de atravesar la BHE por medio de diapedesis e ingresar al parénquima del SNC (Guizar- Sahagún y cols. en prensa) y más aún, como ya se mencionó anteriormente, puede llevarse a cabo la síntesis de inmunoglobulinas dentro del SNC (Sharief y cols. 1990). Algunos estudios han demostrado la participación de los anticuerpos en enfermedades de tipo desmielinizante como la EAE y la esclerosis múltiple (Bernheimer y cols. 1988, Link y cols. 1990), e inclusive se han identificado los epitopos en la PBM, contra los que está dirigida la respuesta humoral (Hashim y Day 1988).

Por otra parte se ha demostrado la presencia de las proteínas del complemento en el SNC (Rodríguez y cols. 1990) lo que permite garantizar la actividad efectora de los anticuerpos.

Con lo que hasta el momento se ha mencionado se puede concluir que el "privilegio inmunológico" del SNC no es absoluto, que en condiciones fisiológicas, aunque no en la misma forma que en otros lugares del organismo, puede desarrollarse una RI y que en condiciones patológicas (neoplasias, enfermedades auto inmunes, intervenciones quirúrgicas, lesiones traumáticas etc.) puede contar con todo lo necesario para desarrollar una RI contra los propios antígenos neurales o bien contra tejidos trasplantados con fines terapéuticos. Así pues, el SI en condiciones patológicas, puede estar funcionando como un probable factor en contra del propio organismo. Después de una LTME el SI puede estar provocando una mayor destrucción e inhibiendo también una probable regeneración al atacar a las células neurales (Willenborg 1977). Por otra parte, actualmente los trasplantes al SNC ofrecen grandes ventajas como medida terapéutica para estimular la regeneración tanto en los casos de lesión (Tessler 1991, Reier y

cols. 1992) como en una gran variedad de enfermedades neurológicas (Madrazo y cols. 1988) y en este caso el SI al provocar el rechazo del trasplante, también esta funcionando como un gran obstáculo a la regeneración del SNC.

RESPUESTA INMUNE DESPUES DE UNA LESION TRAUMATICA AL SNC

Respuesta celular

Uno de los efectos más tempranos después de una lesión al SNC es el desequilibrio de la BHE lo que permite un estrecho contacto entre el SI y el SNC (ver fig. 3). La recuperación de la BHE depende en gran parte de los astrocitos que al delimitar el daño proliferan en grandes cantidades para recuperar el equilibrio en la BHE (Berry 1974). Dichos astrocitos, al ponerse en contacto con citocinas (interferón gamma) secretadas por linfocitos activados, expresan moléculas del MHC clase I y Clase II, de tal manera que son capaces de funcionar como CPAs (Massa 1987, Wekerle y cols. 1986).

Por otra parte las células fagocíticas nativas (microglia) y extrañas (macrófagos) al SNC, así como los polimorfo nucleares (PMN) (neutrófilos y células cebadas) extrañas también al SNC, son reclutadas al lugar de la lesión originando una intensa reacción inflamatoria en el área y un daño mayor (Wakefield y Eidelberg 1975). Los macrófagos por ejemplo, al estar activados, secretan proteasas que son altamente mielolíticas, factores de proliferación astrocítica (Blightn 1985, Perry y Gordon 1988, Giulian y Robertson 1990) y algunas citocinas (IL-1); de tal forma que además de aumentar el número de astrocitos y con ello de CPAs, activan por medio de la IL-1 a los linfocitos T. Los neutrófilos por otro lado, son capaces de atacar a las células neurales (neurofagia) y provocar un mayor daño (Anderson 1992). Las células cebadas, contienen proteasas en sus gránulos, las cuales tienen una alta capacidad mielolítica, por otro lado la PBM y la P2 son capaces de estimular la degranulación de las células cebadas (Johnson y cols. 1988). Así pues las células cebadas pueden originar desmielinización y ésta por si misma estimular la degranulación de las células cebadas formando de esta manera un círculo vicioso y con ello daño tisular.

Finalmente, al mismo tiempo que se están llevando a cabo todos estos procesos, todas las CPAs reclutadas pueden presentar antígenos neurales a los linfocitos T CD4+ (Blightn 1985) mismos que al llevar a cabo esta interacción, se activan y una vez activados secretan factores de

crecimiento, proliferación, activación y migración (IL-2,IL4,IL6,INF gamma,etc) para otras células del SI (linfocitos T CD8+, macrófagos, neutrófilos, y células B) originando con esto una mayor destrucción.

Respuesta humoral

En lo referente a las células B, además de funcionar como CPAs, al estar en contacto con linfocinas como la IL-2,IL-4,IL-6; se se pueden diferenciar a células plasmáticas mismas que son capaces de producir anticuerpos específicos contra antígenos neurales (Mizrachi y cols. 1983, Taranova y cols. 1992) dando lugar a una probable formación de complejos inmunes mismos que pueden contribuir al daño tisular (Palladini y cols. 1987, Iumashev y cols. 1991) (figura 3).

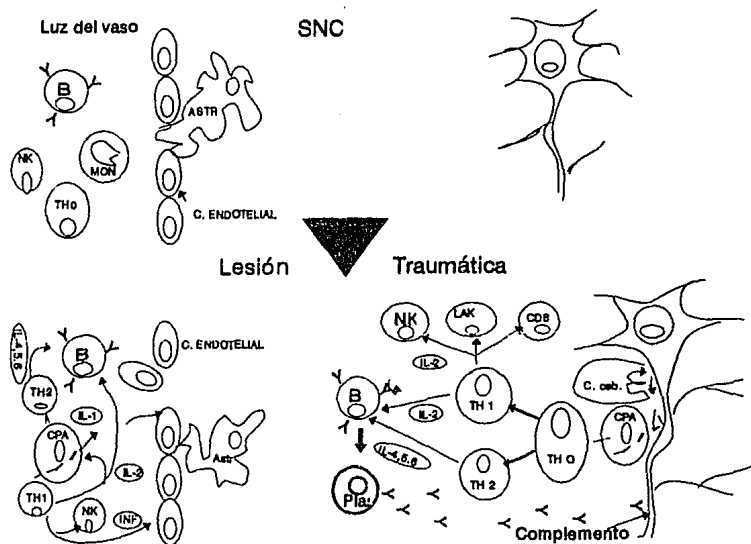


FIGURA 3. Esquema propuesto para explicar la respuesta inmune después de una lesión traumática al SNC. En el SNC la BHE impide que las células del SI reconozcan como propios a los antígenos neurales. Después de una lesión, hay ruptura de la BHE lo que permite un estrecho contacto entre las células del SI y las del SNC, de tal forma que, se puede desarrollar una respuesta inmune contra los antígenos neurales.

RESPUESTA INMUNE CONTRA TRASPLANTES AL SNC

El mismo procedimiento quirúrgico realizado para llevar a cabo el trasplante provoca el desequilibrio de la BHE y con ello, las células del SI pueden estar en contacto con las células del trasplante pero también con las células neurales, de manera que podría originarse una respuesta auto inmune (ver el apartado anterior) además de la RI contra el trasplante. Una vez llevado a cabo el trasplante, el primer factor importante para desencadenar la RI es el número de CPAs con moléculas del MHC clase II derivadas del donador y el número de células CPAs derivadas del receptor (células de la microglia) en la región del trasplante. Las CPAs del donador presentan en forma directa el antígeno a los linfocitos T mientras que las CPAs del receptor lo hacen también pero en forma indirecta (Shoskes y Wood 1994). Posteriormente, las CPAs en el mismo sitio del trasplante o bien migrando hacia el tejido linfático regional (ganglios cervicales) pueden provocar la activación y proliferación de los linfocitos T CD4+ mismos que al estar activados secretan los factores (citocinas) de migración, proliferación y activación para las células efectoras nativas (microglia) y extrañas al SNC (macrófagos, linfocitos T CD8+, células NK), que son las que se dirigirán a destruir el trasplante. Las células extrañas al SNC son capaces (como ya se mencionó anteriormente) de atravesar la BHE y una vez que llegan al trasplante pueden proliferar localmente (Nicholas y Amason 1989), originando así otro factor de rechazo local.

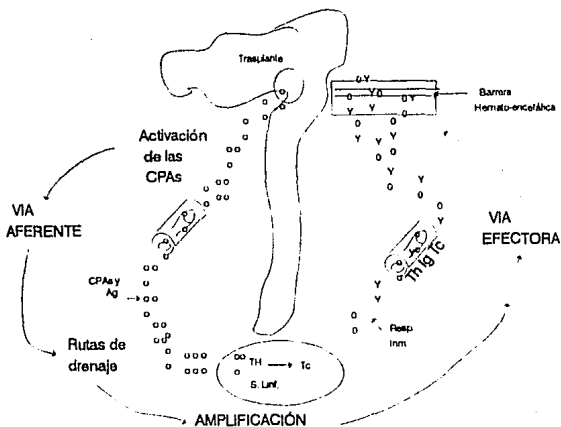


FIGURA 4. Esquema que propone la respuesta inmunológica contra trasplantes en el SNC. La sensibilización se puede llevar a cabo vía LCR en los ganglios cervicales (vía aferente) y aquí mismo da inicio la vía eferente (vía eferente) constituida por los linfocitos T cooperadores, T citotóxicos y los anticuerpos.

INMUNOSUPRESION

La respuesta auto inmune desarrollada contra los antígenos neurales después de una LTME y la RI dirigida contra los trasplantes colocados en dicha área con fines terapéuticos podrían estar funcionando como un obstáculo a la probable regeneración del SNC. Por tal motivo es necesaria la utilización de un adecuado esquema inmunodepresor.

A partir de la década de los 50s se empezaron a ensayar diferentes tipos de Inmunosupresión entre ellos la irradiación corporal total (Dempster y cols. 1950, Lindley y cols. 1955), el uso

de fármacos como los corticosteroides (Billingham y cols. 1951), 6-mercaptopurina, (Calne 1960) (azatioprina) y ciclofosfamida entre otros (Starzl 1990). Algunos de estos fármacos en su momento fueron útiles pero en su momento dejaron de ser utilizados por su gran toxicidad, posteriormente se empezó a utilizar la globulina antilinfocitos (Starzl y cols. 1967) misma que tuvo que administrarse en combinación con los fármacos anteriores por no funcionar tan eficiente mente.

A partir de 1980 se empieza a hacer uso de inmunodepresores con una menor citotoxicidad y una mayor selectividad por células del SI. La ciclosporina A (CsA) y el FK506 son fármacos que inhiben en forma selectiva la proliferación de los linfocitos T CD4+; siendo la CsA la más utilizada actualmente (Kahan 1989).

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra receptores específicos en los linfocitos T CD4+ también podrían ofrecer grandes ventajas como parte de un esquema inmunodepresor y por ello actualmente son también objeto de estudio (Starzl 1990).

Corticosteroides

El más utilizado es la prednisona. Su mecanismo de acción es muy complejo; afecta la función de los linfocitos T y de los macrófagos e inhibe la migración de los monocitos al sitio de inflamación e interfiere con la producción de IL-1, IL2 e IL-6 afectando por tanto en forma indirecta la función de los linfocitos T CD4+ (Fuchs y Bullerd 1988).

Azatioprina

La azatioprina en el hígado es metabolizada a 6-mercaptopurina y funciona inhibiendo la síntesis del DNA y por tanto la división y proliferación celular. Por su acción sobre la división celular impide la formación de células mieloides en la médula ósea y por lo tanto puede originar además de leucopenia también trombocitopenia (Council on Scientific Affairs 1987).

Ciclofosfamida

La ciclofosfamida inhibe también la síntesis de DNA, impidiendo así la replicación de los linfocitos pero también de otras células (fibroblastos, macrófagos) cuya replicación es también rápida. Suprime también la función del sistema reticuloendotelial originando una gran inmunosupresión y citotoxicidad. (Many y Schwartz 1970).

Anticuerpos monoclonales

Los linfocitos T para ser activados requieren de la interacción de sus moléculas CD4 o CD8 (cooperadores y citotóxicos respectivamente) y su RLT, con sus respectivas moléculas en las CPAs. Algunos estudios han demostrado que la inyección de anticuerpos monoclonales anti-CD4 a un ratón trasplantado, origina tolerancia y una gran sobrevida del trasplante (Sloan y cols. 1991).

Otro sitio posible de acción de los anticuerpos es el RLT y el receptor de IL-2 en el linfocito. La administración de anticuerpos contra dichos receptores también ha demostrado que prolongar la sobrevida de los trasplantes al inhibir la activación del linfocito (Starzl 1990).

FK 506

Es un antibiótico del grupo de los macrólidos que ha demostrado ser de 10 a 100 veces más potente que la CsA. Inhibe la transcripción del RNAm de la IL-2 y por tanto inhibe la proliferación de los linfocitos T, la secreción de otras linfocinas (interferón gamma) y la acumulación de RNAm de IL-3, IL-4, Interferón gamma y factor de necrosis tumoral en los linfocitos (Bierer y cols. 1990, Yoshimura y cols. 1989).

Acido micofenólico (RS-61443)

Inhibe la síntesis de GMP y consecuentemente de GTP y GDP los cuales juegan un papel muy importante en el metabolismo de los linfocitos, dando como resultado un efecto antiproliferativo en forma selectiva sobre los mismos (Sollinger y cols. 1992). Este fármaco bloquea en forma selectiva la proliferación de linfocitos T y B, inhibe la formación de anticuerpos y la generación de linfocitos T citotóxicos (Eugui y cols. 1991).

Ciclosporina A

Actualmente es el fármaco más utilizado y que mejores resultados ha dado en relación a la prolongación de la sobrevida de un trasplante.

La CsA es un polipéptido neutral, cíclico lipofílico de 11 aminoácidos y con peso molecular de 1,202.6. A bajas concentraciones (menores a 10 microM) inhibe la transcripción del RNAm para la síntesis de IL-2 y otras linfocinas durante el proceso de activación de los linfocitos T por tanto inhibe su activación y proliferación en forma selectiva (Kahan 1989).

La CsA a diferencia de los corticosteroides, la azatioprina, y la ciclofosfamida actúa en forma selectiva sobre los linfocitos T CD4+ y ofrece un mucho menor rango de citotoxicidad ya que no actúa sobre la proliferación de otras células; además también a diferencia de los anticuerpos monoclonales, el FK506 y el RS- 61443; la CsA es un inmunodepresor bastante investigado y con la ventaja de que actualmente ha dejado de estar en fase experimental, pues una gran cantidad de estudios experimentales (Nakayasu y cols. 1990, Green 1988) y clínicos (Vries y cols. 1990, The Múltiple Sclerosis Study Group 1990, Hodgkinson y cols. 1990, Tugwell y cols. 1990) apoyan su gran utilidad. Además, también a nivel del SNC, se ha demostrado su efectividad en animales de experimentación al promover la sobrevida de aloinjertos y xenoinjertos intracerebrales. (Nicholas y Arnason 1989, Finsen y cols. 1988, Marion y cols. 1990, Brundin y cols. 1985).

Finalmente en nuestro medio, la CsA es el fármaco inmunodepresor más accesible. Todo lo anterior lo hace ser hasta el momento el inmunodepresor de elección. Por tal motivo consideramos de gran importancia revisar de manera más extensa las características de este fármaco.

GENERALIDADES SOBRE CSA

La CsA es un polipéptido cíclico, lipofílico extraído del *Tolypocladium inflatum* Gams. Su sitio inmunodepresor se localiza en los aminoácidos colocados en las posiciones 11, 1, 2 y 3. En la clínica la CsA se estabiliza usando como vehículo el aceite de oliva para la administración oral y con aceite de castor (cremophor) para la vía intravenosa (Kahan 1989).

Absorción

Cuando se administra la CsA vía intravenosa el total de la dosis ingresa a la circulación, mientras que la de la administrada vía oral es muy variable debido a su lenta e incompleta absorción en la primera porción del intestino delgado, en un proceso que es bilis-dependiente, de tal manera que la fracción de la dosis de la CsA que finalmente llega a la circulación (biodisponibilidad) es muy variable. En ambos casos (vía intravenosa o vía oral) la concentración máxima de la droga en la circulación (C_{max}) se puede observar en un promedio de 3.8 hrs después de haber sido administrada. En general la absorción de la CsA administrada por la vía oral, es afectada por colestasis, vaciamiento gástrico lento, motilidad intestinal aumentada, esteatorrea, secreción pancreática exócrina disminuida. Por otro lado se puede promover su absorción coadministrándola con el alimento, en el caso de la vía oral.

Distribución

La mayor parte de la CsA en la circulación se une con lipoproteínas de alta, baja y muy baja densidad (34,34 y 10 respectivamente) y con quilo micrones (Ryffel y cols. 1988). La extensión de tejido donde la CsA se deposita es muy variable de paciente a paciente, su volumen de distribución va de 4 a 8 litros por kilogramo de peso. El lugar de mayor depósito de CsA es el hígado, seguido por el páncreas, la grasa, la sangre, el corazón, el pulmón, el riñón y el tejido neural y el muscular (Kahan 1989).

Biotransformación

La CsA a nivel hepático es convertida por isoenzimas de la superfamilia del citocromo P-450 en metabolitos que retienen la estructura cíclica y que son de una alta polaridad. La coadministración de fármacos que interactúan con el sistema del citocromo P-450 pueden afectar el metabolismo de la CsA. Así pues, los fármacos inhibidores del citocromo P-450 (Ketoconazol, andrógenos, metilprednisolona, diltiazem etc.) incrementan los niveles de CsA; mientras que los fármacos que inducen la formación de la citocromo P-450 (rifampicina, fenobarbital, carbamazepina, ácido valproico, etc.) disminuyen los niveles de CsA (Kahan 1989).

Eliminación

La CsA se elimina principalmente a través de la biotransformación y sólo una pequeña proporción (el 6% aproximadamente) se elimina vía renal. Su vida media (tiempo requerido para que la droga disminuya a la mitad de su concentración plasmática máxima) es de 6.4 a 8.7 horas. La eliminación de la CsA es muy variable de paciente a paciente, obteniéndose un rango de depuración de 2 a 32 ml por minuto por Kg (Kahan 1989).

Acciones inmunodepresoras

La CsA inhibe la cascada de activación necesaria para las funciones inmunes específicas, particularmente la producción de linfocinas (IL-2). El mecanismo preciso de acción de la CsA no se conoce pero existen algunas hipótesis: a) la CsA a nivel citoplasmático se une a la calmodulina y de esta manera se interrumpe la transducción para la producción de linfocinas. b) inhibe la función de proteínas activadoras que median la transducción a nivel citoplasmático. c) inhibe proteínas potenciadoras de la transcripción a nivel nuclear. d) a grandes concentraciones, inhibe la RNA polimerasa (Kahan 1989).

A nivel tímico, la CsA disminuye el número total de timocitos e inhibe su desarrollo (Beschoner y cols. 1988). Disminuye la expresión de moléculas del MHC clase II y la síntesis de prostaglandina E2 en células accesorias (Kahan 1989).

Efectos tóxicos

La administración diaria de CsA puede originar alteraciones neurológicas (tremor, parestesia plantar, depresión psíquica, dolor de cabeza, confusión y somnolencia), dermatológicas (hipertriosis, hiperplasia gingival), gastrointestinales (anorexia, náusea, vómito), endocrinas (hiperglucemia, ginecomastia), hepáticas (colestasis, hiperbilirubinemia, niveles altos de aminotransferasas en suero, necrosis tisular), óseas (osteoporosis), hematológicas (trombosis), renales (necrosis tubular) (Kahan 1989).

Métodos de análisis

La naturaleza química de la CsA ha dificultado el desarrollo de técnicas de análisis por su alto peso molecular y su muy baja absorbancia a la luz ultra violeta. Actualmente existen varias técnicas analíticas para medir CsA en líquidos biológicos (Tjandra-Maga y Verbesselt 1990):

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Es una técnica que permite medir la CsA original en forma separada de sus metabolitos. Es por lo tanto, la técnica más fidedigna pero también la que consume más tiempo pues se requiere del desarrollo de procedimientos de extracción muy elaborados (Sawahuk y Cartie 1981) lo que no la hace una técnica de uso práctico.

Radioinmunoanálisis (RIA)

Esta técnica utiliza una combinación de ciclosporina A marcada con un isótopo radioactivo (^{125}I ó ^3H) como indicador y un anticuerpo policlonal o monoclonal contra ciclosporina A.

Son menos específicas las que utilizan un anticuerpo policlonal (125I-RIA policlonal) pues miden la CsA y sus metabolitos de manera global. Las que utilizan un anticuerpo monoclonal son más específicas (^3H -RIA monoclonal y 125I-RIA-monoclonal). El anticuerpo es producido inmunizando a un ratón con ovalbúmina de pollo conjugada a una molécula de CsA que contenga una sustitución de D-lysyl en la posición 8. Este anticuerpo no reacciona cruzadamente con los metabolitos de la CsA permitiendo así una medición más exacta de la concentración real de la CsA (Quesniaux y cols. 1987).

Recientemente se han introducido dos sistemas de RIA diferentes, el Sandimmun-específico y el Cyclo-Trac SP; ambos basados también en el sistema de anticuerpos monoclonales contra la CsA. Ninguno de los dos mostró reacción cruzada a los metabolitos de la CsA (Sung y cols. 1988)

Selección de la dosis de acuerdo a las variables farmacocinéticas

La "ventana terapéutica" de la CsA en el humano es de 0.12 a 0.275 ug/ml en plasma, de 0.05 a 0.3 ug/ml en plasma y de 0.25 a 0.8 ug/ml en sangre total determinada por RIA. Los valores

séricos por arriba o por abajo de dicho rango, se correlacionan con episodios de rechazo del trasplante, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, infecciones o crisis convulsivas (Kahan y cols. 1984). Aún teniendo ésto en consideración, cada individuo presenta un perfil farmacocinético diferente; por tanto la dosis que cada individuo necesita para alcanzar y no sobrepasar el rango terapéutico también es diferente. Tomando en consideración las grandes variaciones interindividuo, podemos darnos cuenta que es de suma importancia la realización de un perfil farmacocinético previo al inicio del tratamiento, para que, de esta forma podamos predecir la dosis que alcanzará el rango requerido. Para conocer por ejemplo la dosis inicial de CsA que se debe administrar a un individuo que va a recibir un trasplante, el calculo debe basarse en la relación lineal entre la dosis y el AUC plasmática. La dosis necesaria para alcanzar una concentración sérica promedio de 0.2 ug/ml en la mayoría de los pacientes con trasplante renal es de 6mg/kg/día (Kahan 1989).

Biodisponibilidad de la CsA en humanos y en ratas sin LTME (Dosis de 10mg/kg/día)

La biodisponibilidad de la CsA tiene una gran variabilidad entre cada individuo. En el humano por ejemplo, la CsA administrada por la vía oral presenta una C max promedio de 1.08±0.744 ug/ml, y un AUC de .765±0.593 ug/ml/hr, mientras que la administrada por la vía intravenosa (IV) presenta una Cmax mayor de 2.0 ug/ml, y un AUC de 1.93±1.3 ug/ml/hr (Kahan y cols. 1985). En ratas, los valores obtenidos por 2 diferentes autores son los siguientes:

Didlake y cols. (Didlake y cols. 1988) reportan , que al administrar 10 mg/Kg/día de CsA en una sola dosis por la vía oral la C max promedio es de 2.42±0.99 ug/ml, y el AUC de 25.31±7.56 ug/ml/h; mientras que cuando se administra la misma dosis por la vía intravenosa (IV), la C max no es reportada pero el AUC es de 7.77± 1.73 ug/ml/h.

Wassef y cols. (Wassef 1985) por su parte reportan para la CsA administrada por vía oral también a la dosis de 10 mg/kg/día una C max de 0.4±0.2 ug/ml y una AUC de 2.733±0.49

ug/hr/ml; mientras que para la administrada por la vía intraperitoneal (IP) una C max de 3.8 +-0.2 ug/ml y una AUC de 11.82+- 0.14 ug/h/ml.

TABLA I

Biodisponibilidad de la CsA en humanos y ratas después de una dosis de 10mg/kg/día en condiciones fisiológicas.

Especie	Vía	Cmax (ug/ml)	AUC (ug/ml/h)	Ref
Humanos	oral	1.08+-0.74	0.76+-0.59	Kahan y cols
	IV	---	1.93+-1.3	1985
Ratas	oral	2.42+-0.99	25.31+-7.56	Didlake y cols.
	IV	-----	7.77+-1.73	1988
	oral	0.4+-0.2	2.733+-0.05	Wassef y cols.
	IP	3.8+-0.2	11.82+-0.14	1985

Los valores se presentan como promedio +- la desviación estándar, determinados por RIA.

Como se puede observar, la biodisponibilidad de la CsA es muy variable; se encuentran diferencias inter-especie e inclusive intra-especie, lo que nos hace reflexionar en lo importante que es la realización de un estudio farmacocinético previo al inicio del tratamiento con dicho

fármaco pues es de gran importancia conocer la dosis de CsA que a final de cuentas va a ser de utilidad en un individuo determinado.

Después de una LTME sobrevienen una serie de fenómenos fisiopatológicos que alteran la absorción, disposición y eliminación de algunas drogas (Halstead y cols. 1985), de tal manera que la biodisponibilidad de ciertos fármacos podría estar alterada en individuos con LTME.

Algunos estudios han demostrado que la biodisponibilidad de ciertos fármacos como la teofilina y la gentamicina se encuentra disminuida en individuos con LTME (Segal y cols. 1985A, Segal y cols. 1986A, Segal y cols. 1985B). En el caso de la gentamicina se investigó la vía intravenosa y la intramuscular mientras que en el caso de la teofilina se investigó la vía oral solamente. En cada caso se observó una disminución en la biodisponibilidad del fármaco independientemente de la vía de administración, lo que sugiere que estas drogas pueden no estar ejerciendo en forma eficaz su acción terapéutica en pacientes con LTME. En la LTME podemos distinguir a grosso modo 2 fases: la fase aguda y la fase crónica. En cada fase existen diferentes características neurofisiológicas que pueden originar diversas alteraciones. En la fase aguda por ejemplo se presenta el choque medular, mismo que se caracteriza por una disminución importante de la actividad nerviosa por abajo del nivel de la lesión, con movimientos voluntarios y reflejos abolidos. En la fase crónica, la médula espinal aislada y sus nervios espinales muestran gradualmente actividad neuronal autónoma, caracterizada por actividad refleja mínima y actividad flexora espasmódica, entre otros signos (Noback y Demarest 1980).

JUSTIFICACION

En nuestro grupo de investigación sobre la regeneración del SNC nos proponemos investigar el efecto de la inmunosupresión sobre la remielinización de los axones de la médula espinal después de una lesión traumática y hemos elegido la CsA como el fármaco inmunodepresor para nuestro modelo experimental de LTME, por ser el inmunodepresor más usado para evitar el rechazo de trasplantes neurales y por otras ventajas ya mencionadas. Sin embargo es importante estudiar la biodisponibilidad de este fármaco en nuestro modelo experimental, en la fase aguda y en la fase crónica de la LTME ya que en ambas etapas existen diferentes características neurofisiológicas que pueden originar diversas alteraciones. Es importante en una primera fase de esta investigación conocer la biodisponibilidad de la CsA tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la LTME, después de aplicar una dosis de 10 mg/kg/día, dosis que se utiliza en humanos en forma protocolaria para trasplantes de tejidos a SNC (Brundin y cols. 1985). Posteriormente en una segunda fase debemos establecer el esquema que nos garantice niveles útiles y lo menos tóxicos posibles de CsA durante la fase aguda (24 hrs pos lesión), sub aguda (72 hrs pos lesión) y crónica (>30 días pos lesión) de la LTME. En esta fase tomaremos como referencia los valores que representan la ventana terapéutica en el humano (0.12 a 0.275 ug/ml) ya que en la rata no existen dichos valores. Finalmente en una tercera fase debemos evaluar la utilidad de dicho esquema y en este caso lo realizaremos evaluando el efecto del esquema inmunodepresor sobre la recuperación clínica de ratas con LTME.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La CsA puede ser utilizada en modelos experimentales de LTME para controlar la respuesta auto inmune observada después del trauma así como la RI dirigida contra trasplantes colocados en el sitio de lesión con fines terapéuticos. Sin embargo, algunos estudios han sustentado que la biodisponibilidad de algunos fármacos esta disminuida en pacientes con LTME.

Así pues, las preguntas a responder son:

1. ¿ Existen alteraciones en la biodisponibilidad de la ciclosporina-A en ratas con LTME dependientes del estadio (agudo o crónico) y de la vía de administración (oral e intraperitoneal)?
2. ¿ Cual es la dosis y la vía de administración que mantenga los niveles de CsA dentro del rango de 0.12 a 0.275 ug/ml, durante la fase aguda, sub aguda y crónica de la LTME?
3. ¿ El esquema inmunodepresor elegido tiene algún efecto sobre la recuperación clínica de las ratas con LTME?

HIPÓTESIS

1. La biodisponibilidad de la CsA en ratas con LTME se encuentra disminuida y la magnitud de esta disminución depende del estadio de la lesión y de la vía de administración de la droga.
2. Durante la fase aguda de la lesión la mejor vía de administración es la intraperitoneal mientras que para las fases sub aguda y crónica la mejor es la vía oral.
3. La aplicación del tratamiento inmunodepresor elegido, tendrá efecto positivo sobre la recuperación clínica de ratas con LTME.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Analizar la biodisponibilidad de la CsA administrada por la vía oral o intraperitoneal en diferentes etapas de la lesión traumática de la médula espinal en ratas, en función de establecer un esquema de administración de CsA dentro del rango establecido (0.12 a 0.275 ug/ml) y que provoque un efecto inmunodepresor que permita la recuperación clínica de ratas con LTME.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Comparar la biodisponibilidad de la CsA administrada por la vía oral
 - 1.1 Entre las ratas sin LTME y las ratas con LTME en fase aguda.
 - 1.2 Entre las ratas sin LTME y las ratas con LTME en fase crónica.
 - 1.3 Entre las ratas con LTME en fase aguda y las ratas con LTME en fase crónica.

2. Comparar la biodisponibilidad de la CsA administrada vía intraperitoneal
 - 2.1 Entre las ratas sin LTME y las ratas con LTME en fase aguda.
 - 2.2 Entre las ratas sin LTME y las ratas con LTME en fase crónica.
 - 2.3 Entre las ratas con LTME en fase aguda y las ratas con LTME en fase crónica.

3. Determinar la dosificación y la vía de administración que mantenga los niveles de CsA dentro del rango establecido como ventana terapéutica en el humano (0.12 a 0.275 ug/ml), durante la fase aguda, sub aguda y crónica de la LTME en ratas.

5. Determinar el efecto del tratamiento inmunodepresor sobre la recuperación clínica de ratas sometidas a una LTME.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se diseñaron 3 series experimentales que se realizaron en forma secuencial. Se utilizaron un total de 87 ratas Long-Evans, hembras, adultas de 14 a 15 semanas de edad y con peso corporal de 220 a 250 g para los 3 experimentos, mismas que se distribuyeron de la siguiente forma:

Primer serie experimental

"Biodisponibilidad de la CsA durante la fase aguda y crónica de la LTME después de administrar 10 mg/kg/día del fármaco o del vehículo."

N= 30 (tabla II)

* A todas las ratas se les realizaron determinaciones de CsA en suero 10 minutos antes y a las 2, 4, 6, 12 y 24 hrs después de la administración del fármaco.

Segunda serie experimental

"Estandarización de la dosis y la vía de administración que mantenga los niveles de CsA en el rango de 0.12 a 0.275 ug/ml".

N= 25 (tabla III)

* Se realizaron determinaciones de CsA en suero 10 minutos antes y a las 2, 4, 6, 12, 18 y 24 hrs después de la administración del fármaco.

Tercer serie experimental

"Evaluación clínica del efecto del esquema inmunodepresor elegido".

N= 32 (tabla IV)

* Se administró el tratamiento inmunodepresor elegido o el vehículo de la CsA y se realizaron pruebas de evaluación clínica durante 90 días de seguimiento.

TABLA II
GRUPOS

Grupo N=5	Procedimiento quirúrgico (PQ)	Fase de estudio	Vía de administración CsA
I	LTME	Aguda (24h pos-PQ)	Oral
II	LTME	Crónica (7 semanas pos-PQ)	Oral
III	Laminectomía	24h pos-PQ	Oral
IV	LTME	Aguda (24h pos-PQ)	Intraperitoneal
V	LTME	Crónica (7 semanas pos-PQ)	Intraperitoneal
VI	Laminectomía	24h pos-PQ	Intraperitoneal

Nota: Los grupos III y VI son los grupos testigo.

TABLA III
GRUPOS

Grupo N=5	Procedimiento quirúrgico (PQ)	Fase de estudio	Vía de administración CsA	Dosis
I	LTME	Aguda (24h pos-PQ)	IP	5mg/kg/día
II	LTME	Aguda (24h pos-PQ)	IP	2.5mg/kg/12hrs
III	LTME	Sub aguda (72h pos-PQ)	Oral	10mg/kg/día
IV	LTME	Sub aguda (72h pos-PQ)	Oral	5mg/kg/12hrs
V	LTME	Crónica (7 semanas pos-PQ)	Oral	5mg/kg/12hrs

TABLA IV
GRUPOS

Grupo N=8	Procedimiento quirúrgico (PQ)	Esquema Inmunodepresor
I	LTME	Si (CsA)
II	LTME	No (Vehículo)
III	Laminectomía	Si (CsA)
IV	Laminectomía	No (Vehículo)

CIRUGÍA (LTME) Y CUIDADOS POS QUIRÚRGICOS

Antes del procedimiento quirúrgico, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de clorhidrato de ketamina (77.5 mg/kg) y clorhidrato de xilazina (12.5 mg/kg). Bajo condiciones de asepsia y antisepsia, se realizó una Laminectomía a nivel T8 exponiendo la médula espinal con la duramadre íntegra. Se colocó al animal en un aparato estereotáxico y se dejó caer un peso de 15 g de una altura de 8 cm a través de un tubo guía (método de Allen modificado para ratas) (Allen 1911). Se corroboró la presencia de hematoma en el área del impacto y finalmente, se suturó por separado el plano aponeurótico y la piel con dermalón 5-0. Después de la cirugía, las ratas

recibieron una sola dosis de penicilina G benzatínica 240,000 UI, IM luego fueron colocadas en una unidad de cuidados intensivos para animales menores (Schroer Manufacturing Co., Kansas City) hasta que se recuperaron de la anestesia.

Los animales fueron alimentados *ad libitum* y colocados en jaulas individuales con aserrín estéril. El intestino y la vejiga neurogénica fueron evacuados mediante compresión manual 2 veces al día hasta que la recuperación de su motilidad fue compatible con su evacuación refleja.

EVALUACIÓN CLÍNICA

(Tercer serie experimental)

A todos los animales se les realizaron pruebas para evaluar locomoción (escala de Tarlov) y recuperación motora del tren posterior (reflejo de apoyo y plano inclinado) durante 90 días. Dichas pruebas fueron realizadas cada 24 hrs durante los primeros 10 días y posteriormente cada 72 hrs hasta los 30 días pos lesión y finalmente cada semana hasta los 90 días del seguimiento.

Escala de tarlov: Evalúa el grado de recuperación en la locomoción del tren posterior en base a 5 grados; grado 0: Sin movilidad de las extremidades posteriores; grado 1: Movimientos de tipo reflejo; grado 2: Movimientos voluntarios y coordinados con la marcha pero sin base de sustentación; grado 3 Movimientos voluntarios coordinados y con base de sustentación; grado 4: Marcha normal (Tarlov 1954, Kunkel 1993).

Plano inclinado: Evalúa la recuperación motora del tren posterior en base a la capacidad del animal para mantenerse sobre un plano que gradualmente avanza de 0 a 90 grados de inclinación. Una rata normal llega a mantenerse sobre el plano hasta los 80 grados de inclinación, mientras que una rata recién lesionada se mantiene hasta los 30-35 grados de inclinación. El animal debe

mantenerse por lo menos 10 segundos para pasar al siguiente grado de inclinación. Cada vez que el animal pasa la prueba, se aumentan 5 grados de inclinación al plano hasta que la rata ya no pueda mantenerse. Los grados de máxima capacidad para mantenerse sobre el plano se determinan para la extremidad izquierda, la extremidad derecha y ambas patas (posición vertical al plano) (Rivlin y Tator 1977, Kunkel 1993).

Reflejo de apoyo: Explora la recuperación funcional y motora de las extremidades posteriores, en esta prueba solo se evalúa la presencia o ausencia del reflejo. El animal es colocado sobre el filo de una mesa con las extremidades posteriores colgando a un lado del filo. Se provoca el roce de la región dorsal de ambas extremidades con el filo. Al realizar esta maniobra el animal deberá encoger y subir ambas extremidades para apoyarlas sobre el plano de la mesa. Toda rata normal realiza sin problemas esta maniobra (Wrathall 1989, Kunkel 1993).

ADMINISTRACIÓN DE LA CSA

Primer y segunda serie experimental

La CsA se utilizó en forma de solución oral 100 mg/ml para la administración por la vía oral y en forma de solución inyectable 50 mg/ml para la vía intraperitoneal (Sandimmune, Sandoz; Basel, Switzerland). Para la administración oral, la solución original fue diluida en aceite de oliva y mezclada mediante agitación a 2000 R.P.M. durante 2 minutos.; de esta mezcla se tomaron 0.5 ml para administrar finalmente la dosis correspondiente a través de una cánula orogástrica. Para la administración intraperitoneal, la solución original fue diluida en solución de NaCl 0.9% y mezclada mediante agitación a 2000 R.P.M. durante 2 minutos; de esta mezcla se tomaron también 0.5 ml para inyectar finalmente la dosis correspondiente con una jeringa de tuberculina (previa asepsia y antisepsia de la región abdominal) en la cavidad intraperitoneal.

Tercer serie experimental

La CsA se preparó y administró según la vía, de acuerdo a lo anteriormente mencionado. El esquema utilizado fue el siguiente: El fármaco o el vehículo del fármaco según el caso, se administró 24 hrs antes de que los animales fueran sometidos al procedimiento quirúrgico a una dosis de 5mg/kg/12hrs por la vía oral. Durante la fase aguda (24 a 72hrs después del procedimiento quirúrgico) se administraron 2.5 mg/kg/12hrs por la vía intraperitoneal y durante las fases sub aguda y crónica se administraron 5 mg/kg/12hrs por la vía oral.

COLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Las muestras de sangre fueron obtenidas bajo anestesia ligera por inhalación de éter etílico, mediante sangría (0.5ml) de la punta de la cola. Las tomas se realizaron 10 minutos antes y a diferentes tiempos (según el experimento) después de la administración de la droga. Después de permitir la coagulación, las muestras se mantuvieron 60 min a temperatura ambiente para posteriormente ser centrifugadas a 2500 r.p.m. durante 30 min, para la obtención de los sueros correspondientes mismos que se congelaron a -20 C hasta ser analizados. Las concentraciones séricas de CsA fueron determinadas mediante Radioinmunoanálisis (sistema Cyclo-Trac SP) (Sung y cols. 1988).

PROCEDIMIENTO DEL RADIOINMUNOANÁLISIS

1. Se preparó una sol. amortiguadora de fosfatos y se dejó reposar a temperatura ambiente al igual que los demás reactivos utilizados.
2. Se diluyó en el sol. amortiguadora de fosfatos, cada estándar, cada muestra testigo y cada muestra a analizar, tomando 50 ul de cada una.

3. Se agregaron 2.5 ml de la solución sol. amortiguadora a los 50ul de cada muestra (dilución 1:51).
4. Se agitaron gentilmente los tubos.
5. Todas las muestras se hicieron por triplicado.
6. Se marcaron los diferentes tubos para la prueba y se les agregaron los reactivos como sigue:
 - a) a los tubos de cuenta total 100 ul de 125 I CYCLO-Trac SP
 - b) a los tubos de unión no específica (NSB) 100 ul del estándar sérico 0 CYCLO-Trac diluido 100 ul de 125 I CYCLO-Trac SP 1.0 ml de CYCLO-Trac SP Immuno Sep NSB
 - c) a los tubos del estándar sérico 0 CYCLO-Trac SP 100 ul del estándar sérico 0 CYCLO-Trac NS diluido 100 ul de 125 I CYCLO-Trac SP
 - d) a los tubos estandars (A-E) séricos CYCLO-Trac SP 100 ul del estándar CYCLO-Trac SP diluido 100 ul de 125 I CYCLO-Trac SP
 - e) a los tubos de las muestras a analizar y las muestras testigo 100 ul del suero diluido 100 ul de 125 I CYCLO-Trac SP
7. Se agregó después de ser agitado vigorosamente 1 ml de Immuno Sep Anti-CYCLO-Trac SP en todos los tubos antes mencionados excepto a los tubos de cuenta total y de unión no específica.
8. Se agitaron en un vortex todos los tubos y se incubaron por 2 hrs a 20-25 grados centígrados.
9. Después del período de incubación se centrifugaron a 1000 x g por 20 min a 20-25 grados centígrados.
10. Se decantó inmediatamente el sobrenadante de los tubos excepto el de los de cuenta total dejándolos boca abajo por un tiempo de 2 min.
11. Se contó el precipitado de cada tubo y el de los tubos de cuenta total utilizando un contador para radiación gamma.
12. Se elaboró una curva de calibración (figura 5).

Los resultados fueron calculados obteniendo una curva de calibración graficando el porcentaje de unión contra el logaritmo de la concentración de los estandars para calibración. El porcentaje de unión (U/Uo) fue calculado mediante la siguiente fórmula :

$$U/Uo (\%) = \frac{\text{CPM del estándar o muestra a analizar} - \text{CPM del NSB}}{\text{CPM del estándar 0} - \text{CPM del NSB}} \times 100$$

Donde:

1. Se calcula el promedio de las cuentas por minuto (CPM) de cada estándar y cada muestra a analizar.
2. Se resta el promedio de CPM del los tubos NSB a todos los tubos.
3. Se dividen las CPM corregidas de cada estándar, testigo o muestra a analizar entre las CPM corregidas del estándar 0.
4. En una hoja de papel semilogarítmico se colocó el porcentaje de unión para los estándar CYCLO-Trac en el eje de las "Y" y su respectiva concentración en el eje de las "X".
5. Se trazó una línea a través de cada punto para dar origen a la gráfica de calibración.
6. Se interpolaron los niveles de ciclosporina de las muestras a analizar.
7. Se calculó la capacidad de unión máxima dividiendo las CPM del estándar 0 entre el promedio de las cuentas obtenidas en los tubos de cuenta total.

DETERMINACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE LA CSA

Se graficaron curvas individuales concentración sérica -- tiempo de la CsA determinada, a partir del tiempo 0 (basal) y llevando a cabo un seguimiento hasta 24 hrs después de la administración

del fármaco. A partir de estas curvas se determinó la concentración máxima (C_{max}) y el tiempo para alcanzar la concentración máxima (t_{max}) de la CsA. El área bajo la curva concentración sérica--tiempo (AUC) fue calculada por la regla del trapecoide (Ritschel WA 1980). Los datos se presentan como promedio \pm el error estándar de la media (EEM).

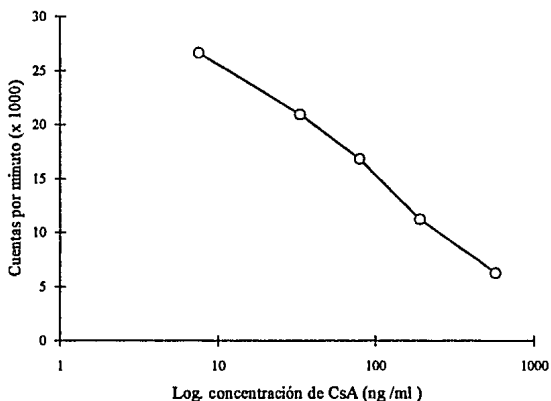


FIGURA 5. Curva de calibración obtenida utilizando el sistema CYCLO-Trac SP para la medición sérica de CsA.

REGLA DEL TRAPEZOIDE PARA EL CÁLCULO DEL AUC

Para calcular el AUC por medio de la regla del trapecoide, primero se dividió toda el área bajo la curva concentración sérica--tiempo, en trapecoides y triángulos, entonces, se calculó el área de cada figura, y finalmente, se obtuvo la suma de todas las áreas (Ritschel 1980).

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE ELIMINACIÓN

Mediante una regresión lineal se obtuvo la pendiente de los cuatro últimos puntos de las curvas concentración sérica—tiempo de los 3 grupos de ratas a los que se les administró la CsA por la vía IP. El valor de cada pendiente calculada fue considerado como su constante de eliminación correspondiente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el primer experimento, las diferencias en los parámetros de biodisponibilidad entre los diferentes grupos fueron determinadas mediante análisis de varianza para grupos independientes con prueba de Tukey (Steel and Torrie 1960). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando la p fue < 0.05 . Para el tercer experimento las diferencias en los parámetros clínicos evaluados entre los grupos I y II fueron determinadas mediante la prueba U de Mann Whitney (Steel and Torrie 1960) para la escala de Tarlov y el plano inclinado y la prueba exacta de Fisher (Steel and Torrie 1960) para el reflejo de apoyo. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando la p fue < 0.05 .

CONSIDERACIONES ÉTICAS DEL USO DE ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN BIOMÉDICA

Para la realización del presente proyecto se tomaron en cuenta los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Título Séptimo: De la Investigación que incluye la utilización de animales de experimentación) (Ley General de Salud 1990).

RESULTADOS

PRIMER SERIE EXPERIMENTAL

Biodisponibilidad de la CsA administrada por la vía oral

En la figura 6 se presentan las curvas concentración sérica--tiempo de los tres grupos a los que se les administró la CsA por la vía oral. Las ratas con LTME en fase aguda presentan una gran disminución de los niveles circulantes de CsA comparados con los presentados por las ratas testigo, la C_{max} se presentó a las 4 hrs después de administrado el fármaco. Después de las 12 hrs de administrado el fármaco, los niveles se encontraron muy disminuidos llegando a ser escasamente detectados a las 24 hrs después de administrada la CsA. Por otra parte, la biodisponibilidad de la CsA parece recuperarse parcialmente con el tiempo, ya que los niveles séricos de la droga en las ratas con LTME en fase crónica, son mayores a los niveles presentados por las ratas con LTME en fase aguda aunque éstos permanecen menores a los observados en las ratas testigo. En la tabla V se indican los valores de los parámetros de biodisponibilidad de la CsA en los 3 diferentes grupos; puede observarse que la C_{max} y el AUC presentan una reducción significativa en la fase aguda de la LTME; ambos parámetros representan aproximadamente el 10% de los valores observados en los animales sin LTME. Sin embargo, no existe una diferencia significativa en el t_{max} . En las ratas con LTME en fase crónica el AUC y la C_{max} fueron significativamente más altos a los observados en las ratas con LTME en fase aguda. Aunque los valores promedio del AUC y la C_{max} en las ratas con LTME en fase crónica representan aproximadamente el 60% de los observados en las ratas sin LTME, esta diferencia no alcanzó una significancia estadística ($p > 0.05$) ya que la variabilidad interindividuo fue alta.

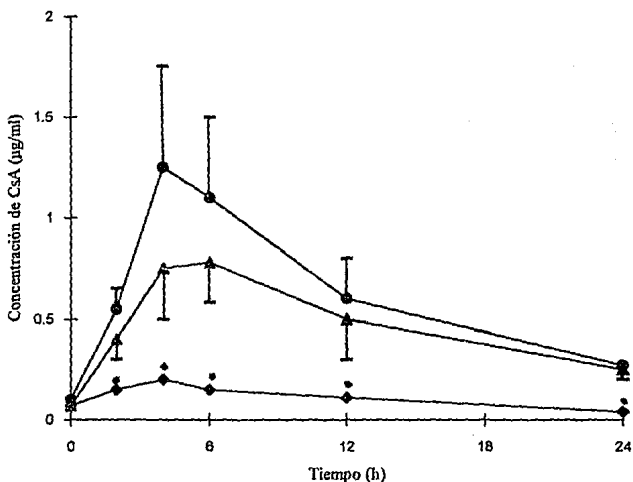


FIGURA 6. Concentraciones séricas de la CsA después de una dosis oral de 10 mg/kg a ratas con LTME en fase aguda (rombos), LTME en fase crónica (triángulos) y sin LTME (círculos). Los datos se presentan como media, el error estándar se marca con la barra.* valor estadísticamente diferente al de las ratas sin LTME ($p < 0.05$).

TABLA V

Biodisponibilidad de la CsA administrada por la vía oral en ratas con LTME y en ratas testigo.

Parámetro	Ratas		
	sin LTME	con LTME fase aguda	con LTME fase crónica
C _{max} (µg/ml)	1.31±0.53	0.15±0.02*	0.74±0.16**
AUC (µg.h/ml)	16.59±1.80	1.62±0.15*	9.9 ±0.20
t _{max} (h)	4.50±0.20	3.71±0.15	4.18±0.28

Valores promedio ± error estándar de 5 animales. * Valor estadísticamente diferente al de las ratas sin LTME (p < 0.05), ** valor estadísticamente diferente al de las ratas con LTME en fase aguda (p < 0.05)

Biodisponibilidad de la CsA administrada por la vía intraperitoneal

En la figura 7 podemos observar las curvas concentración sérica--tiempo de los 3 grupos a los que se les administró la CsA por la vía IP. La LTME (sobre todo en su fase aguda) también altera la biodisponibilidad de la CsA, pero siguiendo un patrón totalmente diferente al observado cuando se administró la CsA por la vía oral. En el grupo de ratas con LTME en fase aguda los niveles circulantes de CsA fueron mayores a los presentados por las ratas sin LTME y además se

puede observar que la caída de la curva es más retardada que la presentada por los otros 2 grupos. En el grupo de ratas con LTME en fase crónica, sin embargo, las concentraciones séricas de CsA se presentaron sin diferencias estadísticamente significativas con respecto a las del grupo testigo.

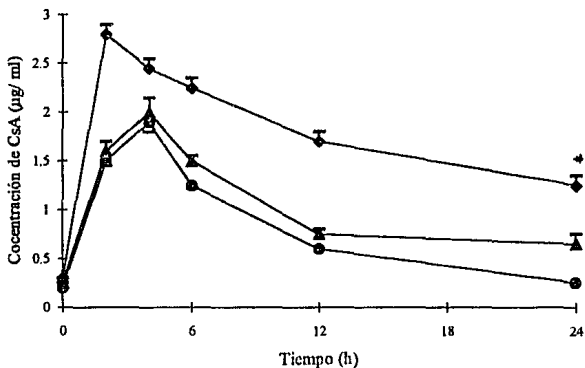


FIGURA 7. Concentraciones séricas de la CsA después de una dosis IP de 10 mg/kg a ratas con LTME en fase aguda (rombos), LTME en fase crónica (triángulos) y sin LTME (círculos). Los datos se presentan como media, siendo la barra el error estándar. * Valor que mostró diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de ratas sin LTME.

La figura 8 muestra la constante de eliminación de CsA luego de su administración IP (Kel) en los 3 grupos de ratas. La LTME en fase aguda, origina una disminución significativa en la Kel

mientras que en la fase crónica parece recuperarse pero aún es menor a la presentada por las ratas testigo.

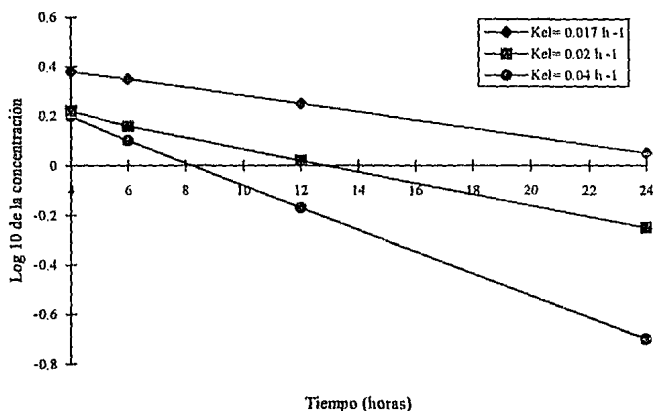


FIGURA 8. Constante de eliminación de la CsA administrada por la vía IP en ratas con LTME en fase aguda (rombos), LTME en fase crónica (cuadrados) y sin LTME (círculos).

En la tabla VI se muestran los valores de AUC de las ratas con LTME en fase aguda, estos valores se incrementaron alrededor de 2.5 veces más que el AUC de las ratas sin LTME. Los valores observados de AUC en las ratas con LTME en fase crónica son muy similares a los observados en las ratas sin LTME. Aunque la C_{max} promedio de las ratas con LTME en fase aguda fue mayor que la de los otros dos grupos, ésta no alcanzó una diferencia que fuera estadísticamente significativa ($p > 0.5$) debido a las grandes variaciones interindividuo

observadas. Por último, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en lo referente a la t_{max} para los tres grupos.

TABLA VI

Biodisponibilidad de la CsA administrada por la vía IP en ratas con LTME y en ratas sin LTME.

Parámetro	Ratas		
	sin LTME	con LTME fase aguda	con LTME fase crónica
C_{max} (ug/ml)	1.97±0.11	2.87±0.16	2.02±0.20
AUC (ug.h/ml)	16.45±0.80	40.41±1.89*	22.50±1.89Ç
t_{max} (h)	3.40±0.39	2.86±0.31	4.01±0.28

Valores promedio ± error estándar de 5 animales. * Valor estadísticamente significativo diferente al de las ratas sin LTME, Ç valor estadísticamente significativo diferente al de las ratas con LTME en fase aguda, $p < 0.05$.

Finalmente, en la tabla VII se muestran los valores de los parámetros de la biodisponibilidad de la CsA administrada por la vía oral y la administrada por la vía IP en ratas con y sin LTME. Puede observarse que la biodisponibilidad de la CsA en las ratas con LTME en fase aguda, se encuentra alterada para ambas vías de administración, solo que con un patrón diferente. Cuando la CsA se administra por la vía oral se disminuyen en forma significativa la C_{max} y el AUC,

mientras que cuando se administra por la vía intraperitoneal, dichos parámetros se incrementan en forma significativa en relación a los observados en las ratas sin LTME.

Las ratas con LTME en fase crónica, presentan parámetros con valores no muy alejados a los observados en las ratas sin LTME, para ambas vías de administración.

TABLA VII

Parámetros de la biodisponibilidad de la CsA administrada por la vía oral o por la vía intraperitoneal en ratas sin y con LTME.

Parámetro	Vía	Sin LTME	con LTME	con LTME
			fase aguda	fase crónica
C _{max} (µg/ml)	oral	1.31±0.53	0.15±0.02*	0.74±0.16Ç
	IP	1.97±0.11	2.87±0.16	2.02±0.20
AUC (µg.h/ml)	oral	16.59±1.80	1.62±0.15*	9.90±1.88
	IP	16.45±0.80	40.41±1.89*	22.50±1.89Ç
t _{max} (h)	oral	4.50±0.20	3.71±0.15	4.18±0.28
	IP	3.40±0.39	2.86±0.31	4.01±0.28

Valores promedio ± error estándar de 5 animales. * Valor estadísticamente significativo diferente al de las ratas sin LTME, Ç valor estadísticamente significativo diferente al de las ratas con LTME en fase aguda, p < 0.05.

SEGUNDA SERIE EXPERIMENTAL

En la figura 9 podemos observar las curvas concentración sérica-tiempo que presentaron los 2 grupos a los que se les administró la CsA en la fase aguda de la LTME. En el grupo que recibió la dosis de 5 mg/kg/día, la concentración del fármaco permaneció por arriba de los 0.275 ug/ml durante las primeras 4 hrs ($C_{max}= 0.728$ ug/ml). De las 6 a las 18 hrs, los niveles se mantuvieron dentro del rango especificado (0.12 a 0.275 ug/ml), permaneciendo a partir de las 20 hrs prácticamente por abajo de los 0.12 ug/ml. Por otra parte, el grupo que recibió la dosis de 2.5 mg/kg/12hrs presentó niveles de CsA dentro del rango especificado prácticamente durante las 24 hrs del seguimiento. Dos horas después de administrado el fármaco la C_{max} rebasó ligeramente los 0.275 ug/ml ($C_{max}= 0.302$ ug/ml), sin embargo, 3 hrs después de administrado el fármaco, los niveles disminuyeron pero se mantuvieron dentro del rango especificado. Al aplicar la segunda dosis, los niveles se elevan nuevamente pero sin rebasar los 0.275 ug/ml ($C_{max}= 0.220$ ug/ml) manteniéndose dentro del rango hasta las 24 hrs del seguimiento.

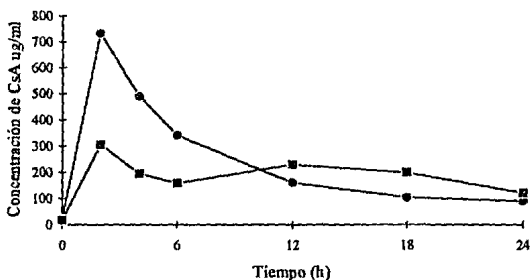


FIGURA 9. Concentración de la CsA en la fase aguda de la LTME después de administrar una dosis de 5mg/kg/día (círculos) o 2.5 mg/kg/12hrs (cuadros).

En la figura 10 observamos las curvas concentración sérica -tiempo de los 2 grupos a los que se les administró la CsA en la fase sub aguda de la LTME. El grupo que recibió la dosis de 10 mg/kg/día, 6 hrs después de administrado el fármaco presento niveles muy superiores a los 0.275 ug/ml (C_{max} = 0.7 ug/ml). Estos niveles se mantuvieron por arriba de este rango hasta las 20 hrs del seguimiento. Por otra parte, el grupo que recibió la dosis de 5 mg/kg/12hrs, presentó 2 hrs después de la primera dosis una C_{uax} que rebasó ligeramente los 0.275 ug/ml (C_{max} = 0.305 ug/ml), sin embargo, los niveles disminuyeron y se mantuvieron dentro del rango establecido durante las primeras 12 hrs del estudio. Al aplicar la segunda dosis los niveles también rebasaron ligeramente los 0.275 ug/ml (C_{max} = 0.309 ug/ml) para posteriormente disminuir y finalizar dentro del rango establecido.

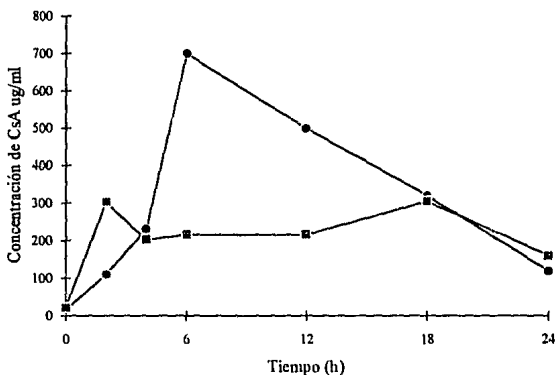


FIGURA 10. Concentración sérica de la CsA en la fase sub aguda de la LTME después de administrar una dosis de 10 mg/kg/día (círculos) o 5 mg/kg/12hrs (cuadros).

Finalmente en la figura 11 podemos observar la curva concentración sérica-tiempo del grupo al que se le administró la CsA en la fase crónica de la LTME a una dosis de 5 mg/kg/12hrs. También observamos que la Cmax después de la primera dosis rebasa ligeramente el rango establecido (Cmax= 0.32 ug/ml) , sin embargo, los niveles disminuyeron hasta encontrarse dentro del rango 12 hrs después de administrado el fármaco. Al aplicar la segunda dosis observamos otra elevación de los niveles que también rebasan el rango establecido (Cmax= 0.3 ug/ml) pero finalmente disminuyeron para mantenerse en el rango al término del estudio.

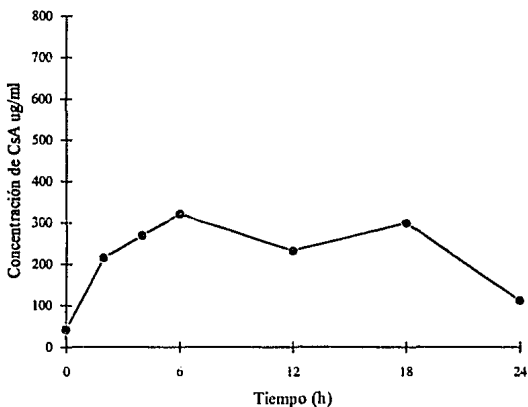


FIGURA 11. Concentración sérica de la CsA en la fase crónica de la LTME después de administrar una dosis de 5 mg/kg/12hrs.

TERCER SERIE EXPERIMENTAL

En la figura 12 podemos observar que las ratas con LTME que recibieron el esquema inmunodepresor presentaron una mayor recuperación motora de acuerdo a la escala de Tarlov al compararlas con las ratas con LTME que no recibieron CSA. Dicha recuperación la podemos observar a partir del día 40 pos lesión, aunque hasta el día 79 alcanzan una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Los 2 grupos de ratas sin LTME presentaron un valor de 4 a lo largo de todo el experimento.

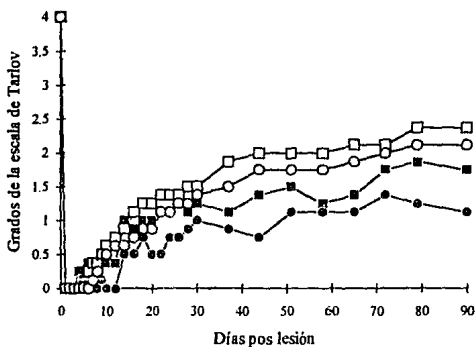


FIGURA 12. Escala de Tarlov en ratas con LTME con y sin tratamiento inmunodepresor. Los valores de la extremidad izquierda se señalan con cuadros, y los de la derecha con círculos. Los valores de los animales con tratamiento inmunodepresor se muestran con símbolos vacíos, y aquellos de los animales sin tratamiento inmunodepresor con símbolos llenos.

En la evaluación del plano inclinado las ratas con LTME que recibieron el esquema inmunodepresor mostraron también una mayor recuperación motora en comparación con aquellas que no recibieron el inmunodepresor, presentando diferencias estadísticamente significativas a partir del día 72 pos lesión en sus tres variantes (extremidad derecha, izquierda y posición vertical) ($p < 0.01$) (ver figuras 13 y 14).

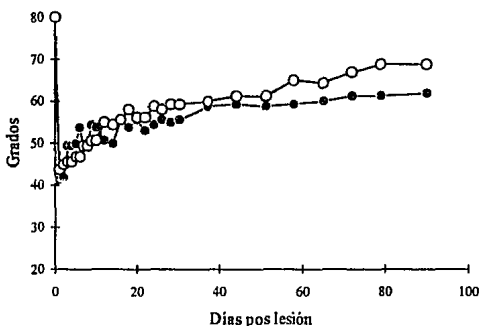


FIGURA 13. Evaluación del efecto de la inmunosupresión sobre la recuperación de ratas con LTME, medida por la prueba de plano inclinado (posición vertical). Ratas sometidas a tratamiento inmunodepresor (círculos llenos) y sin tratamiento (círculos vacíos).

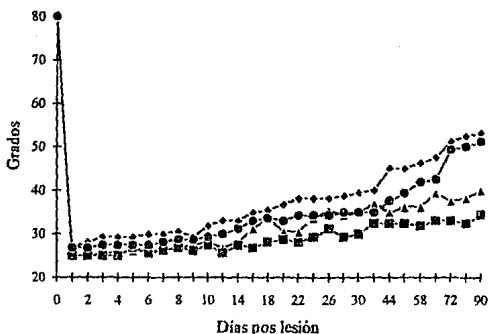


FIGURA 14. Evaluación del efecto de la inmunosupresión sobre la recuperación de ratas con LTME, medida por la prueba de plano inclinado (extremidades). Ratas con tratamiento inmunodepresor (círculos y rombos) y sin tratamiento (cuadros y triángulos). Se evaluaron por separado la extremidad izquierda (rombos y triángulos) y la derecha (círculos y cuadros).

Finalmente en la figura 15 podemos observar que todas las ratas que recibieron el esquema inmunodepresor presentaron positivo el reflejo de apoyo al final del seguimiento, mientras que sólo el 62% del grupo que no recibió la CsA presentó positivo dicho reflejo. Además la recuperación fue más rápida en las ratas inmunodeprimidas que en las que no recibieron tratamiento, alcanzando una significancia estadística a partir del día 72 pos lesión ($p=0.005$).

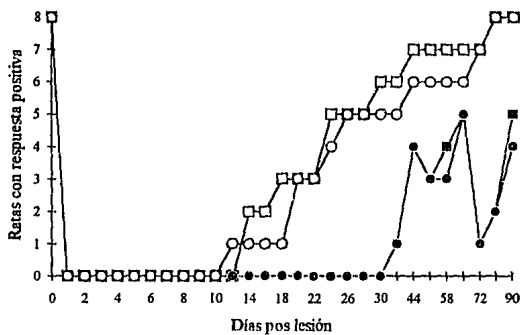


FIGURA 15. Evaluación del efecto de la inmunodepresión sobre la recuperación clínica en ratas con LTME, medida por la prueba del reflejo de apoyo. Extremidad izquierda (cuadros), extremidad derecha (círculos). Ratas con tratamiento inmunodepresor (figuras vacías) y sin tratamiento (figuras llenas).

DISCUSIÓN

El SNC en mamíferos presenta una mínima capacidad de regeneración una vez que ha sido dañado ya sea por una lesión traumática o una enfermedad de tipo infeccioso o degenerativo. Los cambios degenerativos observados en una gran cantidad de enfermedades, incluyendo la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer, así como el daño producido por un trauma a nivel cerebral o en médula espinal, son irreversibles. Aunque existen tratamientos de tipo sintomático, dichos desordenes son actualmente incurables (Fuchs y Bullard 1988).

Existen varios estudios en modelos animales, e inclusive en humanos con algún tipo de desorden neurológico (enfermedad degenerativa o lesión traumática) para los que se trata de encontrar una medida terapéutica (Rier y cols. 1992, Madrazo y cols. 1988).

En lo referente a la LTME existen varias líneas de investigación en modelos experimentales, acerca de la regeneración del tejido neural dañado. Entre ellas tenemos la dedicada a evitar una degeneración mayor y promover la regeneración, disminuyendo la respuesta auto inmune desarrollada después de la LTME contra los antígenos neurales (Giulian y Robertson 1990, Feringa y cols. 1975). Por otro lado existe otra línea dedicada a buscar la regeneración mediante la utilización de trasplantes en el área de la lesión (Anderson y cols. 1991, Rier y cols. 1992, Grijalva y cols. 1994). Ambas líneas de investigación ofrecen amplias perspectivas como medidas terapéuticas en individuos con LTME, pero también en ambas sobresale como factor importante el control adecuado de la RI.

La CsA podría ser utilizada en modelos e inclusive, en un futuro, en pacientes con LTME, como medida terapéutica para disminuir la sensibilización del SI contra los antígenos del tejido neural y para inhibir la RI inducida por tejidos trasplantados; sin embargo, en algunos estudios realizados en modelos con LTME se ha observado una Inmunosupresión incompleta (Rier y cols. 1992) e inclusive el rechazo de trasplantes llevados a cabo en médula espinal, cuando se emplean las dosis de CsA fijadas para trasplantes intracerebrales (10 mg/kg/día) (Anderson y cols. 1991).

Para que la CsA lleve a cabo en forma eficaz su efecto inmunodepresor, se deben mantener concentraciones circulantes dentro del rango considerado como terapéutico. Las

concentraciones por abajo del rango terapéutico pueden no ser efectivas mientras que las concentraciones por arriba del rango, pueden causar toxicidad (Borel 1991).

La LTME en fase crónica en el humano, altera la biodisponibilidad de otras drogas como la teofilaína, la dicloxacilina, la gentamicina, el acetaminofén y la vitamina K (Segal y cols. 1985A, Segal y cols. 1986B, Segal y Brunnemann 1989, Gilman y cols. 1993, Segal y cols. 1986A, Segal y cols. 1988, Halstead y Feldman 1985, Hachen y cols. 1974), y este puede ser el caso de un gran número de fármacos, sin embargo dicha posibilidad no es investigada sistemáticamente.

Nuestros resultados demuestran que la LTME modifica la biodisponibilidad de la CsA. En general se supone que, si un determinado estado patológico origina modificaciones en la biodisponibilidad de una droga, dichas modificaciones son similares independientemente de la vía de administración, como se puede observar en los casos de insuficiencia renal y hepática (Gibaldi y Perrier 1989); sin embargo este no fue el caso para la CsA en nuestro modelo de LTME. Cuando este fármaco fue administrado por la vía oral, su biodisponibilidad disminuyó en forma importante, mientras que, cuando se administró por la vía IP la biodisponibilidad presentó un gran aumento. Cabe mencionar que estas alteraciones de la biodisponibilidad de la CsA parecen ser transitorias ya que en los animales con LTME en fase crónica la biodisponibilidad tiende a recuperar los valores de control. En este estudio utilizamos como testigos a ratas sometidas solo a laminectomía. Las concentraciones de CsA observadas en estos animales fueron similares a las reportadas por otros autores en ratas intactas (Wassef y cols. 1985). Cuando se administró la CsA por la vía oral en las ratas con LTME en fase aguda, se observó una gran disminución en la biodisponibilidad evaluada mediante la C_{max} y el AUC, sugiriendo que existió una reducción en la absorción de la CsA (Mattok 1988). La LTME en humanos como en animales origina severas alteraciones en los mecanismos de homeostasis y de autorregulación neurológica, mediados por el sistema nervioso autónomo (Fealey y cols. 1984, Johansson y cols. 1968, Johansson y Langston 1964). La desconexión del sistema simpático toracolumbar, de los centros nerviosos superiores origina hipotensión ortostática, incapacidad

para la termoregulación y propensión para desarrollar hiperreflexia autonómica (actividad simpática esplácnica excesiva) entre otras alteraciones (Fealey y cols. 1984). Algunos estudios han mostrado que la hiperreflexia autonómica es capaz de originar un retardo en el vaciamiento gástrico al inhibir la motilidad de la región distal del antro (Fealey y cols. 1984) y más aún, puede originar una gran vasoconstricción a nivel renal e intestinal (Jobansson y Langston 1964). La inervación simpática del tracto gastrointestinal se origina en la médula espinal a nivel T5-T10 (Fealey y cols. 1984). En este trabajo el nivel de la médula espinal lesionado fue T8, por tanto, la lesión pudo haber originado la liberación de los centros simpáticos medulares distales al sitio de la lesión dando lugar entonces al desarrollo de la hiperreflexia autonómica, misma que al provocar vasoconstricción a nivel intestinal, podría estar involucrada en la disminución de la absorción de la CsA en el tracto gastrointestinal. La CsA difunde a través de la pared intestinal para llegar a la circulación en los vasos intestinales, siguiendo un gradiente de concentración. Una vasoconstricción intensa, disminuirá en forma importante la superficie de absorción capilar y en consecuencia la velocidad de absorción. Por otra parte la reducción del flujo podría retardar la distribución del fármaco hacia la circulación sistémica. También el retardo en el vaciamiento gástrico secundario a la hiperreflexia autonómica, puede jugar un papel importante en la disminución de la absorción de la CsA (Segal y cols. 1985A) pues la absorción de esta droga se lleva a cabo principalmente en la primera porción del intestino delgado (Kahan 1989).

En forma contraria a lo observado en los animales con CsA administrada por la vía oral, la biodisponibilidad de la CsA administrada por la vía IP presentó valores significativamente mayores en las ratas con LTME en fase aguda. La eliminación de la CsA se lleva a cabo en su mayor proporción luego de su biotransformación en el hígado (Kahan 1989). La vasoconstricción esplácnica observada en la LTME como consecuencia del fenómeno de hiperreflexia autonómica, origina una gran disminución en el flujo sanguíneo hepático (Johansson y Langston 1964), dicha disminución en el flujo, puede originar en primer lugar, que todos los vasos sanguíneos en el hígado no proporcionen la misma exposición de la droga a las células hepáticas es decir, el patrón de distribución del flujo sanguíneo cambia y por tanto puede reducirse la cantidad del

fármaco que puede ser biotransformado por unidad de tiempo, esto puede estar originando que en las ratas con LTME en fase aguda, la C_{max} sea mayor y se alcance en un menor tiempo que en las ratas en fase crónica y las ratas sin LTME, ya que una vez que el fármaco ingresa a la circulación es susceptible de ser biotransformado, y la concentración depende en gran medida de la velocidad en que los procesos de absorción, biotransformación y eliminación se lleven a cabo, al estar disminuida la biotransformación, la C_{max} puede aumentar y alcanzarse en un menor tiempo. En segundo lugar, una disminución en el flujo sanguíneo puede producir anoxia, la cual a su vez puede afectar la actividad hepatocelular y por lo tanto la eliminación de fármacos como la CsA cuya vía de eliminación principal es la hepática (Rowland y Tozer 1989). El retardo evidente en la caída de la curva concentración sérica-tiempo y la disminución en la K_{el} , que apoyan la hipótesis de una disminución en la eliminación de la CsA en la LTME. Sin embargo, el aumento observado en la C_{max} podría también deberse a un aumento en la absorción del fármaco. Dicho aumento a nivel peritoneal solo podría originarse por un aumento en la superficie de absorción (vasodilatación). De tal modo que, si estos sucediera podríamos decir que el fenómeno de hiperreflexia autonómica en la región esplácnica, no se presenta en forma uniforme, de tal forma que algunos vasos (vasos de la cavidad peritoneal) se encuentren dilatados y esto contribuya a un aumento en la superficie de absorción.

Las alteraciones observadas en la biodisponibilidad de la CsA en nuestro modelo experimental de LTME pueden ser originadas entonces, por una excesiva actividad simpática esplácnica (hiperreflexia autonómica) secundaria a una falta de regulación de la misma por los centros superiores (ver figura 16). Aunque en humanos este fenómeno solo ha sido descrito en la fase crónica de la LTME (Fealey y cols. 1984), en animales se describió también en la fase aguda (Johansson y cols. 1968, Johansson y Langston 1964). Con los resultados observados en este trabajo podríamos suponer que el fenómeno de hiperreflexia autonómica en la fase aguda de la LTME se presenta en su máxima expresión y que conforme pasa el tiempo, tiende a disminuir sin llegar a su total normalización 7 semanas después de la LTME. Esto explicaría en parte las

diferencias encontradas entre las ratas con LTME en fase aguda y las observadas para las ratas en fase crónica. Las alteraciones observadas en este estudio pueden deberse al fenómeno de hiperreflexia, sin embargo no podemos excluir la posibilidad de que estén involucrados otros mecanismos en las modificaciones observadas. Hachen y cols. por ejemplo observaron que en pacientes con LTME en fase aguda, esta disminuida temporalmente la absorción intestinal de sustancias liposolubles como la vitamina K (Hachen y cols. 1974). La CsA es un fármaco lipofílico (Kahan 1989), y por tal motivo, podría estar disminuida su absorción cuando es administrada por la vía oral, en cambio este mecanismo no influiría en las características de la biodisponibilidad luego de la administración IP. Por otra parte, la CsA es capaz por sí misma, de alterar los mecanismos de contracción del músculo liso y de esta forma potenciar una respuesta vasoconstrictora (Rego y cols. 1990) misma que también podría estar contribuyendo a las alteraciones observadas en este estudio.

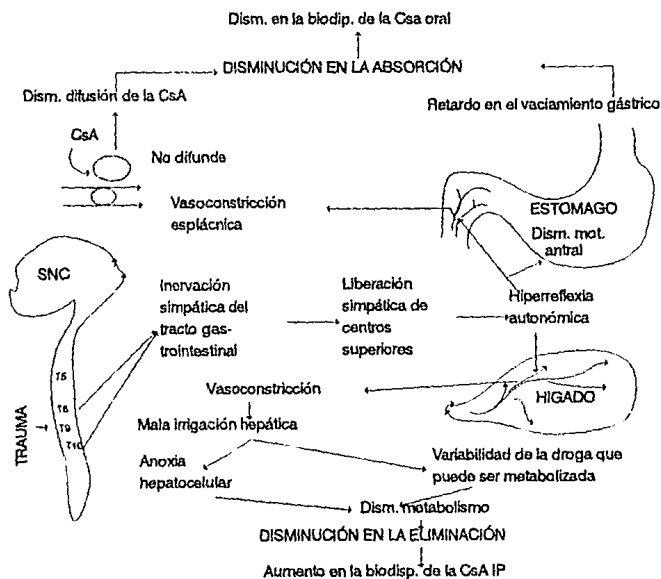


FIGURA 16. Modelo propuesto para explicar las alteraciones observadas en la biodisponibilidad de la CsA en ratas con LTME. La excesiva actividad simpática esplácnica (hiperreflexia autonómica) observada después de una LTME, podría estar originando dichas alteraciones.

Finalmente, los resultados del primer experimento muestran que la LTME modifica la biodisponibilidad de la CsA, probablemente debido a una disminución tanto en la biotransformación y eliminación del fármaco como en la absorción gastrointestinal del mismo. Cuando la CsA es administrada por la vía IP se pueden obtener concentraciones séricas muy altas originadas por una eliminación disminuida. Por otra parte, cuando la CsA es administrada por la vía oral, existe una reducción significativa en la absorción, misma que, anula el efecto producido por la mala eliminación, y como resultado, los niveles circulantes son bajos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, consideramos que la CsA administrada por la vía oral no debe ser utilizada en la fase aguda de la LTME mientras que en el caso de utilizar la vía IP deben aplicarse dosis menores a los 10mg/kg. Por tal motivo al realizar el segundo experimento, en la fase aguda probamos la dosis de 5mg/kg/día y la de 2.5 mg/kg/día administradas por la vía IP. En el primer caso la concentración del fármaco por una parte alcanzó niveles muy superiores a la concentración máxima tolerada lo cual puede originar un alto riesgo de toxicidad (Ryffel y Cols. 1988). Por otra parte, al final del estudio los niveles se presentaron por abajo de la concentración mínima efectiva, originando así la posibilidad de que el efecto terapéutico no se mantenga. Cuando se dividió la dosis para administrarse cada 12 hrs (2.5mg/kg/12hrs), los niveles de CsA se mantuvieron dentro del rango de los 0.12 a 0.275 ug/ml durante las 24 hrs del día, manteniendo así un probable efecto terapéutico y disminuyendo los efectos tóxicos.

Por otra parte, tomando en consideración que 48 a 72 hrs después de la LTME empieza a desaparecer la etapa de choque medular (Noback y Demarest 1980) y suponiendo que el fenómeno de hiperreflexia autonómica disminuye después de la fase aguda; durante la fase sub aguda se administró el fármaco por la vía oral también con 2 esquemas diferentes. La dosis protocolaria de 10mg/kg/día originó niveles de CsA muy por arriba de los 0.275 ug/ml durante un gran lapso de tiempo; sin embargo, cuando se dividió la dosis para administrarse cada 12 hrs (5mg/kg/12hrs), los niveles se mantuvieron la mayor parte del tiempo dentro del rango (0.12 a 0.275 ug/ml). Esta dosis permitió también mantener los niveles dentro del rango durante la fase crónica de la LTME.

De acuerdo con estos resultados, podemos considerar que la administración de 2.5mg/kg/12hrs por la vía IP durante la fase aguda y de 5mg/kg/12hrs por la vía oral desde la fase sub aguda hasta la crónica de la LTME en ratas, constituye un esquema inmunodepresor racional y probablemente efectivo para mantener niveles de CsA dentro del rango considerado como ventana terapéutica en el humano.

Un tratamiento inmunodepresor es un factor de riesgo para el establecimiento de infecciones, que pueden incluso ocasionar la muerte. Feringa y col. (1975), realizaron un estudio en el que utilizaron como inmunodepresor una mezcla de azatioprina, hidrocortisona y suero anti-linfocitos. Al final del seguimiento prácticamente el 50% de las ratas habían muerto. En el mismo estudio administraron también ciclofosfamida y azatioprina por separado a otros grupos de ratas con lesión de la médula espinal; sin embargo, aunque en estos casos la mortalidad disminuyó (40 a 50%), no reportó regeneración en la médula espinal.

Además del efecto inmunodepresor, se ha demostrado la gran toxicidad que puede llegar a tener la CsA, sobre todo a nivel renal, cuando se administra por grandes periodos (Kahan y cols. 1989). En relación a lo anterior, observaciones realizadas en nuestro laboratorio mostraron que al inmunodeprimir a las ratas con LTME desde el inicio hasta el final del seguimiento con la dosis protocolaria de 10mg/kg/día, el 80% de los animales morían por problemas secundarios a procesos infecciosos o problemas de nefrotoxicidad, o ambos. En contraste, bajo el esquema de la tercera serie experimental de este estudio el 90% de los animales sobrevivieron sin problemas de tipo infeccioso agregados hasta el final del seguimiento (90 días), lo que apoya este esquema como el más adecuado.

En relación a la recuperación clínica, observamos que las ratas con LTME que recibieron el esquema inmunodepresor presentaron una mayor y más rápida recuperación clínica en comparación con la que presentaron las ratas que solo recibieron el vehículo. Dicha recuperación clínica pudo deberse al efecto inmunodepresor de la CsA lo que estaría de acuerdo con nuestra hipótesis inicial sobre la falta de regeneración de la médula espinal después de una lesión traumática. Al inhibir la respuesta inmune contra los antígenos neurales, originamos un medio

propicio para la regeneración, lo que podría entonces originar una recuperación clínica. Feringa y cols. (1975) mediante estudios electrofisiológicos demostraron la regeneración de tractos motores de la médula espinal después de una lesión en ratas sometidas a un tratamiento inmunodepresor. En la presente tesis se reporta la recuperación clínica de ratas con LTME que fueron sometidas también a un tratamiento inmunodepresor, lo que podría indicar que el tratamiento inmunodepresor originó un medio propicio para la regeneración después de la lesión. Estudios realizados en nuestro laboratorio (datos aún no publicados) han mostrado que 1 año después de la LTME existe remielinización y formación de colaterales en el sitio de la lesión, sin embargo este proceso de restauración no ha sido suficiente para provocar una recuperación clínica aceptable. Al disminuir la respuesta inmune podemos estar originando el medio propicio para que tanto el proceso de remielinización como el de formación de colaterales se lleve a cabo en mejor forma y esto se haga evidente en la recuperación clínica de nuestro modelo de LTME. Sin embargo, esto deberá comprobarse con experimentos diseñados *ad hoc*. Por el momento sólo podemos decir que el esquema inmunodepresor elegido favoreció la recuperación clínica y disminuyó la mortalidad de las ratas con LTME.

En la presente tesis presentamos una posible alternativa al problema que representa la administración de un inmunodepresor como la CsA por grandes periodos en modelos experimentales de LTME, pero además, presentamos una posible alternativa a la falta de regeneración de la médula espinal después de una LTME.

CONCLUSIONES

1. La biodisponibilidad de la CsA en ratas con LTME se encuentra alterada y dicha alteración depende en gran medida de la vía de administración y de la fase de la LTME.
2. En las ratas con LTME en fase aguda: a) cuando la CsA se administra por la vía oral, la biodisponibilidad disminuye significativamente y b) cuando se administra por la vía IP, la biodisponibilidad se incrementa en relación con las ratas testigo.
3. En las ratas con LTME en fase crónica la biodisponibilidad de la CsA administrada tanto por la vía oral como por la vía IP, es muy similar a la observada en las ratas sin LTME.
4. A partir de las 72 hrs pos lesión, la biodisponibilidad de la CsA tiende a recuperarse.
5. La Administración de 2.5 mg/kg/12hrs por la vía IP durante la fase aguda y de 5 mg/kg/12hrs por la vía oral desde la fase sub aguda hasta la fase crónica de la LTME en ratas, mantiene los niveles de CsA dentro del rango considerado como ventana terapéutica en el humano.
6. La aplicación del esquema inmunodepresor antes mencionado tuvo un efecto positivo sobre la supervivencia y la recuperación clínica de ratas con LTME.
7. La falta de regeneración de la médula espinal después de una lesión puede deberse a la presencia de una respuesta autoinmune que interfiere con la remielinización.

PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

1. Deberá analizarse el efecto directo del esquema inmunodepresor utilizado en este trabajo, sobre la respuesta inmune contra antígenos neurales.
2. Deberá analizarse desde un punto de vista electrofisiológico, morfológico y clínico el efecto directo de la inmunodepresión sobre la regeneración de la médula espinal.

APÉNDICE

CONCEPTOS GENERALES SOBRE FARMACOCINETICA

Para que una droga lleve a cabo su efecto terapéutico, ésta debe ingresar a la circulación y llegar en cantidad suficiente a las células blanco donde sus moléculas se combinan con receptores específicos. Entre el tiempo de administración de una droga y su acción, se llevan a cabo varios procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos. Los procesos farmacocinéticos incluyen la absorción de la droga desde el sitio de su aplicación, la distribución de ésta en los diversos tejidos, su biotransformación o metabolismo y su eliminación. La magnitud y la intensidad con que se lleven a cabo dichos procesos farmacocinéticos determina la concentración de la droga en el plasma y los tejidos durante el tiempo que aquella permanece en el organismo. Los procesos farmacodinámicos se relacionan con la interacción entre la droga y su receptor que es la que a fin de cuentas da lugar al o los efectos farmacológicos. La magnitud del efecto es determinada en gran parte por la concentración de la droga en sus sitios receptores (Wartak 1983).

Absorción de las drogas

La absorción de un fármaco es el proceso mediante el cual la droga pasa del sitio de administración al plasma sanguíneo. Sus características están determinadas por la vía de administración, la dosificación y las propiedades físico-químicas del fármaco. Cuando un fármaco se administra vía intravenosa pasa en forma directa a la circulación. Cuando se administra por la vía intramuscular, subcutánea o intraperitoneal la cantidad de fármaco que llega a la circulación depende del flujo sanguíneo local, de la proporción de la droga que no se encuentra ionizada y del pH del líquido extracelular.

Cuando un fármaco es administrado por la vía oral, la absorción es determinada por las características físicoquímicas de la droga, la magnitud de su ionización en el pH de las diferentes

porciones del tubo digestivo, la presencia de alimentos en el estómago, la motilidad gastrointestinal, el flujo sanguíneo mesentérico, la coadministración de otras drogas y el vaciamiento gástrico (Wartak 1983). Los mecanismos generales de traslocación de fármacos al través de las membranas celulares que operan en los procesos de absorción, distribución y eliminación en orden de importancia son: a) difusión pasiva, b) transporte por conducción o transferencia, c) transporte activo, d) transporte facilitado, e) transporte iónico y f) pinocitosis (Ritschel 1980).

La difusión pasiva es el transporte a través de una membrana permeable al fármaco y depende de la magnitud de un gradiente de concentración, de la liposolubilidad de la droga y del grosor de la membrana; el transporte por conducción es el paso de la droga a través de poros membranales y depende de la naturaleza de la carga eléctrica, de la relación entre el volumen de la molécula de la droga y el diámetro del poro membranar, del grosor de la membrana y el número de poros; el transporte activo por otra parte, utiliza energía pues se da en contra de gradientes de concentración, cada droga o grupo de drogas necesita un acarreador específico (enzima u otro tipo de proteínas) al cual se une por medio de un receptor; el transporte facilitado se lleva a cabo de igual forma que el transporte activo solo que en este caso no va en contra de un gradiente de concentración; el transporte iónico se lleva a cabo en drogas altamente iónicas mismas que forman complejos electroquímicos neutros al unirse con cationes y de esta forma atraviesan la membrana por difusión pasiva; finalmente la pinocitosis es el único mecanismo de transporte donde la droga no requiere estar en solución acuosa y donde se pueden absorber prácticamente partículas. Este mecanismo es comparable al de la fagocitosis donde la membrana engloba e introduce la partícula (Ritschel 1980).

Biodisponibilidad de los fármacos

El término biodisponibilidad se refiere a la fracción de la dosis de una droga que ingresa a la circulación. Puede ser representada por la concentración máxima (C_{max}) y el área bajo la curva (AUC del inglés Area Under the Curve). La C_{max} es la concentración plasmática más alta que

alcanza una droga después de haber sido administrada mientras que el AUC es una forma de medir la cantidad de droga absorbida y que se encuentra en la circulación, se calcula realizando un análisis gráfico de la curva concentración plasmática-tiempo en un papel semilogarítmico. La biodisponibilidad de una droga depende en gran parte de la absorción y la eliminación de la misma. Una absorción disminuida origina una menor biodisponibilidad, una eliminación disminuida origina una mayor biodisponibilidad (Ritschel 1980, Wartak 1983).

Distribución de los fármacos

Cuando una droga ingresa a la circulación es rápidamente diluida y transportada por el plasma a varios tejidos del organismo. Algunas moléculas de la droga quedan disueltas en el plasma y otras se unen a proteínas plasmáticas y a los eritrocitos. Solo las moléculas libres pueden ser llevadas a los diferentes tejidos donde ejercerían su efecto farmacológico. Una vez que el fármaco se encuentra en la circulación se lleva a cabo una distribución y redistribución continuas hasta que la droga es finalmente eliminada. La distribución va a depender de las propiedades fisicoquímicas del fármaco, del flujo sanguíneo regional, de la unión del fármaco a las proteínas plasmáticas, de las características anatómicas de la membrana celular (Wartak 1983).

Volumen de distribución

Esta constituido por el o los compartimentos hacia los cuales el fármaco se difunde. El volumen de distribución está determinado por el grado de hidro o liposolubilidad del fármaco, la capacidad de este mismo para unirse a las proteínas del plasma y los tejidos y las características fisicoquímicas de los tejidos (Wartak 1983).

Biotransformación de los fármacos

La mayoría de las drogas se biotransforman en el hígado y solo unas cuantas en otros órganos (pared intestinal, riñón, pulmones). Dicha biotransformación se lleva a cabo mediante reacciones que incluyen oxidación, reducción, hidrólisis y conjugación mismas que originan una serie de metabolitos que, aunque no en todos los casos, son menos capaces de ser captados en los tejidos y de penetrar las membranas celulares. Esta biotransformación por lo general inactiva a la droga aunque en ocasiones puede transformarla en otra forma activa. La biotransformación es importante para que el fármaco no permanezca por tiempo indefinido en el organismo. La actividad metabólica de un fármaco se ve influenciada por defectos de tipo genético (deficiencias de enzimas específicas), modificaciones del funcionamiento de los órganos involucrados en la biotransformación e interacciones de otras drogas (Wartak 1983).

Eliminación de los fármacos

Las mayor parte de los fármacos y sus metabolitos son eliminados en la orina, algunos otros son eliminados en la bilis. Los fármacos volátiles son eliminados principalmente por los pulmones. La magnitud de la eliminación de un fármaco va a depender en gran medida de la relación fármaco ionizado/ fármaco no ionizado pH urinario. Los fármacos que se encuentran muy ionizados y en consecuencia muy liposolubles son fácilmente eliminados. Cuando el pH urinario es alcalino aumenta la eliminación de fármacos ácidos mientras que cuando es ácido aumenta la eliminación de fármacos básicas (Wartak 1983).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Selección de la dosis de acuerdo a las variables farmacocinéticas.

Para que un fármaco lleve a cabo su efecto terapéutico, es necesario que la biodisponibilidad del mismo se encuentre dentro del rango considerado como "ventana terapéutica" (rango en el cual un determinado fármaco ejerce su efecto terapéutico sin producir reacciones adversas ni toxicidad; éste va de la concentración mínima efectiva a la concentración máxima tolerada) (Wartak 1986), pues cuando se encuentra dentro del rango terapéutico, puede ser tóxico para el individuo y cuando la encontramos por abajo del rango, pierde su efectividad terapéutica. El cálculo de la dosis debe basarse en la relación lineal entre la dosis y la concentración plasmática del fármaco.

BIBLIOGRAFIA

Anderson DK, Reier PJ, Wirth ED, Theele DP, Mareci T and Brown SA. Delayed grafting of fetal CNS tissue into chronic compression lesions of the adult cat spinal cord. *Rest Neurol Neurosci* 1991; 2: 309-325.

Anderson DK. Chemical and cellular mediators in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1992; 9: 143-146.

Allen A. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. *J Am Med Assoc* 1911; 57: 878-880.

Austyn JM, Larsen CP. Migration patterns of dendritic leukocytes. *Transplantation* 1990; 49: 1-7. Balentine JD. Calcium toxicity as a factor in spinal cord injury. *Surv Synth Path Res* 1983; 2: 184-193.

Barker CF, Billingham RE: Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 1977 ; 25: 1-54.

Bedbrook GM. The development and care of spinal cord paralysis (1918-1986). *Paraplegia* 1987; 25: 172-184.

Bernheimer H, Lassman H, Suchanek G. Dynamics of IgG⁺, IgA⁺ and IgM plasma cells in the CNS of Guinea pigs with chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Neuropathol App Neurobiol* 1988; 14: 157-167.

Berry M: An immunological approach to regeneration in the central nervous system. *Brith J Med* 1974; 30: 135-140.

Beschoner WE, Olson JL, Hess AD, Di Gennaro KA, Santos GW. Cyclosporine-induced cell-mediated injury of the thymic medullary epithelium. *Transplantation* 1988; 45: 797-803.

Bierer BE, Schreiber SL, Burakoff SJ. Mechanisms of immunosuppression by FK506. *Transplantation* 1990; 49: 1168-1202.

Billingham RE, Krohn PL, Medawar PB. Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits. *Br Med J* 1951; 1: 1157- 1163.

Blackman M, Kappler J, Marrack P. The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. *Science* 1990; 248: 1335-1341.

Blightn AR. Delayed demyelination and macrophage invasion: A candidate for secondary cell damage in spinal cord injury. *CNS Trauma* 1985; 2: 299-315.

Borel J. Mechanism of action of cyclosporine A and rationale for use in nephrotic syndrome. *Clin Nephrol* 1991; 35: 23-30.

Bracken MB, Freeman DH Jr, Hellenbrand K. Incidence of acute traumatic hospitalized spinal cord injury in the United States 1970-1977. *Am J Epidemiol* 1981; 113: 615-622.

Bradbury MW, Westrop RJ: Factors influencing exit of substances from cerebrospinal fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *J Physiol* 1983; 519-534.

Bradbury MW: Overview of passage routes of interstitial fluid to the lymphatics: history and current concepts. En: Johansson BB, Owman C, Widner H (eds) *Pathophysiology of the blood-brain barrier. Long term consequences of barrier dysfunction for the brain.* Fernstrom Foundation Series 14, Amsterdam, Elsevier, 1990, pp 403-412.

Brown MJ, Rosen JL, Lisak RP: Demyelination in vivo by Guillain- Barré syndrome and other human serum. *Muscle Nerve* 1987; 10: 263- 271.

Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoud B, Bjorkman PJ, Wiley DC. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of the class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988; 332: 845- 850.

Brundin P, Nilsson OG, Gage FH and Bjorklund A. Cyclosporin A increases survival of cross-species intrastriatal grafts of embryonic dopamine-containing neurons. *Exp Brain Res* 1985; 60: 204-208.

Calne RY. The rejection of renal homografts, inhibition in dogs by 6-mercaptopurine. *Lancet* 1960; 1: 417-418.

Chou YK, Vainiene M, Whitham R, Bourdette D, Chou CH-J, Hashim G, Offner H and Vandenberg AA. Response of human T lymphocyte lines to myelin basic protein: association of dominant epitopes with HLA class II restriction molecules. *J Neurosci Res* 1989; 23: 207- 216.

Claus-Walker J, Halstead LS. Metabolic and endocrine changes in spinal cord injury: II (section 1). Consequences of partial decentralization of the autonomic nervous system. *Arch Phys Med Rehabil* 1982A; 63: 569-575.

Claus-Walker J, Halstead LS. Metabolic and endocrine changes in spinal cord injury: II (section 2). Partial decentralization of the autonomic nervous system. *Arch Phys Med Rehabil* 1982B; 63 : 576-581.

Claus-Walker J, Halstead LS. Metabolic and endocrine changes in spinal cord injury: IV. Compounded Neurologic Dysfunctions. Arch Phys Med Rehabil 1982C; 63: 632-638.

Columbani J. Conserved and variable structures in HLA class I molecules: a review. Tissue Antigens 1990; 35: 103-113.

Cotman CW. The neuroimmuno-endocrine connection, 1st ed. Raven Press, NY 1987.

Council on Scientific Affairs: Introduction to the management of immunosuppression. J Am Med Ass 1987; 257: 1781-1785.

Cross AH, Cannella B, Brosnan CF, Raine CS. Homing to cerebral nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes. I. Localization of ¹⁴C-labeled cells during acute, chronic and relapsing experimental allergic encephalitis. Lab Invest 1990; 63: 162-170.

Cser HF, Harling-Berg C, Ichimua YT, Knopf PM, Yamada S. Drainage of cerebral extracellular fluids into cervical lymph: an afferent limb in brain immune system interactions. En: Johansson BB, Owman C, Widner H (eds) Pathophysiology of the blood-brain barrier. Long term consequences of barrier dysfunction for the brain. Fernstrom Foundation Series 14, Amsterdam, Elsevier, 1990, pp 403-412.

Das GD, Das KG, Brasko J, Riedl M, Rai P, Rajeswari V. Spinal traumas: Some postoperative complications in experimental animals. Brain Res Bull 1989; 22: 33-37.

Dempster WJ, Lennox B and Boag JW. Prolongation of survival of skin homotransplants in the rabbit by irradiation of the host. Br J Exp Pathol 1950; 31: 670-679.

Dhib-Jalbut S, MacFarlin DE: Immunology of multiple sclerosis. *Annals of Allergy* 1990; 64: 433-443.

Didlake RH, Kim EK, Grevel J, Jarolinek L and Kahan BD. Cyclosporine pharmacokinetics and pharmacodynamics after oral administration in rat. *Transplant Proc* 1988; XX: 692-695.

Drigges PI, Ennist DL, Gleason SL, Mak W-H, Marks MS, Levi B-Z, Flanagan JR, Appella E, Ozato K. An interferon gamma-regulated protein that binds the interferon inducible enhancer element of major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3743-3747.

Eugui EM, Mirkovich A, Allison AC. Lymphocyte-selective antiproliferative and immunosuppressive effect of mycophenolic acid in mice. *Scand J Immunol* 1991; 33: 175.

Eugui EM, Almquist S, Muller CD, Allison AC. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxiguanosine nucleotide depletion. *Scand J Immunol* 1991; 33: 161.

Erlich SS, McComb JG, Hyman S. Ultrastructural morphology of the olfactory pathway for cerebrospinal fluid drainage in the rabbit. *J Neurosurg* 1986; 64: 466-473.

Fealey RD, Szurszewski JI, Merritt JL and Dimagno EP. Effect of traumatic spinal cord transection on human upper gastrointestinal motility and gastric emptying. *Gastroenterology* 1984; 87: 69-75.

Feringa ER, Johnson RD and Wendt JS: Spinal cord regeneration in rats after immunosuppressive treatment. *Arch Neurol* 1975; 32: 676-683.

Finsen B, Poulsen PH and Zimmer J. Xenograft of fetal mouse hippocampal tissue to the brain of adult rats: effects of cyclosporin A treatment. *Exp Brain Res* 1988; 70: 117-133.

Fontana A, Frei K, Bodmer S. Immune-mediated encephalitis: on the role of antigen presenting cells in brain tissue. *Immunological Rev* 1987; 100: 185-201.

Fontana A, Fierz W and Wekerle H. Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature (London)* 1984; 307: 273-276.

Freedman MS, Loertscher R, Cashman NR, Duquette P, Blain M and Antel JP. Immunoregulatory properties of T-cell lines derived from the systemic and intrathecal compartments: A phenotypic and functional study. *Ann Neurol* 1990; 27: 258-265.

Fuchs HE and Bullard DE. Immunology of transplantation in the central nervous system. *Appl Neurophysiol* 1988; 51: 278-296.

Gibaldi M and Perrier D. *Pharmacokinetics*, 1st ed. Marcel dekker Inc., New York 1989.

Gilman TM, Brunemann SR and Segal JL. Comparison of population pharmacokinetic models for gentamicin in spinal cord injured and able-bodied patients. *Antimicrob Agents Chemoter* 1993; 37: 93-99.

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

Goodkin R and Campbell JB. Sequential pathologic changes in spinal cord injury. Arch Neurol 1979; 30: 197-201.

Green CJ. Experimental transplantation and cyclosporine. Transplantation 1988; 46: 3s-10s.

Grijalva I, Guizar-Sahagún G, Salgado-Ceballos H, Ibarra A, Franco-Bourland R, Espitia AL and Madrazo I. Clinical improvement of rats subjected to severe spinal cord contusion treated with fetal allogeneic homotopic transplant into the lesion site prepared with aspiration and enzymes. Arch Med Res 1994; 25: 106.

Guizar-Sahagún G, Grijalva I, Madrazo I, Franco-Bourland R, Salgado H, Ibarra A, Oliva E and Zepeda A. Development of post-traumatic cysts in the spinal cord of rats subjected to severe spinal cord contusion. Surg Neurol 1994; 41: 241-249.

Hachen HJ, Rossier AB, Bouvier CA and Ritschard J. Deficiency within extrinsic prothrombin activator system in patients with spinal cord injury. Paraplegia 1974; 12: 132-138.

Halstead LS, Claus-Walker J, Feldman S, Patel VC. Drug absorption in spinal cord injury. Arch Phys Med Rehabil 1985; 66: 298-301.

Hashim GA and Day ED. Role of antibodies in T cell-mediated experimental allergic encephalomyelitis. J Neurosci Res 1988; 21: 1-5.

Hart MN, Waldschmidt MN, Hanley-Hyde JM, Moore SA, Kemp JD, Schelper RL. Brain microvascular smooth muscle expresses class II antigens. J Immunol 1987; 138: 2960-2963.

Hodgkinson SJ, Pollard JD, McLeod JG. Cyclosporin A in the treatment of chronic demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psych* 1990; 53: 327-330.

Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H: Presence of T- cytotoxic suppressor and common leukocyte antigen positive cells in Alzheimer's disease brain tissue. *Neurosci Lett* 1988; 91: 259- 264.

Iumashev GS, Petrova NV, Eliseev AT, Aleshkin VA, Rozina MN. Immune complexes in blood and liquor in patients with spinal cord injuries. *Klin Med* 1991; 69: 53-58.

Johansson B, Jonsson O and Ljung B. Tonic spraspinal mechanisms influencing the intestino-intestinal inhibitory reflex. *Acta Physiol Scand* 1968; 72: 200-204.

Johansson B and Langston JB. Reflex influence of mesenteric afferents on renal, intestinal and muscle blood flow and on intestinal motility. *Acta Physiol Scand* 1964; 61: 400-412.

Johnson D, Seeldrayers PA and Weiner HL. The role of mast cells in demyelination. 1. Myelin proteins are degraded by mast cells proteases and myelin basic protein and P2 can stimulate mast cell degranulation. *Brain Research* 1988; 444: 195-198.

Kahan BD, Wideman CA, Reid M, et al. The value of serial serum trough cyclosporine levels in human renal transplantation. *Transplant Proc* 1984; 16: 1195-1199.

Kahan BD. Individualization of cyclosporine therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Transplantation* 1985; 40: 457-476.

Kahan BD. Cyclosporine. *New Eng J Med* 1989; 321: 1725-1738.

Kasama T, Kobayashi K and Fukushima T. Production of interleukin 1 like factor from human peripheral blood monocytes and polymorphonuclear leukocytes by superoxidase anion: the role of interleukin 1 and reactive oxygen species in inflamed sites. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 53: 439-448.

Key EAH and Retzius MG. studien in der anatomic des nervencystems und des bidgewebes. Stockholm 1875: Samson and Wallin.

King PD, Katz DR. Mechanisms of dendritic cell function. *Immunol Today* 1990; 11: 206-211.

Konno H, Yamamoto T, Iwasaki Y, Saitoh T, Susuki H and Terushima H. Ia-expressing microglial cells in experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Acta Neuropathol* 1989; 77: 472-479.

Kunkel E, Dai HN, Bregman BS. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 1993; 119: 153-164.

Lampson LA: Molecular bases of the immune response to neural antigens. *Trends Neurosci* 1987; 10: 211-216.

Lauer K: The intrathecal immune response in multiple sclerosis: a different concept of specificity. *Medical Hypotheses* 1990; 31: 245-251. Laver WG, Air GM, Webster RG. Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities. *Cell* 1990; 61: 553-556.

Lemke M, Denediuk P, McIntosh TK, Vink R, Faden AI. Alterations in tissue Mg⁺⁺, Na⁺ and spinal cord edema following impact trauma in rats. *Bioch Bioph Res Com* 1987; 147: 1170-1175.

Ley General de Salud. Título Séptimo: De la Investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. Editorial Porrúa, 6a ed, México, D.F. 1990; pp 430-431.

Lindsley DL, Odell TT, Tausche FG. Implantation of functional erythropoietic elements following total-body irradiation. Proc Soc Exp Biol 1955; 90: 512-515.

Link H, Baig S, Olsson O, Yu-Ping J, Hojeberg B and Olsson T. Persistent anti-myelin basic protein IgG antibody response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. J Neuroimmunol 1990; 28: 237-248.

Loveland B, Simpson E. The non-MHC transplantation antigens: neither weak nor minor. Immunol Today 1986; 7-8: 223-229.

Madrazo I, Leon V, Torres C, Aguilera C, Varela G, Alvarez F, Fraga A, Drucker-Colín R. Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. N Eng J Med 1988; 318: 51.

Male D, Champion B, Cooke A and Owen M. Advanced Immunology. 2a ed, Gower Medical Publishing; New York USA 1991.

Many A, Schwartz RS. On the mechanism of immunological tolerance in cyclophosphamide-treated mice. Clin Exp Immunol 1970; 6: 87- 99.

Marion DW, Pollack IF and Lund RD. Patterns of immune rejection of mouse neocortex transplanted into neonatal rat brain, and effects of host immunosuppression. Brain Res 1990; 519: 133-143.

Massa PT. Hyperinductibility of Ia antigen on astrocytes correlates with strain-specific susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4219-4223.

Matsumoto Y, Kawai K and Fujiwara M: Analysis of the T cell repertoire for myelin basic protein in Thymus-grafted and other types of chimera: evidence that major histocompatibility complex molecules on accessory cells rather than T cell specificity mainly regulate susceptibility to autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1990; 20: 2119-2126.

Mattok GL. Premarketing biopharmaceutical requirements. *Drug Inf* 1988; 22: 143-148.

McCarron RM, Racke M, Spatz M, McFarlin DE. Cerebral vascular endothelial cells are effective targets for in vitro lysis by encephalitogenic T lymphocytes. *J Immunol* 1991; 147: 503-508.

Medawar PB: Immunity to homologous grafted skin. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 1948; 29: 58- 69.

Mizrachi BY, Ohry A, Aviel A, Rozin R, Brooks ME and Schwartz M. Systemic humoral factors participating in the course of spinal cord injury. *Paraplegia* 1983; 31: 287-293.

Nakayasu H, Ota K, Tanaka H, Irie H and Takahashi K. Suppression of actively induced and passively transferred experimental allergic neuritis by cyclosporin A. *J Neuroimmunol* 1990; 26: 219- 227.

Nicholas MK, Arnason BGW: Immunologic considerations in transplantation to the central nervous system. *Neural Regeneration and Transplantation*. 1989; 239-284.

Noback CH R, Demarest RJ. *Sistema nervioso humano*, 1ra ed. Mc Graw Hill, México 1980.

Palladini G, Grossi M, Maleci A, Lauro GM and Guidetti B. Immunocomplexes in rat and rabbit spinal cord after injury. *Exp Neurol* 1987; 95: 639-651.

Peress N, Siegelman J, Fleit HB, Fanger MW and Perillo E. Monoclonal antibodies identify three IgG Fc receptors in normal human central nervous system. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 53: 268-280.

Perry VH, Gordon S. Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 1988; 11: 273-277.

Peterson M, Miller J. Invariant chain influences the immunological recognition of MHC class II molecules. *Nature* 1990; 345: 172-174.

Pezeshkpour GI, Dalakas MC: Long-term changes in the spinal cords of patients with old poliomyelitis. *Arch Neurol* 1988; 45: 505- 508.

Pober JS, Gimbrone MA, LaPierre LA, Mendrick DA, Fiers W Rothlein R and Springer T. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin-1, tumour necrosis factor and immune interferon. *J Immunol* 1986; 137: 1893.

Prineas JW. Multiple sclerosis presence of lymphatic capillaries and lymphoid tissue in the brain and spinal cord. *Science* 1989; 66: 1123-1125.

Pryce G, Male DK and Sarkar C. Control of lymphocyte migration into brain: selective interactions of lymphocyte subpopulations with brain endothelium. *Immunology* 1991; 72: 393-398.

Quesniaux V, Tees R, Schreier MH, Maurer G and Van Regenmortel MH. Potential of monoclonal antibodies to improve therapeutic monitoring of cyclosporine. *Clin Chem* 1987; 33: 32-37.

Ramsdell F, Fowlkes BJ. Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science* 1990; 248: 1342-1348.

Rapoport SI. *Blood-Brain barrier in physiology and medicine*, 1st ed. Raven Press, New York 1976.

Rego A, Vargas R, Suarez KR, Foegh ML and Ramwell PW. Mechanism of cyclosporin potentiation of vasoconstriction of the isolated rat mesenteric arterial bed: Role of extracellular calcium. *A J Pharmacol Exp Ther* 1990; 254: 799-808.

Reier PJ, Stokes BT, Thompson FJ and Anderson DK. Fetal cell grafts into resection and contusion/compression injuries of the rat and cat spinal cord. *Exp Neurol* 1992; 115: 177-188.

Richert JR, Robinson ED, Deibler GE, Martenson RE, Dragovic LJ, Kies MW. Human cytotoxic T cell recognition of a synthetic peptide of myelin basic protein. *Ann Neurol* 1989; 26: 342-346.

Rivlin AS and Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg* 1977; 47: 577-581.

Ritschel WA. Hand book of basic pharmacokinetics, 2a ed, Drug Intelligence Publications, Inc. Hamilton Illinois USA 1980.

Rock KL, Gamble S, Rothstein L. Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. Science 1990; 249: 918-921.

Rodriguez M, Wynn D, Katzmann J. Terminal component of complement (C9) in the cerebro-spinal fluid of patients with multiple sclerosis and neurologic controls. Neurology 1990; 40: 855-857.

Rowland M and Tozer TN. Clinical Pharmacokinetics, 2a ed. Lea and Febiger, Philadelphia 1989.

Roye DP. Cervical spinal cord injury - A public catastrophe. J Traum 1988; 28: 1260-1264.

Ryffel B, Foxwell BM, Mihatsch MJ, Donatsch P, Maurer G. Biologic significance of cyclosporine metabolites. Transplant Proc 1988; 20: Suppl 2: 575-584.

Ryffel B, Foxwell BM, Gee A, Greiner B, Wocrlty G, Mihatsch MJ. Cyclosporine-Relationship of side effects to mode of action. Transplantation 1988; 46: 90s-96s.

Sawahuk RJ and Cartie LL. Liquid chromatographic determination of cyclosporin A in blood and plasma. Clin Chem 1981; 27: 1368- 1371.

Segal J, Brunnemann S, Gordon S and Ibrahim M. Decreased theophylline bioavailability and impaired gastric emptying in spinal cord injury. Curr Ther Res 1985A; 38: 831-846.

Segal JL, Gray DR, Gordon SK, Eltorai IM, Khonsari F and Patel J. Gentamicin disposition kinetics in humans with spinal cord injury. *Paraplegia* 1985B; 23: 47-55.

Segal J, Brunnemann S, Gray D, Gordon S and Ibrahim M. Impaired absorption of intramuscularly administered gentamicin in spinal cord injury. *Curr Ther Res* 1986A; 39: 961-969.

Segal JL, Brunneeman SR, Gordon SK and Eltorai IM. The absolute bioavailability of oral theophylline in patients with spinal cord injury. *Pharmacotherapy* 1986B; 6: 26-29.

Segal JL, Brunnemann SR. Clinical pharmacokinetics in patients with spinal cord injuries. *Clin Pharmacokinet* 1989; 17: 109-129.

Segal JL, Brunnemann SR, Gray DR. Gentamicin bioavailability and single-dose pharmacokinetics in spinal cord injury. *Drug Intell Clin Pharm* 1988; 22: 461-465.

Sharief M, Keir G, Thompson E. Intrathecal synthesis of IgM in neurological diseases: a comparison between detection of oligoclonal bands and quantitative estimation. *J Neurol Scie* 1990; 96: 131-142.

Shoskes DA and Wood KJ. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today* 1994; 15: 32-38.

Singer M: The role of ependyma in the regeneration of the spinal cord in the urodele amphibian tail. *J Comp Neurol* 1978; 180: 349- 374.

Sloan DJ, Wood MJ and Charlton HM. The neuroimmune response to intracerebral neural grafts. Trends Neurosci 1991; 14: 341-346.

Sobel RA, Schneeberger EE, Colvin RB. The immunopathology of acute experimental allergic encephalomyelitis. Am J Pathol 1988; 131: 547-558.

Sobel R, Ames M. Major histocompatibility complex molecule expression in the human central nervous system: immunohistochemical analysis of 40 patients. J Neuropathol Exp Neurol 1988; 47: 19-28.

Sollinger HW, Deierhoi MH, Belzer FO, Diethelm AG and Kauffman RS. RS-61443-A phase I clinical trial and pilot rescue study. Transplantation 1992; 53: 428-432.

Starzl TE. The development of clinical renal transplantation. Am J Kid Dis 1990; 16: 548-556.

Starzl TE, Marchioro TL, Porter KA, et al. The use of heterologous antilymphoid agents in canine renal and liver homotransplantation and in human renal homotransplantation. Surg Gynecol Obstet 1967; 124: 301-318.

Steel RG and Torrie JH. Principles and procedures of statistics with special reference to the biological sciences, 1st ed. McGraw Hill, New York 1960.

Steinman JL. Lymphocyte homing to the central nervous system. In: Johansson BB, Owman C, Widner H (eds) Pathophysiology of the blood-brain barrier. Long term consequences of barrier dysfunction for the brain. Fernstrom Foundation Series 14, Amsterdam, Elsevier, 1990, pp 453-466.

Steinmuller D. Skin-specific histocompatibility antigens. En Ninneman JL (ed): "Traumatic injury, infection, and other immunologic sequelae" Baltimore: University Park Press, 1983 pp 181-196.

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

Streit WJ, Graeber MB. Functional plasticity of microglia: A review. Glia 1988; 1: 301-307.

Sung CL, Yasminch JL and Brudzinsky AM. Specific measurements of cyclosporin A in transplant patient specimens by RIA with a monoclonal antibody and 125I-tracer. Clin Chem 1988; 34: 1260 abstract No. 525.

Taranova NP, Makarov AIU, Amelina OA, Luchakova OS, Loboda EB, Lesikin IB. The production of autoantibodies to nerve tissue glycolipid antigens in patients with traumatic spinal cord injuries. Zh Vopr Neurokhir (4-5): 21-24.

Tarlov DM. Spinal cord compression studies. III. Time limits for recovery after gradual compression in dogs. Arch Neurol Psychiatry 1954 ; 71: 588-597.

Tessler A. Intraspinal Transplants. Ann Neurol 1991; 29: 115-123.

The Multiple Sclerosis Study Group. Efficacy and toxicity of cyclosporine in chronic progressive multiple sclerosis: a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. Ann Neurol 1990; 27: 591-605.

Ting A, Simpson E. Current clinical and immunological concepts. 1st ed. Bailliere Tindal, London 1989.

Ting J, Shigekawa BL, Linthicum DS, Weiner LP and Frelinger JA. Expression and synthesis of murine immune response-associated (Ia) antigen by brain cells. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 3170- 3174.

Tjandra-Maga B and Verbesselt R. Comparison of cyclosporin A measurement in whole blood by six different methods. J Clin Chem Clin Biochem 1990; 28: 53-57.

Tooyama I, Kimura H, Akiyama H, McGeer PL: Reactive microglia express class I and class II major histocompatibility complex antigens in Alzheimer's disease. Brain Research 1990; 523: 273- 280.

Tugwell P, Bombardier C, Gent M, et al. Low-dose cyclosporin versus placebo in patients with rheumatoid arthritis. Lancet 1990; 335: 1051-1055.

Umehara F, Goto M, Wekerle H and Meyermann R: Experimental autoimmune encephalomyelitis in the maturing central nervous system. Laboratory Investigation 1990; 62: 147-155.

Unanue ER. Antigen-presenting function of the macrophage. Ann Rev Immunol 1984; 2: 395-428.

Vries J, Baarsma GS, Zaal MJW, Boen-Tan TN, Rothova A, Buitenhuis HJ, Schweitzer CMC, de Keizer RJW and Kijlstra A. Cyclosporin in the treatment of severe chronic idiopathic uveitis. Br J Ophthalmol 1990; 74: 344-349.

Wagner CR, Veitch MR, Burger DR. Expression of I region-associated (Ia) and interleukin 1 by subcultured human endothelial cells. *Cell Immunol* 1985; 77: 196-201.

Wakefield CL and Eidelberg E. Electron microscopic observations of the delayed effects of spinal cord compression. *Exp Neurol* 1975; 48: 637-646.

Wartak J. *Clinical Pharmacokinetics: A Modern Approach To Individualized Drug Therapy*, 2nd ed. PRAEGER SPECIAL STUDIES, New York 1983.

Wassef R, Cohen Z and Langer B. Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats. *Transplantation* 1985; 40: 489-493.

Wekerle H, Linington C, Lassmann H and Meyermann R: Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci* 1986; 9: 271- 277.

Willenborg DO, Staten EA, Eidelberg E.: Studies on cell-mediated hypersensitivity to neural antigens after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 1977; 54 383-392.

Wrathall JR. Behavioral methods for evaluating rats with contusive spinal cord injury: The combined behavioral score. En: *Criteria for assessing recovery of function: Behavioral methods* (M. Brown y M.E. Goldberger, Eds.) , pp 26-33.

Yoffey JM and Courtice M. *Lymphatics, lymph and the lymphomyeloid complex*, 1st ed. Academic Press, New York 1970.

Yoshimura N, Matsui S, Hamashima T, Oka T. Effect of a new immunosuppressive agent, FK506, on human lymphocyte responses in vitro. *Transplantation* 1989; 47: 351.

Zinkernagel RM. Restriction of in vitro T cells mediate cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semi-allogeneic system. *Nature* 1974; 248: 701-702.