

11281
4/29
BIBLIOTECA

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**EVALUACION MORFOFUNCIONAL DEL IMPLANTE DE NERVIO
PERIFERICO Y METILPREDNISOLONA DESPUES DE
CONTUSION MEDULAR EN RATAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PRESENTA

GABRIEL GUIZAR SAHAGUN

México, D.F.

marzo de 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COMITE TUTORIAL

DR. IGNACIO MADRAZO NAVARRO

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social; México D.F.

DR. ALFREDO FERIA VELASCO

División de Investigación Biomédica, Instituto Mexicano del Seguro Social; México D.F.

DRA. REBECCA FRANCO BOURLAND

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán; México D.F.

JURADO

DR. JULIO SOTELO MORALES

Subdirección General de Investigación, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suárez; México D.F.

DR. ALFREDO FERIA VELASCO

División de Investigación Biomédica, Instituto Mexicano del Seguro Social; México D.F.

DR. IGNACIO MADRAZO NAVARRO

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social; México D.F.

DR. SIMON BRAILOWSKY

Laboratorio de Neurofarmacología, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México; México D.F.

DRA. REBECCA E. FRANCO BOURLAND

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán; México D.F.

DR. GILBERTO CASTAÑEDA HERNANDEZ

Departamento de Farmacología y Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional; México D.F.

DR. RAUL MENA LOPEZ

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional; México D.F.

INDICE GENERAL

Resumen	1
Antecedentes	3
Introducción	3
Fisiopatología de la lesión traumática de médula espinal	4
Regeneración y plasticidad en médula espinal	8
Nervio periférico como material de trasplante al SNC	12
Metilprednisolona como neuroprotector	13
Trasplantes al SNC como neuroprotectores	14
Justificación	16
Planteamiento del problema	17
Hipótesis	18
Objetivos	19
Material y métodos	20
Diseño del experimento	20
Procedimientos	20
Evaluación	25
Consideraciones éticas y legales	31
Resultados	32
Índice de supervivencia	32
Evaluación funcional	32
Evaluación morfológica general	39
Morfometría	53
Correlación morfo-funcional	59
Correlación función motora-axones aberrantes	61
Discusión	62
Neuroprotección	62
Plasticidad	66
Índice de supervivencia	68
Escala funcional ponderada	69
Conclusiones	70
Referencias bibliográficas	71

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1- Locomoción libre sobre el piso	33
Fig. 2- Prueba del plano inclinado	34
Fig. 3- Caminata sobre reja de alambre	35
Fig. 4- Base de sustentación delantera	36
Fig. 5- Base de sustentación trasera	37
Fig. 6- Longitud de zancada	38
Fig. 7- Imagen panorámica del epicentro	40
Fig. 8- Epéndimo normal y conglomerados celulares intracavitarios	41
Fig. 9- Neoformación del epéndimo	42
Fig. 10- Inmunorreactividad a GFAP	43
Fig. 11- Degeneración cefálica al epicentro	46
Fig. 12- Degeneración caudal al epicentro	47
Fig. 13- Axones aberrantes en cantidad moderada	48
Fig. 14- Axones aberrantes abundantes	49
Fig. 15- Axones aberrantes ausentes	50
Fig. 16- Axones aberrantes ausentes	51
Fig. 17- Plasticidad y astrocitos reactivos	52
Fig. 18- Area de tejido medular preservado en epicentro	54
Fig. 19- Area de tejido medular preservado 2 mm cef. a epicentro	55
Fig. 20- Area de tejido medular preservado 4 mm cef. a epicentro	56
Fig. 21- Area de tejido medular preservado 2 mm caud. a epicentro	57
Fig. 22- Area de tejido medular preservado 4 mm caud. a epicentro	58
Fig. 23- Evaluación funcional con escala ponderada	60
Tabla I- Porcentaje de ratas con colaterales axónicos aberrantes	45
Tabla II- Area preservada de parénquima medular	53
Tabla III- Correlación morfo-funcional	59
Tabla IV- Correlación función motora-axones aberrantes	61

ABREVIATURAS

ANOVA:	análisis de varianza
CON:	únicamente contusión, sin algún otro tratamiento
aFGF:	factor de crecimiento fibroblástico ácido
bFGF:	factor de crecimiento fibroblástico básico
GAP-43:	proteína asociada al crecimiento 43
GFAP:	proteína ácida fibrilar glial
INP:	implante isogénico de células disociadas de nervio periférico
LTME:	lesión traumática de médula espinal
ME:	médula espinal
MP:	metilprednisolona
M+I:	tratadas con la combinación de metilprednisolona e implante
NASCIS2:	segundo estudio nacional sobre lesión aguda de médula espinal
NGF:	factor de crecimiento nervioso
PBS:	amortiguador salino de fosfatos 0.01 M, pH 7.4
SNC:	sistema nervioso central
SNP:	sistema nervioso periférico
trk:	receptores de alta afinidad del factor de crecimiento nervioso
VEH:	tratadas con el vehículo del implante (solución salina de Hank)

RESUMEN

La lesión traumática de la *médula espinal* [ME] permanece como un problema sin resolver, a pesar de la mejoría relativa que se obtiene con algunos tratamientos farmacológicos. La *metilprednisolona* [MP] se considera el "estándar de oro" en el tratamiento para la lesión aguda de la ME. Se recomienda que cualquier tratamiento nuevo sea tan bueno o mejor que la MP. Debido a las limitaciones del tratamiento con MP, en el presente trabajo probamos una alternativa terapéutica usando *implante singénico de células disociadas de nervio periférico* [INP] para reforzar el efecto de la MP, en un modelo de contusión medular en rata, que semeja la lesión traumática de la ME en humanos.

Bajo anestesia, ratas singénicas Fischer adultas, fueron sometidas a contusión moderada (45 g cm^{-1}) de la ME en T-9. Cinco grupos de 6 ratas c/u fueron tratados inmediatamente después de la lesión de la siguiente manera: 1) MP, 3 dosis de 30 mg kg^{-1} IP seguidas por 2 dosis de 60 mg kg^{-1} IM en un lapso de 24 h; 2) INP en la zona de lesión, usando $10 \mu\text{l}$ de células disociadas en sol. de Hank; 3) combinación de MP e INP; 4) Inyección de $10 \mu\text{l}$ de sol. de Hank [VEH] en la zona de lesión; 5) únicamente lesión. Antes de la cirugía, todos los animales se condicionaron para realizar las pruebas funcionales. Después de la lesión, se evaluaron cada semana con una batería de pruebas funcionales incluyendo: marcha libre sobre el piso, prueba del plano inclinado, caminata en rejilla de alambre y análisis de huellas podales. Ocho semanas después de la lesión, las ratas se sacrificaron para estudios morfológicos.

El mejor grupo en las pruebas funcionales fue el tratado únicamente con MP, mientras que el peor fue el control que no recibió tratamiento. En el estudio morfológico se observó, en todos los casos, ausencia de sustancia gris a nivel del epicentro (zona de mayor destruc-

ABSTRACT

Besides the relative improvement obtained with pharmacological treatments, acute *spinal cord* [SC] injury remains a non-solved problem. *Methylprednisolone* [MP] is considered the clinical standard of therapy after acute SC injury. It has been recommended that any new treatment be as good or better than MP. Because of the limited effectiveness of the treatment of SC injury with MP, in this work we tested a therapeutic alternative using a syngeneic *implant of dissociated cells from peripheral nerve* [PNI] to boost the effect of MP, in an experimental SC contusion model in rats that resembles human SC injury.

Under anesthesia, adult female inbred Fischer rats were subjected to SC contusion (45 g cm^{-1}), at T9 level. Five groups of 6 rats each were treated immediately after the injury as follows: 1) MP, 3 doses of 30 mg kg^{-1} IP followed by 2 doses of 60 mg kg^{-1} IM in a period of 24 h; 2) PNI to the SC injured area using $10 \mu\text{l}$ of dissociated cells (in Hank's solution); 3) combination of MP and PNI (as above); 4) injection of $10 \mu\text{l}$ of *Hank's solution* [VEH] in the SC injured area; 5) injured only. To assess the motor deficit and recovery, before injury rats were trained to cross a runway, and to walk on a grid. Functional tests (open field walking, inclined plane, grid walking, and footprint analysis) were assessed weekly. Rats' performance was videotaped for subsequent quantitative analysis. Finally, rats were killed on week 8 after SC injury, for SC morphologic and morphometric analyses.

The best functional outcome was observed in rats treated with MP only. Rats of the control group (injured only) had the poorest functional scores. The other 3 groups showed intermediate functional recovery. Morphologic studies revealed that in all cases, the gray matter at the epicenter (zone of less spared SC

ción medular) y preservación de una cantidad variable de sustancia blanca, la cual fue significativamente menor en todos los grupos de ratas lesionadas, en relación con las normales (aprox. entre 10 y 20% del normal). Al comparar los grupos de ratas lesionadas entre sí, se encontró diferencia significativa a favor de las tratadas con MP (sola o combinada con INP) vs únicamente lesionadas. Usando inmunohistoquímica con GFAP se identificaron abundantes astrocitos reactivos en el parénquima medular preservado de la zona de lesión; fueron escasos o ausentes en las porciones destruidas o con infiltrado inflamatorio abundante. Con la impregnación argéntica de Sevier y Munger, a nivel del epicentro y en regiones vecinas, se identificó un fenómeno de plasticidad caracterizado por la presencia de colaterales axónicos neoformados, con un trayecto aberrante. En general, la cantidad de estos axones en animales no tratados se calificó de moderada, en los tratados con solo INP se calificó de abundante, mientras que en las ratas que recibieron MP sola o combinada con INP, la presencia de los axones aberrantes fue escasa o ausente.

Se concluye que la MP tiene un moderado efecto neuroprotector y bloquea parcialmente la formación de colaterales axónicas aberrantes a nivel del epicentro. El INP no demostró ser útil como neuroprotector y aparentemente favorece la neoformación de colaterales axónicas en la zona de lesión.

tissue) was lost. A variable amount of white matter was spared, located mainly at the lateral and ventral portions of the damaged SC. The amount of spared white matter at the epicenter was in all injured groups significantly less than uninjured (between 10 and 20% of uninjured approx.). Among the injured groups, significant differences were found between groups treated with MP (alone or combined with PNI) and the injured only group. Using immunohistochemistry to GFAP, abundant reactive astrocytes were identified in the spared SC tissue, but they were scarce or absent in areas of parenchymal destruction or in presence of inflammatory infiltrate. A particular phenomenon of plasticity at the epicenter and neighboring area was observed after using the Sevier-Munger silver nitrate method for nerve fibers. It is characterized by the sprouting of axon collaterals with an aberrant course. In general, the amount of these axons was catalogued as moderated in injured only animals, abundant in the PNI group, and scarce or absent in animals treated with MP (alone or combined with PNI).

In conclusion, under the paradigms used in this work, MP has a moderate neuroprotective effect, and also partially blocks the abnormal sprouting at the area of injury. PNI does not show a neuroprotective effect, although it enhances the abnormal sprouting at the lesion zone.

ANTECEDENTES

A) Introducción

La lesión traumática de la médula espinal [LTME] en los seres humanos representa un problema socioeconómico de gran magnitud. Su manejo integral es muy complejo, requiere de la intervención de un grupo multidisciplinario y de tecnología especializada desde el momento del accidente hasta que el individuo es rehabilitado, generalmente con graves secuelas neurológicas permanentes.^{19, 72, 171} La morbi-mortalidad es considerablemente elevada, aun en los centros de atención especializados en este tipo de lesión.^{19, 171} La incidencia de LTME en la población civil de Estados Unidos es de 40 por 1,000,000 de habitantes por año y la mortalidad global por dicha lesión es del 11%.³¹ En nuestro país no contamos con estadísticas al respecto.

El desarrollo de diferentes modelos de LTME en animales ha permitido conocer muchos aspectos de la fisiopatología y probar diferentes estrategias de tratamiento, también han permitido profundizar en el conocimiento de la degeneración, regeneración y plasticidad del sistema nervioso central [SNC]. Actualmente se acepta que entre los diferentes modelos de LTME, la lesión experimental tipo contusión-compresión es el modelo de lesión que más fielmente reproduce la fisiopatología de la mayor parte de lesiones medulares en humanos.⁵³

Hasta el momento, las estrategias utilizadas en seres humanos para evitar o limitar las secuelas neurológicas después de una LTME no han mostrado resultados halagadores, a excepción de la administración de metilprednisolona [MP] durante las primeras 8 horas después de producida la lesión, lo que permite una cierta mejoría en la función motora de los pacientes sometidos a esta terapia.^{32-34, 192}

B) Fisiopatología de la lesión traumática de la médula espinal

Después de producir una LTME, el daño no queda confinado exclusivamente al sitio de la lesión original. Al paso del tiempo también se produce destrucción del parénquima medular contiguo, así como destrucción o atrofia de algunas neuronas distantes a la zona de lesión.^{68, 69, 81, 107, 108, 175}

El período de latencia entre el momento de la lesión y el desarrollo de necrosis máxima, permite diferenciar los eventos de la LTME en "primarios" y "secundarios". Los eventos primarios son el resultado directo del trauma inicial y varían de acuerdo al tipo e intensidad del mismo, mientras que la lesión secundaria es la producida por una secuencia de eventos deletéreos que siguen a la lesión primaria y que conllevan a un grado mayor de necrosis parenquimatosa.^{81, 108, 194}

Diferentes grupos de investigadores han reportado diversos mecanismos secundarios como responsables del daño final en la LTME. Probablemente la desregulación iónica sea el mecanismo de lesión secundaria más temprano, que obedece a la perturbación inicial de las membranas de las células dañadas, inducida por el evento traumático primario.^{14, 16, 99, 116, 161, 190} A medida que el tiempo transcurre, se desencadenan otros mecanismos deletéreos, entre los que se pueden destacar: producción de radicales libres y peroxidación de lípidos, isquemia y liberación de neurotransmisores con efecto tóxico.

Desregulación iónica

Como consecuencia del trauma inicial, las células de la sustancia gris y muchos axones de la sustancia blanca pierden el control de la regulación iónica y osmótica. Por tal motivo se inicia un intenso movimiento iónico que está determinado por sus gradientes de concentración y de carga; entre otras alteraciones a nivel intracelular, ocurre incremento de los iones de sodio y calcio, con disminución concomitante de los iones de potasio y magnesio. Al verse alterado el gradiente iónico, cesa rápidamente la conducción de impulsos nerviosos y se favorece la formación de edema.^{105, 116, 190}

El incremento intracelular descontrolado del calcio iónico libre, desencadena mecanismos de lesión que pueden llevar a la muerte celular por diversos mecanismos incluyendo: inhibición de las funciones mitocondriales, depleción de ATP por activación de ATPasa, activación de proteasas y fosfolipasas con el consiguiente catabolismo de proteínas y lípidos estructurales e inhibición del metabolismo celular.^{14, 99, 105, 161}

Los neurofilamentos constituyen la parte fundamental del citoesqueleto axonal ya que mantienen el calibre y la longitud del axón y participan en el transporte rápido.^{59, 114, 115,}

¹⁶² Las proteasas neutras activadas por calcio, producen una proteólisis masiva de los neurofilamentos, que puede llevar a la pérdida de soporte estructural con colapso progresivo y fragmentación del axón, todo lo cual ocurre durante las primeras horas o días subsiguientes a la lesión.^{15, 17, 99, 161, 162} El calcio libre intracelular también activa proteasas y fosfolipasas que a su vez encuentran como substratos los componentes de la mielina y pueden, en el mismo lapso, producir una desmielinización completa en el área de la lesión.^{15, 16, 99}

La disminución intracelular del magnesio iónico es directamente proporcional a la severidad de la lesión y su baja concentración altera actividades enzimáticas, disminuye la producción de energía y la síntesis de proteínas, además de que incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática.¹¹⁶ La concentración elevada de potasio en el espacio extracelular daña la conducción nerviosa y contribuye a la destrucción neuronal al favorecer la liberación excesiva de aminoácidos excitatorios.¹²²

Neurotoxicidad por radicales libres y peroxidación de lípidos

Después de una lesión neurológica aguda se producen abundantes radicales libres en la zona de lesión, originados principalmente durante la respiración mitocondrial, en la isquemia-reperfusión, por la conversión irreversible de la deshidrogenasa de xantina a oxidasa de xantina, como consecuencia de la autoxidación de catecolaminas, en la cascada del ácido araquidónico y como producto de los neutrófilos activados.^{40, 93, 102}

El SNC puede ser particularmente susceptible al daño inducido por radicales libres por varias razones. Los lípidos de membrana son especialmente ricos en colesterol y ácidos grasos poli-insaturados, los cuales son blanco de compuestos activos de oxígeno (radicales libres de oxígeno y peróxido de hidrógeno).⁸ El SNC es pobre en actividad de catalasa y de glutatión peroxidasa y tiene una cantidad moderada de superóxido dismutasa. Por el contrario, es rico en hierro y el hierro es el principal inductor de la producción de radicales libres en lesiones del SNC. El ácido ascórbico se encuentra en altas concentraciones tanto en la sustancia gris como en la blanca. Cuando se presenta solo y en altas concentraciones cumple una función antioxidante, mientras que en presencia del hierro y del cobre liberados por la extravasación de sangre después del trauma, el ácido ascórbico se convierte en un potente oxidante y produce grandes cantidades de radicales libres.⁷ Las neuronas contienen un gran número de lisosomas, cuyas membranas son dañadas por los radicales libres, dando por resultado la liberación de enzimas hidrolíticas dentro del citoplasma de las propias neuronas.^{63, 188}

Tanto en lesiones medulares como cerebrales se ha demostrado incremento en la producción de malondialdehído (producto de la lipoperoxidación). En ambas lesiones se ha demostrado oxidación del colesterol extraíble y consumo de los principales anti oxidantes (ácido ascórbico y alfa tocoferol),^{8, 145} así como inhibición de la actividad de la ATPasa sodio-potasio dependiente, siendo ésta una de las manifestaciones tempranas de la peroxidación de lípidos.⁴⁹

Para evaluar el tiempo en el que se produce la lipoperoxidación, en la ME de ratas lesionada por compresión se midieron los niveles de malondialdehído a 1 y 15 min, así como a 1, 2 y 4 h postlesión; se encontró un incremento significativo a partir de los 15 min, alcanzó el máximo a 1 h y después fue disminuyendo.¹⁸

Isquemia

La isquemia que se presenta después de la LTME desempeña un papel importante en el desarrollo de la lesión secundaria. Los valores del flujo sanguíneo inicialmente

permanecen en un rango normal y alcanzan su nivel crítico en la región central entre una y tres horas postlesión; en la sustancia blanca el nivel crítico se alcanza más tardíamente. El grado de isquemia es directamente proporcional a la intensidad de la lesión e inversamente a la extensión de la recuperación funcional.¹³

Entre los mecanismos fisiopatológicos de la isquemia, diferentes autores destacan:

- 1- La acción directa del traumatismo sobre los vasos sanguíneos.^{13, 112, 176}
- 2- La hipotensión arterial sistémica ocasionada por disminución de la actividad simpática y predominio de la actividad parasimpática.^{13, 176}
- 3- La vasoconstricción local por:
 - a. Espasmo del músculo liso arteriolar como resultado de la elevación de los niveles de calcio intracelular.^{92, 158}
 - b. Elevación de metabolitos vasoactivos. El incremento intracelular de calcio iónico activa de inmediato a la fosfolipasa A_2 lo que conduce a la liberación de ácido araquidónico y a la formación enzimática subsecuente de sus metabolitos eicosanoides entre los que se incluyen a las prostaglandinas $F_{2\alpha}$ y al tromboxano A_2 .^{92, 100, 101, 106, 134, 166, 186}
 - c. Producción de radicales libres y peroxidación de lípidos vasculares.^{58, 77, 92}
- 4- Microtrombosis por adherencia plaquetaria a las paredes vasculares alteradas, lo cual pudiera también estar determinado por un desbalance entre tromboxano y prostaciclina.^{82, 92, 100, 101}

Excitotoxicidad

Algunos aminoácidos excitatorios como el glutámico, el aspártico y el ácido quinolínicico contribuyen al daño neuronal secundario.^{27, 64, 143, 147, 184} Dichos aminoácidos en condiciones normales se encuentran almacenados en las neuronas para ser utilizados como neurotransmisores. Sin embargo, después del trauma se liberan en grandes cantidades al espacio extracelular como resultado de la lesión directa de la membrana celular que los contiene, o bien, como resultado de la isquemia.¹⁶⁷ El ácido quinolínicico puede producirse en las células inflamatorias infiltradas en la zona de lesión.^{27, 147} Los aminoácidos

excitatorios libres producen extensa excitación de las neuronas viables, en parte por permeación membranal de calcio a nivel de los receptores N-metil-D-aspartato.^{133, 147, 184} El efecto tóxico de dichos aminoácidos se conoce como excitotoxicidad.

C) Regeneración y plasticidad en médula espinal

Es bien sabido que en los mamíferos adultos las neuronas no tienen la potencialidad para dividirse^{149, 150} y que los axones centrales lesionados no se regeneran de manera apropiada y espontánea para permitir el restablecimiento funcional.^{22, 23, 65, 88, 107, 169} Santiago Ramón y Cajal demostró que después de seccionar la ME de mamíferos, algunos axones se empezaban a regenerar, sin embargo, dicho proceso se detenía después de las primeras dos semanas de la lesión, siendo incapaces de retornar a sus blancos denervados; a este fenómeno lo denominó *regeneración abortiva*.¹⁵⁰ El aborto de la regeneración de los axones medulares es un problema multifactorial: la cicatriz fibrogliol^{123, 151, 182, 183} y las cavidades que se forman en el sitio de la lesión tiene un efecto de barrera física para el crecimiento axonal,^{85, 108} el crecimiento axonal a través de la lesión también se detiene debido al establecimiento de sinapsis inapropiadas (al azar) entre los brotes de crecimiento que emergen de los axones lesionados y neuronas denervadas muy próximas a los mismos;²² el cono de crecimiento axonal es inhibido por contacto con pequeñas proteínas de membrana con masa molecular definida en 35 kDa (NI-35) y 250 kDa (NI-250), presentes en la membrana de los oligodendrocitos maduros y en su producto: la mielina central^{148, 164, 165} o por una fracción de proteoglicanos presente en la membrana de la microglia activada.²⁹

Durante la última década, con la utilización de diferentes estrategias, se ha logrado favorecer el recrecimiento a gran distancia de axones medulares seccionados. Schwab y sus colaboradores han conseguido regeneración exitosa de los axones de la vía corticoespinal de rata. Ratas de 2 semanas de edad sometidas a una sección medular a nivel torácico, tratadas al nacimiento con radiaciones X para destruir los oligodendrocitos y evitar que se formara la mielina, 2-3 semanas después de la lesión mostraron recrecimiento de los axones corticoespinales 4.5-6 mm por abajo del sitio de lesión (el máximo fue de

18.7 mm).¹⁶⁰ En otro trabajo reciente, también seccionaron la porción dorsal de la ME incluyendo la vía piramidal en su totalidad, en ratas jóvenes y adultas; aplicaron un anticuerpo (IN-1) el cual neutraliza las proteínas asociadas a la mielina que inhiben el crecimiento axonal; unas semanas después encontraron recrecimiento de los axones corticoespinales 2.5 a 3.5 mm por abajo del nivel de lesión. En el mismo estudio demostraron que la neurotrofina-3 promueve un intenso crecimiento colateral de las fibras corticoespinales seccionadas, aunque no se observó recrecimiento a partir de la punta seccionada.¹⁶³

Si en un estado temprano del desarrollo se lesiona el sitio por donde deben crecer las fibras corticoespinales, éstas no pueden crecer a través del sitio de lesión y forman una vía aberrante a través del tejido no dañado, rodeando el sitio de lesión; aparentemente hacen sinapsis con sus blancos apropiados en sentido caudal a la lesión.^{24,41} La capacidad para reorientar el crecimiento de las fibras corticoespinales en desarrollo está restringida a los días 5-6 postnatal en ratas.²⁴ Es posible que este fenómeno esté relacionado con cambios en el microambiente en torno a la vía piramidal en desarrollo, por ejemplo, la formación de mielina en el sistema de vías ascendentes largas vecinas a la vía piramidal pueden suprimir la capacidad de recrecimiento de los axones corticoespinales. El período crítico de 5 a 6 días postnatal que permite el recrecimiento de la vía piramidal de manera espontánea, puede ser extendido hasta 30 días postnatal en presencia de un trasplante de médula espinal [ME] fetal.⁴³

Uno de los resultados recientes más alentadores fue reportado por Iwashita et al.¹⁰⁴ quienes, en ratas neonatales, resecaron un segmento completo de ME torácica y lo reemplazaron con ME fetal de la misma región, manteniendo en el implante la orientación rostro-caudal idéntica al segmento medular extirpado; demostraron regeneración axonal de vías ascendentes y descendentes, entre las que se incluyen: corticoespinal, rubroespinal, retículoespinal, rafeespinal, espinocerebelar y espinotalámica.

Un proceso diferente a la regeneración axonal (recrecimiento y conectividad apropiada de los axones lesionados), es el crecimiento de axones colaterales que emergen

de axones intactos, generalmente para ocupar los sitios que los axones lesionados dejan denervados. A este último proceso se le conoce como plasticidad anatómica y se le ha atribuido la mejoría funcional parcial que suele observarse después de lesiones medulares incompletas^{78, 98, 113, 138}

Al principio de la década de los cincuenta, Edds⁶¹ describió el fenómeno de crecimiento nervioso colateral a nivel de sistema nervioso periférico [SNP]. A fines de la misma década, Liu y Chambers¹²⁰ demostraron que la plasticidad anatómica no era un fenómeno exclusivo del SNP, al observar dicho fenómeno en lesiones experimentales de ME. En las últimas décadas, la neuroplasticidad ha sido objeto de múltiples estudios. En la actualidad, el término "neuroplasticidad" se usa para describir los principios asociados tanto con la reorganización neuronal que se presenta después del daño al sistema nervioso, como con la nueva organización neuronal creada por un factor inductor del ambiente externo. La primera, se conoce como plasticidad anatómica o estructural, se relaciona con fenómenos de regeneración y de degeneración, y se enfoca a los mecanismos que inducen, guían y sostienen los cambios; la segunda, se conoce como plasticidad sináptica, se relaciona con el aprendizaje y con la memoria, y se enfoca más a los estímulos que inician los cambios, así como a los efectos fisiológicos y funcionales de éstos.^{35, 74, 109}

Después de una LTME, en el área de lesión, se crea un microambiente favorable para que se den fenómenos de plasticidad anatómica, incluyendo la formación de colaterales axónicas. El microambiente favorable se da de manera espontánea, principalmente por el incremento en la producción de diferentes factores tróficos, por una mayor expresión de receptores para los mismos y por el incremento en la producción de proteínas asociadas al crecimiento, particularmente GAP-43. A continuación, el resultado de algunos trabajos al respecto:

- En un estudio a 10 días y 6 semanas postlesión se encontró una fuerte elevación del receptor de alta afinidad del factor de crecimiento nervioso [trk] tipo B y de su RNA mensajero en el tejido cicatrizal que delimita la zona de lesión. Otros factores como el factor de crecimiento nervioso, el factor neurotrófico derivado del cerebro, las neuro-

trofinas 3 y 4, trk y trkC, solo mostraron un incremento pequeño; la inmunoreactividad se localizó en neuronas, astrocitos y células de leptomeninges; los axones neoformados se concentraron en áreas con alta concentración de proteína trkB.⁷³

- A 2 días postlesión se incrementó la expresión de factor de crecimiento fibroblástico ácido [aFGF] en motoneuronas y en neuronas de sustancia gris intermedia cercana al sitio de lesión, este incremento se mantuvo a 5 y 12 días postlesión. El bFGF no se modificó a los 2 días, pero a los 5 días se incrementó en el citoplasma y núcleo de los astrocitos reactivos que limitan la zona de lesión, así como en los cordones posteriores.¹¹¹

- Incremento importante del RNAm del bFGF en la zona de lesión desde 6 h postlesión, manteniéndose elevado a 1 y 7 días; a 7 días se localizó solo en la porción rostral de la ME ; no encontraron cambios del RNAm del aFGF, NGF o trkA a 6h, 1 y 7 días postlesión.⁷¹

- El NGF se incrementa a nivel de la zona de lesión, alcanza su máximo a los 7 días y disminuye a 2 y 4 semanas.¹²

- El RNAm del receptor de baja afinidad del NGF manifestó su máxima expresión a 7 días postlesión; se encontró asociado con células de vasos sanguíneos neoformados a nivel del epicentro.¹⁵²

- Después de lesión del cordón anterior, desde 2 días hasta 8 semanas que duró el estudio, se demostró expresión del receptor de NGF en motoneuronas afectadas y tejido cicatrizal, principalmente en las células perivasculares que no son pericitos.¹⁵⁶

La presencia de niveles altos de GAP-43 se ha correlacionado con periodos de crecimiento axonal tanto durante el desarrollo como durante la regeneración y la plasticidad anatómica; se piensa que es la molécula clave en la regulación del crecimiento axonal.^{168, 172, 173} En diferentes modelos de LTME se ha reportado elevación significativa de los niveles de GAP-43 o de su RNAm, desde 1 día hasta 4 semanas postlesión, en diferentes poblaciones neuronales, incluyendo neuronas del núcleo rojo,¹⁷⁷ cuerpos neuronales y axones localizados en torno a la zona de lesión^{5, 52} y motoneuronas axotomizadas de la ME.¹¹⁹

D) Nervio periférico como material de trasplante al SNC

Al principio de la década pasada, el grupo de Aguayo y colaboradores demostraron, (empleando neurotrazadores), que los injertos de nervio periférico favorecían la regeneración de neuronas centrales *in vivo*.^{2, 21, 55, 153-155} Con estos resultados, reafirmaron el concepto de que las neuronas del SNC expresan su capacidad de regenerarse cuando se les proporciona un microambiente favorable.

Con los injertos de fragmentos de nervio periférico colocados en la ME se ha demostrado que los axones regenerados son capaces de crecer varios milímetros o inclusive centímetros en el interior del nervio injertado, pero son incapaces de continuar su crecimiento más allá de 1 a 2 mm al retornar a la ME. Además, no forman sinapsis apropiadas que permitan la recuperación de funciones perdidas,^{21, 55, 154, 185} lo que ha limitado su utilización en la clínica.

Recientemente se demostró que los injertos de nervio periférico al SNC estimulan la expresión más intensa y sostenida de la proteína asociada al crecimiento [GAP-43] por neuronas axotomizadas localizadas cerca del implante y por las células de Schwann del implante, fenómeno que se correlaciona estrechamente con la regeneración de las neuronas dañadas.¹⁸¹

En estudios *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que la capacidad del SNP para favorecer la regeneración, radica en las células de Schwann, particularmente en algunas moléculas de superficie.^{9, 25, 46, 66, 141}

Mediante la técnica de cultivo de tejidos ha sido posible obtener poblaciones de células de Schwann estables, abundantes y funcionales,^{45, 135} lo que ha permitido el implante de estas células en la zona de lesión medular mediante inyección^{128, 129, 185} o inmersas en una matriz de colágena.¹⁴² En ambos casos se ha demostrado, desde el punto de vista morfológico, que favorecen la regeneración axonal, aunque no se menciona algún efecto funcional.

E) Metilprednisolona como neuroprotector

En un estudio clínico multicéntrico realizado en los Estados Unidos, *el Segundo Estudio Nacional sobre Lesión Aguda de Medula Espinal* [NASCIS 2], se demostró que el tratamiento con el glucocorticoide MP, iniciado dentro de las primeras 8 h de una LTME y administrado a dosis altas durante 24 h, mejora la recuperación motora de los pacientes evaluados 6 semanas, 6 meses y 1 año después de la lesión.^{32-34, 94} La justificación de este esquema se basó en la necesidad de una megadosis (dosis inicial de 30 mg kg⁻¹ I.V.) para inhibir la peroxidación de lípidos secundaria a neurotrauma^{89, 90, 94} y en base a una extensa experiencia en modelos de LTME en animales.^{3, 6-8, 20, 37-39, 140, 159}

Se han demostrado diferentes mecanismos de acción de la MP para evitar los cambios patológicos secundarios después de LTME aguda, casi todos relacionados con un efecto antioxidante, ya que inhibe la lipólisis (que implica liberación de ácido araquidónico y la consecuente formación de eicosanoides),^{8, 159} la peroxidación de lípidos,^{7, 8, 90, 94, 159} también evita la acumulación intracelular excesiva del calcio iónico¹⁸⁹ y reduce la liberación de aminoácidos excitatorios.¹²¹ Como consecuencia mejora el flujo sanguíneo tisular,^{90, 187, 189} mejora el metabolismo aeróbico (producción de energía aeróbica),^{6, 37} se reduce la degradación de los neurofilamentos,³⁸ disminuye la hiperemia en la ME adyacente al sitio de lesión haciendo menos severo el fenómeno de isquemia-reperfusión,^{96, 103} disminuye el edema a nivel del sitio de lesión^{3, 187} y se favorece la excitabilidad neuronal así como la transmisión sináptica.⁹⁵ Todo lo anterior se manifiesta en la recuperación funcional parcial que se ha observado tanto en estudios experimentales como en pacientes.

En un estudio reciente⁸⁴ demostramos que la manipulación mecánica y enzimática del área de lesión medular subaguda (con fines de trasplante⁸³), causa destrucción adicional del parénquima medular, y que la administración de MP, empleando el esquema de dosificación utilizado en el NASCIS 2, limita dicha destrucción.

A partir de los resultados del NASCIS 2, publicados por primera vez en 1990,³² la MP se ha considerado como el "estándar de oro" para valorar la acción terapéutica de otros

fármacos o procedimientos en LTME aguda; se sugiere que cualquier medida terapéutica debe ser tan buena como o mejor que la acción de la MP.^{11, 20, 193}

F) Trasplantes al SNC como neuroprotectores

Una forma de evaluar el efecto neuroprotector de los trasplantes neurales es su influencia en el índice de supervivencia de animales sometidos a lesiones neurológicas severas. Kopyev et al.¹¹⁰ observaron un incremento significativo en la supervivencia de ratas sujetas a traumatismo craneocerebral e implante de tejido fetal neocortical en el área de lesión inmediatamente después del trauma. Tulipan et al.¹⁷⁹ demostraron en ratas que el injerto de estriado neonatal puede evitar el síndrome letal producido por la inyección intraestriatal bilateral de ácido kaínico. Ellos atribuyen tal efecto a la protección dada por el injerto a las neuronas dañadas por excitotoxicidad.¹⁷⁸

Al respecto, nuestro grupo recientemente⁸⁶ ha establecido que: 1- Los trasplantes de tejido fetal homotópico alogénico y xenogénico incrementan la supervivencia de ratas sometidas a laceración completa de la ME. 2- El implante de otros tejidos heterotópicos como nervio periférico o tejido adiposo, así como el empleo de un "ocupador de espacio" (Gelfoam), también incrementan la supervivencia de ratas sometidas al mismo modelo de lesión. 3- El implante homotópico de tejido fetal alogénico, así como el autotrasplante de nervio periférico o de tejido adiposo en ratas sometidas a laceración medular completa, disminuye la destrucción del parénquima medular vecino a la zona de lesión.

El mayor índice de supervivencia y la menor incidencia de complicaciones graves, puede ser atribuida a una mejor función segmentaria de la ME, posiblemente como una consecuencia de la menor destrucción tisular, observada en el área vecina al sitio de laceración en la ME de los animales trasplantados.

La menor destrucción tisular, de acuerdo con los hallazgos recientes de Tulipan et al.^{178, 179} y de Pearlman et al.¹⁴⁴, pudieran atribuirse a que el tejido trasplantado puede asumir un papel benéfico al amortiguar, neutralizar y/o captar algunas de las sustancias neurotóxicas liberadas en el área de lesión, tales como aminoácidos excitatorios y enzimas

líticas, o bien por captación del exceso de iones libres. El efecto benéfico de los injertos heterotópicos (nervio periférico y tejido adiposo), apoya esta posibilidad y coincide con los resultados de Pearlman et al.¹⁴⁴ sobre el uso de trasplantes heterotópicos como neuroprotectores del estriado.

JUSTIFICACION

A pesar de la mejoría relativa obtenida con tratamientos farmacológicos, incluyendo los esteroides parenterales, la LTME permanece como un problema no resuelto.

En la actualidad, la MP se considera el "estándar de oro" en el tratamiento de la lesión aguda de la ME. Se recomienda que cualquier medida terapéutica nueva debe ser tan bueno o mejor que la MP.

Sin embargo, el tratamiento en el que se emplea únicamente MP es insuficiente, posiblemente porque no influye positivamente en todos los mecanismos de lesión secundaria. Además, la MP tiene algunas desventajas como son, una dosis efectiva estrecha, inmunodepresión y tiempo corto de ventana terapéutica.

Recientemente reportamos acerca del efecto neuroprotector de diferentes tejidos (incluyendo nervio periférico) trasplantados en el área de lesión después de laceración medular completa en ratas.

Debido a las limitaciones del tratamiento con solo MP, en este trabajo probamos una alternativa terapéutica usando implante isogénico de células disociadas de nervio periférico [INP] para reforzar el efecto de la MP, usando el modelo de contusión medular en ratas, el cual reproduce a la LTME en humanos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Pregunta general

Cual es el efecto en la evolución funcional, así como en las características morfológicas y morfométricas del INP, de la MP, o de la combinación de ambos cuando se utilizan en el tratamiento de una contusión medular aguda en rata adulta?

Pregunta específica 1

Cual es el efecto morfofuncional del INP colocado en el área de lesión después de una contusión medular aguda, al compararlo con ratas lesionadas y no tratadas, o con ratas a las que se le inyecta el vehículo del implante?

Pregunta específica 2

Es similar el efecto morfofuncional del INP en comparación a la administración de MP?

Pregunta específica 3

Existe sinergismo en el resultado morfofuncional al combinar INP y MP como tratamiento de contusión medular aguda en rata adulta?

HIPOTESIS

Hipótesis general

Las ratas adultas sometidas a contusión medular y tratadas con INP, MP, o la combinación de ambos tendrán una mejor evolución funcional y menor destrucción del parénquima medular al compararlo con testigos.

Hipótesis específica 1

La colocación de un INP en la zona de lesión después de producir una contusión medular aguda, tendrá un mejor efecto morfofuncional al compararlo con ratas lesionadas y no tratadas, o con ratas a las que se le inyecta el vehículo del implante.

Hipótesis específica 2

El efecto morfofuncional del INP en comparación con la administración de MP será similar.

Hipótesis específica 3

Habrà sinergismo en el resultado morfofuncional al combinar INP y MP como tratamiento de contusión medular aguda en rata adulta

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto del INP, de la MP y de la combinación de ambos, en la recuperación funcional, así como en la cantidad y calidad del tejido medular preservado en ratas adultas sometidas a una contusión medular controlada.

Objetivo específico 1

Evaluar el efecto morfofuncional del INP colocado en la zona de lesión después de una contusión medular aguda, tomando como referencia las ratas testigo.

Objetivo específico 2

Comparar el efecto morfofuncional del INP con la administración de MP después de contusión medular aguda en rata adulta.

Objetivo específico 3

Evaluar si tienen un efecto sinérgico en el resultado morfofuncional la combinación de INP y MP como tratamiento de contusión medular aguda en rata adulta?

MATERIAL Y METODOS

A) DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Población objetivo:

Se utilizaron ratas singénicas Fischer adultas, hembras, de 12 a 14 semanas de edad y con peso corporal de 190 a 210 gr, aparentemente sanas, nunca embarazadas y sin ningún procedimiento experimental previo. Todas las ratas se sometieron a contusión controlada de la ME en la región torácica baja (T-9). La asignación de los animales para cada grupo se hizo de manera aleatoria (mediante sorteo). Cada grupo se formó de 6 animales que completaron el tiempo de seguimiento programado.

Grupos de estudio:

Grupos experimentales.

Grupo 1- Ratas lesionadas y tratadas con metilprednisolona. [MP]

Grupo 2- Ratas lesionadas y tratadas con implante de nervio periférico. [INP]

Grupo 3- Ratas lesionadas y tratadas con MP e INP. [M+I]

Grupos testigo.

Grupo 4- Ratas lesionadas, inyectadas con el vehículo del implante. [VEH]

Grupo 5- Ratas lesionadas, sin tratamiento alguno. [CON]

B) PROCEDIMIENTOS

Método de anestesia

Para los procedimientos de lesión medular (incluyendo el tratamiento correspondiente) y sacrificio, se aplicó una dosis intramuscular (en la cara externa del muslo izquierdo) de una mezcla de clorhidrato de ketamina (77.5 mg kg^{-1}) e hidrocloreuro de xilacina (12.5 mg kg^{-1}).

Método para contundir la médula espinal

Bajo el efecto de la anestesia se realizó tricotomía de la región torácica baja. Mediante técnica estéril se practicó una incisión sagital en piel, seguido de disección de los músculos paravertebrales de las apófisis espinosas, usando tijeras tipo iris y desperiostización de láminas usando hoja de bisturí # 20. Se extirparon luego tres apófisis espinosas (T8, T9 y T10) con una gubia tipo Beyer para visualizar ampliamente los procesos laminares de T9. Finalmente se realizó una laminectomía de un solo nivel (T9), extendiéndola bilateralmente hasta los procesos facetarios. Las meninges se mantuvieron intactas. Una vez concluida la laminectomía, el animal se colocó en un equipo de estereotaxia para la realización de la contusión medular con una modificación de la técnica de Allen⁴: se dejó caer sobre la ME un cilindro de acero inoxidable (con peso de 15 gr, con punta roma de 1.7 mm de diámetro y 1 cm de largo) de una altura de 3 cm a través de un tubo guía. Intensidad de la lesión = 45 gr cm^{-1} . Finalmente, la incisión quirúrgica se suturó en dos planos: la fascia muscular y la piel con puntos simples de nylon 5-0.

Método de obtención y preparación del tejido donador

El nervio periférico utilizado para implante se obtuvo de una rata hembra singénica a la rata lesionada en la que se implantó. La rata donadora anestesiada se colocó en decúbito ventral. Previa tricotomía de la región glútea y del muslo, en condiciones asépticas, se realizó incisión cutánea longitudinal extensa, luego se disecaron los músculos hasta identificar el nervio ciático, el cual se disecó ampliamente. Iniciando desde la región más proximal se resecó un fragmento de 1.5 cm de longitud. El nervio se colocó en solución salina balanceada de Hank. Con técnica microquirúrgica se eliminó el epineurio en su totalidad y luego se fragmentó finamente con una navaja de afeitar. Los fragmentos de nervio se colocaron en un tubo Eppendorf y se incubaron en 100 μl de una solución de colagenasa al 0.25% durante 8 min a 37 C, con agitación continua. Luego se agregaron 200 μl de solución de Hank y se centrifugó durante 5 min a 3,000 RPM. Se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 300 μl de solución de Hank. Los frag-

mentos de nervio resuspendidos se pasaron varias veces por una aguja calibre 20, hasta que pasaran todos los fragmentos libremente. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, se decantó el sobrenadante y se resuspendió como anteriormente. Se pasó por agujas de diámetro interno progresivamente menor incluyendo calibre 21, 23, 25, 29 y 30. Finalmente se volvió a centrifugar y decantar como anteriormente. El botón celular se resuspendió en 50 μ l de solución de Hank y a esta concentración quedó para el implante y para los estudios de viabilidad celular. Así, el tejido fue disociado hasta obtener una mezcla de células independientes y conjuntos celulares pequeños. La viabilidad de la suspensión celular se valoró usando el azul de tripano, basado en el principio de que la membrana de las células vivas (viables) impide el paso a su interior de ciertos colorantes como el azul de tripano, mientras que la membrana de las células recién muertas (no viables) permite el paso de tales sustancias al interior de la célula, lo que facilita su diferenciación²⁶. Para la prueba de viabilidad se colocaron en un tubo 50 μ l de azul de tripano al 0.4%, 30 μ l de solución de Hank y 20 μ l de la suspensión celular; se agitó la mezcla, se colocó en un hemocitómetro y se observó de inmediato al microscopio. Se contaron 200 células disociadas o en cúmulos muy pequeños, anotando por separado viables y no viables. Con este método se demostró viabilidad celular de aproximadamente 80%. No fue posible determinar el número total de células a implantar debido a la existencia de agregados celulares incontables.

Método para el implante del nervio periférico.

Inmediatamente después de terminar el proceso de disociación celular se tomaron 10 μ l de la suspensión celular y se inyectaron dentro de la ME recién lesionada en las ratas correspondientes, justo en el sitio donde se produjo la contusión. Para la inyección se utilizó una microjeringa Hamilton con una aguja metálica del número 30. La inyección se llevó a cabo en un lapso de 5 min y la aguja se dejó 5 min más dentro del sitio de inyección para evitar la salida del implante. En el grupo testigo, en el que solo se inyectó el

vehículo del implante (solución salina balanceada de Hank), los procedimientos de inyección en cuanto a volumen y tiempo de inyección fueron idénticos.

Administración de metilprednisolona

Los animales de los grupos en que se aplicó este fármaco (succinato sódico de metilprednisolona <Solu-Medrol, Upjohn, Kalamazoo, Mich. USA>) recibieron la primera dosis inmediatamente después de producirse la lesión medular. Las primeras tres aplicaciones se hicieron vía intraperitoneal con un intervalo de 2 horas ($30 \text{ mg kg}^{-1}/\text{dosis}$); la cuarta y quinta aplicación 8 y 24 h después de la lesión ($60 \text{ mg kg}^{-1}/\text{dosis}$), vía intramuscular (en la cara externa del muslo derecho). Para la dilución del fármaco se usó agua bidestilada inyectable. El esquema de dosificación está basado en el NASCIS 2.³²

Cuidados postoperatorios

Al final del procedimiento quirúrgico de lesión medular (y tratamiento correspondiente), a todos los animales se les aplicó una dosis de 200,000 UI de penicilina benzatínica vía intramuscular (cara externa del muslo izquierdo). Se colocaron en una unidad de cuidados intensivos para animales menores (Schroer Manufacturing Co., Kansas City) con temperatura y humedad controlada ($23 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y 80% respectivamente) hasta que se recuperaron de la anestesia. Luego se colocaron en jaulas individuales con aserrín estéril.

Las ratas se alimentaron *ad libitum* y se les proporcionaron los mismos cuidados generales, independientemente del grupo al que pertenecieran. El intestino y la vejiga neurogénicos se manejaron con expresión manual 2 veces por día mientras fue necesario (mientras se recuperó el automatismo, aproximadamente entre 1 y 2 semanas).

Sacrificio y estudio morfológico

Ocho semanas después de la lesión, los animales se anestesiaron y 5 min antes de su sacrificio se les aplicó una dosis intraperitoneal de 1000 UI de heparina. Después se practicó una toracotomía amplia, se canuló la aorta ascendente y empleando una bomba

peristáltica (Masterflex; Cole-Parmer Inst. Co. Chicago Il.) se perfundieron 50 ml de solución salina fisiológica, seguidos de 500 ml de formaldehído al 10%. Ambas soluciones se perfundieron a una velocidad de 30 ml min^{-1} y a temperatura ambiente. Al término de la perfusión se extrajo un fragmento de 2 cm de ME, con la zona de lesión en el centro de dicho fragmento.

El espécimen se colocó en el mismo fijador durante 1 semana, al cabo de la cual se siguió el procedimiento de rutina para ser embebido en parafina: deshidratación en alcoholes graduales (alcohol etílico al 50%, 80%, 95% y alcohol absoluto, 30 min en cada uno), aclaración en 2 baños de xileno (media hora en cada uno), colocación en parafina a 57°C durante 2 horas y posteriormente inclusión en unos moldes fabricados *ex-profeso* para contener los 2 cm de ME en sentido longitudinal y de esta manera tener la posibilidad de hacer cortes transversales sin necesidad de reincluir el tejido. Se realizaron cortes secuenciales de 10μ de espesor, de los cuales se tomaron muestras para los estudios morfológicos a intervalos de 650μ . Los cortes seleccionados se pasaron a un baño de flotación con agua a 45°C (a cada litro de agua se le agregó 0.5 gr de gelatina bacteriológica) y luego se colocaron sobre laminillas de vidrio (5 laminillas con 3 cortes para cada segmento).

Laminillas de todos los niveles se impregnaron con nitrato de plata utilizando la técnica de Sevier-Munger. Con esta técnica se tiñen de negro y de manera selectiva las fibras nerviosas¹²⁶. Brevemente, los cortes se desparafinaron colocándolos en xileno durante 12 horas, luego se colocaron en alcohol absoluto y alcoholes graduales de manera descendente, 10 min en cada uno, hasta llevarlos a agua destilada, después se colocaron durante 15 min en una solución de nitrato de plata al 20% (precalentada a 60°C), se lavaron en agua destilada luego se colocaron durante 5 a 30 min (hasta obtener un color café dorado) en una solución preparada a base de nitrato de plata al 10%, hidróxido de amonio al 30%, carbonato de sodio al 26% y formaldehído al 2%; después se lavaron en agua corriente, se colocaron durante 2 min en solución de tiosulfato de sodio al 5%, nuevamente se lavaron, se deshidrataron en alcoholes graduales hasta llevarlas a xileno y se montaron con resina sintética para ser observadas al microscopio. Se identificó el

epicentro de la lesión definido como el sitio donde se encontró mayor destrucción de tejido medular o menor cantidad de tejido medular preservado. En el epicentro y en los cortes adyacentes al mismo, tanto en sentido cefálico como caudal, se hizo la tinción de Masson. En los cortes de la laminilla adyacente al epicentro, en sentido cefálico, se realizó una reacción inmunohistoquímica a proteína ácida fibrilar glial [GFAP] para evaluar la reacción astrocítica, con la técnica de avidina-biotina-fosfatasa alcalina. Los cortes se desparafinaron colocando las laminillas a 56 °C durante 15 min seguido de 2 baños de xileno (5 min c/u), luego se llevaron hasta agua corriente pasándolos previamente por alcoholes graduales descendentes desde absoluto hasta 70%. Se pasaron por amortiguador salino de fosfatos 0.01 M, pH 7.4 [PBS] y se incubaron 60 min a temperatura ambiente con el anticuerpo primario (GFAP, Sigma) diluido 1:400 en PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1%. El solvente se usó para los testigos negativos. Se lavaron con PBS y luego se incubaron 30 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado (anti Ig G de ratón, diluido 1:15 en PBS con albúmina de suero bovino al 1%) (Kit ExtrAvidin Alkaline Phosphatase, Sigma Extra-2A). Nuevamente se lavaron con PBS y se incubaron 20 min con extravidina-fosfatasa alcalina del mismo kit, diluida 1:15 en PBS. En seguida se lavaron con amortiguador de Tris salino 0.01 M, pH 8.2, se incubaron en la solución de sustrato con el colorante fast red (SigmaFast F4648) de 5 a 10 min, a temperatura ambiente. Esta reacción se detuvo antes de que se generalizara el fondo rojo en los controles negativos, irrigando los cortes con agua destilada. Finalmente, los cortes se contratificaron con hematoxilina de Mayer y se montaron con un medio acuoso a base de glicerina y gelatina.

C) EVALUACION

Indice de Sobrevida

Las ratas que murieron entre el segundo día y las 8 semanas después de la lesión (tiempo de seguimiento programado) se tomaron en cuenta para la realización de las curvas de sobrevida (curvas de Kaplan y Meier)¹³¹ de acuerdo al grupo correspondiente.

Evaluación funcional

Antes de ser lesionados, todos los animales se sometieron en dos ocasiones a las pruebas funcionales programadas con intervalo de una semana, para obtener los parámetros de normalidad. Después de la lesión, los animales se evaluaron una vez por semana hasta el final del estudio. Para cada una de las pruebas funcionales, un observador previamente entrenado y con pruebas para variabilidad intraobservador mayor de 0.7, determinó de manera cegada la calificación correspondiente.

1- Locomoción libre sobre el piso:

Esta prueba nos permite conocer de manera gruesa las características generales de la locomoción. Cada una de las extremidades posteriores se evaluaron de acuerdo a una escala de 6 puntos (escala de Tarlov¹⁷⁴ modificada).

= grado 0 (0 %) - parálisis flácida, no se observa ningún movimiento.

= grado 1 (10 %) - movimientos inconstantes e incoordinados de la cadera o de la rodilla, no hay movimientos del tobillo.

= grado 2 (20 %) - movimiento coordinado de las patas en las 3 articulaciones principales (cadera, rodilla y tobillo). Las patas no sostienen el peso del tren posterior.

= grado 3 (40 %) - soporta el peso del tren posterior sobre las patas, pero no camina o dá de 1 a 3 pasos incoordinados.

= grado 3.5 (60 %) - camina con mucha inestabilidad, dá pasos alternos o simultáneos indistintamente.

= grado 4 (80 %) - pasos alternos, movimiento coordinado entre patas anteriores y posteriores, inestabilidad poco perceptible, pérdida del equilibrio en las vueltas rápidas.

= grado 5 (100 %) - marcha de aspecto normal.

2- Prueba del plano inclinado:

Esta prueba fue diseñada por Rivlin y Tator¹⁵⁷. Permite evaluar mecanismos de compensación para el desplazamiento en el espacio. El animal se colocó en una tabla

cubierta con corcho que tiene la posibilidad de inclinarse entre 0 y 90 grados. Se modificó la posición de 5 en 5 grados y se anotó el número máximo de grados que toleró el animal sin caer durante 5 segundos. Se evaluaron tres posiciones diferentes: cabeza hacia arriba, derecha e izquierda.

3- Caminata sobre reja de alambre:

Se evaluó la capacidad del animal de caminar sobre una reja de alambre elevada sobre el piso que tiene barras con un claro de separación de 3.7 cm entre cada una (espacio mayor a la longitud total del pie de la rata). Cada prueba duró de 3 a 6 min, de los cuales el animal caminó al menos 30 segundos o dió al menos 15 pasos. La caminata se filmó en video y se analizó en cámara lenta. Se contó el número total de caídas y de pasos acertados (cuando colocó la planta sobre el alambre); se expresó como índice de errores al producto de la división del número de caídas/número total de pasos; se anotó por separado el resultado para cada una de las patas posteriores. En un trabajo previo el índice se obtuvo al dividir número de caídas/segundos caminados.⁴⁴ Esta prueba sólo se puede realizar cuando la evaluación en la escala de Tarlov es de 60% o superior. La mayor parte de las ratas la pudieron efectuar a partir de la 5a. semana postlesión. A las ratas, que por su pobre recuperación, no fueron capaces de realizar esta prueba, se les asignó un índice 5% más deficiente al peor índice obtenido en ratas capaces de hacer la prueba, con el objeto de tener un índice representativo al momento de hacer las pruebas estadísticas, ya que el considerar a estas ratas como "perdidas" representaría un sesgo.

4- Análisis de las huellas podálicas

Para esta prueba se les puso tinta de diferente color a las patas anteriores (roja) y posteriores (negra). Se colocó al animal en una pasarela construida de acrílico (de 1.60 m de longitud y 10 cm de ancho) y con cartulina blanca en la superficie. Para que los animales caminaran motivados a través de la pasarela, se condicionaron durante tres semanas antes de la cirugía poniendo al final del recorrido un fragmento de crema de cacahuete

-Aladino- (alimento por el que tienen una marcada preferencia); con este método de condicionamiento no se requiere privarlos de alimento o agua, lo cual pudiera ser peligroso después de la cirugía. Para el análisis de las huellas digitales se promediaron las medidas de 4 a 6 pasos consecutivos, obtenidos de la porción media del recorrido. Se midieron la base de sustentación delantera y trasera (distancia entre las dos patas anteriores y posteriores, respectivamente), así como la longitud de la zancada (distancia entre huella de pata anterior y posterior de cada lado).^{42, 80}

El análisis de las huellas, al igual que la caminata sobre la reja de alambre, sólo pudieron evaluarse cuando en la marcha el animal fue capaz de soportar su peso sobre las patas posteriores y dar pasos (mínimo 60% en la locomoción libre sobre el piso). También se aplicó el mismo criterio de castigo para las ratas incapaces de realizar la prueba: 5% adicional a la peor medida de rata que si realizó la prueba.

Evaluación Morfológica

Descripción general.

En base a la observación de los cortes teñidos con las técnicas de Sevier-Munger, Masson e inmunorreacción a GFAP, se hace una caracterización general del aspecto de las médulas espinales estudiadas dos meses después de la lesión y del tratamiento correspondiente.

Morfometría.

Para la evaluación morfométrica se tomaron de cada espécimen una laminilla correspondiente al epicentro y laminillas con cortes a 2 y 4 mm tanto en sentido cefálico como caudal al epicentro.

En el epicentro se midió: 1) el área del parénquima medular preservado (en todos los casos fue solo sustancia blanca) y 2) el área total del corte, incluyendo además del tejido preservado el área de cavitación y de otro contenido celular. En los cortes adyacentes al epicentro se hicieron dos mediciones: 1) área de destrucción de parénquima

medular, generalmente localizada en cordones posteriores, aunque algunas veces se extendía a la porción central de la médula y rara vez a cordones laterales. 2) área total, incluyendo tejido preservado y destruido. Adicionalmente, en ME no lesionada de ratas de las mismas características, se hicieron mediciones para contar con el parámetro de normalidad. Se midió el área de corte transversal a nivel torácico bajo (T8-T9)(NL/T), así como el nivel toraco-lumbar (NL/TL); el 1º sirvió para contrastar con el epicentro y las mediciones en sentido cefálico al mismo, mientras que el 2º se usó para contrastar con las mediciones en sentido caudal al epicentro.

Para hacer las mediciones se usaron laminillas con impregnación argéntica en un sistema computarizado de morfometría compuesto de: un microscopio de campo claro con objetivo 2.5 X, cámara de video colocada en orificio triocular del microscopio, interfase cámara-computadora, tarjeta para convertir imagen analógica en digital, computadora con procesador 486 DX y el programa para análisis de imágenes *ANALYSIS* de Zeiss.

Evaluación Estadística

1- Para evaluar la probabilidad de sobrevida de los animales por grupo se calcularon las curvas de Kaplan-Meier. A efecto de determinar la significancia estadística de las diferencias entre las curvas se utilizó la prueba de Mantel-Haenszel.¹³¹

2- La significancia estadística de las diferencias en las pruebas funcionales se evaluó contrastando los resultados de cada semana de manera independiente. Se usó el programa de computo SigmaStat for Windows, Ver. 1.0, Copyright 1992-1994 Jandel Co. Si los datos tenían una distribución normal y pasaban la prueba de igualdad de varianza se comparaban todos los grupos entre sí con una prueba de análisis de varianza [ANOVA] de una vía; caso contrario, se hacía la prueba no paramétrica de ANOVA en rangos (Kruskal-Wallis). Para identificar el o los grupos que estaban dando la diferencia estadística se aplicó el método Student-Newman-Keuls o el procedimiento de comparación múltiple de Dunn, respectivamente. En algunos casos, se hizo una comparación adicional entre dos grupos en particular, sobre todo cuando la comparación múltiple dejaba dudas. En tales

casos se utilizó la prueba de T o la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney, dependiendo de si los datos tenían, o no tenían una distribución normal. Una p igual o menor a 0.05 la consideramos significativa.

3- Para el análisis estadístico de los resultados morfométricos, se compararon los grupos correspondientes al final del estudio con el mismo programa, criterios y pruebas señalados en el párrafo anterior.

4- Los resultados de las pruebas funcionales y de la morfometría se presentan en gráficas. La evolución semanal de las pruebas funcionales se presenta en líneas continuas (que representan la media aritmética) para cada grupo; en estas gráficas no se incluyen líneas de dispersión para evitar sobreposición por la cercanía entre las líneas. Los resultados morfométricos se graficaron en barras y/o en gráfica de cajas; cuando los datos tenían una distribución normal y pasaban la prueba de igualdad de varianzas se graficó en barras la media y desviación estándar, en el caso contrario se graficó la mediana con el error estándar o se hicieron las gráficas de caja.

5- El porcentaje de ratas con colaterales axónicos aberrantes a nivel del epicentro, se presenta en una tabla, en función del grupo de tratamiento.

6- Se hizo una correlación de Pearson entre cada una de las pruebas funcionales y la cantidad de tejido preservado en el epicentro de la lesión, tomando en cuenta a cada uno de los animales independientemente del grupo al que pertenecieran. En base a esta correlación se diseñó una escala ponderada para la evaluación funcional conjunta.

7- Tomando como variable dependiente el epicentro y como variables independientes todas las pruebas funcionales, se hizo una regresión lineal múltiple para obtener una ecuación que nos permitiera predecir el valor del epicentro a partir de las pruebas funcionales.

8- Se hizo una correlación por rangos de Spearman entre el resultado de la evaluación funcional ponderada de cada rata y la incidencia de colaterales axónicos neoformados a nivel del epicentro.

D) CONSIDERACIONES ETICAS Y LEGALES

Para la realización del presente proyecto, se tomaron en cuenta los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación Para la Salud (Título Séptimo: De la Investigación que incluya la utilización de animales de experimentación).¹¹⁸

RESULTADOS

Índice de sobrevida

Sin considerar la muerte de las ratas ocurrida durante las primeras 24 h después de la lesión, la cual fue atribuida a problemas anestésico-quirúrgicos no relacionados con el tratamiento específico, la morbi-mortalidad fue muy baja en todos los grupos. Solo se murió una rata de cada grupo, a excepción del grupo inyectado en la ME con vehículo en el cual no se presentó ninguna defunción. La prueba de Mantel-Haenszel para determinar la significancia estadística de las diferencias entre las curvas de sobrevida resultó negativa.

Resultados en las evaluaciones funcionales

En términos generales, todas las pruebas funcionales aplicadas mostraron un deterioro funcional importante durante las primeras semanas postlesión, con una tendencia a la mejoría progresiva en las semanas subsecuentes.

A continuación se describe el comportamiento por grupos para cada una de las pruebas aplicadas. Algunas pruebas pudieron hacerse desde el principio del experimento. Otras requerían de un cierto grado de recuperación funcional para poder aplicarse; de éstas, únicamente se dan los resultados de las últimas 4 semanas del estudio. Para cada prueba, se muestran los resultados en una gráfica de líneas. Cada línea representa la media aritmética del grupo correspondiente, en función del tiempo; no se incluyen imágenes de dispersión (error o desviación estándar) porque su sobreposición dificulta la observación de la imagen.

Figura 1- Locomoción libre sobre el piso

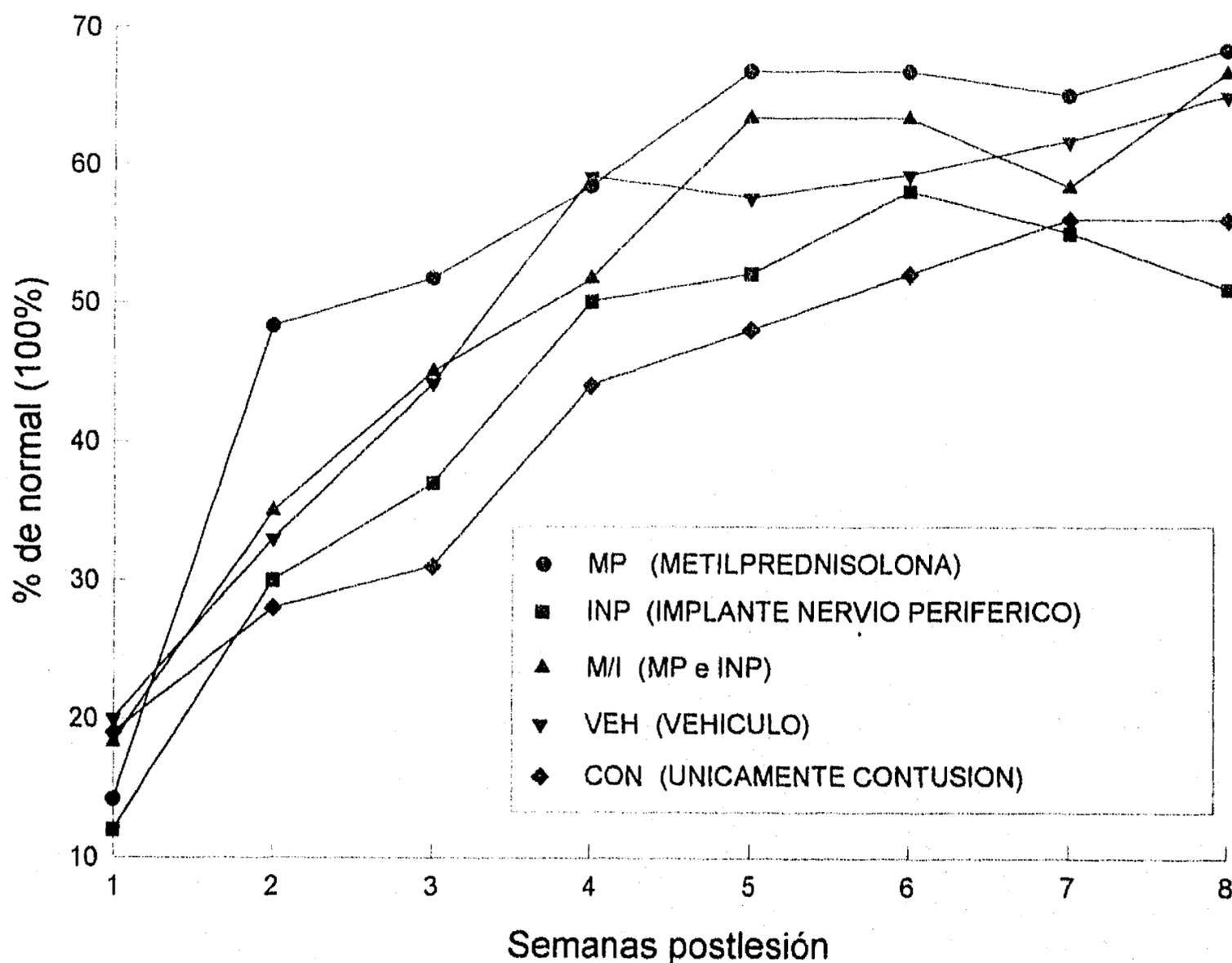


Figura 1: Resultados de la prueba de locomoción libre sobre el piso. Se omitió de la gráfica la evaluación de las ratas normales (100%). A las 24 h postlesión (no mostrada) todas las ratas tenían 0% en la escala de locomoción libre. En la 1ª semana, la media de los diferentes grupos se ubicó entre 10 y 20%; luego fue mejorando hasta ubicarse entre 45 y 65% en la 5ª semana, rango en el que, con pequeñas variaciones, se mantuvo hasta el fin del estudio. A partir de la 2ª semana, los grupos de MP, M+I, y VEH se colocaron en las posiciones más altas, mientras que INP y CON se mantuvieron abajo. Se encontraron diferencias con significancia estadística entre MP y CON en las semanas 2, 3 y 5.

Figura 2- Prueba del plano inclinado

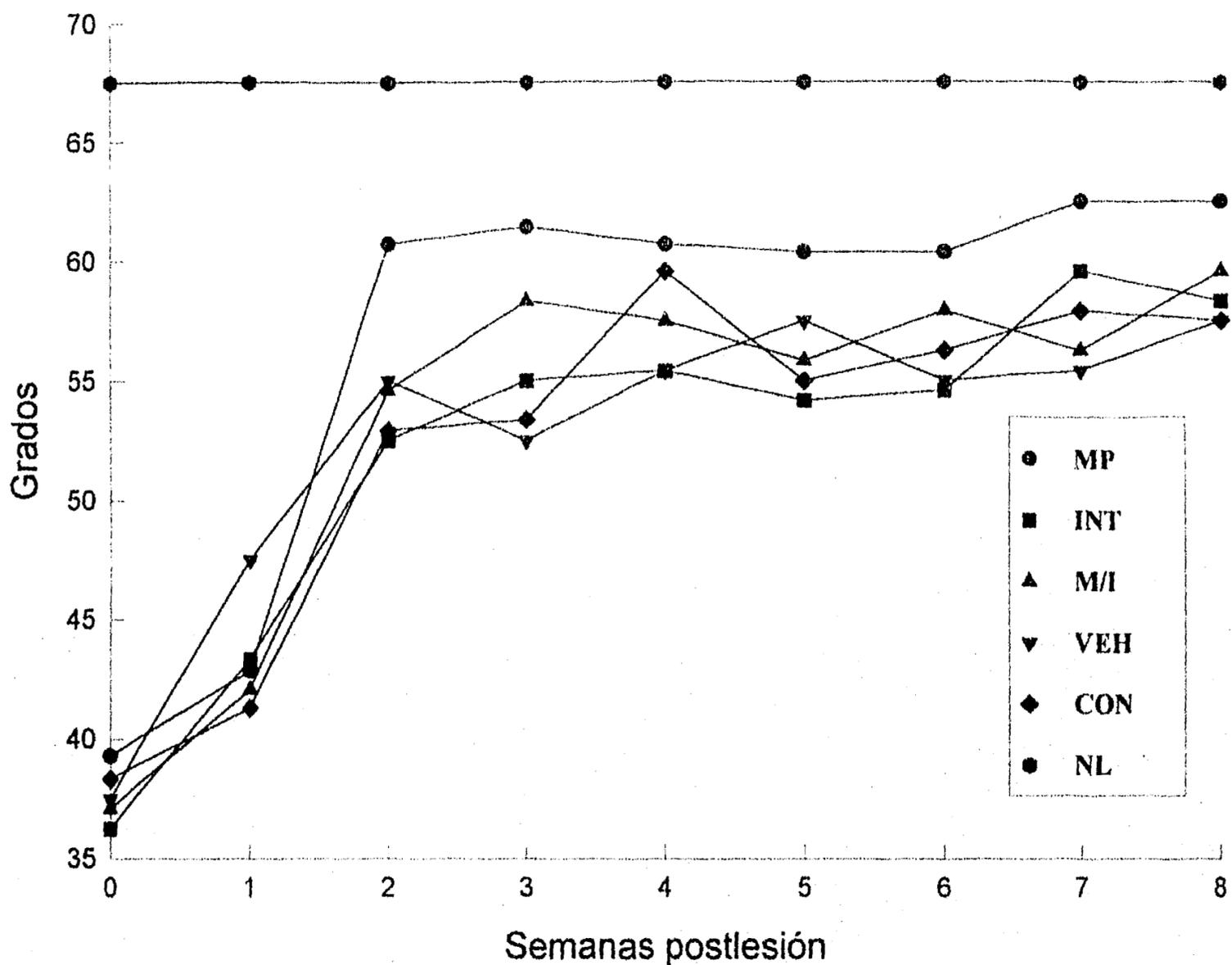


Figura 2: Prueba del plano inclinado en la posición cabeza hacia la derecha; las otras dos posiciones mostraron resultados similares y no se ilustran. Las ratas normales toleraron $67.5 \pm 4.9^\circ$. Veinticuatro h postlesión (semana 0), la media de todos los grupos se ubicó entre 35 y 40° . En las 2 primeras semanas se incrementó para colocarse entre 50 y 60° aprox., manteniéndose hasta el final con ligeras variaciones. A partir de la 2ª semana la media más elevada correspondió al grupo MP. Significancia estadística:

-NL vs todos = 24 h, semanas 1,4,5 y 6

-NL vs todos excepto MP = semanas 2,3,7 y 8

-MP vs CON = semanas 2,3 y 7

-MP vs INP = semana 2

-MP vs VEH = semanas 3 y 7

-VEH vs CON = semana 1

Figura 3- Caminata sobre reja de alambre

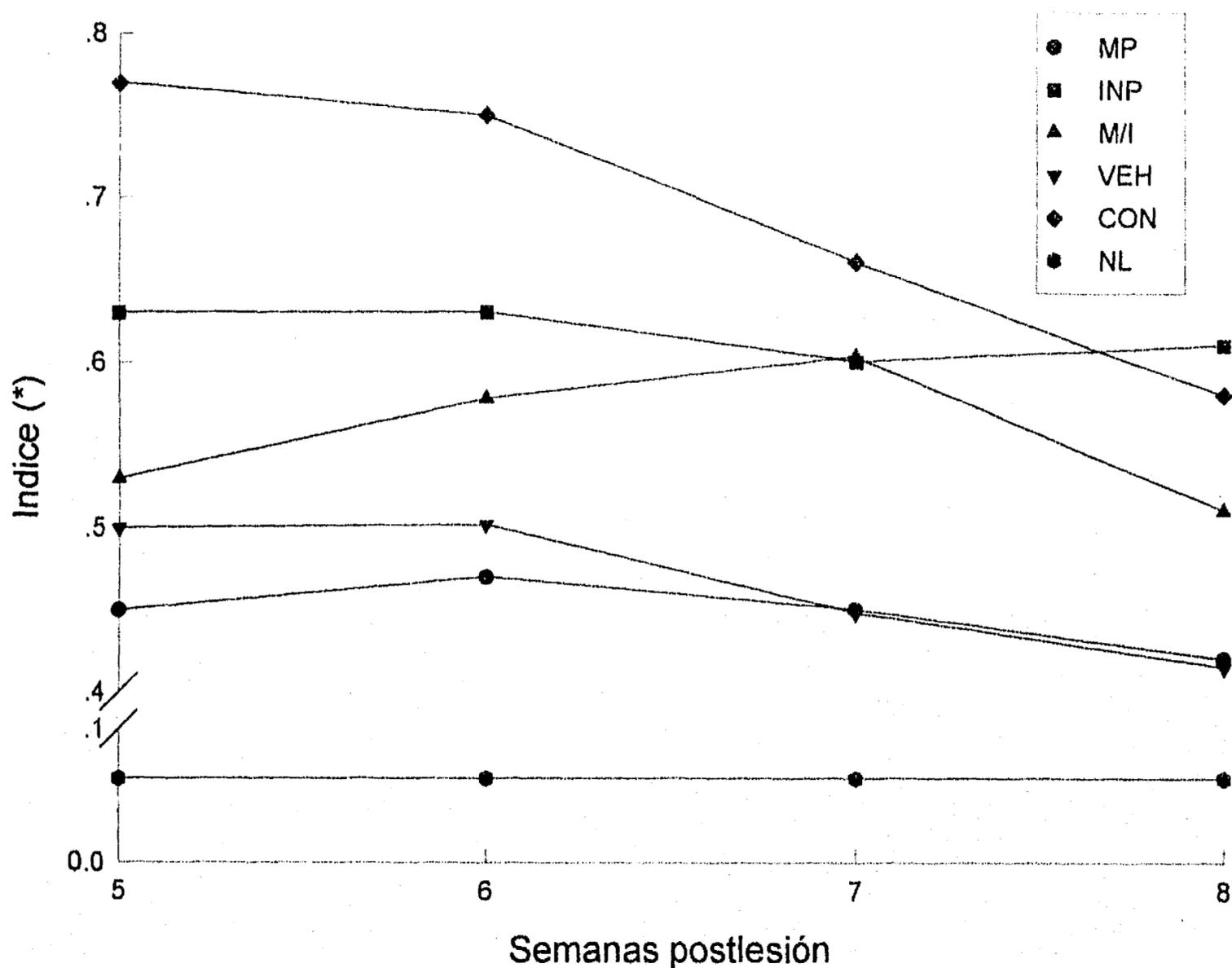


Figura 3: Comportamiento de los diferentes grupos en la prueba de caminata sobre reja de alambre. Las ratas normales tuvieron un índice de 0.06 ± 0.03 . Los grupos con mejor índice fueron MP y VEH, cuyas medias se mantuvieron entre 0.4 y 0.5 durante las últimas 4 semanas evaluadas, mientras que los grupos con peor índice fueron CON e INP. El grupo M+I se mantuvo en una posición intermedia. Desde el punto de vista estadístico, todos los grupos de ratas experimentales y controles fueron significativamente diferentes de las ratas normales, pero no hubo diferencia entre ellos, en ninguna de las 4 semanas evaluadas.

Análisis de las huellas podálicas

En esta prueba se determinaron 3 parámetros (base de sustentación delantera, trasera y longitud de zancada) los cuales se reportan por separado.

Figura 4- Base de sustentación delantera

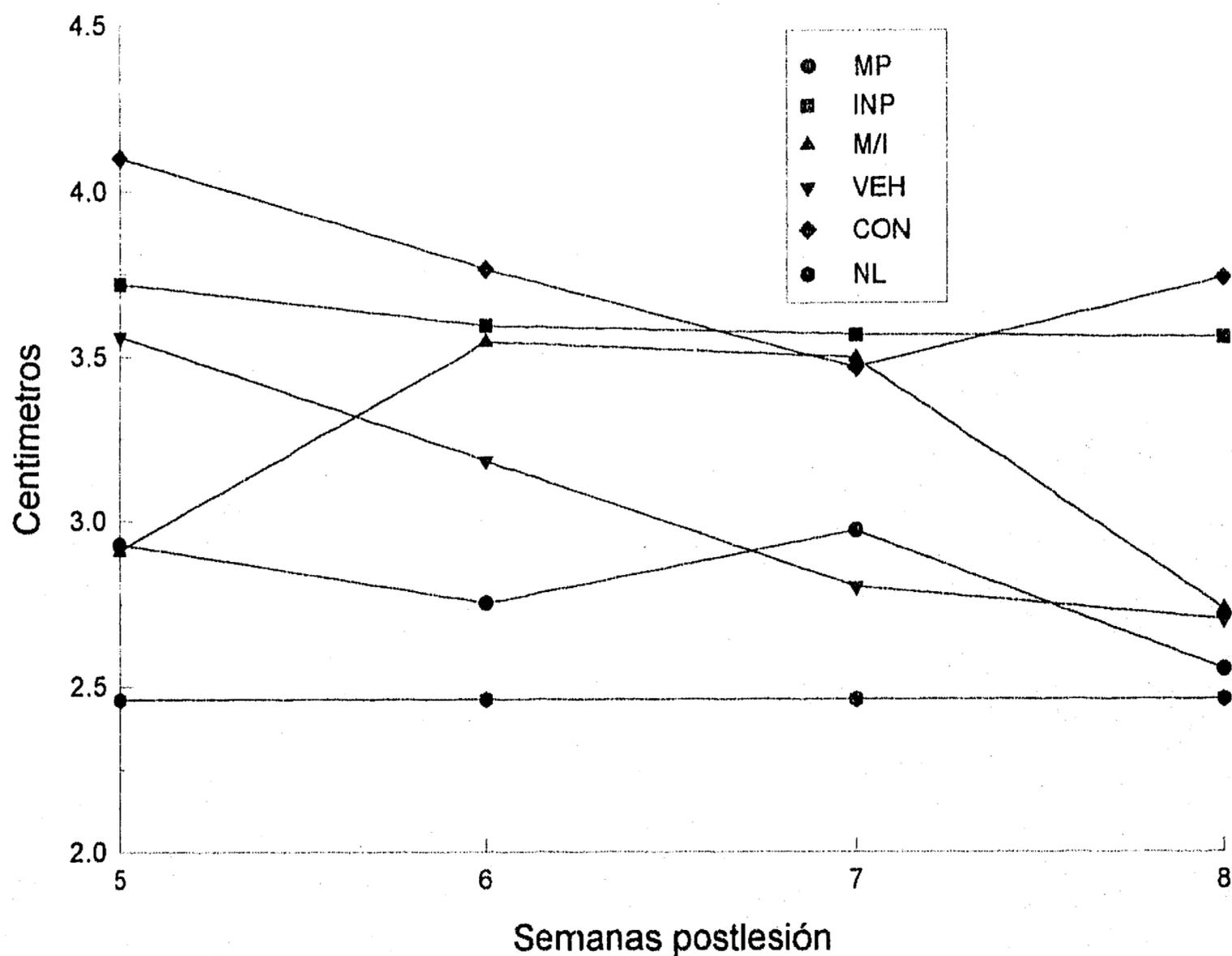


Figura 4: El tamaño de la base de sustentación de las patas delanteras. En rata normal fue de 2.46 ± 0.38 cm. La media de los diferentes grupos tuvo un comportamiento un tanto errático durante las 4 semanas evaluadas. En términos generales, las medias más cercanas a la normal fueron las de los grupos MP, VEH y M+I, mientras que las más alejadas fueron CON e INP. Diferencia con significancia estadística solo se obtuvo en la semana 5, entre NL y CON.

Figura 5- Base de sustentación trasera

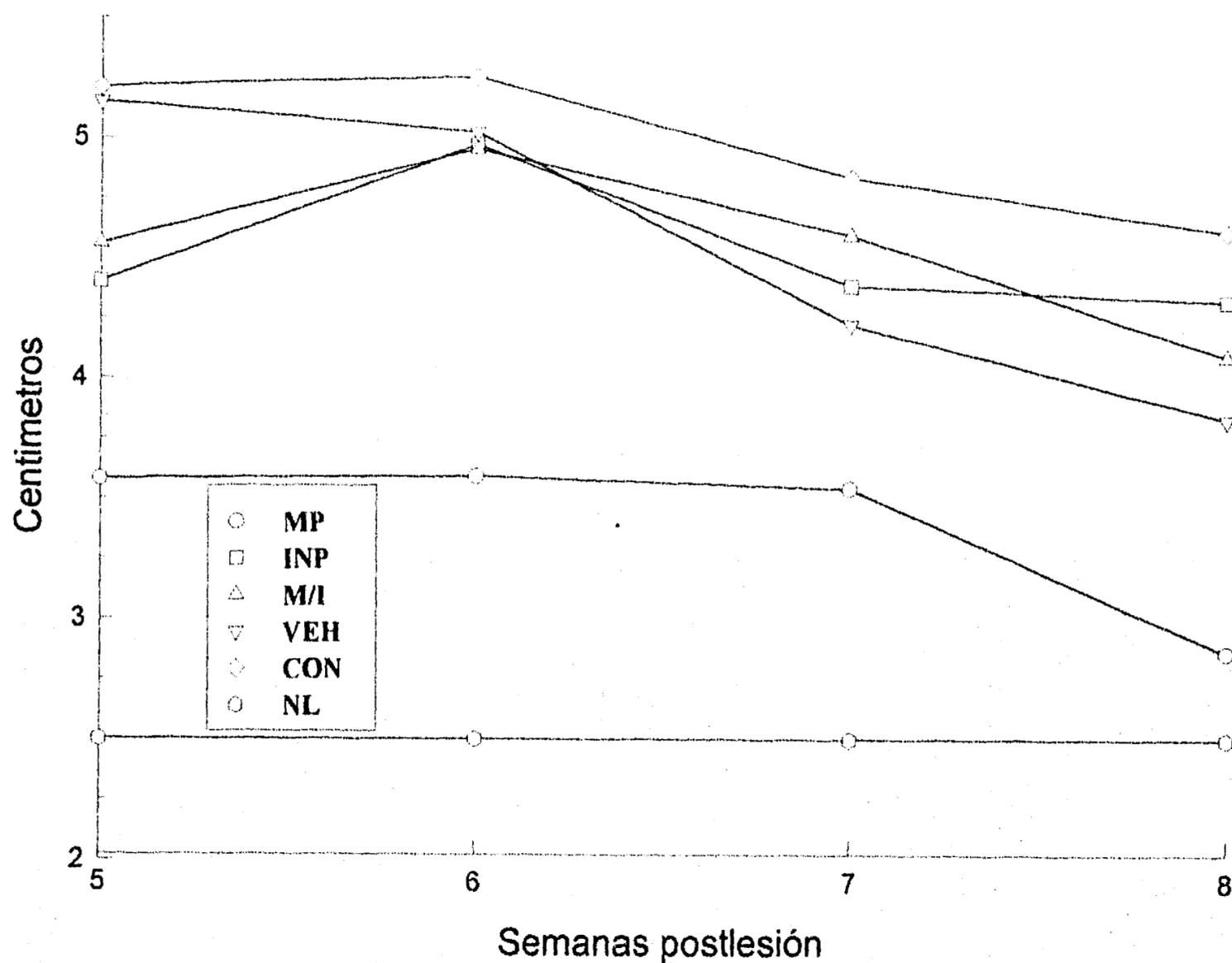


Figura 5: Comportamiento de los diferentes grupos en el tamaño de la base de sustentación de las patas traseras. En ratas normal fue de 2.50 ± 0.68 cm. La media más cercana a la normal correspondió al grupo MP, mientras que la más alejada fue la del grupo CON. En todos los grupos se observó una ligera tendencia a la mejoría durante las 4 semanas evaluadas. Diferencias con significancia estadística:

- semana 5: NL vs CON y VEH; MP vs CON y VEH
- semana 6: NL vs todos excepto MP; MP vs todos excepto NL
- semana 7: NL vs CON y M+I
- semana 8: NL y MP vs INP

Figura 6- Longitud de zancada

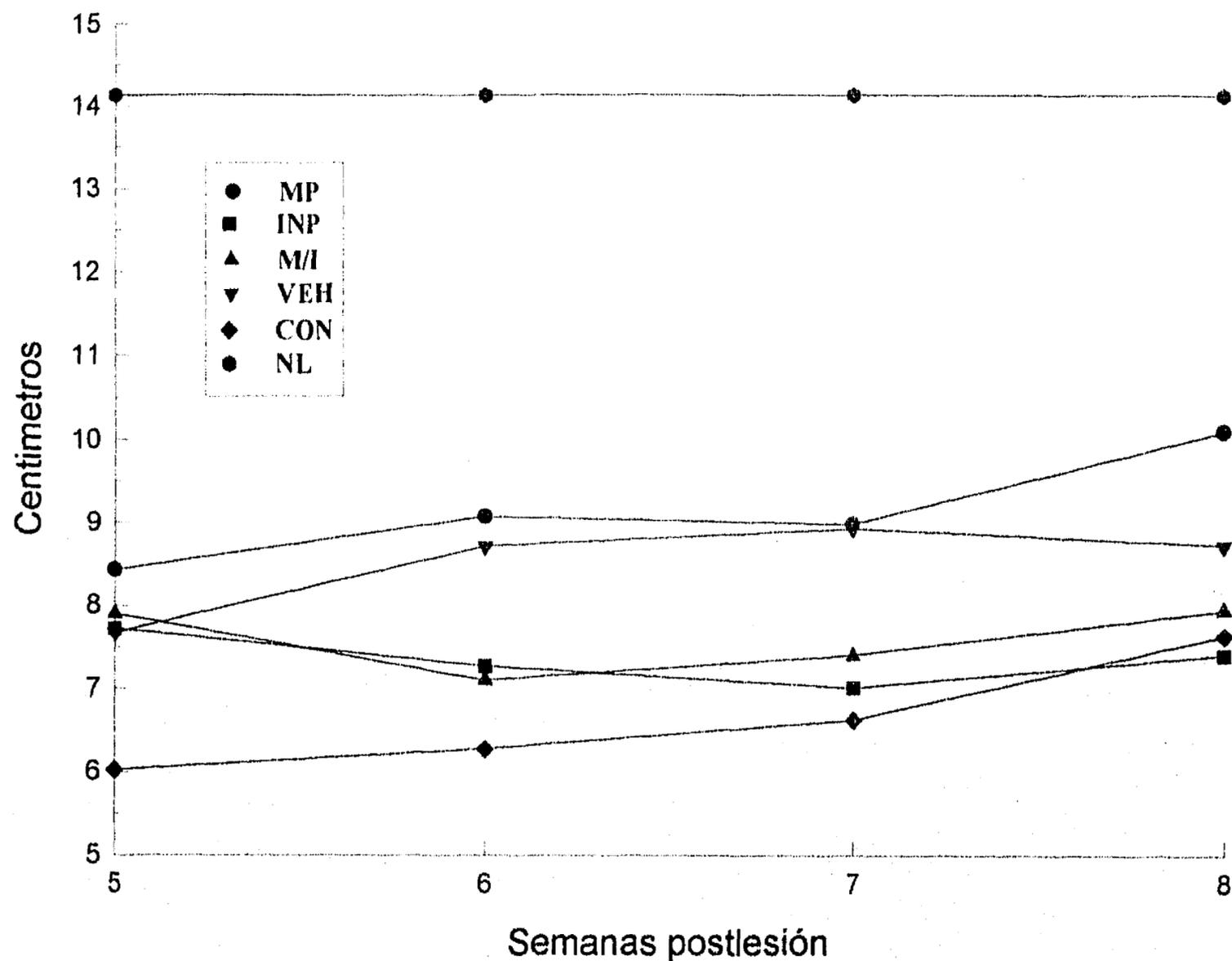


Figura 6: Comportamiento de los diferentes grupos en el tamaño de la longitud de zancada. En ratas normales fue de 14.13 ± 1.97 cm. La media más alta la obtuvo el grupo MP, mientras que la más baja fue para CON. Desde el punto de vista estadístico, se encontraron las siguientes diferencias significativas:

- NL vs todos (las 4 semanas)
- MP vs CON = semanas 5, 6 y 8
- MP vs INP y M+I = semana 8

Resultados de la evaluación morfológica general

En todos los especímenes, independientemente del grupo al que correspondían, se observó un patrón similar con respecto a las características de destrucción y preservación del parénquima medular. Las diferencias entre los grupos fueron más bien cuantitativas.

La zona de mayor destrucción del parénquima medular (o de menor preservación de tejido medular), denominada epicentro, correspondió al sitio del impacto. En todos los casos se caracterizó por pérdida total de la sustancia gris y preservación de sustancia blanca en cantidad variable y generalmente en forma asimétrica (derecha-izquierda), localizada en la periferia de la ME, sobre todo a nivel lateral y ventral, formando muchas veces un anillo incompleto, delimitando total o parcialmente al quiste central (Fig. 7). En la porción dorso-central del epicentro y zonas adyacentes se identificó el quiste, habitualmente trabeculado, de tamaño variable, conteniendo infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por macrófagos abundantes, células mononucleares (presumiblemente linfocitos) en cantidad moderada y células cebadas escasas. También se encontraron grupos celulares formados presumiblemente por células ependimarias y células de Schwann con vasos de diversos calibres (Fig. 8). De manera asociada a estos conglomerados celulares se identificaron axones con trayectoria aparentemente errática, perpendiculares u oblicuos al eje mayor de la ME, a los que denominamos colaterales axónicos aberrantes (Figs. 8B, 13, 14 y 17). El área total de corte de la ME a nivel del epicentro siempre fue significativamente menor al normal, indicando un proceso de colapso a este nivel. Algunas veces fue posible identificar la neoformación del epéndimo cerca del epicentro, como se ilustra en la figura 9.

Los cuerpos de astrocitos reactivos, identificados por inmunorreacción a GFAP, se localizaron principalmente en la zona del parénquima medular preservado, con un gradiente decreciente de la zona central (más lesionada) hacia la periferia. Con frecuencia se encontraron prolongaciones astrocíticas positivas a GFAP en la pared del quiste. La inmunoreactividad a GFAP estuvo ausente en áreas de infiltrado inflamatorio y de conglomerados celulares descritos previamente (Fig. 10).

Figura 7- Imagen panorámica del epicentro

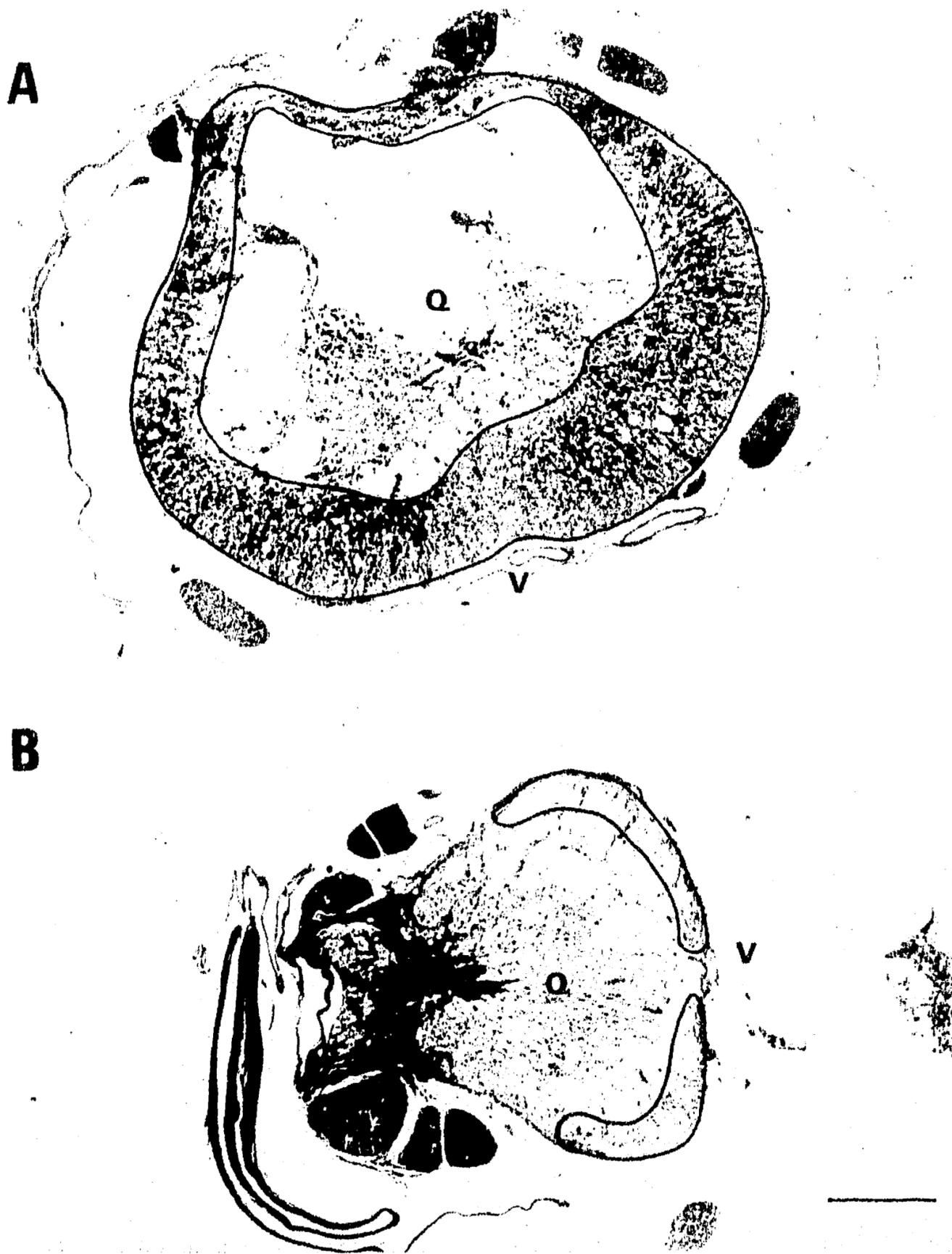


Figura 7: Imágenes de los especímenes con mayor (A) y menor (B) cantidad de tejido medular preservado a nivel del epicentro, en toda la serie. Corresponden al grupo VEH y CON, respectivamente. La sustancia blanca preservada está delimitada en negro; (Q) quiste; (V) porción ventral de la médula. Técnica: Sevier-Munger, barra: 200 μ

Figura 8- Epéndimo normal y conglomerados celulares intracavitarios



Figura 7- Imagen panorámica del epicentro

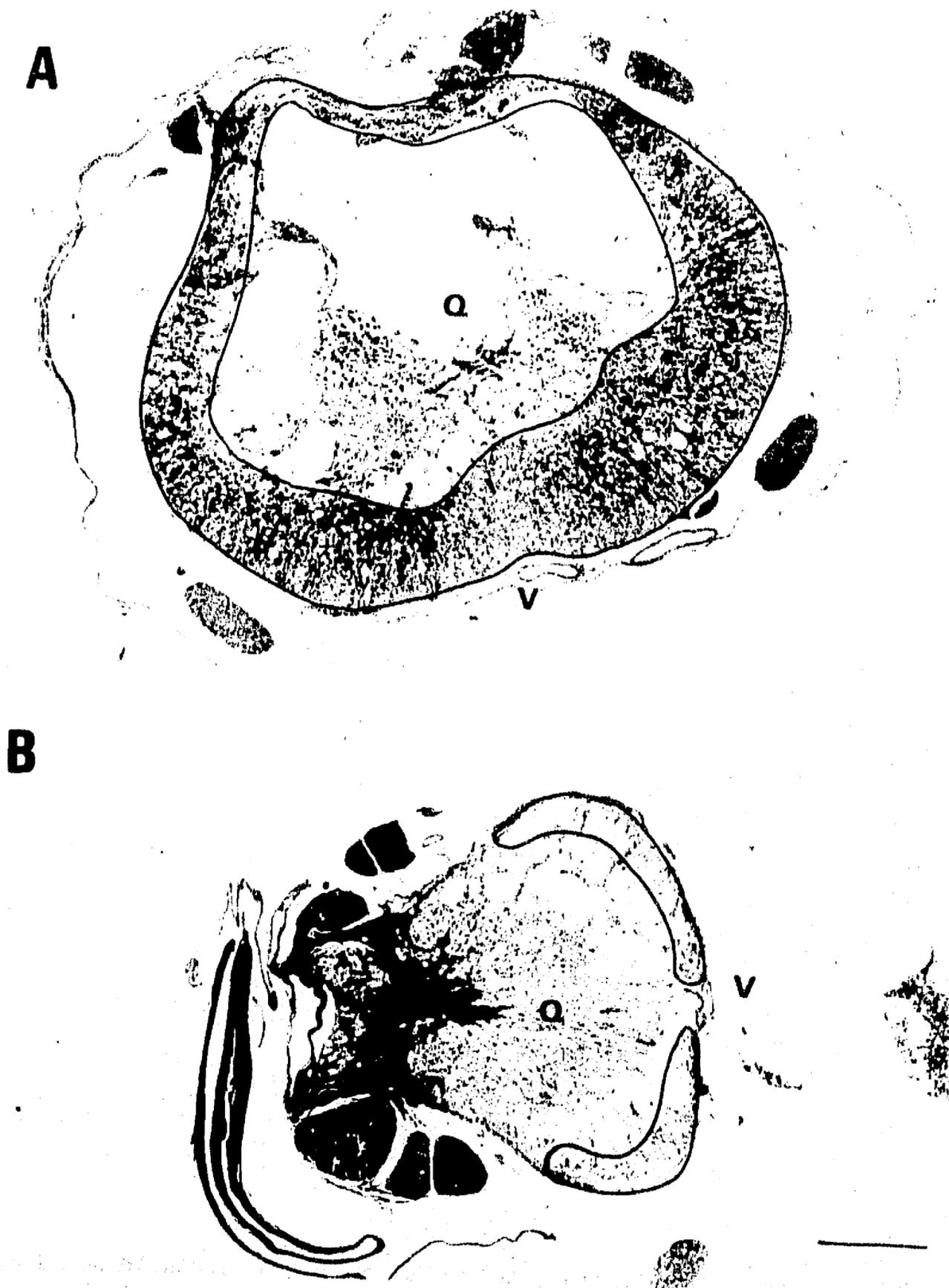


Figura 7: Imágenes de los especímenes con mayor (A) y menor (B) cantidad de tejido medular preservado a nivel del epicentro, en toda la serie. Corresponden al grupo VEH y CON, respectivamente. La substancia blanca preservada está delimitada en negro; (Q) quiste; (V) porción ventral de la médula. Técnica: Sevier-Munger. barra: 200 μ

Figura 8: Imágenes que muestran la similitud entre las células ependimarias (E) de una ME normal (A) y las células que forman grupos celulares compactos dentro de los quistes en la zona de lesión. (B), espécimen del grupo CON, las flechas señalan escasos colaterales axónicos aberrantes. Especimen del grupo MP (C) y M+T (D), con una estrella se señala el grupo de células similares a ependimarias, no se observan colaterales axónicas neoformadas; (v), ejemplo de vasos sanguíneos. Técnica: Sevier-Munger, barra: 20μ.

Figura 8- Epéndimo normal y conglomerados celulares intracavitarios

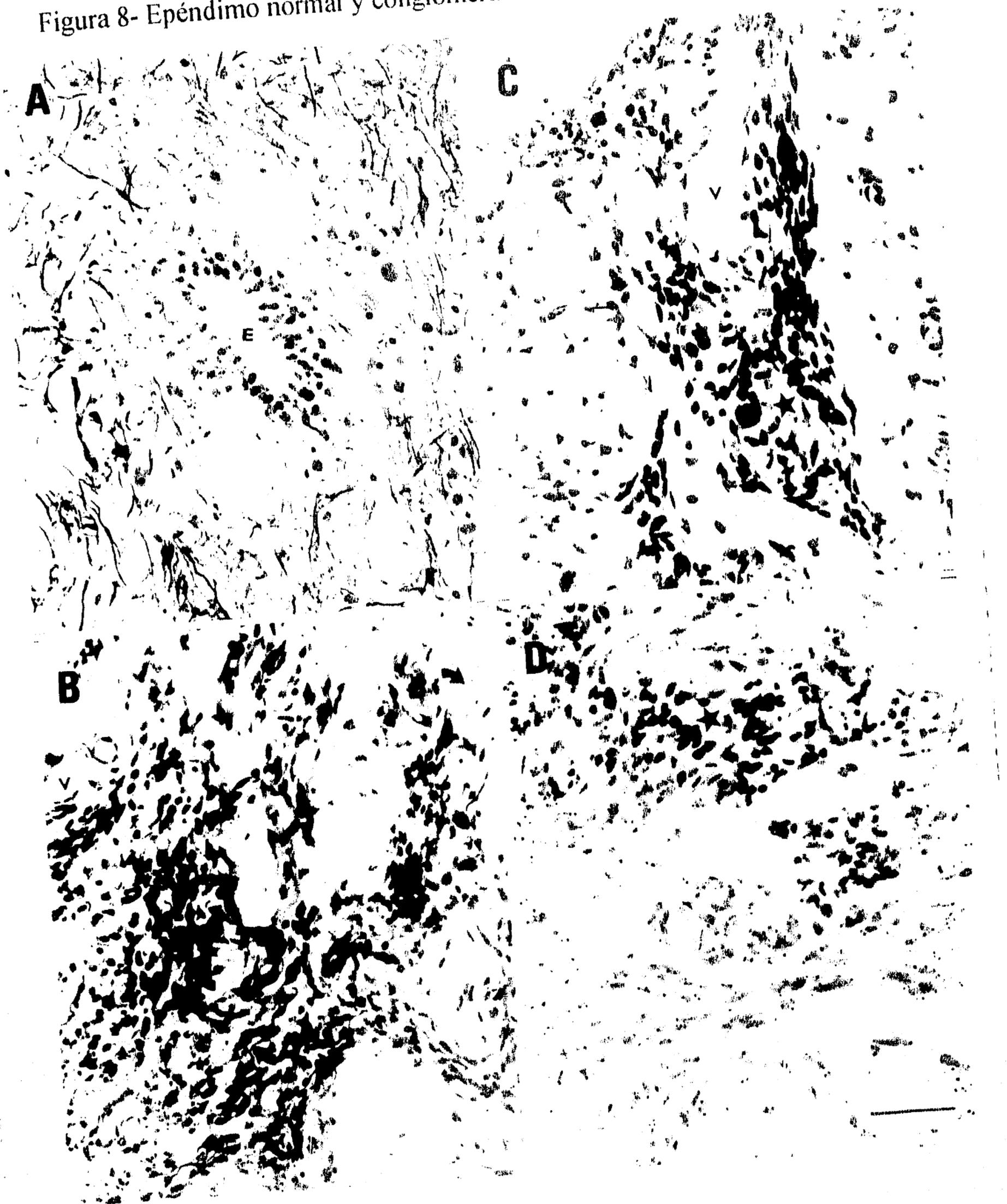


Figura 9- Neoformación del epéndimo

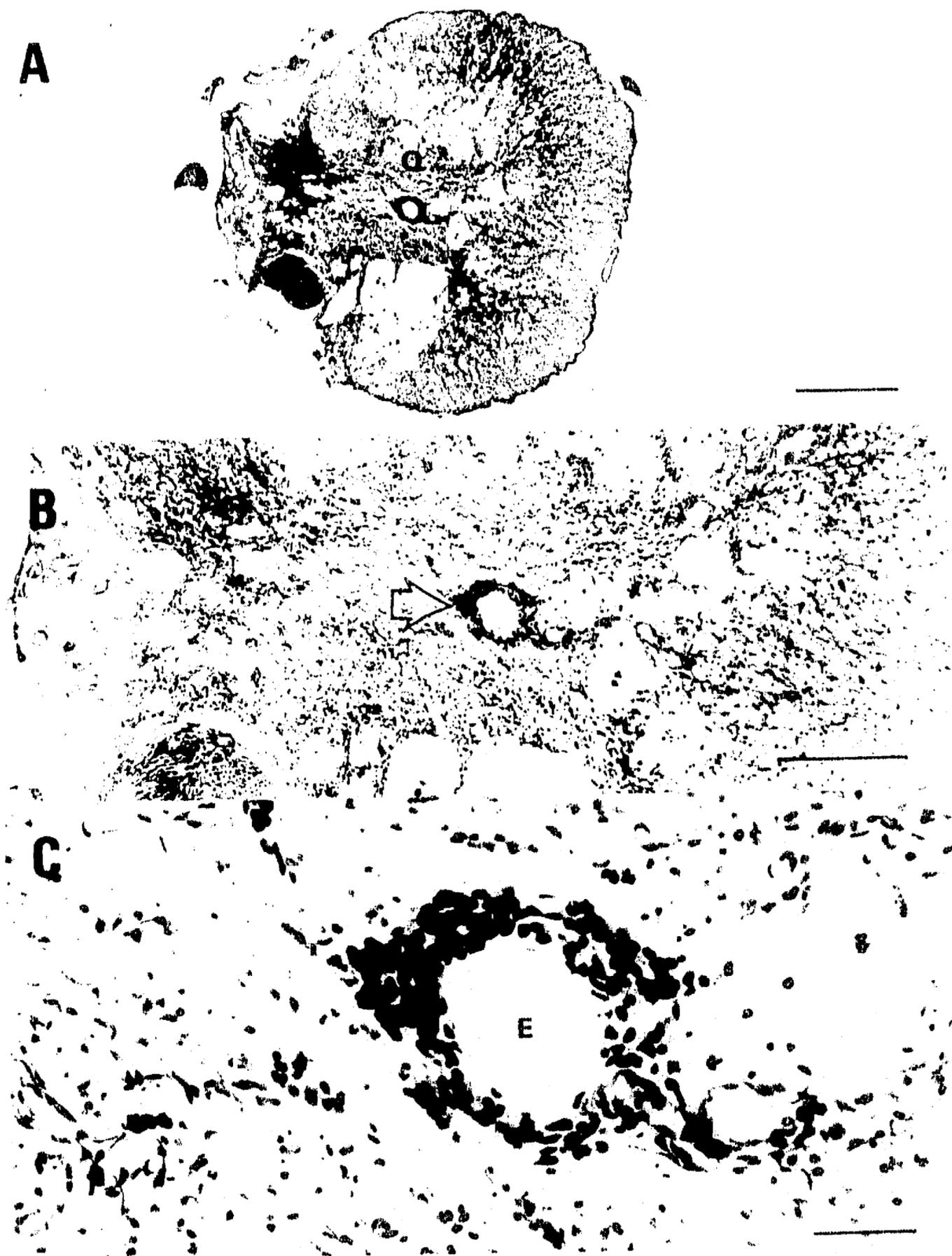


Figura 9: Serie de fotografías de un espécimen del grupo CON, a 650 μ en sentido caudal al epicentro. (A), se observa en la porción central del quiste (Q) un grupo de células con una luz central. A mayor aumento (B y C) se identifican las células en cuestión como ependimarias (flecha y E). El tejido que lo rodea es propio del quiste y no parénquima medular preservado. Técnica: Sevier-Munger, barras = A: 200 μ , B: 100 μ , C: 20 μ

Figura 10- Inmunorreactividad a GFAP

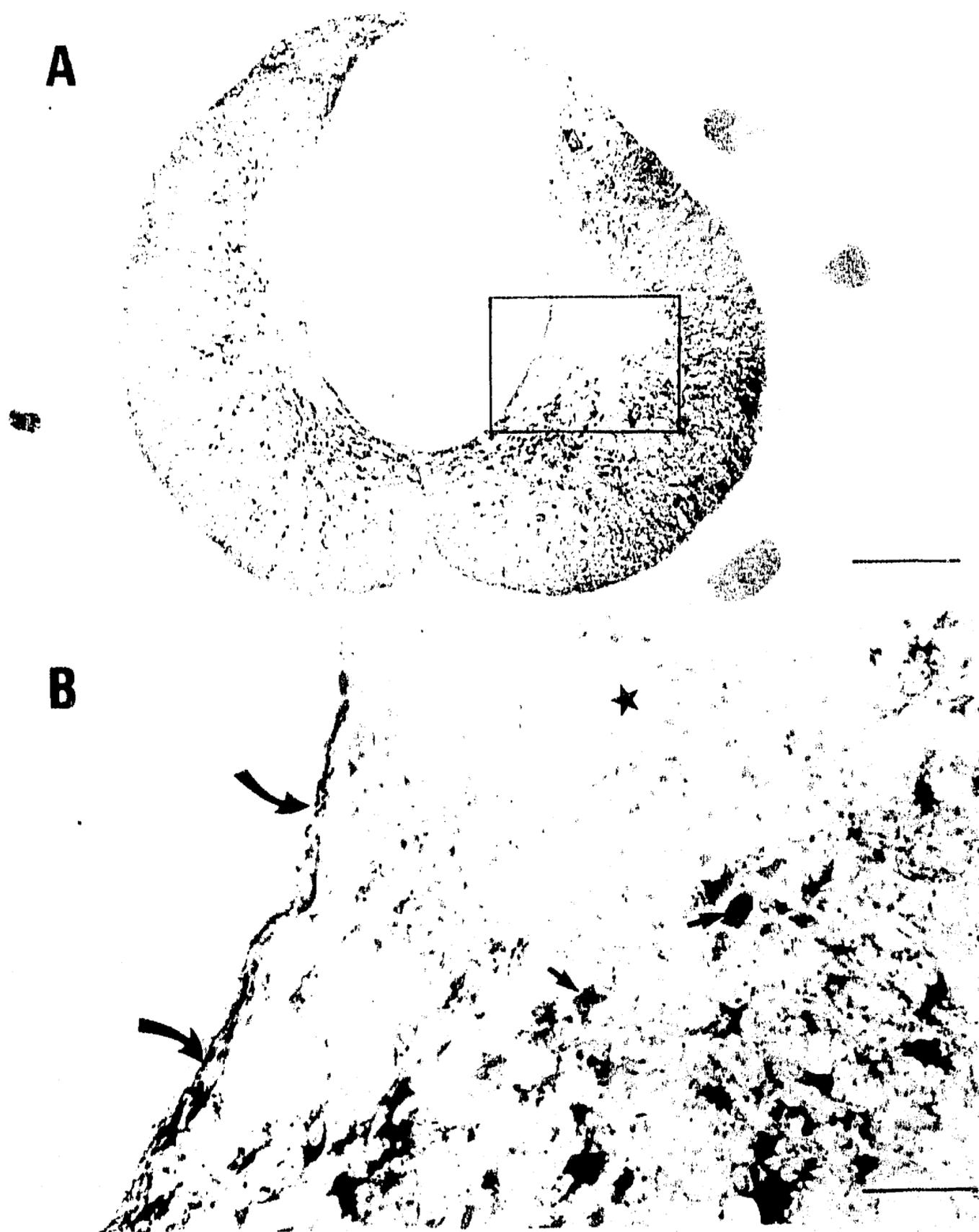


Figura 10: Inmunorreacción a GFAP en un espécimen del grupo MP, a 650 μ del epicentro. (A). localización de astrocitos reactivos (en rojo) en áreas de parénquima medular preservado, con un gradiente decreciente de la zona central (más lesionada) hacia la periferia. (B). detalle que ilustra cuerpos de astrocitos reactivos (flechas rectas) en parénquima preservado, prolongaciones astrocíticas positivas en la pared del quiste (flechas curvas). La inmunorreactividad a GFAP esta ausente en la zona de infiltrado inflamatorio (estrella). Barras = A: 200 μ , B: 40 μ

En cortes sucesivos en sentido cefálico al epicentro se encontró mayor cantidad de tejido medular (tanto sustancia blanca como sustancia gris), mientras más se alejaba del epicentro. El área de corte en relación a la ME normal no solamente fue igualada, sino que en muchos casos superada (ver sección de morfometría). En todos los casos se identificó una zona de destrucción Walleriana en los cordones posteriores, de magnitud variable, incluyendo la porción central y con salida hasta la periferia, en forma de ojo de cerradura antigua (Fig. 11). Este fenómeno se encontró hasta el final del extremo cefálico analizado (aprox. a 1 cm del epicentro).

En los cortes en sentido caudal al epicentro, al igual que en sentido cefálico, se observó más tejido medular a mayor distancia del epicentro. La destrucción en los cordones posteriores, a diferencia de lo observado en el segmento cefálico al epicentro, se observó en la porción central de dichos cordones (Fig. 12); dicha destrucción estuvo ausente en la mayoría de los casos más allá de 5 mm del epicentro.

A nivel del epicentro y cortes adyacentes, se observó un fenómeno de plasticidad aberrante caracterizado por la presencia de axones, presuntamente colaterales axónicos, orientados en forma perpendicular u oblicua al eje mayor de la ME, con dirección aparentemente errática, y localizados en áreas de destrucción medular, asociados a grupos celulares identificados como probables células endimarias y de Schwann.

En la tabla I se muestra el porcentaje de ratas con colaterales axónicos aberrantes a nivel del epicentro, en función del grupo correspondiente. En el 50% a 60% de las ratas de los grupos en que se administró MP (Figs. 8C, 8D, 15 y 16) no se identificaron axones aberrantes a nivel del epicentro, mientras que esta ausencia de plasticidad solo se observó entre el 17% y 20% de las ratas de los otros grupos. Abundantes colaterales axónicas en cuestión se identificaron en el 60% de las ratas tratadas solo con INP (Figs 14 y 17) y en ninguna de las ratas del grupo M+I (Figs. 8D y 16); en el resto de los grupos, esta variable se ubicó entre el 17% y 33%. El mayor porcentaje de ratas con axones aberrantes en cantidad leve a moderada lo obtuvieron los grupos control VEH y CON (50% y 60%

respectivamente)(Figs. 8B, 13,). Los axones aberrantes aparentemente no crecen en zonas donde hay astrocitos reactivos (Fig. 17).

Tabla I. Porcentaje de ratas con colaterales axónicos aberrantes a nivel del epicentro.

<i>Grupos</i>	Ausente	Leve a Moderado	Abundante
MP	50	33	17
INP	20	20	60
M+I	60	40	0
VEH	17	50	33
CON	20	60	20

Figura 11- Degeneración cefálica al epicentro

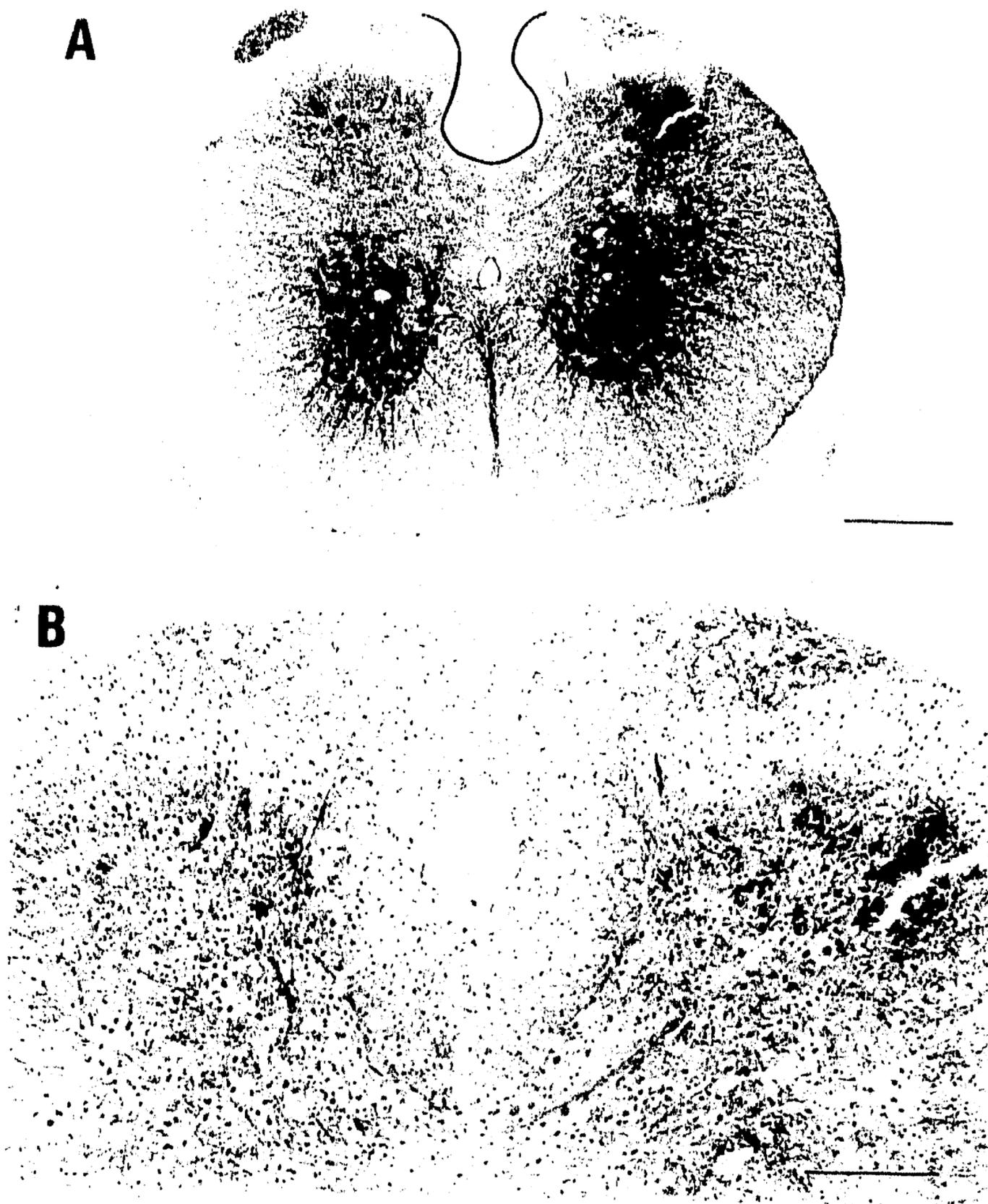


Figura 11: Imágenes que muestran la degeneración típica de los cordones posteriores en sentido cefálico al epicentro. (A). panorámica con la zona de degeneración (delimitada en negro) incluyendo la porción central de los cordones y con salida hasta la periferia, en forma de ojo de cerradura antigua. (B). detalle de la zona de degeneración. Técnica: Sevier-Munger, barra = A: 200 μ , B: 100 μ .

Figura 12- Degeneración caudal al epicentro

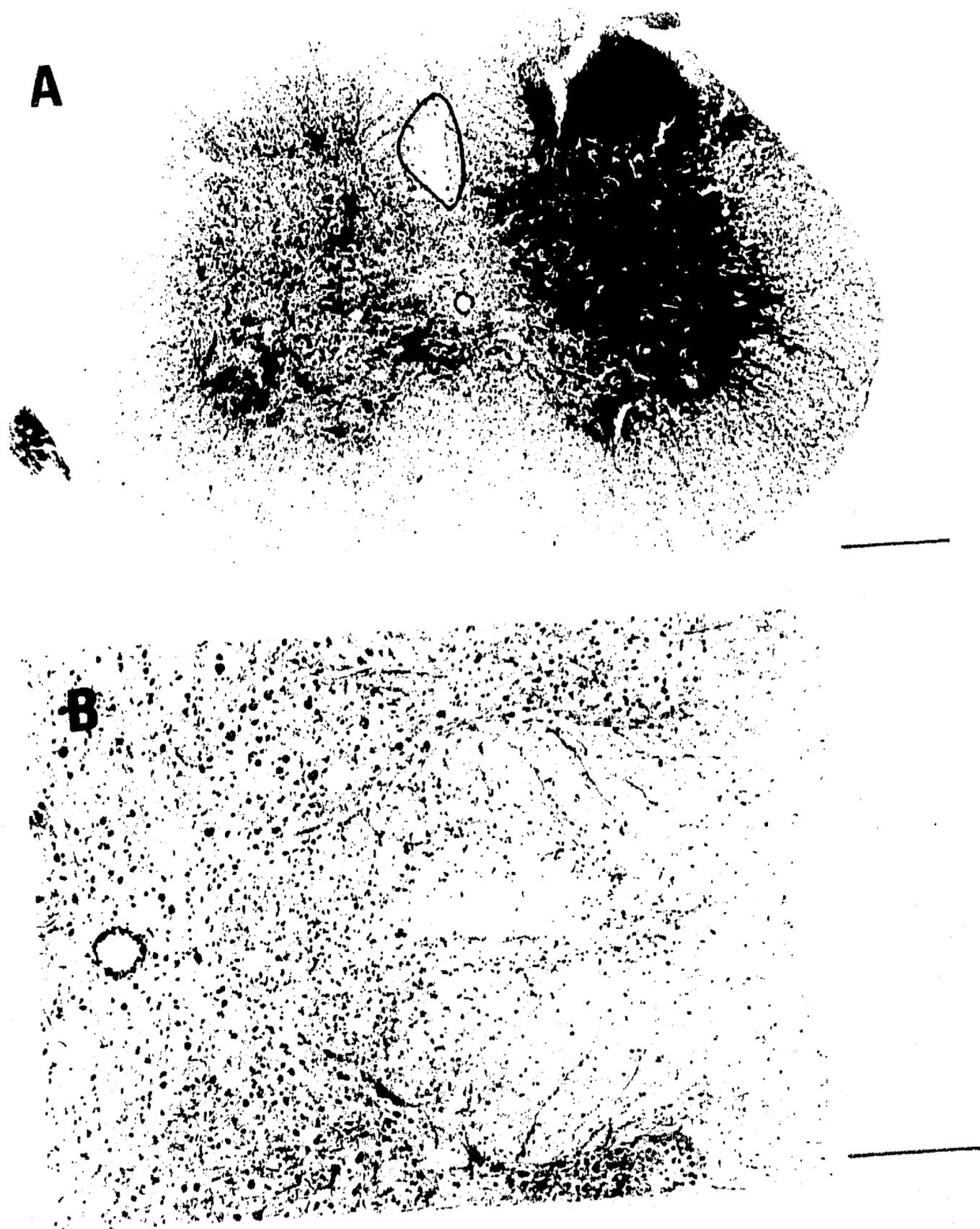


Figura 12: Imágenes que muestran la degeneración típica de los cordones posteriores en sentido caudal al epicentro. (A). panorámica con la zona de degeneración localizada en la porción central de los cordones posteriores (delimitada en negro). (B), detalle de la zona de degeneración. Técnica: Sevier-Munger, barra = A: 200 μ , B: 100 μ

Figura 13- Ejemplo de axones aberrantes en cantidad moderada



Figura 13: Imágenes del epicentro de una ME del grupo CON. (A), panorámica; (B), detalle donde se muestran una cantidad moderada de axones aberrantes (flechas) en asociación con el grupo compacto de células localizado al interior del quiste. Técnica: Sevier-Munger. barra = A: 200 μ , B: 20 μ

Figura 14- Ejemplo de axones aberrantes abundantes (grupo INP)

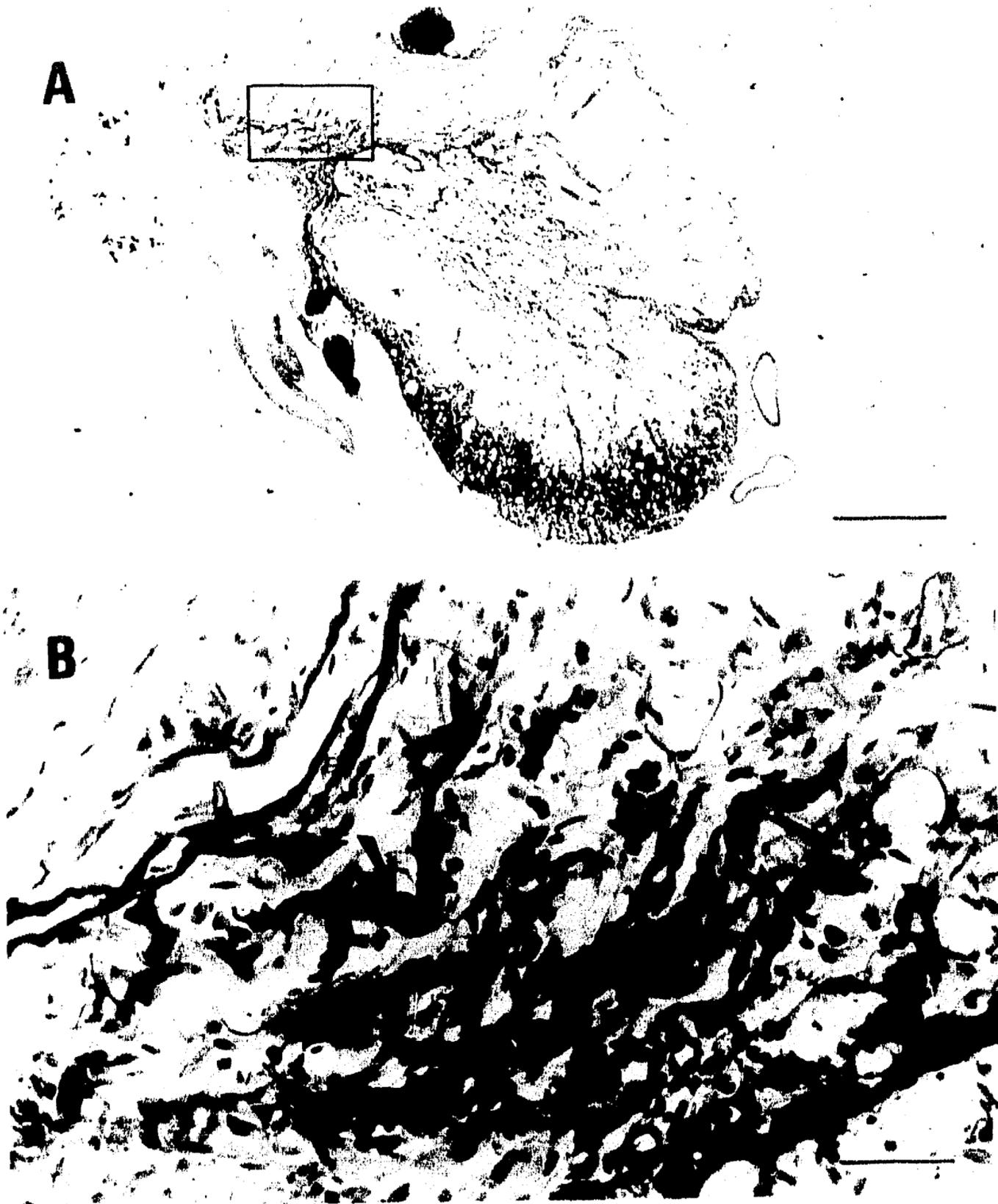


Figura 14: Imágenes del epicentro de una ME del grupo INP. (A), panorámica; (B), detalle donde se muestran abundantes colaterales axónicas aberrantes (flechas) en asociación con un cúmulo de células intracavitarias. Técnica: Sevier- Munger, barra = A: 200 μ , B: 20 μ

Figura 15- Ejemplo de axones aberrantes ausentes (grupo MP)

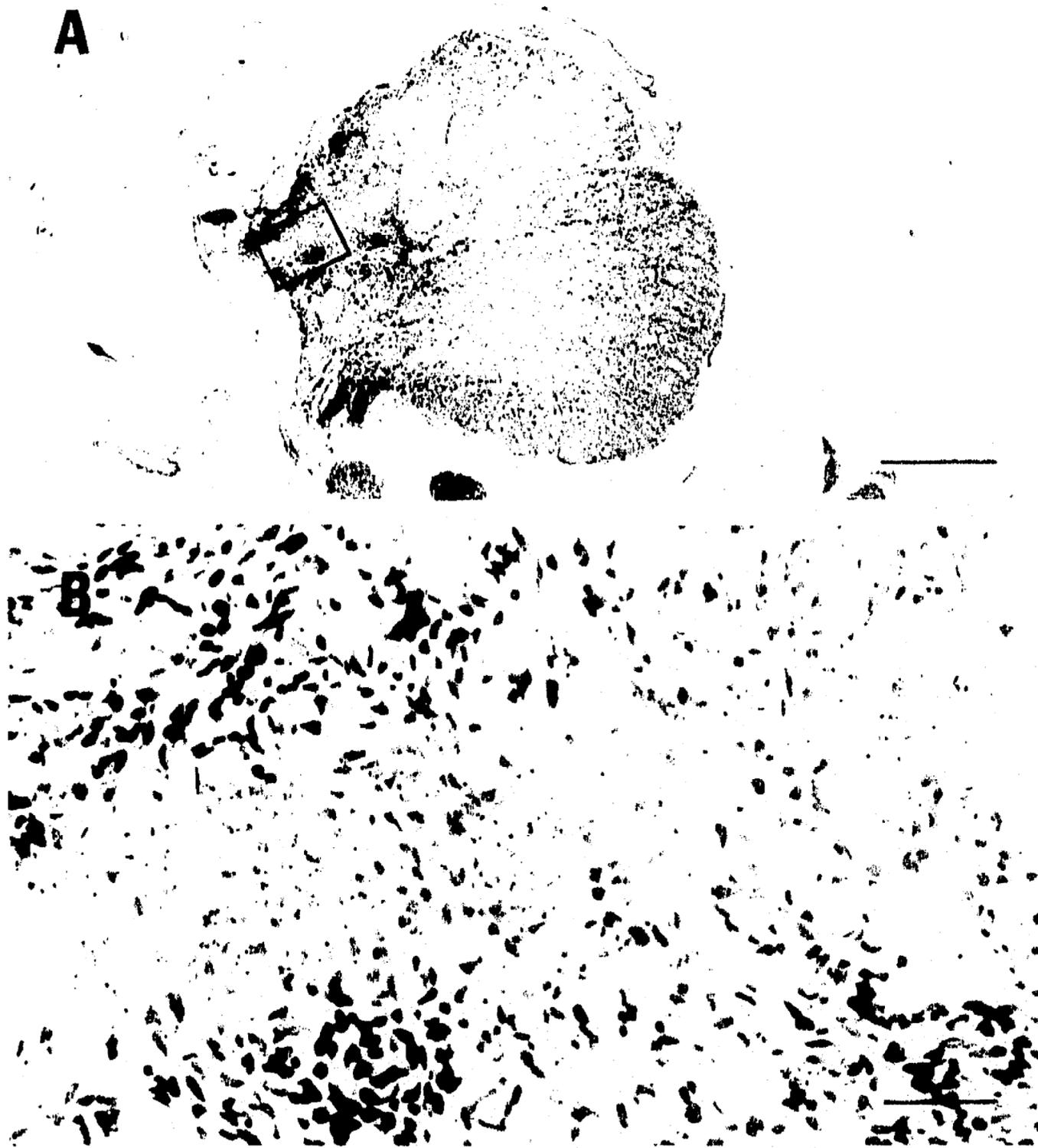


Figura 15: Imágenes del epicentro de una ME del grupo MP. (A), panorámica; (B), detalle donde se muestran un grupo compacto de células del interior del quiste y ausencia de colaterales axónicos aberrantes. Técnica: Sevier-Munger, barra = A: 200 μ , B: 20 μ

Figura 16- Ejemplo de axones aberrantes ausentes (grupo M+I)



Figura 16: Imágenes del epicentro de una ME del grupo M+I. (A), panorámica; (B), detalle donde se muestran grupos compactos de células al interior del quiste. No se observan colaterales axónicas aberrantes. Técnica: Sevier-Munger, barra = A: 200 μ , B: 40 μ

Figura 17- Plasticidad y astrocitos reactivos

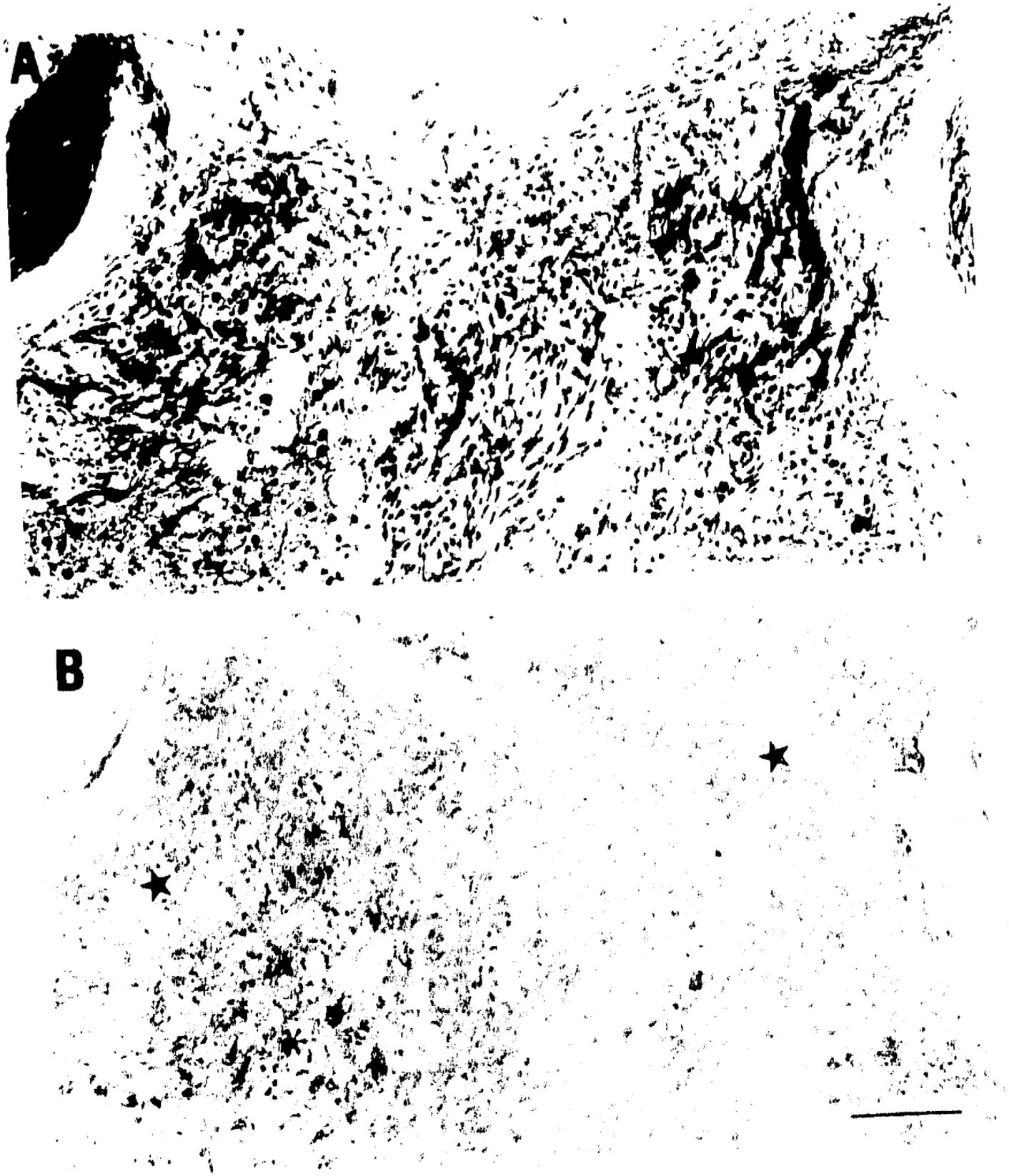


Figura 17: Imágenes comparativas con la técnica de Sevier-Munger (A) e inmunorreacción a GFAP (B) de un espécimen del grupo INP, a 650 μ en sentido cefálico al epicentro. Se observan axones aberrantes abundantes asociados a grupos compactos de células intraquadrantes negativas a GFAP (estrellas). En una pequeña área de sustancia gris preservada, se observa positividad a GFAP y axones aberrantes escasos o ausentes (asteriscos). Barra = 40 μ

Resultados de la morfometría

En la tabla II se muestra un resumen de los resultados de la evaluación morfométrica. En las figuras 18 a 22 se muestran en forma gráfica las áreas de tejido medular preservado en cada una de las regiones evaluadas.

Tabla II. Area preservada (mm²) de parénquima medular en epicentro y regiones adyacentes, por grupos.

Región		MP	INP	M+I	VEH	CON	NL
Epicentro	X	0.78	0.55	0.67	0.72	0.32	3.49
	DS	0.28	0.21	0.16	0.42	0.23	0.18
	ES	0.11	0.09	0.07	0.17	0.10	0.05
	% de NL	22.58	15.87	19.14	20.63	9.28	100
Cefálico (2 mm)	X	3.16	2.75	2.94	2.75	2.24	3.49
	DS	0.48	0.92	0.42	1.07	0.79	0.18
	ES	0.19	0.41	0.19	0.48	0.35	0.05
	% de NL	90.54	78.80	84.24	78.80	64.18	100
Cefálico (4 mm)	X	3.57	3.68	3.50	3.32	3.36	3.49
	DS	0.24	0.31	0.31	0.73	0.51	0.18
	ES	0.10	0.14	0.14	0.30	0.23	0.05
	% de NL	102.3	105.4	100.3	95.13	96.27	100
Caudal (2 mm)	X	3.88	3.65	2.83	3.38	2.43	4.24
	DS	0.87	0.34	1.27	0.87	0.55	0.50
	ES	0.36	0.17	0.57	0.35	0.25	0.11
	% de NL	91.51	86.08	66.74	79.72	57.31	100
Caudal (4 mm)	X	4.79	4.53	4.09	4.19	4.22	4.24
	DS	0.50	0.66	1.08	0.78	0.42	0.50
	ES	0.21	0.30	0.48	0.32	0.19	0.11
	% de NL	112.97	106.84	96.46	98.82	99.53	100

X media
 DS desviación estándar
 ES error estándar
 % de NL porcentaje de tejido medular íntegro en relación a la ME normal, tomando como referencia la media del área medida.

Figura 18- Area de tejido medular preservado en el epicentro

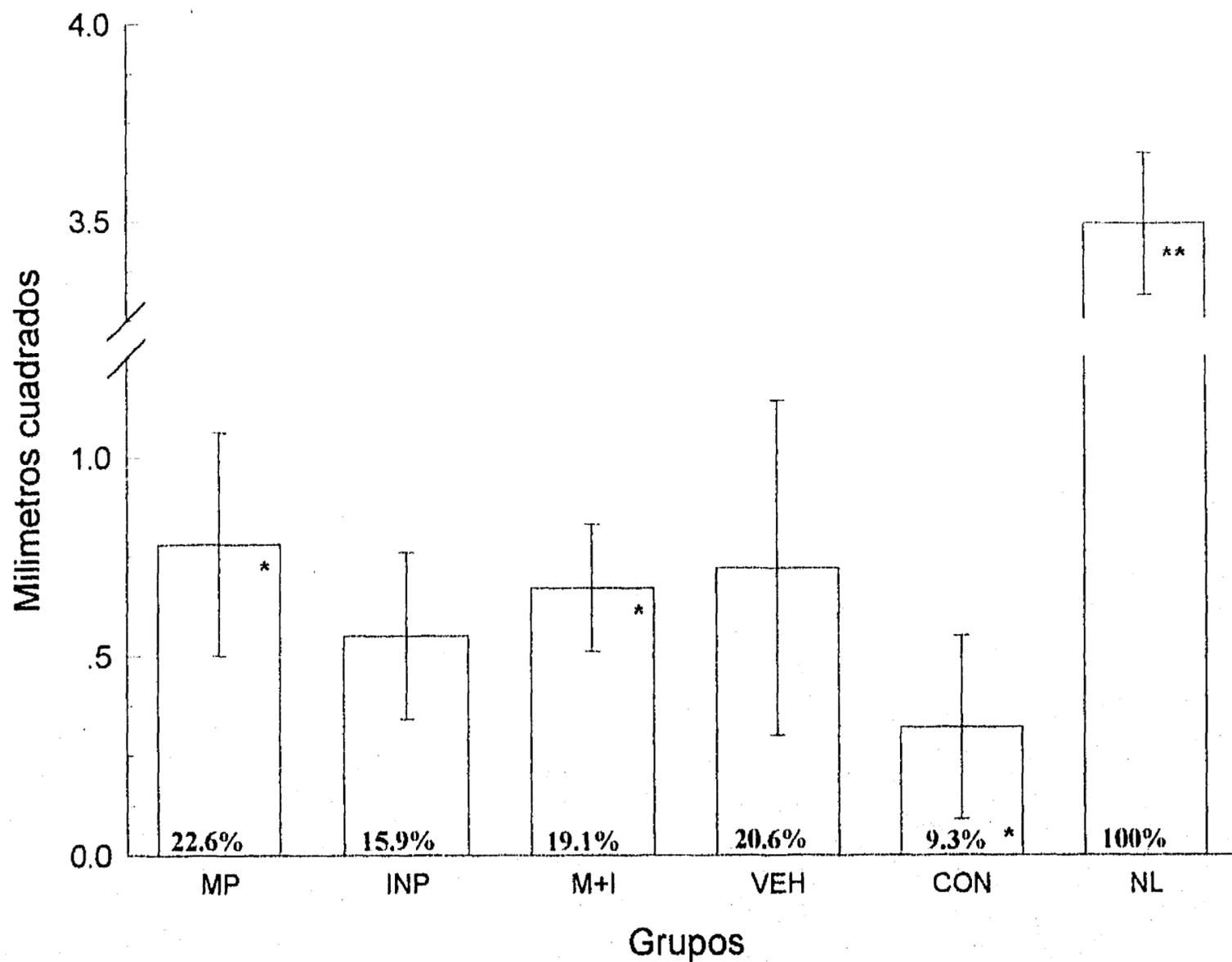


Figura 18: A nivel del epicentro se midió una cantidad de tejido medular preservado muy inferior al normal (entre 10 y 20% aprox.). En la evaluación estadística todos los grupos mostraron diferencia significativa con el normal (NL/T = normal a nivel torácico). Al comparar los grupos de ratas lesionadas entre si se encontró diferencia significativa entre MP y M+I vs CON. Gráfica: media más-menos desviación estandar

Figura 19- Area de tejido medular preservado a 2 mm
en sentido cefálico al epicentro

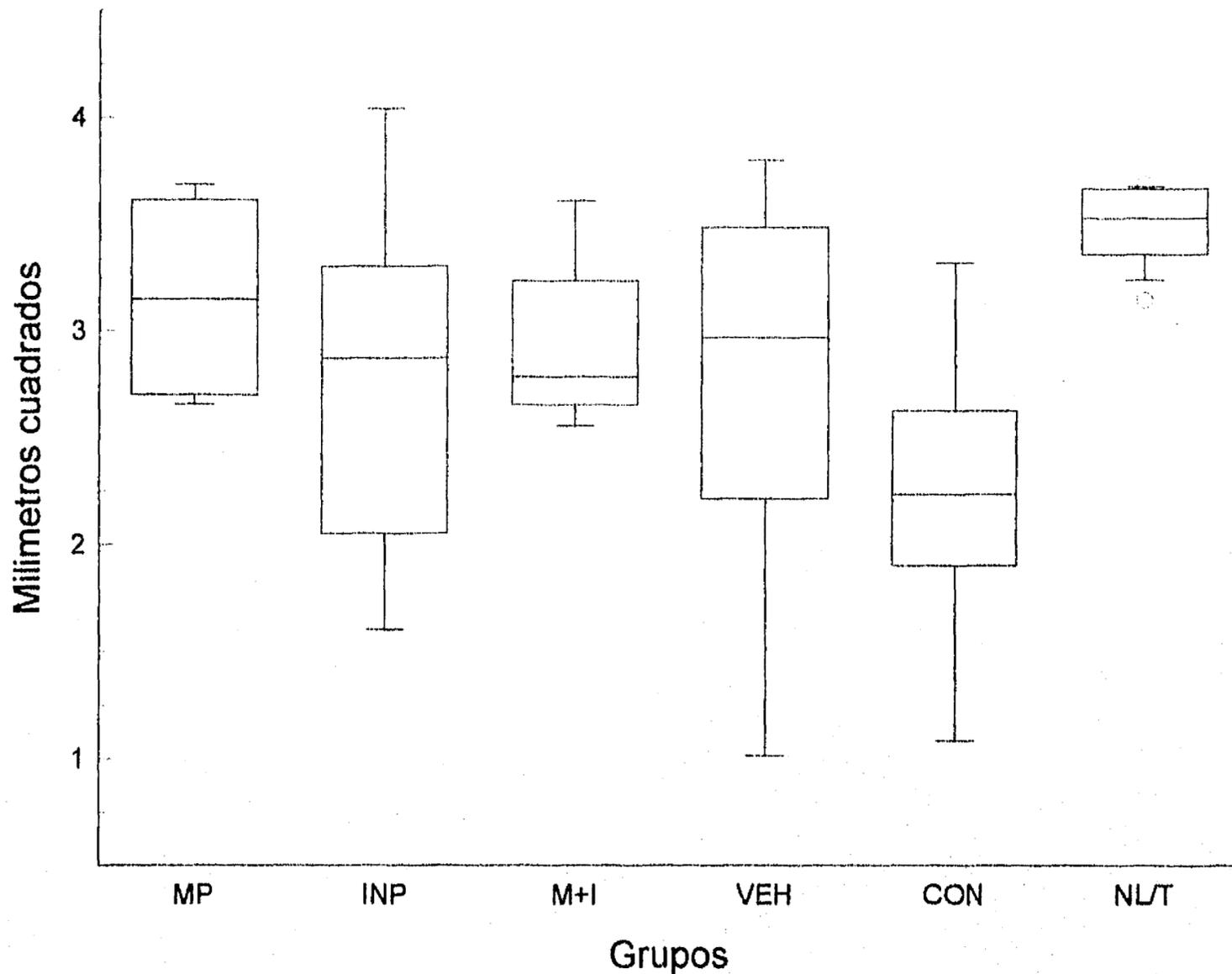


Figura 19: A 2 mm en sentido cefálico al epicentro se observa una recuperación importante del tejido medular íntegro de los grupos lesionados (aprox. 60 a 90% en relación al normal). Al comparar todos los grupos, solo se encontró diferencia con significado estadístico entre NL/T vs CON y MP vs CON. Nota- cuando la distribución de los datos no es normal, los resultados se muestran en gráfica de cajas. Significado de las líneas: línea en el interior de la caja = mediana, línea inferior de la caja = 25%, línea superior de la caja = 75%, punto más bajo de la línea de dispersión = valor mínimo en la serie, punto más alto = valor máximo.

Figura 20- Area de tejido medular preservado a 4 mm
en sentido cefálico al epicentro

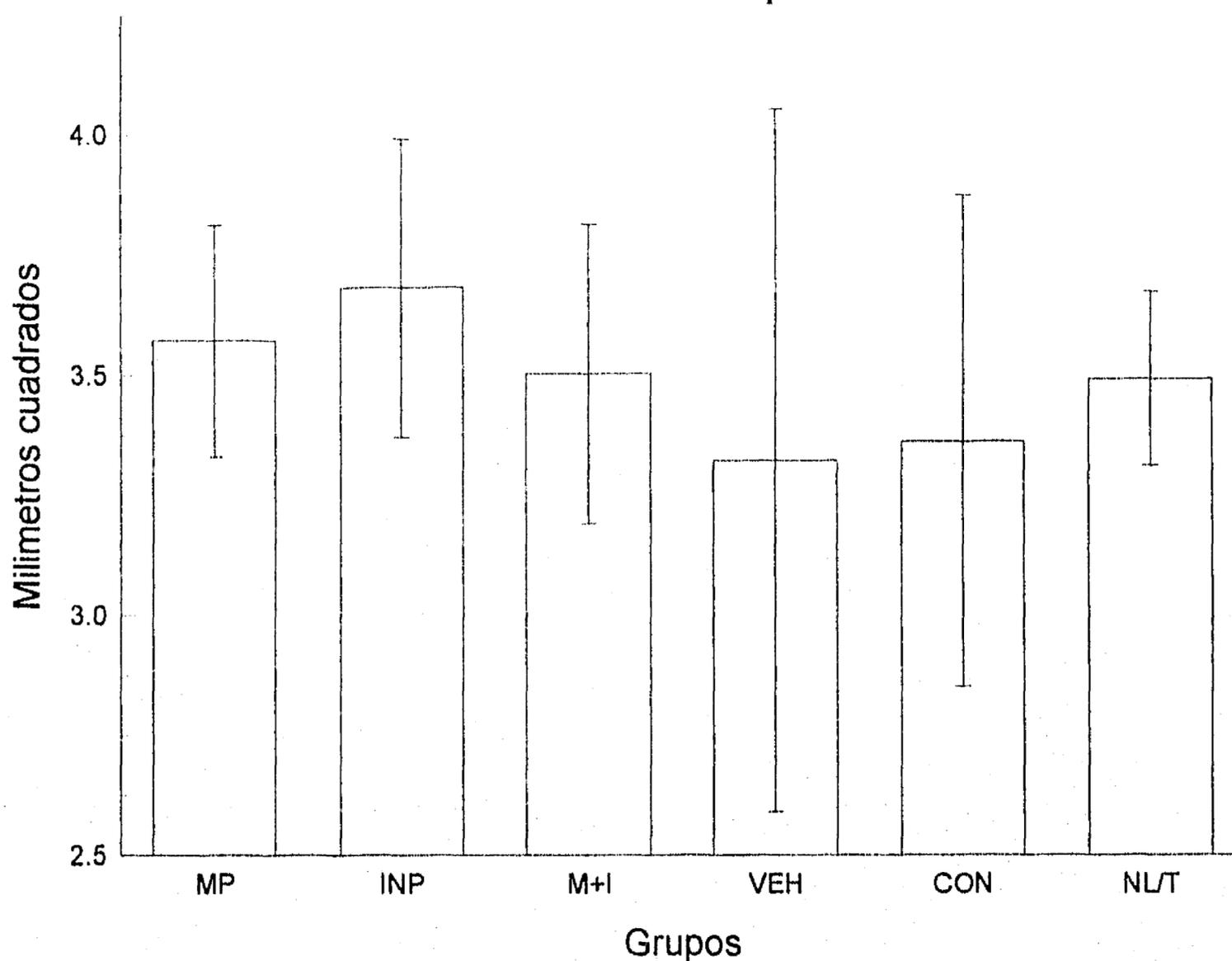


Figura 20: A 4 mm en sentido cefálico al epicentro, la cantidad de tejido medular íntegro medido en muchos animales lesionados resulto ser mayor al medido en los normales. La media de los grupos MP, INP y M+I fue ligeramente superior a la media del grupo normal, siendo la media mas alta la del grupo INP. En la evaluación estadística no se encontraron diferencias significativas entre alguno de los grupos. Gráfica: media más-menos desviación estandar

Figura 21- Area de tejido medular preservado a 2 mm
en sentido caudal al epicentro

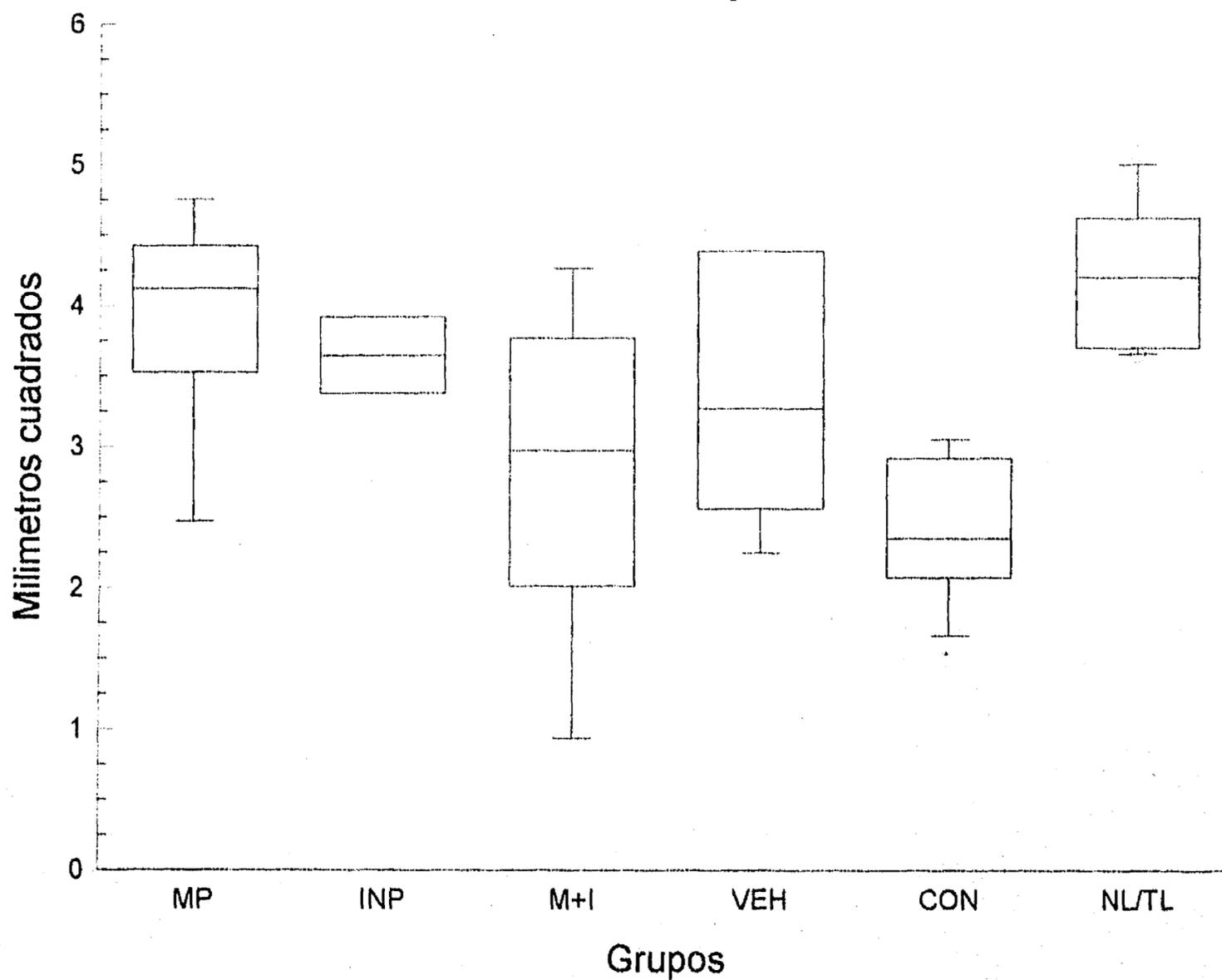


Figura 21: A 2 mm en sentido caudal al epicentro, al igual que en sentido cefálico se observa una mayor cantidad de tejido medular íntegro (aprox. del 60 al 90% en relación al NL/TL = normal toraco-lumbar). En la evaluación estadística se encontraron las siguientes diferencias significativas:

NL vs TODOS (excepto MP); MP vs CON; INP vs CON

Significado de las líneas de la gráfica de cajas en Fig. 19.

Figura 22- Area de tejido medular preservado a 4 mm
en sentido caudal al epicentro

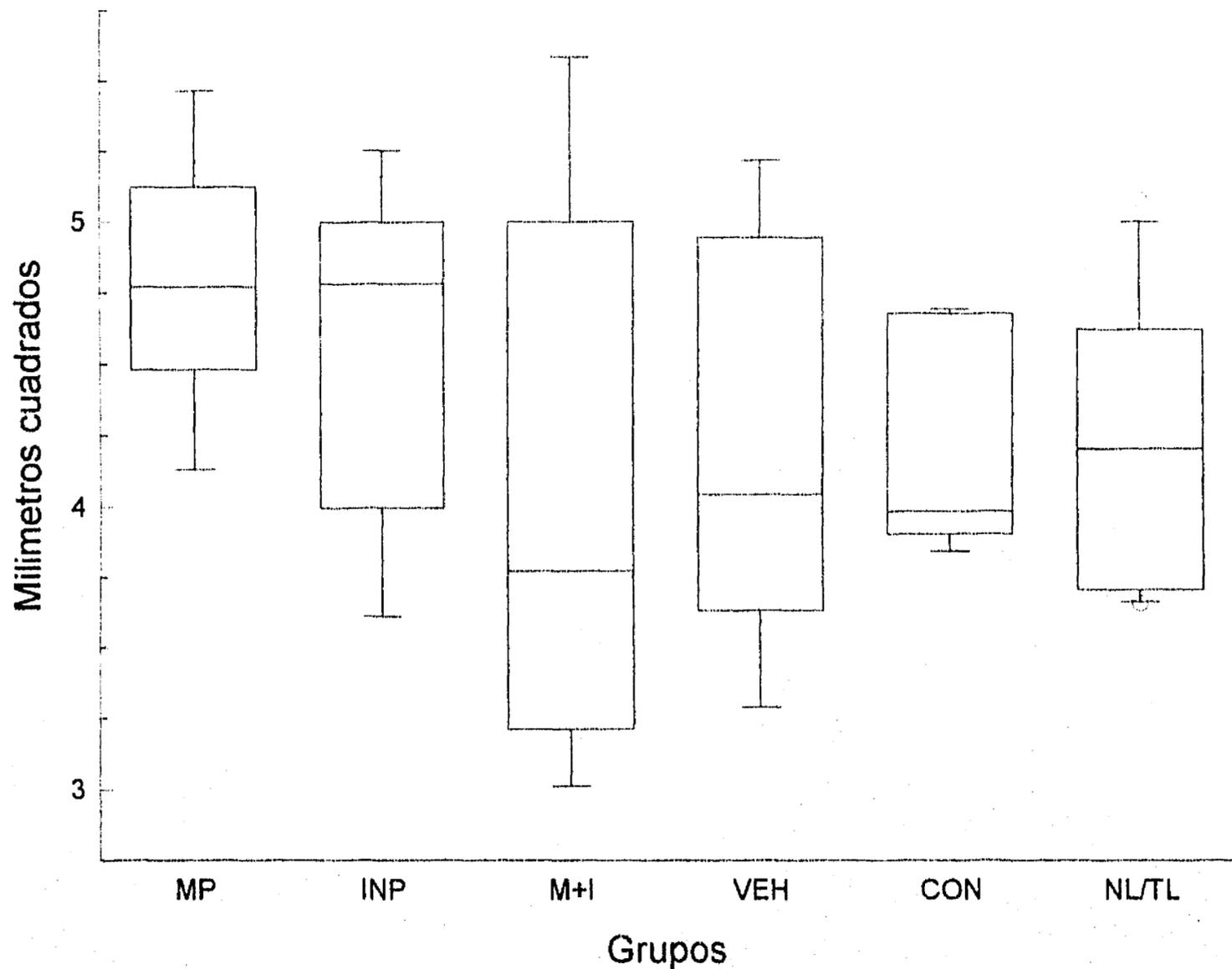


Figura 22: A 4 mm en sentido caudal al epicentro se observó un fenómeno similar al descrito para la misma distancia en sentido cefálico. En muchos animales se midió área de tejido medular íntegro superior a la normal. La media en los grupos MP e INP fue mayor a la NL/TL, mientras que la media de los otros grupos fue muy similar (ligeramente inferior) a la normal. Al compararlos estadísticamente ninguno fue diferente de manera significativa. Significado de las líneas de la gráfica de cajas en Fig. 19.

Correlación morfo-funcional

De la correlación entre la cantidad de tejido preservado a nivel del epicentro de cada espécimen con cada una de las pruebas funcionales, se encontró que las diferentes pruebas utilizadas tienen diferente coeficiente de correlación (Tabla III).

Tabla III. Correlación entre área de parénquima medular preservado a nivel de epicentro y resultado de las diferentes pruebas funcionales.

*	Longitud de Zancada	Errores en Rejilla	Base de Sustent. T.	Escala de Tarlov	Plano Inclinado	Base de Sustent. D.
Coef. Correl	0.768	-0.564	-0.541	0.512		-0.386
Valor de p	0.000001	0.0014	0.0025	0.0045	0.0082	0.0385
% en escala	24	18	17	16	14	11

* Correlación de Pearson

Propuesta de una escala funcional ponderada

Tomando como punto de referencia la cantidad de tejido preservado a nivel del epicentro y de acuerdo a la manera que se correlaciona cada una de las pruebas funcionales con dicha medida, se propone una escala de estado funcional de ratas con secuelas de LTME en estadio crónico. La longitud de zancada, que tiene el mayor coeficiente de correlación "pesa" más en la escala ponderada que la base de sustentación delantera, que posee la correlación más baja. En base a una regla de 3 se proponen los siguientes porcentajes anotados en el último renglón de la Tabla III. Los resultados funcionales en base a esta escala se presentan en forma gráfica (Fig. 23).

La ecuación que permite predecir el tamaño del epicentro, obtenida de la regresión lineal múltiple, tiene un valor de $p < 0.0001$. Se enuncia como sigue:

$$\text{Epicentro} = -2.10 + (0.00116 [\text{Tarlov}]) + (0.0129 [\text{plano inclinado}]) - (0.258 [\text{índice errores}]) + (0.312 [\text{BSD}]) - (0.116 [\text{BST}]) + (0.174 [\text{longitud de zancada}]).$$

Figura 23- Evaluación funcional en la semana 8, con la escala ponderada

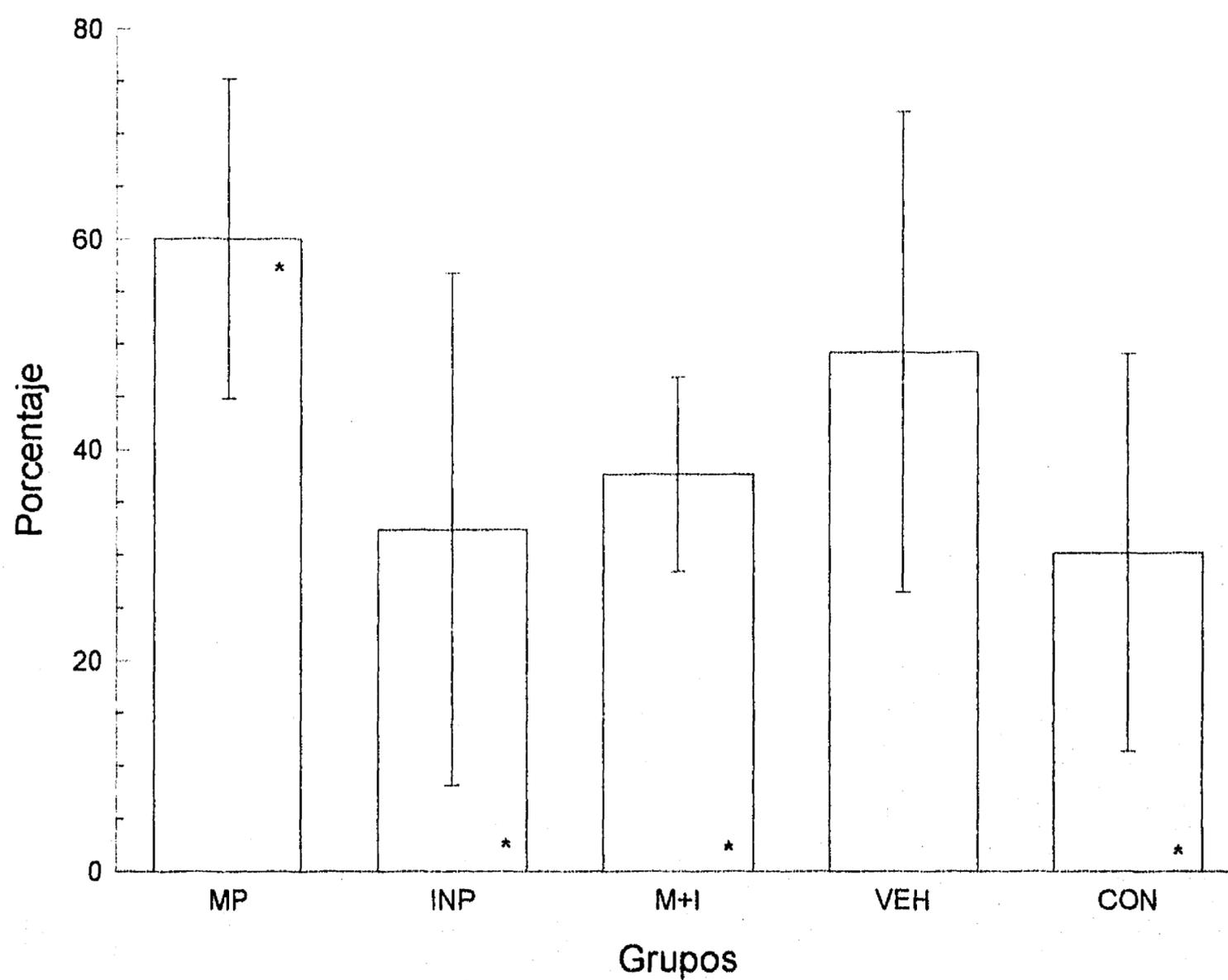


Figura 23: En la comparación de los resultados funcionales a la 8ª semana, entre los diferentes grupos, utilizando la escala ponderada propuesta, se encontraron diferencias significativas entre MP vs CON, INP y M+I. Gráfica: media más-menos desviación estandar

Correlación entre función motora e incidencia de axones aberrantes neoformados

En la tabla IV se muestra en orden descendente la calificación en la escala funcional ponderada que obtuvo cada una de las ratas del estudio, se señala el grupo al que corresponden y la incidencia de axones aberrantes. No se encontró correlación entre la función motora global y la presencia (o ausencia) de axones aberrantes.

Tabla IV. Correlación entre la calificación funcional (tomada de la escala ponderada) y la incidencia de axones aberrantes neoformados en el epicentro.

Grupo	Función motora (%)	Incidencia de axones (*)	Grupo	Función motora (%)	Incidencia de axones (*)
MP	81	2	INP	45	0
MP	70	1	INP	42	2
VEH	68	0	MP	40	0
VEH	65	2	M+I	37	1
MP	64	1	M+I	37	1
VEH	62	1	VEH	36	1
INP	61	2	CON	28	1
MP	59	0	M+I	23	0
VEH	55	1	CON	14	1
CON	51	0	CON	10	1
CON	48	2	VEH	9	2
M+I	46	0	INP	7	2
MP	46	0	INP	7	1
M+I	45	0			

* Incidencia de axones neoformados: 0 = Ausente; 1 = Leve a moderado; 2 = Abundante

DISCUSION

En el presente trabajo probamos en un modelo de contusión controlada de la ME el efecto neuroprotector del INP, de la administración parenteral de megadosis de MP y de la combinación de ambos, buscando un efecto sinérgico. Los resultados fueron evaluados desde el punto de vista funcional (motor) y morfológico.

Neuroprotección

La neuroprotección, entendida como cualquier medida que evite o disminuya el proceso de lesión neurológica secundaria, debe manifestarse, entre otros parámetros, en la mejor evolución clínica y menor destrucción del parénquima medular después de una LTME.

En el presente trabajo, todas las pruebas funcionales, independientemente del grupo de estudio, reflejaron una profunda alteración motora después de producida la lesión. Con el paso del tiempo se observó mejoría progresiva y en algunos casos con diferencia significativa entre los grupos. En el estudio morfológico, también se encontró, en todos los grupos, destrucción parenquimatosa importante a nivel del sitio de lesión, aunque la evaluación morfométrica permitió identificar diferencias significativas entre algunos grupos.

Tratamiento con MP

De nuestros resultados, en términos generales, el grupo que obtuvo mejor calificación en las diferentes pruebas funcionales y mayor cantidad de tejido preservado a nivel del epicentro fue el tratado únicamente con MP, mientras que el grupo con las peores calificaciones en cuanto a función motora y menor cantidad de tejido preservado en el epicentro fue el control que no recibió ningún tratamiento. Nuestros resultados concuerdan con la neuroprotección parcial reportada en numerosos trabajos previos, en los cuales se han administrado megadosis parenteral de MP, tanto en modelos experimentales de LTME,^{3, 6-8, 20, 37-39, 140, 159} como en pacientes con traumatismo raquímedular.^{32-34, 94} El

principal mecanismo de acción atribuido al fármaco en cuestión, es su efecto antioxidante.^{7, 8, 89,90, 94, 96, 103, 159}

Tratamiento con INP

En el grupo tratado únicamente con INP no encontramos evidencias de un efecto neuroprotector. Se observó una recuperación motora pobre, similar a la registrada en el grupo control que no recibió ningún tratamiento. Además, el área de tejido medular preservado en el epicentro, solo fue ligeramente superior al grupo control en cuestión, sin diferencia significativa.

El trasplante de nervio periférico es capaz de proteger de daño secundario a estructuras del SNC, como se ha demostrado en lesiones excitotóxicas del estriado¹⁴⁴ y en laceración completa de la ME.⁸⁶ En el presente trabajo, no observamos ningún efecto neuroprotector mediado por el INP. No nos queda claro por qué no obtuvimos el efecto esperado. Especulamos que pudiera estar en relación a aspectos metodológicos como el tipo y la intensidad de la lesión, o bien con las características del material implantado (que existan diferencias si el nervio se implanta en fragmento, como células disociadas o como células cultivadas). Otro aspecto a considerar en la explicación de la ausencia de un efecto neuroprotector mediado por el implante, es el posible daño mecánico (por exceso de volumen) ocasionado por la inyección de las células disociadas; a diferencia del método usado en LTME por laceración completa donde queda un espacio amplio para colocar el implante⁸⁶, en el presente trabajo no se reseco un fragmento de ME y las meninges se mantuvieron íntegras, impidiendo una distensión excesiva de la ME que ya de por sí se edematiza como parte de la lesión secundaria¹¹⁶. Es posible que la inyección del vehículo no sea un testigo adecuado para el efecto mecánico de la inyección de células disociadas, ya que por tratarse de una solución fisiológica inyectada muy lentamente y sin partículas grandes (como las células) puede difundirse rápidamente en los tejidos y reabsorberse, sin dejar daño adicional por efecto de volumen.

La metodología empleada en el presente trabajo no nos permitió evaluar la supervivencia de las células implantadas. Se conoce que después de una LTME ocurre una migración espontánea de células de Schwann hacia la zona de lesión, procedentes de nervios periféricos vecinos^{53, 125} y aún cuando identificamos en el área de lesión células con morfología compatible con células de Schwann, no podemos asegurar que sean las implantadas, ya que no las marcamos y también se encontraron presentes en el área de lesión de animales no implantados.

Es poco probable que se hayan rechazado las células implantadas, ya que en ninguno de nuestros animales se encontró infiltrado inflamatorio que sugiriera un fenómeno de rechazo, lo cual concuerda con los estudios de Duan et al.⁶⁰ en relación a la respuesta inmune contra células singénicas, alogénicas o xenogénicas implantadas en el SNC de ratas adultas. Ellos reportan que el trasplante singénico se asocia a una respuesta inflamatoria leve, temprana y transitoria, atribuible al procedimiento de trasplante, sin evidencia de rechazo a largo plazo; la respuesta inflamatoria al trasplante alogénico es ligeramente mayor y dura un poco más de tiempo, pero no es suficiente para causar rechazo, mientras que la respuesta al trasplante xenogénico es intensa y en todos los casos lleva al rechazo. También concuerda con la respuesta inmune contra células de Schwann singénicas o alogénicas implantadas en nervio periférico⁸⁷ donde las primeras sobrevivieron y favorecieron el crecimiento axonal, mientras que las alogénicas fueron rechazadas.

Tratamiento con MP+INP

En el grupo de ratas tratadas con INP y MP, se buscaba un efecto sinérgico de ambos tratamientos, ya que a pesar del efecto antioxidante de las megadosis de MP después de LTME, este fármaco tiene limitaciones como neuroprotector, pues no ha probado ser útil para controlar algunos mecanismos de lesión secundaria, como el incremento en los niveles de eicosanoides.⁹⁶ Además, la MP puede tener efectos negativos, como se observó en lesiones del estriado inducidas por ácido quinolínico, donde el pretratamiento con megadosis de MP resulta en lesiones del doble de tamaño, comparado

con los tratados con vehículo; en este caso, el efecto glucocorticoide de depleción de energía, opacó cualquier efecto positivo antioxidante.¹⁷⁹

Debido a las limitaciones de la MP se han intentado otras alternativas terapéuticas que potencien su efecto aislado. Tal es el caso del efecto sinérgico que se observó en un modelo de compresión medular al combinar MP con aplicación intralesional de factor de crecimiento fibroblástico básico [bFGF]¹¹ (factor que promueve regeneración y supervivencia de neuronas lesionadas, neutraliza aminoácidos excitatorios^{1, 28, 139} y estimula la angiogénesis⁷⁰). También se observó un efecto sinérgico al combinar MP con el bloqueador de canales de calcio flunarizina, resultó que la recuperación de potenciales evocados somatosensoriales después de LTME experimental fue mayor al combinar ambos fármacos en comparación con el uso individual de los mismos.⁵⁷

En nuestro trabajo no observamos sinergismo al combinar INP y MP. Tanto en la evaluación clínica como en la evaluación morfométrica, las ratas del grupo en cuestión mostraron resultados ligeramente inferiores a las ratas del grupo tratado con solo MP. Las diferencias favorables (con significancia estadística) que se observaron al comparar el grupo combinado con el grupo que no recibió tratamiento alguno, tanto en algunas pruebas funcionales, como en la evaluación morfométrica, deben ser atribuidas a la MP más que al INP, a juzgar por los resultados independientes de cada una de estas variables.

No siempre la combinación de dos neuroprotectores produce resultados satisfactorios, como se demostró en un trabajo reciente⁵⁰ donde se buscó un posible efecto sinérgico en un modelo de LTME aguda de dos neuroprotectores conocidos: MP y gangliósido GM1. Resultó que el último bloqueó los efectos benéficos de la MP. Cabe mencionar que los gangliósidos exógenos pueden modular la capacidad del SNC para modificar su respuesta a señales del microambiente. Por ejemplo, amplifican la respuesta de las neuronas a factores neurotróficos y protegen de la neurotoxicidad provocada por los aminoácidos excitatorios limitando la sobrestimulación de los receptores.¹⁴⁷ A pesar de dichas propiedades, el resultado de la combinación de MP + GM1 fue negativo. Los autores lo

atribuyen a que el GM1 inhibe a las lipocortinas que son mediadores del efecto anti inflamatorio de los glucocorticoides.

Plasticidad

En las evaluaciones morfológica identificamos un fenómeno de plasticidad, caracterizado por la formación de colaterales axónicas aberrantes a nivel del epicentro. Este fenómeno se manifestó de manera diferente entre los grupos estudiados.

Se conoce que en muchas regiones del SNC ocurre reinervación de neuronas desnervadas parcialmente por crecimiento colateral de neuronas no dañadas.^{76, 78, 79, 146, 170} Se ha propuesto que el crecimiento de colaterales de axones de raíces dorsales distales a una hemisección medular a nivel torácico bajo es responsable de la reinervación de regiones de sustancia gris medular desnervada parcialmente.^{79, 98, 137} En la ausencia de regeneración de las vías seccionadas, se ha sugerido que tal reinervación procedente de las raíces dorsales está involucrada en la recuperación motora postlesión en dichos animales^{78, 137} y también en la espasticidad humana.¹³¹ La observación de que la rizotomía ipsilateral y caudal a una hemisección evita permanentemente la recuperación motora,^{79, 138} apoya la hipótesis de que el sistema de aferentes primarios está involucrado en la recuperación de la función motora. Este concepto se ha reforzado más recientemente mediante el análisis de la locomoción y de los reflejos.⁹⁸

Notablemente en los grupos que recibieron MP, la incidencia de axones aberrantes a nivel del epicentro fue menor al compararla con la observada en los otros grupos, particularmente con el tratado solo con INP. En base a los conocimientos actuales y a nuestros resultados no es posible definir el mecanismo por el cual la MP bloquea la formación de tales colaterales axónicos. Es ampliamente conocido que las hormonas esteroides juegan un papel muy importante en la regulación del desarrollo, crecimiento, homeostasis y muerte. De los efectos bloqueadores de los glucocorticoides destacan: disminución de la velocidad de síntesis de colágena⁹⁷ resultando en retardo y eventualmente bloqueo de la cicatrización;³⁰ supresión del sistema inmune por diversos mecanismos;^{130, 136} bloqueo de

la producción de diferentes factores tróficos incluyendo factor de crecimiento de queratinocitos,³⁶ factor de crecimiento epidermal,⁴⁷ y factor de crecimiento similar a la insulina I;⁵⁶ también participan en la muerte celular programada.^{62, 124} Los glucocorticoides y los receptores de aminoácidos excitatorios, se han relacionado a la atrofia (inducida por estrés) de las dendritas apicales de neuronas del hipocampo.¹²⁷

Desconocemos reportes donde se relacione a los glucocorticoides y en particular a la MP con fenómenos de neuroplasticidad anatómica; pudiera tratarse de una expresión adicional de bloqueo provocada por corticoesteroides, posiblemente relacionado a la inhibición de factores neurotróficos. La metodología empleada en el presente trabajo no nos permite explicar este fenómeno, para lo cual se requiere de estudios adicionales. La respuesta pobre al combinar gangliósido GM1 y MP,⁵⁰ a la que hicimos referencia en párrafos anteriores, podría explicarse en base a nuestros resultados, además de la explicación que dan los autores, por el antagonismo que ambos fármacos tienen en relación a la neuroplasticidad, pues mientras el GM1 es un inductor de neuroplasticidad conocido,^{117,148} la MP la bloquea.

Se ha demostrado ampliamente que las células de Schwann y sus productos neurotróficos proveen un ambiente favorable para la regeneración axonal sostenida.^{10, 25, 137} En nuestras condiciones experimentales, se observó que el INP (solo, sin combinar con MP) favorece la plasticidad anatómica en cuestión. En este sentido, nuestros resultados concuerdan con los reportes histológicos de Martin y colaboradores^{127, 128} quienes hicieron estudios de trasplante inmediatamente, 2, 4 y 7 días después de una LTME, utilizando inyección intralesional de células de Schwann singénicas, cultivadas. La mayor sobrevida de células implantadas la encontraron en los extremos (inmediato y 7 días); reportan que en torno a las células de Schwann se formaron abundantes prolongaciones nerviosas aberrantes, aparentemente originadas de los ganglios de las raíces dorsales, a juzgar por los neurotransmisores que contenían; no reportan evaluación funcional.

En el grupo control de ratas lesionadas que no recibieron tratamiento y en las inyectadas con el vehículo del implante, la incidencia de axones aberrantes neoformados

fue catalogada como moderada. Como se describió en los antecedentes, después de una LTME se crea, de manera espontánea, un microambiente que favorece los fenómenos de plasticidad anatómica, caracterizado por el incremento de diferentes factores neurotróficos, sus receptores^{12, 71, 73, 111, 152, 156} y la proteína asociada al crecimiento GAP-43.^{5, 52, 119}

La falta de correlación entre la calificación funcional global (ponderada) de cada uno de los animales del experimento, con su correspondiente expresión de axones aberrantes a nivel del epicentro, nos hace pensar que la presencia o ausencia de dichos axones no influye en el comportamiento motor que se expresa después de la lesión. Por su posible origen en los ganglios de las raíces dorsales^{128, 129} pudieran estar más relacionados con la función sensitiva, la cual no fue evaluada en este trabajo.

Existen ejemplos de plasticidad aberrante que en parte explican el deterioro de la función, como en el caso de el crecimiento colateral axónico en torno a las placas cerebrales de amiloide, que se presenta en la enfermedad de Alzheimer.⁵¹ No descartamos que la plasticidad observada en nuestro trabajo, genere circuitos neuronales anormales que lejos de ser favorables para la recuperación funcional, la distorsionen.

Respecto a la observación de que las colaterales axónicas neoformadas en la zona de lesión crecen en donde los astrocitos reactivos son escasos o ausentes (Figura 17), concuerda con los resultados de Curtis et al,⁵² quienes reportan que después de LTME, los axones neoformados en la zona de lesión, identificados por la expresión de altos niveles de GAP-43, no crecieron en contacto con astrocitos; aparentemente su crecimiento se asoció a capilares neoformados, cuyas células expresan algunos factores neurotróficos.^{152, 156}

Índice de sobrevida

El bajo índice de morbi-mortalidad observado en todos los grupos del presente experimento, contrasta con el alto índice de morbi-mortalidad observado en otros estudios experimentales de LTME.^{54, 86} Es muy probable que la diferencia se explique por el tipo y la intensidad de la lesión, ya que en el presente trabajo se produjo una contusión medular con intensidad de leve a moderada, que en todos los casos mantuvo una porción anatómi-

camente íntegra de ME a nivel del epicentro, mientras que en los otros estudios la lesión producida fue una laceración completa.

Escala funcional ponderada

No todas las pruebas funcionales deben reflejar con la misma precisión el estado funcional o el grado de recuperación de los animales. Más allá de la evaluación del estado funcional por pruebas independientes, diversos autores han diseñado escalas que agrupan diferentes pruebas funcionales para evaluar el déficit⁷⁵ o la mejoría¹¹ funcional en modelos de LTME. En dichas escalas, el peso de las diferentes pruebas en el porcentaje total de la escala, es dado de una manera arbitraria.

En nuestro trabajo, al correlacionar el resultado de cada una de las pruebas funcionales con la cantidad de tejido preservado en cada uno de los especímenes, encontramos diferentes grados de correlación. En base a estos resultados propusimos una escala en la que el valor relativo de cada prueba tuviera un peso diferente en la escala global, basado en su coeficiente de correlación. En un trabajo reciente, demostraron una correlación positiva entre severidad de la lesión, función neurológica residual, axones preservados a nivel del sitio de lesión y número de neuronas marcadas retrógradamente en diferentes núcleos cerebrales.⁶⁷

CONCLUSIONES

En ratas adultas sometidas a una contusión de la médula espinal a nivel torácico bajo, de intensidad moderada:

- La administración parenteral temprana de metilprednisolona favorece una recuperación funcional parcial.
- El implante temprano en la zona de lesión de 10 μ l de una suspensión de células singénicas de nervio periférico o de su vehículo (solución salina balanceada de Hank), no favorecen la recuperación funcional, pero tampoco incrementan el déficit funcional.
- El tratamiento temprano con la combinación de metilprednisolona e implante de células de nervio periférico, produce una recuperación funcional de menor magnitud a la observada con solo aplicar metilprednisolona.
- La cantidad de tejido medular preservado a nivel del epicentro se correlaciona positivamente con los resultados funcionales.
- La administración de metilprednisolona bloquea la formación de colaterales axónicos aberrantes a nivel del epicentro, mientras que el implante de células de nervio periférico estimula dicho proceso plástico.
- La presencia o ausencia de colaterales axónicas aberrantes en cuestión, notablemente no se correlaciona con la evaluación funcional motora.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- Abe K, Saito H. Selective enhancement by basic fibroblast growth factor of NMDA receptor-mediated increase of intracellular Ca^{2+} concentration in hippocampal neurons. *Brain Res* 1992; 595: 128-132
- 2- Aguayo AJ. Axonal regeneration from injured neurons in the adult mammalian central nervous system. In: Cotman CW (Ed). *Synaptic plasticity*. Guilford Press, New York. 1985; pp 457-484
- 3- Akdemir H, Pasaoglu H, Arman F, Coksevim B, Pasaoglu A. Effects of TRH and high-dose corticosteroid therapy on evoked potentials, and tissue Na^+ , K^+ and water content in experimental spinal injury. *Res Exp Med Berl* 1993; 193: 297-304
- 4- Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. *JAMA* 1911; 57: 878-880
- 5- Alonso G, Ridet L, Oestreicher AB, Gispen WH, Privat A. B-50 (GAP-43) Immunoreactivity is rarely detected within intact catecholaminergic and serotonergic axons innervating the brain and spinal cord of the adult rat, but is associated with these axons following lesion. *Exp Neurol* 1995; 134: 35-48
- 6- Anderson DK, Means ED, Waters TR. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg* 1982; 56: 106-113
- 7- Anderson DK, Means ED. Iron-induced lipid peroxidation in spinal cord: protection with mannitol and methylprednisolone. *J Free Rad Biol Med* 1985; 1: 59-64
- 8- Anderson DK, Saunders RD, Demediuk P, Dugan LL, Braughler JM, Hall ED, Means ED, Horrocks LA. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *CNS Trauma* 1985; 12: 257-267
- 9- Ard MD, Bunge RP, Bunge MB. Comparison of the Schwann cell surface and Schwann cell extracellular matrix as promoters of neurite growth. *J Neurocytol* 1987; 16: 539-555
- 10- Assouline JG, Bosch P, Lim R, et al. Rat astrocytes and Schwann cells in cultures synthesize nerve growth factor-like neurite-promoting factors. *Dev Brain Res* 1987; 31: 103-118
- 11- Baffour R, Achanta K, Kaufman J, Berman J, Garb JL, Rhee S, Friedman P. Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and methylprednisolone on neurological function after experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 1995; 83: 105-110
- 12- Bakhit C, Armanini M, Wong WL, Bennett GL, Wrathall JR. Increase in nerve growth factor-like immunoreactivity and decrease in choline acetyltransferase following contusive spinal cord injury. *Brain Res* 1991; 554: 264-271
- 13- Balentine JD, Paris D. Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest* 1978; 39: 236-253
- 14- Balentine JD. Calcium toxicity as a factor in spinal cord injury. *Surv Synth Path Res*. 1983; 2: 184-193
- 15- Balentine JD. Spinal cord trauma: In search of the meaning of granular axoplasm and

- vesicular myelin. *J Neuropath Exp Neurol* 1988; 47: 77-92
- 16- Banik NL, McAlhaney WW. Calcium-stimulated proteolysis in myelin: Evidence of a Ca²⁺ activated neutral proteinase associated with purified myelin of rat CNS. *J Neurochem* 1985; 45: 581-588
- 17- Banik NL, Hogan EL. Proteolytic enzymes in experimental spinal cord injury. *J Neurol Sci* 1986; 73: 245-256
- 18- Barut S, Canbolat A, Bilge T, Aydin Y, Cokneseli B, Kaya U. Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury: time-level relationship. *Neurosurg Rev* 1993; 16: 53-59
- 19- Bedbrook GM. The development and care of spinal cord paralysis (1918-1986). *Paraplegia* 1987; 25: 172-184
- 20- Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS. Modeling of acute spinal cord injury in the rat: neuroprotection and enhanced recovery with methylprednisolone, U-74006F and YM-14673. *Exp Neurol* 1994; 126: 61-75
- 21- Benfey M, Aguayo AJ. Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts. *Nature* 1982; 296: 150-152
- 22- Bernstein JJ, Bernstein ME. Axonal regeneration and formation of synapses proximal to the site of the lesion following hemisection of the rat spinal cord. *Exp Neurol* 1971; 30: 336-351
- 23- Bernstein ME, Bernstein JJ. Regeneration of axons and synaptic complex formation rostral to the site of hemisection in the spinal cord of the monkey. *Int J Neurosci* 1973; 5: 15-26
- 24- Bernstein DR, Stelzner DJ. Developmental plasticity of the corticospinal tract (CST) following mid-thoracic "over hemisection" in the neonatal rat. *J Comp Neurol* 1983; 221: 371-385
- 25- Bixby JL, Lillien J, Reichardt LF. Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells in vitro. *J Cell Biol* 1988; 107: 353-362
- 26- Björklund A, Stenevi U, Schmidt RH, Dunnett SB, Gage FH. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. *Acta Physiol Scand Suppl* 1983; 522: 1-75
- 27- Blight AR, Saito K, Heyes MP. Increased levels of the excitotoxin quinolinic acid in spinal cord following contusion injury. *Brain Res* 1993; 632: 314-316
- 28- Blottner D, Baumgarten HG. Basic fibroblast growth factor prevents neuronal death and atrophy of retrogradely labeled preganglionic neurons *in vivo*. *Exp Neurol* 1992; 118: 35-46
- 29- Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M. Neurite outgrowth inhibitors in gliotic tissue. *Restor Neurol Neurosci* 1992; 4: 173
- 30- Bowman WC, Rand MJ. *Farmacología: Bases bioquímicas y patológicas*. Nueva Editorial Interamericana SA de CV, 2ª edición, México DF., 1985 pp 13.1-13.30
- 31- Bracken MB, Freeman DH, Hellenbrand K. Incidence of acute traumatic hospitalized cord injury in the United States, 1970-1977. *Am J Epidemiol* 1981; 133: 615-622
- 32- Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leosummers L, Maroon J. A randomized, controlled trial of

- methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med* 1990; 322: 1405-1411
- 33- Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Baskin DS. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. *J Neurosurg* 1992; 76:23-31
- 34- Bracken MB, Holford TR. Effect of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *J Neurosurg* 1993; 79: 500-507
- 35- Brailowsky S, Stein DG, Wills B (Eds). *El cerebro averiado. Plasticidad cerebral y recuperación funcional*. Fondo de Cultura Económica, México. 1992
- 36- Brauchle M, Rassler R, Werner S. Suppression of keratinocyte growth factor expression by glucocorticoids in vitro and during wound healing. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 579-584
- 37- Braughler JM, Hall ED. Lactate and pyruvate metabolism in injured cat spinal cord before and after a single large intravenous dose of methylprednisolone. *J Neurosurg* 1983; 59: 256-261
- 38- Braughler JM, Hall ED. Effects of multi-dose methylprednisolone sodium succinate administration on injured cat spinal cord neurofilament degradation and energy metabolism. *J Neurosurg* 1984; 61: 290-295
- 39- Braughler JM, Hall ED, Means ED, Waters TR, Anderson DK. Evaluation of an intensive methylprednisolone sodium succinate dosing regimen in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 1987; 67: 102-105
- 40- Braughler JM, Hall ED. Involvement of lipid peroxidation in CNS injury. *J Neurotrauma* 1992; 9 Suppl 1: S1-7
- 41- Bregman BS, Goldberger ME. Anatomical plasticity and sparing of function after spinal cord damage in neonatal cats. *Science* 1982; 217: 553-555
- 42- Bregman BS, Kunkel-Bagden E. Methods of determining development and recovery of motor function after spinal cord lesions and transplants in rats. In: M Brown and M Goldberger (eds), *Proceedings of the Conference on Criteria for Assessing Recovery of Function: Behavioral Methods*, Springfield, NJ: American Paralysis Association, 1989, pp 47-55
- 43- Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Reier PJ, Dai HN, McAtee M, Gao D. Recovery of function after spinal cord injury: mechanisms underlying transplant-mediated recovery of function differ after spinal cord injury in newborn and adult rats. *Exp Neurol* 1993; 123: 3-16
- 44- Bresnahan JC, Beattie MS, Todd III FD, Noyes DH. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. *Exp Neurol* 1987; 95: 548-570
- 45- Brookes PJ, Fields KP, Raff MC. Studies on cultured rat Schwann cells. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res* 1979; 165: 105-108
- 46- Bunge RP, Hopkins JM. The role of peripheral and central neuroglia in neural regeneration in vertebrates. *Sem Neurosci* 1990; 2: 509-518

- 47- Chang WC, Kao HC, Liu YW. Down-regulation of epidermal growth factor-induced 12-lipoxygenase expression by glucocorticoids in human epidermoid carcinoma A431 expression by glucocorticoids in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 947-952
- 48- Chiquet M. Neurite growth inhibition by CNS myelin proteins: a mechanism to confine fiber tracts? *TINS* 1989; 12: 1-3
- 49- Clendenon NR, Allen H, Gordon WA, Bingham WG. Inhibition of Na⁺ K-activated ATPase activity following experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg* 1978; 49: 563-568
- 50- Constantini S, Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg* 1994; 80: 97- 111
- 51- Cotman CW, Cummings BJ, Whitson JS. The role of misdirected plasticity in plaque biogenesis and Alzheimer's disease pathology. In: Hefti F, Brachet P, Will B, Christen Y (Eds). *Growth factors and Alzheimer's disease*. Springer-Verlag, Heidelberg 1991; pp 222-233
- 52- Curtis R, Green D, Lindsay RM, Wilkin GP. Up-regulation of GAP-43 and growth of axons in rat spinal cord after compression injury. *J Neurocytol* 1993; 22: 51-64
- 53- Das GD. Perspectives in anatomy and pathology of paraplegia in experimental animals. *Brain Res Bull* 1989; 22: 7-32
- 54- 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
- 55- David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 1981; 214: 931-933
- 56- Delany AM, Canalis E. Transcriptional repression of insulin-like growth factor I by glucocorticoids in rat bone cells. *Endocrinology* 1995; 136: 4776-4781
- 57- DeLey G, Leybaert L. Effect of flunarizine and methylprednisolone on functional recovery after experimental spinal injury. *J Neurotrauma* 1993; 10: 25-35
- 58- Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD. The free radical pathology and the microcirculation in the mayor central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand (suppl III)* 1980; 492: 91-119
- 59- Droz B, Leblond CP. Axonal migration of proteins in the central nervous system and peripheral nerves as shown by radioautography. *J Comp Neurol* 1963; 121: 325-346
- 60- Duan WM, Widner H, Brundin P. Temporal pattern of host responses against intrastriatal grafts of syngeneic, allogeneic or xenogeneic embryonic neuronal tissue in rats. *Exp Brain Res* 1995; 104: 227-242
- 61- Edds MV. Collateral nerve regeneration. *Quartz Rev Biol* 1953; 28: 260-276
- 62- Evans-Storms RB, Cidlowski JA. Regulation of apoptosis by steroid hormones. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1995; 53: 1-8
- 63- Faden AI. Pharmacology in spinal cord injury: a critical review of recent developments. *Clin Neuropharmacol* 1987; 10: 193-204
- 64- Faden AI, Simon RP. A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol* 1988; 23: 623-626

- 65- Faden AI, Gannon A, Basbaum AI. Use of serotonin immunocytochemistry as a marker of injury severity after experimental spinal trauma in rats. *Brain Res* 1988; 450: 94-100
- 66- Fallon JR. Preferential outgrowth of central nervous system neurites on astrocytes and Schwann cells as compared with nonglial cells in vitro. *J Cell Biol* 1985; 100: 198-207
- 67- Fehlings MG, Tator CH. The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 1995; 132: 220-228
- 68- Feringa ER, Vahlsing HL. Retrograde transport in cortico-spinal neurons after spinal cord transection. *Neurology* 1983; 33: 478-482
- 69- Feringa ER, McBride RL, Pruitt II JN. Loss of neurons in the red nucleus after spinal cord transection. *Exp Neurol* 1988; 100: 112-120
- 70- Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-447
- 71- Follesa P, Wrathall JR, Mocchetti I. Increased basic fibroblast growth factor mRNA following contusive spinal cord injury. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 22: 1-8
- 72- Frankel H. Spinal cord injury units. *Paraplegia* 1987; 25: 239-240
- 73- Frisen J, Verge VM, Cullheim S, Persson H, Fried K, Middlemas DS, Hunter T, Hokfelt T, Risling M. Increased levels of trkB and trkB protein-like immunoreactivity in the injured rat and cat spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1282-1286
- 74- Gage FH, Cotman CW (Eds). *Plasticity and pathology in the damaged brain*. Raven Press, New York. 1992
- 75- Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol* 1985; 88: 123-134
- 76- Ganchrow D, Margolin J, Perez L, Bernstein JJ. Pattern of reafferentation in rat nucleus gracilis after thoracic dorsal column lesions. *Exp Neurol* 1981; 71: 437-451
- 77- Giulian D, Robetson C. Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. *Ann Neurol* 1990; 27: 33-42
- 78- Goldberger ME, Murray M. Lack of sprouting and its presence after lesions of the cat spinal cord. *Brain Res* 1982; 242: 227-239
- 79- Goldberger ME, Murray M. Patterns of sprouting and implications for recovery of function. In S.G. Waxman (ed). *Advances in Neurology*, vol 47, Raven Press, New York, 1988, pp 361-385
- 80- Goldberger ME, Bregman BS, Vierck CJ, Brown M. Criteria for assessing recovery of function after spinal cord injury: Behavioral methods. *Exp Neurol* 1990; 107: 113-117
- 81- Goodkin R, Campbell JB. Sequential pathologic changes in spinal cord injury: A preliminary report. *Surg Forum* 1969; 20: 430-432
- 82- Goodman JG, Bingham WG, Hunt WE. Platelet aggregation in experimental spinal cord injury. *Arch Neurol* 1979; 30: 197-201
- 83- Grijalva I, Guizar-Sahagun G, Salgado-Ceballos Ibarra A, Franco-Bourland R, Espitia

- AL, Madrazo I. Enzymatic manipulation of the site of spinal cord injury allows better survival and adhesion of allogeneic homotopic fetal transplants in adult rats. *J Neural Transplan Plasticity* 1992; 3: 313-314
- 84- Grijalva I, Guizar-Sahagun G, Madrazo I, Franco-Bourland R, Salgado-Ceballos H, Ibarra A, Espitia AL. Neuroprotection by methylprednisolone for mechanic-enzymatic manipulation of contused spinal cord areas in rats. *Neurodegeneration* 1994; 3: 159-162.
- 85- Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I, Franco-Bourland R, Salgado H, Ibarra I, Oliva E, 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.
- 86- Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I, E. Franco-Bourland R, Salgado-Ceballos H, Ibarra A, Larriva-Sahd J. Neuroprotection of completely lacerated spinal cord of adult rats by homotopic and heterotopic transplantation. *Restor Neurol Neurosci* 1994; 7: 61-70.
- 87- Gulati AK. Immunological fate of Schwann cell-populated acellular basal lamina nerve allografts. *Transplantation* 1995; 59: 1618-1622
- 88- Guth L, Barrett C P, Donati E J. Histological factors influencing the growth of axons into lesions of the mammalian spinal cord. *Exp Brain Res Suppl* 1986; 13: 271-282
- 89- Hall ED, Braughler JM. Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and (Na⁺ K⁺)-ATPase activity. Dose-response analysis during 1st hour after contusion injury in the cat. *J Neurosurg* 1982; 57: 247-253
- 90- Hall ED, Braughler JM. Glucocorticoid mechanisms in acute spinal cord injury: a review and therapeutic rationale. *Surg Neurol* 1982; 18: 320-327
- 91- Hall ED, Wolf DL, Braughler JM. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. Dose-response and time-action analysis. *J Neurosurg* 1984; 61: 124-130
- 92- Hall ED, Wolf DL. A pharmacological analysis of the pathophysiological mechanisms of posttraumatic spinal cord ischemia. *J Neurosurg* 1986; 64: 951-961
- 93- Hall ED, Braughler JM. Central nervous-system trauma and stroke. II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radical Biol Med* 1989; 6: 303-313
- 94- Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg* 1992; 76: 13-22
- 95- Hall ED. Glucocorticoid effects on central nervous excitability and synaptic transmission. *Int Rev Neurobiol* 1992; 23: 165-195
- 96- Hall ED, Yonkers PA, Taylor BM, Sun FF. Lack of effect of postinjury treatment with methylprednisolone or trilazad mesylate on the increase in eicosanoid levels in the acutely injured cat spinal cord. *J Neurotrauma* 1995; 12: 245-256
- 97- Hansen M, Stoltenberg M, Host NB, Boesby S, Lorenzen I, Bentsen KD. Glucocorticoids inhibit the synthesis rate of type III collagen, but do not affect the hepatic clearance of its aminoterminal propeptide (PIIINP). *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 543-548

- 98- Helgren ME, Goldberger ME. The recovery of postural reflexes and locomotion following low thoracic hemisection in adult cats involves compensation by undamaged primary afferent pathways. *Exp Neurol* 1993; 123: 17-34
- 99- Hogan EL, Hsu C. Calcium-activated mediators of secondary injury in the spinal cord. *Cent Nerv Syst Trauma* 1986; 3: 175-179
- 100- Hsu CY, Halushka PV, Hogan EL, Banik NL, Lee WA, Perot PL. Alterations of thromboxane and prostacyclin levels in experimental spinal cord injury. *Neurology* 1985; 35: 1003-1009
- 101- Hsu CY, Halushka PV, Hogan EL, Cox RD. Increased thromboxane level in experimental spinal cord injury. *J Neurol Sci* 1986; 74: 289-296
- 102- Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* 1990; 27: 1-11
- 103- Iwai A, Monafó WW, Eliasson SG. Methylprednisolone treatment of experimental spinal cord injury. *Paraplegia* 1993; 31: 417-429
- 104- Iwashita Y, Kawaguchi S, Murata M. Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature* 1994; 367: 167-170
- 105- Jalc P, Marsala J, Jalcova H. Postischemic reperfusion causes a massive calcium overload in the myelinated spinal cord fibers. *Mol Chem Neuropath* 1995; 25: 143-153
- 106- Jonsson HT, Daniell HB. Altered levels of PGF in cat spinal cord tissue following traumatic injury. *Prostaglandins* 1976; 11: 51-59
- 107- Kalil K, Schneider G. Retrograde cortical and axonal changes following lesions of the pyramidal tract. *Brain Res* 1975; 89: 15-27
- 108- Kao CC, Chang LW. The mechanism of spinal cord cavitation following spinal cord transection. Part I. A correlated histochemical study. *J Neurosurg* 1977; 46: 197-209
- 109- Kerr FWL. Structural and functional evidence of plasticity in the central nervous system. *Exp Neurol* 1975; 48: 16-31
- 110- Kopyev OV, Bragin AG, Pichkour LD, Radzievski AA, Tsinbalyuk VI, Vinogradova OS. Grafting of the embryonal brain tissue helps to survival of the rats after severe craniocerebral trauma. *Restorat Neurol Neurosci* 1989; Suppl: 39
- 111- Koshinaga M, Sanon HR, Whittemore SR. Altered acidic and basic fibroblast growth factor expression following spinal cord injury. *Exp Neurol* 1983; 120: 32-48
- 112- Koyanagi I, Tator CH, Lea PJ. Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. Part 2: Acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 1993; 33: 285-291
- 113- Kuang RZ, Kalil. Specificity of corticospinal axon arbors sprouting into denervated contralateral spinal cord. *J Comp Neurol* 1990; 302: 461-472
- 114- Lasek RJ. Protein transport in neurons. *Int Rev Neurobiol* 1970; 13: 289-321
- 115- LaVail JH, LaVail MM. Retrograde axonal transport in the central nervous system. *Science* 1972; 176: 1416-1417

- 116- Lemke M, Demediuk P, McIntosh TK, Vink R, Faden A I. Alterations in tissue Mg^{++} , Na^{+} and spinal cord edema following impact trauma in rats. *Bioch Bioph Res Com* 1987; 147: 1170-1175
- 117- Leskawa KC, Maddox T, Webster KA. Effects of ethanol on neuroblastoma cells in culture: role of gangliosides in neuritogenesis and substrate adhesion. *J Neurosci Res* 1995; 42: 377-384
- 118- Ley General de salud. Título Séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. Editorial Porrúa, Sexta edición, México, D.F. 1990; pp 430-431
- 119- Linda H, Piehl F, Dagerlind A, Verge VM, Arvidsson U, Cullheim S, Risling M, Ulfhake B, Hokfelt T. Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal cord under normal conditions and after different types of lesions, with special reference to motoneurons. *Exp Brain Res* 1992; 91: 284-95
- 120- Liu CN, Chambers WW. Intrasprouting of dorsal root axons. *Arch Neurol Psychiat* 1958; 79: 46-61
- 121- Liu D, McAdoo DJ. Methylprednisolone reduces excitatory amino acid release following experimental spinal cord injury. *Brain Res* 1993; 609: 293-297
- 122- Liu D, McAdoo DJ. An experimental model combining microdialysis with electrophysiology, histology, and neurochemistry for exploring mechanisms of secondary damage in spinal cord injury: effects of potassium. *J Neurotrauma* 1993; 10: 349-362
- 123- Liuzzi FJ. Proteolysis is a critical step in the physiological stop pathway: Mechanisms involved in the blockade of axonal regeneration by mammalian astrocytes. *Brain Res* 1990; 512: 277-283
- 124- Losa GA, Graber R. Modulation of plasma membrane enzymes during apoptosis of human leukemic T-cells induced by glucocorticoids. *Fundamental Clinical Immunol* 1995; 3: 71-73
- 125- Ludwin SK. Evolving concepts and issues in remyelination. *Dev Neurosci* 1989; 11: 140-148
- 126- Luna LG (Ed). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, Third edition. McGraw-Hill, New York. 1968, pp 215-216
- 127- Magarinos AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 1995; 69: 89-98
- 128- Martin D, Schoenen J, Delree P, Leprince P, Rogister B, Moonen G. Grafts of syngenic cultured, adult dorsal root ganglion-derived Schwann cells to the injured spinal cord of adult rats: preliminary morphological studies. *Neurosci Lett* 1991; 124: 44-48
- 129- Martin D, Schoenen J, Delree P, Rigo JM, Rogister B, Leprince P, Moonen G. Syngenic grafts of adult rat DRG-derived Schwann cells to the injured spinal cord. *Brain Res Bull* 1993; 30: 507-514
- 130- Marx JL. How the glucocorticoids suppress immunity. *Science* 1995; 270: 232-233
- 131- Matthews DE, Farewell V, (Eds). Using and understanding medical statistics. Karger, Basel. 1985; pp 67-87

- 132- McCouch GP, Austin GM, Liu CN, Liu CY. Sprouting as a cause of spasticity. *J Neurophysiol* 1957; 21: 205-216
- 133- Miller RJ. Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 1987; 235: 46-52
- 134- Mitsuhashi T, Ikata T, Morimoto K, Tonai T, Katoh S. Increased production of eicosanoids, TXA₂, PGI₂ and LTC₄ in experimental spinal cord injuries. *Paraplegia* 1994; 32: 524-30
- 135- Morrissey TK, Kleitman N, Bunge RP. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *J Neurosci* 1991; 11: 2433-2442
- 136- Moser M, Desmedt T, Sornasse T, Tielemans F, Chentoufi AA, Muraille E, Vanmechelen C, Urbain J, Leo O. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2818-2824
- 137- Muir D, Gennrich C, Varon S, Manthorpe M. Rat sciatic nerve Schwann cell cultures: responses to mitogens and production of trophic and neurite-promoting factors. *Neurochem Res* 1989; 14: 1003-1009
- 138- Murray M, Goldberger M. Restitution of function and collateral sprouting in cat spinal cord: The partially hemisected animal. *J Comp Neurol* 1974; 158: 19-36
- 139- Nakata N, Kato H, Kogure K. Protective effects of basic fibroblast growth factor against hippocampal neuronal damage following cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res* 1993; 605: 354-356
- 140- Naso WB, Perot PL, Cox RD. The neuroprotective effect of high-dose methylprednisolone in rat spinal cord hemisection. *Neurosci Lett* 1995; 189: 176-178
- 141- Noble M, Juin FS, Cohen J. Glia are a unique substrate for the *in vitro* growth of central nervous system neurons. *J Neurosci* 1984; 4: 1892-1903
- 142- Paino CL, Bunge MB. Induction of axon growth into schwann cell implants grafted into lesioned adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 1991; 114: 254-257
- 143- Panters SS, Yum SW, Faden AI. Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. *Ann Neurol* 1990; 27: 96-99
- 144- Pearlman SH, Levivier M, Collier TJ, Sladek JR Jr, Gash DM. Striatal implants protect the host striatum against quinolinic acid toxicity. *Exp Brain Res* 1991; 84: 303-310
- 145- Pietronigro DD, Hovsepian M, Demopoulos HB, Flamm ES. Loss of ascorbic acid from injured feline spinal cord. *J Neurochem* 1983; 41: 1072-1076
- 146- Polistina DC, Murray M, Goldberger ME. Plasticity of dorsal root and descending serotonergic projections after partial deafferentation of the adult rat spinal cord. *J Comp Neurol* 1990; 299: 349-363
- 147- Popovich PG, Reinhard JF Jr, Flanagan EM, Stokes BT. Elevation of the neurotoxin quinolinic acid occurs following spinal cord trauma. *Brain Res* 1994; 633: 348-52
- 148- Rabin SJ, Mocchetti I. GM1 ganglioside activates the high-affinity nerve growth factor receptor trkA. *J Neurochem* 1995; 65: 347-354
- 149- Rakic P. Limits of neurogenesis in primates. *Science* 1985; 227: 1054-1056

- 150- Ramón y Cajal S. Degeneration and regeneration of the nervous system. Vol. 1 & 2. University Press, Oxford, London. 1928
- 151- Reier PJ. Gliosis following CNS injury: The anatomy of astrocytic scars and their influences on axonal elongation. In: Federoff S, Vernadakis A (Eds). Astrocytes. Vol. 3, Academic Press, Orlando. 1986 pp 263-324
- 152- Reynolds ME, Brunello N, Mocchetti I, Wrathall JR. Localization of nerve growth factor receptor mRNA in contused rat spinal cord by in situ hybridization. *Brain Res* 1991; 559: 149-153
- 153- Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ. Axons from CNS neurons regenerate into PSN grafts. *Nature* 1980; 284: 264-265
- 154- Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ. Peripheral nerve autografts to the rat spinal cord: studies with axonal tracing methods. *Brain Res* 1982; 237: 147-162
- 155- Richardson PM, Issa VMK, Aguayo AJ. Regeneration of long spinal axons in the rat. *J Neurocytol* 1984; 13: 165-182
- 156- Risling M, Fried K, Linda H, Cullheim S, Meier M. Changes in nerve growth factor receptor-like immunoreactivity in the spinal cord after ventral funiculus lesion in adult cats. *J Neurocytol* 1992; 21: 79-93
- 157- Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg* 1977; 47: 577-581
- 158- Sabel BA, Stein DG. Pharmacological treatment of central nervous system injury. *Nature* 1986; 323: 493
- 159- Sanders RD, Dugan LL, Demediuk P, Anderson DK. Effect of methylprednisolone and the combination of alpha tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue. *J Neurochem* 1987; 49: 24-31
- 160- Savio T, Schwab ME. Lesioned corticospinal tract axons regenerate in myelin-free rat spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4130-4133
- 161- Schlaepfer WW, Zimmerman UP. Calcium-mediated breakdown of glial filaments and neurofilaments in rat optic nerve and spinal cord. *Neurochem Res* 1981; 6: 243-255
- 162- Schlaepfer WW. Neurofilaments: Structure, metabolism and implications in disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1987; 46: 117-129
- 163- Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde YA, Schwab ME. Neurotrophin-3 enhances of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 1994; 367: 170-173
- 164- Schwab ME. Myelin-associated inhibitors of neurite growth. *Exp Neurol* 1990; 109: 2-5
- 165- Schwab ME. Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS. *TINS* 1990; 13: 452-456
- 166- Sharma S, Olsson Y, Nyberg F, Dey PK. Prostaglandins modulate alterations of microvascular permeability, blood flow, edema and serotonin levels following spinal cord injury: an experimental study in the rat. *Neuroscience* 1993; 57: 443-449
- 167- Simpson RK Jr, Robertson CS, Goodman JC. Spinal cord ischemia-induced elevation of amino acids: extracellular measurement with

- microdialysis. *Neurochem Res* 1990; 15: 635-639
- 168- Skene JHP. Axonal growth associated proteins. *Annu Rev Neurosci* 1989; 12: 127-156
- 169- Smith GM, Rudge J, Silver J, Miller RH. Astrocyte supported neurite outgrowth and neuronal adhesion is reduced as the astrocyte matures. *Soc Neurosci Abstr* 1988; 14: 867
- 170- Steward O. Reorganization of neural circuitry following central nervous system trauma: naturally occurring processes and opportunities for therapeutic intervention. In SK Salzman and AI Faden (Eds). *The neurobiology of central nervous system trauma*, Oxford University Press, Oxford, 1994, pp 266-287
- 171- Stover SL, Fine PR. The epidemiology and economics of spinal cord injury. *Paraplegia* 1987; 25: 225-228
- 172- Strittmatter SM, Valenzuela D, Kennedy TE, Neer EJ, Fishman MC. GO is a major growth protein subjected to regulation by GAP-43. *Nature* 1990; 344: 836-841
- 173- Strittmatter SM, Vartarian T, Fishman MC. GAP-43 as a plasticity protein in neural form and repair. *J Neurobiol* 1992; 23: 507-520
- 174- Tarlov IM, Klinger H, Viales S. Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. *Arch Neurol Psych* 1953; 70: 813-819
- 175- Tator CH, Rivlin AS, Lewis AJ, Schmoll B. Effect of spinal cord injury on axonal counts in the pyramidal tract of rats. *J Neurosurg* 1984; 61: 118-123
- 176- Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 1991; 75: 15-26
- 177- Theriault E, Tetzlaff W, Tator CH. Elevated gene expression in the red nucleus after spinal cord compression injury. *Neuroreport* 1992; 3: 559-62
- 178- Tulipan N, Huang S, Whetsell WO, Allen GS. Neonatal striatal grafts prevent lethal syndrome produced by bilateral intrastriatal injection of kainic acid. *Brain Res* 1986; 377: 163-167
- 179- Tulipan N, Whetsell WO, Luo S, Huang S, Allen GS. Long-term prevention of toxin-induced damage by neural grafts. Gash DM, Sladek JR Jr (Eds). *Transplantation into the mammalian CNS. Serie Progress in Brain Research*. Elsevier, Amsterdam. 1988; pp 613-618
- 180- Uhler TA, Frim DM, Pakzaban P, Isacson O. The effects of megadose methylprednisolone and U-78517F on toxicity mediated by glutamate receptors in the rat neostriatum. *Neurosurgery* 1994; 34: 122-127
- 181- Vaudano E, Campbell G, Anderson PN, Davies AP, Woolhead C, Schreyer DJ, Lieberman AR. The effects of a lesion or a peripheral nerve graft on GAP-43 upregulation in the adult rat brain: an *in situ* hybridization and immunocytochemical study. *J Neurosci* 1995; 15: 3594-3611
- 182- Windle WF. Regeneration of axons in the vertebrate central nervous system. *Physiol Rev* 1956; 36: 427-440
- 183- Windle WF, Littrell JL, Smart JO, Joralemon J. Regeneration in the cord of spinal monkeys. *Neurology* 1956; 6: 420-428

184- Wong EK, Kemp JA. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Nat Acad Sci* 1986; 83: 7104-7108

185- Wrathall JR, Rigamonti DD, Braford MR, Kao CC. Reconstruction of the contused cat spinal cord by the delayed nerve graft technique and cultured peripheral non-neural cells. *Acta Neuropathol* 1982; 57: 59-69

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

187- Xu J, Qu ZX, Hogan EL, Perot PL. Protective effect of methylprednisolone on vascular injury in rat spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1992; 9: 245-253

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

189- Young G, Flamm E. Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury. *J Neurosurg* 1982; 57: 667-673.

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

191- Young W. Methylprednisolone treatment of acute spinal cord injury: an introduction. *J Neurotrauma* 1991; 8 Suppl 1: S43-S46

192- Young W. Medical treatments of acute spinal cord injury. *J Neurol Neurosurg Psych* 1992; 55: 635-639

193- Young W. Strategies for the development of new and better pharmacological treatments for acute spinal cord injury. *Adv Neurol* 1993; 59: 249-256

194- Young W. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord injury. *J Emerg Med* 1993; 11 Suppl 1: 13-22